

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA AGRARIA DE COLOMBIA  
Facultad de Ingeniería de Alimentos  
Maestría en Ingeniería



Fermentación en medio líquido del cacao con inoculación inicial de *Brettanomyces bruxellensis*.

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Magister en Ingeniería

**Presenta:**  
Oscar Díaz Acosta

Dirigido por:  
Ph.D. Javier Darío Hoyos Leyva

Codirector  
Mg. Mauricio Aníbal Sierra Sarmiento

Nombre del evaluador  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Nombre del evaluador  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Nombre del evaluador  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Dr. Javier Darío Hoyos Leyva  
Director de la Maestría

\_\_\_\_\_  
Decano de la Facultad de Ingeniería

Bogotá D.C.

Fecha (será el mes y año de aprobación del Consejo Técnico, Académico y Curricular)

## RESUMEN

La fase de fermentación en el procesamiento agroindustrial del cacao es crucial para la generación de precursores de sabor y aroma mediante procesos bioquímicos y reacciones enzimáticas. Estos elementos son fundamentales para el desarrollo de las propiedades sensoriales en los granos de cacao. La fermentación espontánea de las semillas y la pulpa del fruto tradicionalmente involucra microorganismos de diversas especies que varían según las condiciones ambientales y climáticas en las que se cultiva el cacao. Dado que no se añade ningún otro ingrediente, esta fermentación se lleva a cabo en un medio sólido, lo que resulta en una fermentación heterogénea. Las dificultades tecnológicas durante este proceso pueden afectar la calidad debido a las condiciones variables en las que se desarrolla.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la fermentación de cacao en medio líquido con inoculación inicial de *Brettanomyces bruxellensis*. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos, T1 (medio líquido con inoculación inicial), T2 (medio líquido sin inoculación), T3 (medio sólido con inoculación) y T4 (medio sólido sin inoculación)

En el medio líquido con inoculación inicial, se logró el mayor porcentaje de granos fermentados, alcanzando un 90,38%, mientras que, en el medio líquido sin inoculación, se obtuvo un porcentaje ligeramente menor, un 87,50%. En el medio sólido con inoculación inicial, se registró un 71,15% de granos fermentados, y en el medio sólido sin inoculación, se alcanzó un 63,46% de granos fermentados. Respecto al pH, el tratamiento 1 (T1) mantuvo niveles adecuados con un pH promedio de 4,97, similar al pH de los granos de cacao comerciales (4,9). Por otro lado, el tratamiento 2 (T2) presentó un pH promedio de 5,2, acercándose al umbral de fermentación.

En el análisis colorimétrico, los granos completamente fermentados exhibieron un color marrón o chocolate en comparación con los tratamientos T1 y T2, mientras que los granos insuficientemente fermentados conservaron un tono violeta o marrón-violeta, en los casos T3 y T4. Respecto a los polifenoles totales, se observó que el T1 tenía una menor cantidad de polifenoles en comparación con los demás tratamientos. Los medios líquidos presentaron menos polifenoles que los medios sólidos, y el medio sólido con inoculación inicial tuvo menos polifenoles que el medio sólido sin inoculación. En términos de sabor, el tratamiento T4 mostró una mayor astringencia y amargor, posiblemente debido a una fermentación insuficiente. El T1 tuvo sabores más suaves debido a una reducción en los polifenoles totales, que son responsables de la astringencia y el amargor en los granos de cacao.

**Palabras claves:** Fermentación en medio líquido, microorganismos, agroindustria, cacao, *Brettanomyces bruxellensis*

## ABSTRACT

The fermentation phase in the agroindustrial processing of cocoa is crucial for generating flavor and aroma precursors through biochemical processes and enzymatic reactions. These elements are fundamental for the development of sensory properties in cocoa beans. The spontaneous fermentation of the seeds and fruit pulp traditionally involves microorganisms of various species that vary depending on the environmental and climatic conditions in which cocoa is grown. Since no other ingredients are added, this fermentation takes place in a solid medium, resulting in heterogeneous fermentation. Technological difficulties during this process can affect quality due to the variable conditions under which it occurs.

The aim of this work was to evaluate the effect of cocoa fermentation in a liquid medium with an initial inoculation of *Brettanomyces bruxellensis*. Four treatments were carried out, T1 (liquid medium with initial inoculation), T2 (liquid medium without inoculation), T3 (solid medium with inoculation), and T4 (solid medium without inoculation).

In the liquid medium with initial inoculation, the highest percentage of fermented beans was achieved, reaching 90.38%, while in the liquid medium without inoculation, a slightly lower percentage of 87.50% was obtained. In the solid medium with initial inoculation, 71.15% of fermented beans were recorded, and in the solid medium without inoculation, 63.46% of fermented beans were reached. Regarding pH, treatment 1 (T1) maintained suitable levels with an average pH of 4.97, similar to the pH of commercial cocoa beans (4.9). On the other hand, treatment 2 (T2) presented an average pH of 5.2, approaching the fermentation threshold.

In the colorimetric analysis, fully fermented beans exhibited a brown or chocolate color compared to treatments T1 and T2, while insufficiently fermented beans retained a violet or brown-violet hue in the cases of T3 and T4. Concerning total polyphenols, it was observed that T1 had a lower amount of polyphenols compared to the other treatments. Liquid media contained fewer polyphenols than solid media, and the solid medium with initial inoculation had fewer polyphenols than the solid medium without inoculation. In terms of flavor, treatment T4 showed higher astringency and bitterness, possibly due to insufficient fermentation. T1 had smoother flavors due to a reduction in total polyphenols, which are responsible for astringency and bitterness in cocoa beans.

**Keywords:** Liquid medium fermentation, microorganisms, agroindustry, cocoa, *Brettanomyces bruxellensis*.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Marco Teórico</b> .....	<b>9</b>
2.1. Generalidades del cacao.....	9
2.2. Agroindustria del cacao en Colombia.....	10
2.3. Fermentación del cacao .....	11
2.3.1. Fase anaerobia.....	12
2.3.2. Fase aerobia.....	13
2.4. Problemas que se presentan en la fermentación actual del cacao .....	14
2.5. Tipos de fermentación.....	14
2.6. Los microorganismos en la fermentación del cacao .....	15
<b>3. Justificación</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>18</b>
4.1. Objetivo General .....	18
4.2. Objetivos específicos .....	18
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>19</b>
5.1. Muestras de cacao .....	19
5.2. Tratamientos de fermentación de cacao .....	19
5.3. Índice de Fermentación (IF) .....	21
5.4. Medición de pH y acidez titulable .....	21
5.5. Polifenoles Totales (PFT).....	21
5.6. Cuantificación de granos fermentados .....	22
5.7. Evaluación sensorial .....	23
5.8. Determinación y cuantificación de compuestos fenólicos .....	23
5.9. Análisis estadístico.....	24
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>6.1. Índice de Fermentación (IF)</b> .....	<b>25</b>
<b>6.2. Medición pH de las muestras de cacao</b> .....	<b>25</b>
<b>6.3. Medición de la Acidez titulable</b> .....	<b>26</b>
<b>6.4. Medición Polifenoles Totales</b> .....	<b>27</b>

<b>6.5. Prueba de corte en granos fermentados.....</b>	<b>28</b>
<b>6.6. Evaluación sensorial.....</b>	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>32</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>34</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Dinámica de las comunidades de microorganismos (a) y cinética de los metabolitos (b) durante la fermentación en masa de pulpa y grano de cacao. Tomado de: Vuyst y Weckx, 2016.....	14
<b>Figura 2:</b> Promedio de los índices de fermentación (IF) de los granos fermentados en los tratamientos, T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido) y T4 (Medio sólido sin inoculación inicial). .....	25
<b>Figura 3:</b> Promedio de los valores de pH de los granos fermentados en los tratamientos, T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), CC (Granos adquiridos comercialmente) y SF (Granos sin fermentar).....	26
<b>Figura 4:</b> Promedio de los valores del Acidez titulable de los granos fermentados en los tratamientos, T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), CC (Granos adquiridos comercialmente) y SF (Granos sin fermentar).....	27
<b>Figura 5:</b> Promedio de polifenoles totales de los granos fermentados en los tratamientos, T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), CC (Granos adquiridos comercialmente) y SF (Granos sin fermentar).....	28
<b>Figura 6:</b> Porcentaje de granos fermentados en cada tratamiento de acuerdo con la prueba de corte (NTC 1252, 2021), en donde T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial).....	29
<b>Figura 7:</b> Evaluación sensorial de granos en los tratamientos en donde T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), y evaluación sensorial del cacao comercial (CC). Representando intensidades de: ninguno, muy débil, débil, medio, fuerte y muy fuerte, respectivamente. ....	31

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos para fermentación del cacao realizado en el laboratorio UNIAGRARIA.....	19
<b>Tabla 3.</b> Determinación colorimétrica de los granos fermentados en los tratamientos, en donde T1 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 ( <i>B. bruxellensis</i> en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), y SF (Granos sin fermentar).....	29
<b>Tabla 3.</b> Compuestos fenólicos identificados y contenido en la muestra de cacao obtenida en el tratamiento de fermentación en medio líquido con inoculación de <i>B. bruxellensis</i> . ....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

El procesamiento agroindustrial del cacao relaciona actividades como la fermentación, secado, molienda, entre otras; sin embargo, la etapa de la fermentación es una de las etapas de mayor importancia debido a que el grano del cacao adquiere sus características sensoriales finales. Esta fermentación tradicionalmente ocurre de manera espontánea de las semillas en conjunto con la pulpa de la fruta (conocido como mucilago), en donde participan microorganismos nativos de diferentes especies, los cuales están presentes de acuerdo a las condiciones agroclimáticas donde se cultiva el cacao (Pliego-Arreaga et al. 2013). Los tipos de microorganismos que intervienen en la fermentación del cacao son levaduras y bacterias, que involucran dos fenómenos distintos, pero no independientes, una fermentación microbiana que contribuye a la eliminación de la pulpa mucilaginoso que rodea los granos de cacao y otra que induce a un conjunto de reacciones bioquímicas en los cotiledones al interior de la semilla, estas conllevan a la modificación de la composición química de los granos y también a la formación de los precursores del aroma y sabor de lo que sería el chocolate (Graziani de Fariñas, Portillo, and Cros 2006). Zamudio-Palacios et al. (2021) reportaron que la fermentación en el cacao reduce la astringencia y amargor, permitiendo la generación de compuestos precursores de sabor y aroma, como compuestos volátiles, péptidos y aminoácidos, estos compuestos son producidos durante la degradación enzimática de azúcares y proteínas, primero en la pulpa y posteriormente en la semilla por efecto de levaduras, bacterias ácido-lácticas (BAL) y bacterias ácido-acéticas (BAA). Las levaduras y las BAL son los microorganismos predominantes en la etapa inicial de la fermentación.

La fermentación espontánea usada tradicionalmente tienen varios inconvenientes, ya que son procesos con resultados heterogéneos; cambios en el número y tipo de microorganismos presentes pueden afectar la eficiencia de la fermentación o la calidad del producto, debido a que estos procesos espontáneos son generalmente ineficientes y a menudo conducen a la formación de sabores desagradables (Steensels y Verstrepen, 2014). Es conocido también que la fermentación tradicional de los granos de cacao es realizada en medio sólido, donde

solo se agrupan los granos de cacao en cajas de madera, montones sobre el suelo o en sacos, causando problemas de presencia de microorganismos indeseados producen compuestos que alteran el sabor y aroma del cacao final. Castillo (2019) indica que de la fermentación espontánea resultan productos heterogéneos con un bajo porcentaje de granos fermentados y con un elevado porcentaje de granos en mal estado, existiendo también problema para realizar la remoción o mezcla de los granos y la fácil contaminación con el crecimiento de microorganismos indeseados en el proceso fermentativo. Hasta el conocimiento del autor, dentro de la literatura y a nivel del sector de productores cacaoteros, no se encuentran reportes de una fermentación en medio líquido para los granos de cacao. La fermentación en medio líquido para granos la realizan productores de café, los cuales han identificado nichos de mercado especializado por la diversidad de sabores y aromas que se logran al promover la fermentación de los granos de café sumergidos en agua. El proceso de fermentación del café ha sido reportado por mejorar el sabor y el aroma del café al producir compuestos como alcoholes superiores, ésteres, aldehídos y ácidos orgánicos (Elhalis et al., 2021).

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. Generalidades del cacao**

El nombre científico del cacao es *Theobroma cacao*, del griego para el árbol del cacao o cacaotero. El fruto de cacao es una baya ovoide de aproximadamente 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, con surcos a lo largo, y un peso entre 200 y 1000 g. Es de color amarillo, rojo, naranja, verde o café, dependiendo del genotipo. En su interior, contiene de 20 a 40 semillas aproximadamente (Cardona 2016). Las semillas del cacao, llamadas también granos, almendras o habas de cacao, miden 2 - 3 cm de largo, no tiene albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginoso de color blanco y de sabor dulce y acidulado (Arango Angarita 2017). Los granos de cacao son una materia prima fundamental para muchos productos alimenticios como pasta de cacao, manteca, polvo, licor y chocolate (Moreira et al. 2021). Los granos crudo tienen notas sensoriales específicas del genotipo, principalmente

amargas y astringentes, sus principales atributos dependen de la fermentación, que es crucial para el desarrollo de las características sensoriales de los granos de cacao mediante la formación de precursores de sabor y aroma generados por procesos bioquímicos y reacciones enzimáticas (Alvarez-villagomez, Ledesma-escobar, y Priego-capote 2022). Las semillas de cacao se componen de un embrión con dos cotiledones que están compuestos por dos tipos de células de almacenamiento de parénquima, las células polifenólicas o células pigmentadas (púrpura) que contienen una sola vacuola llena de polifenoles (antocianinas) y alcaloides que incluyen cafeína, teobromina y metilxantinas, estos cotiledones están protegidos por una cáscara de semilla flexible (testa mucilaginosa) y se componen de almidón, proteínas y aproximadamente un 50% de materia grasa polimorfa, conocida también como manteca de cacao, que es el ingrediente de mayor influencia en el costo del chocolate, además es la responsable de sus características tan apreciadas como la dureza, la rápida y completa fusión en la boca, el brillo y la vida útil del chocolate (Codini et al. 2004; Penagos Muñetón 2019).

## 2.2. Agroindustria del cacao en Colombia

Las familias que cultivan cacao en Colombia para el año 2019 fueron aproximadamente 65.341, en una cobertura de 422 municipios en 27 departamentos, la producción para el mismo año fueron 59.740 toneladas en un área de 183.497 ha., generando 165.000 empleos directos e indirectos (MADR 2020). Para el año 2020 la producción de cacao fue aproximadamente 63 mil toneladas y se concentró en el departamento de Santander con 27 mil toneladas (42%), seguido de Antioquia con 5,6 mil toneladas (8,8%) y Arauca con 4,8 mil toneladas (7,6%).

Para el año 2020, la producción se incrementó en 3.676 toneladas para un aumento del 6 %, posicionándose como la mayor histórica del país. El aumento en la producción del año 2020 fue producto de dos aspectos: el primero se refiere a las condiciones climáticas favorables presentadas durante todo el año, que contribuyeron positivamente a la florecencia de los árboles, y el segundo, los precios del cacao en los últimos dos años han estado por encima del \$7.500/kilo, que

ayudan a que los productores tengan disponibilidad económica para la fertilización de sus cultivos (MADR, 2020).

Uno de los factores principales que afecta la comercialización internacional del cacao se precisan en la calidad del producto, estableciendo un componente importante en cualquier estrategia para crear competitividad en una economía nacional y mundial, la calidad del cacao, resulta de un largo proceso que se inicia en la finca con la selección del material genético, el manejo del cultivo, además de los efectos de los factores climáticos sobre el desarrollo del fruto, continuando con un beneficio que comprende la cosecha, apertura de mazorcas y extracción de semillas, fermentación, secado, clasificación, empaque y almacenamiento del producto (Cardona 2016), es por eso que la calidad final de un grano fino de cacao depende de los siguientes factores: 50% genética del cacao, 20% postcosecha o proceso de beneficio, es decir, fermentación y secado apropiados; 25% transformación (tostado y conchado) y 5% suelo y clima (Gutierrez 2007). Y según el comité del 2019 de la Organización Internacional del Cacao (ICCO) el 95% del cacao colombiano es catalogado de fino sabor y aroma (MADR 2020), sin embargo, más del 75% de sus exportaciones son comercializadas como cacao convencional.

### 2.3. Fermentación del cacao

Debido a la presencia de grandes cantidades de compuestos fenólicos, las semillas de cacao fresco se caracterizan por una astringencia desagradable; además, no desarrollan ningún sabor de chocolate durante el tostado porque faltan los precursores necesarios, estos precursores solo se forman durante la fermentación (Kadow et al. 2015). Es así que la fermentación de los granos de cacao es la combinación de reacciones microbianas y enzimáticas que ocurren en la pulpa (Cardona 2016), tradicionalmente se extraen los granos en conjunto con el mucilago o pulpa y estas son situadas sobre el suelo en montones o en cajas de madera, en donde ocurre la fermentación, la pulpa que es rica en azúcares fermentables la cual tiene un pH bajo de 3.0 a 3.5, debido a la presencia de ácido cítrico (Ardhana and Fleet 2003). Durante la fermentación las levaduras producen enzimas pectinolíticas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa por la actividad de la invertasa,

favoreciendo la difusión de ácidos orgánicos y etanol, aumentando la temperatura de la semilla de cacao, las levaduras también producen ésteres y alcoholes superiores, lo que puede contribuir a la compleja mezcla de compuestos volátiles que caracteriza el aroma del chocolate, la fermentación del cacao se produce en dos fases; la primera se denomina anaerobia, y la segunda, denominada aerobia. En ellas intervienen diferentes grupos de levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), principalmente (Cardona 2016).

### 2.3.1. Fase anaerobia

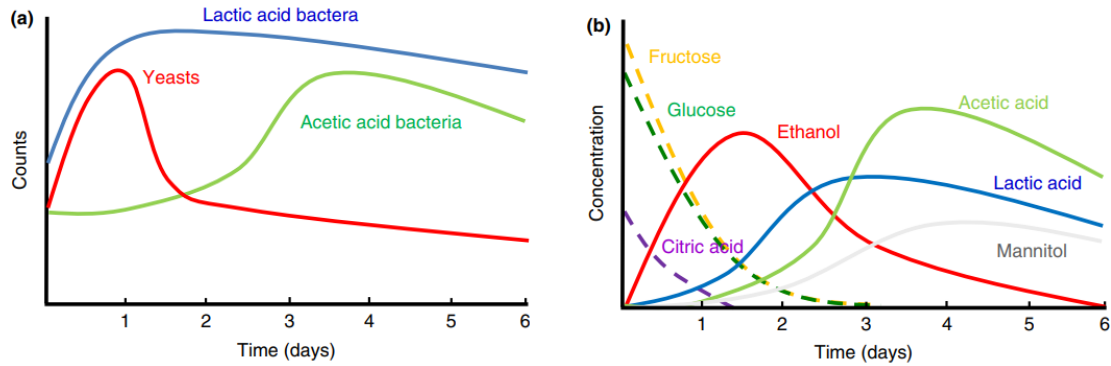
Al inicio del proceso de fermentación del grano de cacao, entre las primeras 24 h. y 48 h., las levaduras, siendo los microorganismos dominantes, realizan través de su actividad de depectinización, las levaduras son responsables de licuar la pulpa de cacao, lo que provoca el drenaje de la pulpa y reduce la viscosidad de la pulpa que a su vez permite la entrada de aire en la masa de pulpa de cacao y grano de cacao (Vuyst and Weckx 2016). En esta primera fase se lleva a cabo la transformación de los azúcares del mucílago, en alcohol etílico y posteriormente, en ácido láctico, por la intervención, en primera instancia de levaduras y luego de las bacterias lácticas. En ausencia de oxígeno proliferan diferentes especies de levaduras, lo que genera un aumento de temperatura en la masa de fermentación entre 30°C y 35°C, y una acidificación del medio, lo que genera un inicio en el rompimiento de las células de la pulpa durante las primeras 24 h (Lagunes y Loiseau, 2007). En esta fase, las especies más frecuentes son las del tipo *Saccharomyces* (en particular, *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *anomola Hansenula* y *Schizosaccharomyces pombe*), según expresan Schwan y Fleet (2015). Las levaduras utilizan los azúcares fermentables presentes en la pulpa para producir etanol y dióxido de carbono, y algunas también secretan enzimas pectinolíticas, las cuales ayudan a solubilizar la pulpa (Ho, Zhao y Fleet, 2014). Luego de veinticuatro horas, la población de levaduras comienza a decrecer lentamente, favoreciendo el crecimiento de las BAL, las cuales alcanzan su pico después de treinta y seis horas de inicio de la fermentación (Saltini, Akkerman y Frosch, 2013). Su principal actividad es degradar la glucosa de la pulpa

en ácido láctico (Medina y Vargas, 2009). Las especies más abundantes son: *Lactobacillus fermentum*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, y *Lactococcus (Streptococcus) lactis* (Schwan y Fleet, 2015). Durante la fase anaeróbica, la sacarosa es parcialmente hidrolizada a azúcares reductores; por su parte, las proteínas son sometidas a proteólisis en péptidos y aminoácidos, y los polifenoles son hidrolizados y oxidados

### 2.3.2. Fase aerobia.

Esta fase inicia con la aireación de los granos; comúnmente, después de cuarenta y ocho horas, con la incorporación de oxígeno en la masa, la población de BAL decrece y se crean las condiciones favorables para el desarrollo de las BAA, principalmente, *Acetobacter pasteurianus*. Estas bacterias son las responsables de la oxidación del etanol a ácido acético y luego a dióxido de carbono y agua. Estas reacciones son exotérmicas, lo que hace que la temperatura de la masa se incremente hasta los 50°C. Todo esto, ocasiona la difusión de alcohol y ácido acético al interior del grano y la inhibición de la germinación; es así como se desencadenan una serie de reacciones bioquímicas que llevan a la formación de los precursores del sabor (Lagunes, Loiseau, Luis, Barel y Guiraud, 2007; Saltini et al., 2013; Schwan y Fleet, 2015; Schwan y Wheals, 2004).

En la fase aeróbica, se caracteriza por reacciones oxidativas y de condensación como la reacción de oxidación de los complejos polifenol-proteína y la condensación del carbonil-amino— las cuales reducen la astringencia e influyen el sabor final del cacao (Afoakwa et al., 2008; López y Dimick, 1995).



**Figura1:** Dinámica de las comunidades de microorganismos (a) y cinética de los metabolitos (b) durante la fermentación en masa de pulpa y grano de cacao. Tomado de: Vuyst y Weckx, 2016.

#### 2.4. Problemas que se presentan en la fermentación actual del cacao

La fermentación del cacao tradicional se produce de manera espontánea, lo que lleva a productos finales de calidad variable, esto ocurre por la que no se realiza control en el proceso y por lo tanto la contaminación ambiental ya sea por el polvo, insectos que rodean, como los utensilios y equipos utilizados afectan la fermentación, por lo tanto, los fabricantes de chocolate necesitan utilizar mezclas de granos de cacao seco fermentados en sus recetas de chocolate para complementar o contrastar la calidad inconsistente de la composición y el sabor de los granos de cacao secos fermentados espontáneamente de diferentes prácticas y orígenes para permitir la entrega de productos con un perfil de sabor estandarizado al consumidor (Vuyst y Weckx 2016)

#### 2.5. Tipos de fermentación

Dentro de los procesos de fermentación existe la fermentación en medio sólido y en medio líquido o sumergido, respecto al sólido se puede decir que son fermentaciones que no se adicionan componentes distintos a la naturaleza del producto, como el caso del cacao, mientras que la fermentación en medio líquido, se realiza con adición de líquidos, peculiarmente agua, con el principal objetivo de afianzar la fermentación y de manera homogénea, este proceso es aplicado en el caso de la fermentación café, para obtener algún tipo de producto especial. Al

revisar en la literatura y experiencias de productores cacaoteros, no se aplica la fermentación en medio líquido para el caso del cacao, no obstante es posible relacionar muchas semejanzas en los atributos que se logran obtener en la fermentación tanto del café con en cacao; dado que la fermentación de estos productos involucra dos fenómenos distintos, pero no independientes, una fermentación microbiana que contribuye a la eliminación de la pulpa mucilaginosa que rodea los granos de cacao o café y otra que induce a un conjunto de reacciones bioquímicas en interior de las semillas, que conllevan a la modificación de la composición química de los granos y también a la formación de los precursores del sabor y el aroma.

## 2.6. Los microorganismos en la fermentación del cacao

La fermentación tiene lugar espontáneamente por la microbiota endógena, sin embargo, el proceso puede conducir a una mala calidad y heterogeneidad del producto final (Alvarez-villagomez, Ledesma-escobar, y Priego-capote 2022), participando varios microorganismos nativos o comúnmente denominados microorganismo salvajes, los cuales son inoculados de manera involuntaria a partir de los utensilios utilizados en operaciones previas de postcosecha, superficies de las frutas, manos de personas que manipulan y recipientes de fermentación, a pesar que el proceso de fermentación ha sido estudiado ampliamente, evidenciándose microorganismos involucrados en el proceso, aún no ha sido posible industrializarlo a gran escala con cultivos iniciadores adecuados para obtener una calidad homogénea en los granos de cacao fermentados (Pliego-Arreaga et al. 2013). Mientras que Steensels y Verstrepen (2014) mencionan que las fermentaciones espontáneas se han utilizado durante miles de años para producir productos fermentados, estos tienen varios inconvenientes, ya que tienden a ser variables e impredecibles, porque incluso cambios leves en el número y tipo de microorganismos presentes pueden tener efectos de gran alcance sobre la eficiencia de la fermentación o la calidad del producto. Debido a que estos procesos espontáneos son generalmente ineficientes y a menudo conducen a la formación de sabores desagradables, por lo tanto, se realiza un control en la fermentación con

el uso de inoculaciones iniciales con cepas domesticadas específicas, como en caso de las *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* o *Saccharomyces pastorianus*. Aunque en estudios como el caso en donde Crafacck et al., (2013) utilizan dos cultivos iniciadores mixtos, con levaduras salvajes: *Pichia kluyveri* y *Kluyveromyces marxianus* las cuales son inoculados en los granos de cacao, como resultado se logró identificar que a pesar de que estos dos microorganismos no fueron dominantes, pareció tener una influencia positiva en el perfil de sabor en comparación con un control fermentado espontáneamente. En otro estudio Batista et al., (2016) menciona que emplearon un consorcio iniciador de microorganismos conformado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*, para fermentar cacao, obteniendo como resultado la generación de 67 compuestos volátiles en el grano fermentado, que fueron detectados sensorialmente en el chocolate, mostrando notas intensas afrutadas, sin embargo, esto no significa que no sea posible incluir estudios con el uso de otros microorganismos de gran importancia, que necesariamente no sea cepas domesticadas, sino también microorganismos que constituyen comportamientos positivos fermentativos y que soporten ambientes críticos; Existen microorganismo como las *Brettanomyces bruxellensis*, que hacen parte de la microbiota del cacao (Trindade et al. 1999). Aunque son pocos los estudios que se han realizada acerca de este microorganismo en la fermentación del cacao, que por el contrario se conocen que las *Bretanomyces* afectan la industria del vino, que según Mehlomakulu et al. (2015) *Brettanomyces bruxellensis* se considera una de las principales levaduras que estropean el vino tinto, y la presencia de este microorganismo y desarrollo en el vino se controla principalmente mediante el uso de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Aunque también han ganado una gran importancia en el uso de la industria por sus cualidades fermentativas, que pueden agregar aromas beneficiosos (o al menos interesantes) que aumentan la complejidad del sabor de bebidas fermentadas, como cervezas especiales, que pueden ser aplicadas en la industria de los alimentos. Además, su fascinante fisiología con su excepcional tolerancia al estrés y su peculiar metabolismo de carbono y nitrógeno (Steensels et al. 2015). Portugal & Ruiz-Larrea (2012) mencionan que se trata de una levadura con resistencia excepcional a condiciones mínimas de nutrientes, factor de

supervivencia determinante, capaz de fermentar concentraciones mínimas de azúcares y etanol, produciendo una gran gama de metabolitos como fenoles volátiles y ácidos grasos de cadena media, además, puede también utilizar etanol como única fuente de carbono. Por otro lado Steensels y Verstrepen (2014), afirman que hay una creciente demanda de productos estilo boutique y productos orientados a los deseos específicos de los consumidores, los productores a gran escala también están mostrando ahora un mayor interés en el uso de microorganismos no convencionales en procesos de fermentación controlada para aumentar la diversidad de sabores, controlar el deterioro microbiano, entre otras características claves.

### **3. Justificación**

La fermentación tradicional del cacao al ser espontánea y en medio sólido se obtiene como resultado granos de cacao fermentado de manera heterogénea, es así como se realizará una evaluación al efecto de la fermentación en medio líquido para cacao con inoculación inicial de *Brettanomyces bruxellensis*. Es preciso aclarar que dentro de las bibliografía no se logró identificar posibles fermentaciones húmedas en cacao ni la inoculación de este microorganismo de interés, sin embargo se puede conocer en productos similares, como la fermentación en el caso del café, en donde Elhalis, Cox, Frank y Zhao (2020) mencionan que los hallazgos demostraron que la fermentación en medio líquido jugó un papel importante en el favor, el aroma y la calidad sensorial del café. Es por lo que este estudio nos permite aplicar esta metodología en el caso del cacao. Así mismo este método de fermentación permite una remoción de la totalidad de los granos del cacao logrando una fermentación homogénea. Ribeiro et al. (2018) mencionan que el café despulpado es colocado en tanques de hormigón llenos de agua para realizar la fermentación, el contenido de cada tanque se homogeniza manualmente a intervalos de aproximadamente 4 horas. Existen investigaciones para el mejoramiento de la fermentación en medio sólido, posibilitando una fermentación homogénea con la implementación de equipos con rotores para el volteo del grano, como es el caso de Teneda (2016) en donde mencionan que en el proceso

fermentativo tradicional el porcentaje de granos de cacao no fermentados es elevado, aproximadamente llega al 25%, y 15%, respectivamente, siendo una calidad de la fermentación insuficiente, para esto diseñan fermentadores con sistema rotatorio, lo que reduce mano de obra y tiempo de procesamiento, el fácil manejo y remoción de la masa, así como la obtención de mayor rendimiento y de mejor calidad, sin embargo, el costo adicional energético es muy elevado (Castillo Ramos 2019). Por lo tanto, es una gran ventaja la fermentación en un medio líquido ya que no se requiere de maquinaria ni equipos adicionales para esta fermentación, en donde la remoción u homogenización se realizaría con una pala de material inerte, limpia y desinfectada. La inoculación inicial es importante ya que permite que la fermentación con la levadura seleccionada e inoculada viene siendo una fermentación más rápida, generando en este caso granos con características especiales. Ya que se inocularía con *Brettanomyces bruxellensis* obtenida de manera comercial, cabe señalar que esta levadura se ha encontrado dentro del ambiente del cacao (Trindade et al. 1999) afirmando que es un buen fermentador para la producción de vino de pulpa de cacao, que además está activo en el proceso para la eliminación de la pulpa de cacao y, al predominar en la comunidad de levaduras podría indicar un papel ecológicamente importante proceso de fermentación.

#### **4. Objetivos**

##### 4.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de la fermentación de cacao en medio líquido con inoculación inicial de *Brettanomyces bruxellensis*.

##### 4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el proceso de fermentación del cacao en un medio líquido y sólido, inoculado con *Brettanomyces bruxellensis*,
- Comparar las propiedades fisicoquímicas del grano de cacao obtenido en una fermentación sólida y líquida.

- Evaluar sensorialmente la aceptabilidad por parte de consumidores no entrenados del cacao obtenido en una fermentación sólida y líquida.
- Comparar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del grano del cacao obtenido en una fermentación líquida con una muestra comercial.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Muestras de cacao

Se cosecharon mazorcas de cacao de la variedad CCN-51 en el municipio de Yacopí (Cundinamarca - Colombia), en la vereda Alonso, finca El Recuerdo. Las mazorcas maduras cosechadas fueron transportadas en recipientes plásticos para evitar daños por golpes.

En el laboratorio de microbiología de Fundación Universitaria Agraria de Colombia (UNIAGRARIA), las mazorcas de cacao se cortaron transversalmente con un cuchillo previamente esterilizado. Los granos de cacao fueron desgranados manualmente y puestos en recipientes plásticos para ser pesados, homogeneizados y distribuidos en los diferentes tratamientos de fermentación.

### 5.2. Tratamientos de fermentación de cacao

Para la evaluación del efecto del tipo de fermentación (sólida o líquida) y la inoculación con la levadura *Brettanomyces bruxellensis*, se planteó un diseño factorial 2<sup>2</sup>, como se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tratamientos para fermentación del cacao realizado en el laboratorio UNIAGRARIA

Tratamiento		Tipo de fermentación	Inoculación con <i>B. bruxellensis</i>
T1	B+L	Líquida	SI
T2	B-L	Líquida	NO
T3	B+S	Sólida	SI
T4	B-S	Sólida	NO

\*B+ simboliza la muestra con inoculación; B- simboliza la muestra sin inoculación; L= Fermentación en medio líquido; S= Fermentación en medio sólido.

Los Tratamientos T1 (B+L) y T2 (B-L) medio líquido (con agua). Se realizó la fermentación con un biorreactor en acero inoxidable, en el cual se usaron 200 ml de agua destilada y 250 g de granos de cacao en cada tratamiento, en el T1 se inoculó con la levadura *B. bruxellensis*, mientras que en el T2 se promovió la fermentación espontánea. Los tratamientos T3 (B+S) y T4 (B-S) fueron fermentados en medio sólido (sin agua) realizando la fermentación en cajas de madera de tamaño 10 cm x 10 cm x 10 cm, colocando 250 g. de almendras de cacao en cada tratamiento, en el T3 se inoculó con la levadura *B. bruxellensis*, mientras que en el T4 ocurrió una fermentación espontánea.

En el tanque de fermentación para los tratamientos T1 y T2, estaba dotado de un sistema de agitación con aspas, el cual se hizo el proceso mezclado del cacao en cada ajuste de temperatura (Kadow et al., 2015). Para las cajas del T3 y T4 se realizó el volteo con paletas de madera. Las fermentaciones se realizaron dentro de una incubadora donde se controló la temperatura correspondiente en cada fase de fermentación. El tiempo de fermentación total fueron 120 horas (5 días), las primeras 48 horas (dos días) se mantuvo a una temperatura de 30°C, las siguientes 24 horas (tercer día) se mantiene a una temperatura de 35°C, las 24 horas siguientes (cuarto día) se mantiene a una temperatura de 40°C y las últimas 24 horas (quinto día) se mantiene a una temperatura de 45°C, estos rangos de temperaturas se trabajaron según lo reportado por (Kadow et al. 2015). En cada ajuste de temperatura se agitó y se voltearon los granos de cacao.

Terminada la fermentación en medio líquido, se dejaron decantar los granos de cacao por 10 min, y se separaron del medio para ser secados en un horno de circulación forzada (Binder) durante 24 h a una temperatura de 50°C. La temperatura de secado fue fijada ya que según (Voigt et al. 2016) manifiestan que la temperatura superior a 52°C favorecen la actividad de enzimas responsables de proteólisis y la formación de aminoácidos libres, que se requieren para la formación de los componentes relacionados con el aroma durante el proceso de tostado afectando la calidad del producto final (Vegas et al, 2010). Las condiciones de secado fueron usadas para las muestras de fermentación sólida y medio líquido.

### 5.3. Índice de Fermentación (IF)

El índice de fermentación (FI) se determinó siguiendo la metodología propuesta por Gourieva y Tserrevitinov (1979) con algunas modificaciones. Se molieron 0,5 g de semillas de cacao y se mezclaron con 50 ml de una solución 97:3 de metanol:HCl. El homogeneizado se dejó reposar en el refrigerador (8 °C) durante 16 a 19 h y luego se filtró al vacío. El filtrado se enrasó en un matraz aforado de 50 ml. El índice de fermentación de la muestra se obtuvo calculando la relación entre la absorbancia a 460 nm y la absorbancia a 530 nm. El índice de fermentación con valor a 1 se considera bien fermentado, mientras que menos de 1 como sub fermentado y mayor a 1 sobre fermentado.

### 5.4. Medición de pH y acidez titulable

La acidez titulable se determinó según Nazaruddin et al. (2006), donde se tomaron 2,5 g de muestras de cada tratamiento, las cuales fueron trituradas y homogenizadas en 50 mL de agua caliente destilada y posteriormente filtrados a través de papel filtro No. 4. El pH fue medido directamente sobre la muestra filtrada y una alícuota de 25 mL fue titulada hasta alcanzar un pH de 8.1 con NaOH 0,1N.

### 5.5. Polifenoles Totales (PFT)

La cuantificación de polifenoles totales (PFT) de cacao en grano seco se realizó según (Zapata Bustamante, Tamayo Tenorio, and Alberto Rojano 2015), en donde se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. En un tubo de reacción se agregaron 50  $\mu$ L del extracto metanólico, 425  $\mu$ L de agua destilada y 125  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, se agitó y luego se dejó en reposo por 6 min. Posteriormente se agregaron 400  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,1%. Después de 1 hora en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm (Singleton y Rossi, 1965). Se usaron soluciones de ácido gálico entre 50 - 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para construir la curva de calibración. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico / g de cacao.

## 5.6. Cuantificación de granos fermentados

Se caracterizaron los granos fermentados según la NTC 1252 de 2021, tomando de cada tratamiento 52 granos y cada uno de ellos se les realizó prueba de corte evaluando las características sensoriales del cacao en granos fermentado y seco, identificando grano bien fermentado y grano insuficientemente fermentado, grano sin fermentar o pizarroso; cuando el grano de cacao cuyo proceso de fermentación ha sido completo, posee la almendra con color marrón o chocolate, los alvéolos se encuentran bien definidos (forma arriñonada internamente), la cáscara se desprende fácilmente al presionarla con los dedos y mantiene un olor agradable a cacao, por otra parte están los granos insuficientemente fermentados, dado al poco tiempo de fermentación, las almendras mantiene color violeta o marrón violeta, el sabor de estos granos son amargos y astringentes, también están los granos sin fermentar que tienen aspectos pizarrosos, con estructura compacta de color interno gris oscuro o violeta, con sabor amargos y astringentes. Para la evaluación visual, se determinó según metodología de (Piñeiro-Di-Blasi et al. 2014) el color de los granos en la prueba de corte, sin embargo, se realiza una modificación, ya que en este estudio se tomó registros fotográficos que fueron evaluados en la página [imagecolorpicker.com/es](http://imagecolorpicker.com/es), obteniendo valores comparativos de los distintos tratamientos para conseguir una sensación visual más detallada mediante CIELAB, el cual se obtiene las variables: luminosidad ( $L^*$ , 0%= blanco, 100%= negro),  $a^*$  (verde en valores negativos y rojo en valores positivos), y  $b^*$  (amarillo en valores positivos y azul en valores negativos). A partir de  $a^*$  y  $b^*$  se calcula el ángulo de tono y el índice de saturación o croma ( $C^*$ ). El color es un atributo físico, que puede detectarse de manera visual, pues el ojo humano es capaz de diferenciar millones de colores. Sin embargo, esta valoración carece de objetividad y puede variar según la percepción del individuo. Por tanto, el uso de instrumentos aptos para medir el color en función de variables objetivas es elemental para establecer caracterizaciones y comparaciones entre productos (Piñeiro-Di-Blasi et al. 2014).

## 5.7. Evaluación sensorial

Se tomó como referencia a Horta-Téllez et al. (2019), en donde los granos de cacao fermentado fue sometido a una evaluación sensorial por consumidores no entrenados, pero conocedores en la producción de cacao, el panel evalúa las muestras granos de cacao fermentados sin su testa, de la siguiente manera. i) sabores básicos como acidez, amargor y astringencia, ii) sabores específicos como floral, frutal y nuez iii) sabores adquiridos como crudo o verde, entre otros sabores. Todos estos parámetros se basaron en la NTC 3929, con un ajuste en la escala de calificación de cero (0) a 10.

## 5.8. Determinación y cuantificación de compuestos fenólicos

La muestra que presentó un mejor perfil de sabor en el panel de catación fue analizada para determinar los compuestos fenólicos y cuantificarlos mediante cromatografía líquida de ultra-alta-resolución con detector de masas Orbitrap (UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS). El cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU) estaba equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap. Operado en modo positivo con un voltaje de capilar de 4,5 kV. La columna cromatográfica fue de la marca Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9  $\mu$ m de tamaño de partícula) operada a 30 °C. La fase móvil fue A: una solución acuosa de 0,2% de formiato de amonio y B: acetonitrilo con 0,2% de formiato de amonio. La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante 4 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para post-corrída. La identificación de los compuestos se realizó usando el modo de adquisición full scan y la extracción de corrientes iónicas (EIC) correspondientes a los  $[M+H]^+$  de compuestos de interés, medición de masas con exactitud y precisión de  $\Delta$ ppm < 1 y usando una solución-mix estándar de los compuestos (sustancias certificadas estándar), para la

cuantificación de los analitos de interés se realizaron curvas de calibración empleando los materiales de referencia se utilizaron las xantinas: cafeína (Part N° C8960-250G, Sigma-Aldrich), teobromina (Part N° T4500-25G, Sigma-Aldrich) y teofilina (Part N° T1633-25G, Sigma-Aldrich); las catequinas: (±)-catequina (C) (Part N° C1788-500MG, Sigma-Aldrich), (-)-epigallocatequina galato (EGCG) (Part N° E4143-50MG, Sigma-Aldrich), (-)-epicatequina (EC) (Part N° E1753-1G, Sigma-Aldrich), (-)-epicatequina galato (ECG) (Part N° E3893-10MG, Sigma-Aldrich), (-)-epigallocatequina (EGC) (Part N° E3768-5MG, Sigma-Aldrich); los flavonoides: ácido caféico (Part N° C0625, Sigma-Aldrich), ácido p-cumárico (Part N° C9008, Sigma-Aldrich), ácido rosmarínico (Part N° 536954-5G, Sigma-Aldrich), quercetina (Part N° Q4951-10G, Sigma-Aldrich), naringenina (Part N° N5893-1G, Sigma-Aldrich), luteolina (Part N° L9283-10MG, Sigma-Aldrich), kaempferol (Part N° K0133-50MG, Sigma-Aldrich), pinocembrina (Part N° P5239, Sigma-Aldrich), apigenina (Part N° A3145-25MG, Sigma-Aldrich); las antocianinas: cianidina 3-rutinosido (Part N° G36428, Sigma-Aldrich), pelargonidina 3-glucósido (Part N° 53489, Sigma-Aldrich). El nivel mínimo de cuantificación (NMC) del compuesto fue igual al doble del nivel mínimo de detección (NMD). Los datos fueron reportados como mg del compuesto/g de muestra.

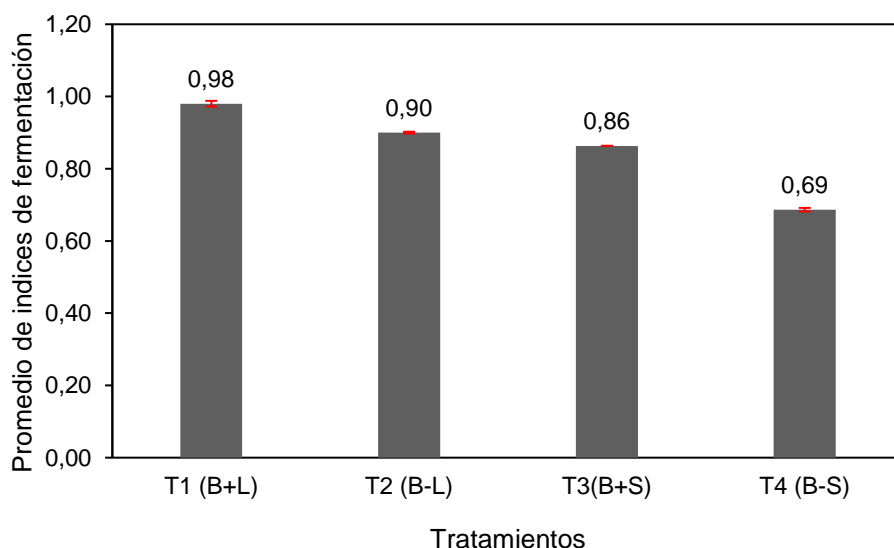
### 5.9. Análisis estadístico

Los datos reportados son el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones. Los análisis químicos se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza para establecer si hay diferencias estadísticas entre los tratamientos (valor  $p < 0.5$ ). Cuando se presentaron diferencias estadísticas, se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey, con la finalidad de especificar las diferencias entre los tratamientos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Índice de Fermentación (IF)

Para los muestreos evaluados en los tratamientos se identifica el índice de fermentación de los granos, obteniendo una mejor fermentación en el T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), dado que los resultados de los índices se acercan a 1, considerando granos mejor fermentados, mientras que los otros tratamientos indican una menor fermentación como indica la Figura 2. Identificando también que no hubo una sobre fermentación dado que no se encontró índices superiores a 1.0.

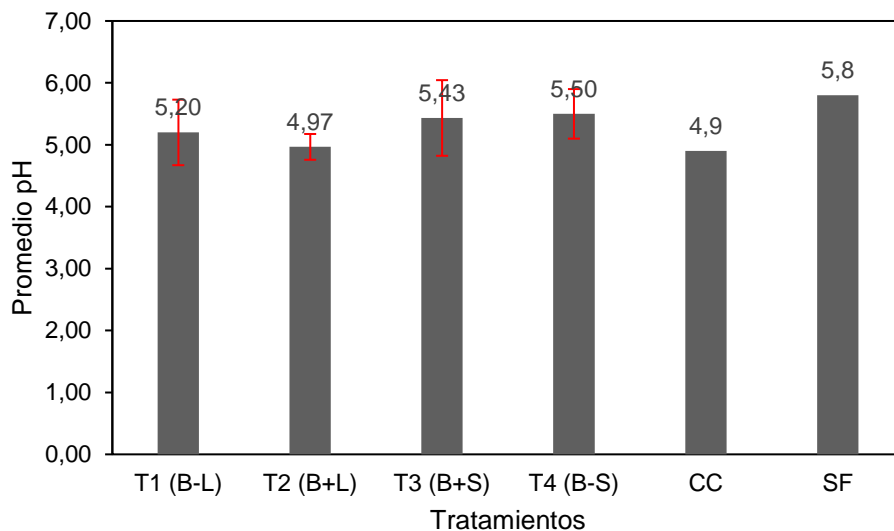


**Figura 2.** Promedio de los índices de fermentación (IF) de los granos fermentados en los tratamientos, T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido) y T4 (Medio sólido sin inoculación inicial).

### 6.2. Medición pH de las muestras de cacao

En la Figura 3 se determina que T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), se encuentra con un promedio del pH de 4.97, acercándose al pH del grano adquirido comercialmente el cual tiene un pH de 4.9. Identificando también que el promedio del pH del T2 (Medio líquido sin inoculación inicial) indica 5.2, acercándose al valor límite, para ser considerado granos fermentados, según indica Sunoj, Igathinathane, y Visvanathan (2016), el pH al final de la fermentación tiene un gran papel en el

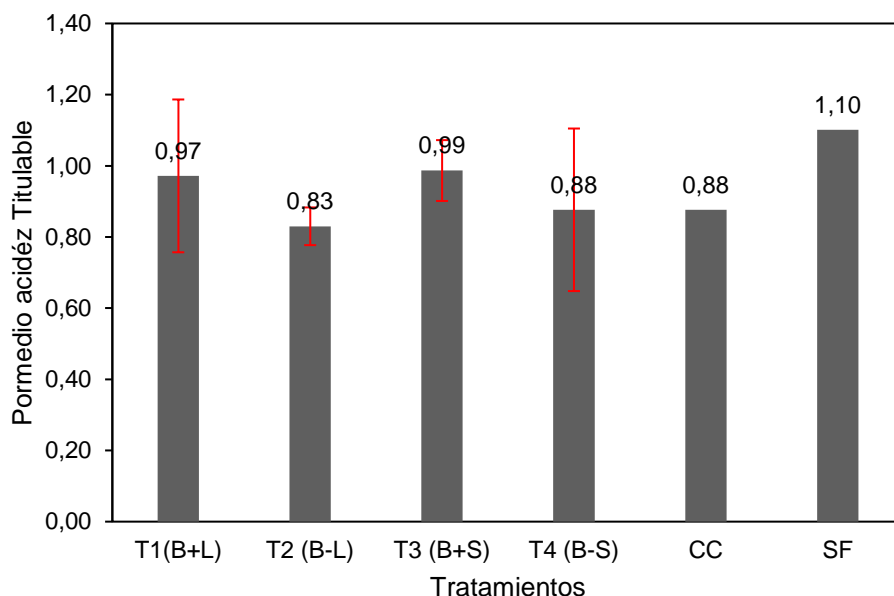
desarrollo del sabor, cuando se tiene un pH más alto entre 5.5 y 5.8 se considerando una fermentación deficiente con bajo índice de fermentación, y los granos de pH más bajo entre 4.75 y 5.19, se consideran bien fermentados.



**Figura 3.** Promedio de los valores de pH de los granos fermentados en los tratamientos, T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), CC (Granos adquiridos comercialmente) y SF (Granos sin fermentar).

### 6.3. Medición de la Acidez titulable

Según Afoakwa et al. (2013) la producción de ácidos en la pulpa es importante en la fermentación del cacao ya que estos ácidos se difunden en los granos y posteriormente inducen importantes reacciones bioquímicas que conducen a granos de cacao bien fermentados, pero una alta producción de ácido en la pulpa es perjudicial, ya que conduce a una difusión excesiva de ácido en los granos, lo que da como resultado la producción de granos ácidos, por lo que los cambios en la acidez durante la fermentación del cacao son cruciales para la calidad final del grano, por lo tanto, se puede apreciarla que acidez titulable en los granos. Sin embargo, se pudo notar que hubo dificultad en la toma de valores, debido a que no fue posible identificar con exactitud los valores en esta prueba, debido a que las muestras mantienen una coloración oscura y al momento de generar la coloración azul en la reacción con la fenolftaleína no se identifica con facilidad.

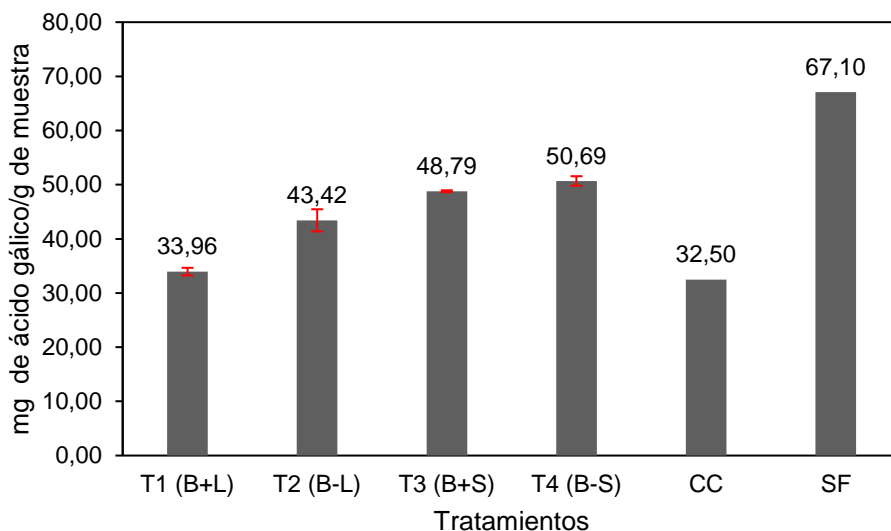


**Figura 4.** Promedio de los valores del Acidez titulable de los granos fermentados en los tratamientos, T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), CC (Granos adquiridos comercialmente) y SF (Granos sin fermentar).

#### 6.4. Medición Polifenoles Totales

En el proceso de fermentación del cacao hay disminución de polifenoles, dada a difusión de las células de almacenamiento promovida durante el tiempo de fermentación, reduciendo hasta el 30% del total de alcaloides y hasta 20% de polifenoles totales, cuando hay una disminución de polifenoles de igual manera se reduce la astringencia, y la tonalidad purpura de las almendras, esto ocurre por la transformación y degradación de antocianinas, así mismo hay una disminución del amargor, debido a la disminución de alcaloides de las almendras, desarrollo de coloración marrón (presencia de quinonas). Incluso, algunos parámetros que se emplean a nivel industrial para evaluar el grado de fermentación son los contenidos de antocianinas y el color marrón. (Vázquez et al. 2016). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** 5 se presenta el resultado de polifenoles totales teniendo como referencia granos de cacao sin fermentar (SF) y granos comerciales ya fermentados (CC), pudiéndose notar que el T1 posee menor cantidad de polifenoles frente a los demás tratamientos realizados, de igual manera

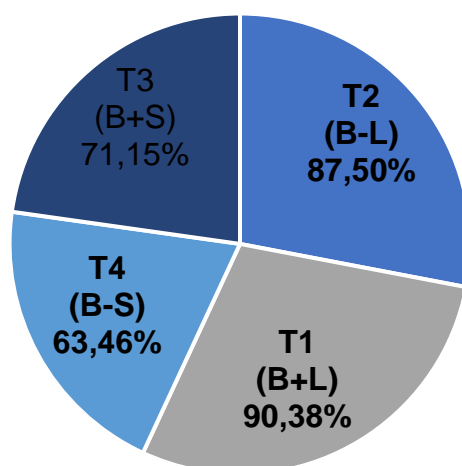
se identifica que los tratamientos en medio líquido poseen menos polifenoles que en los tratamientos en medio sólido, así mismo, menos cantidad de polifenoles en el tratamiento en medio solido con inoculación inicial que sin inoculación del tratamiento sólido.



**Figura 5.** Promedio de polifenoles totales de los granos fermentados en los tratamientos, T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), CC (muestra comercial de cacao) y SF (Granos sin fermentar).

### 6.5. Prueba de corte en granos fermentados




De los resultados de la prueba de corte y de acuerdo, a la norma NTC 1252 – 2021, se puede establecer que el tratamiento T1 (B+L) tuvo mayores granos fermentados, incluso el tratamiento en medio liquido tuvo mayor número de granos fermentados en comparación con tratamiento en medio sólido, y también se puede apreciar que hubo mayor número de granos fermentado en el tratamiento en medio sólido con inoculación que sin inoculación.





**Figura 6.** Porcentaje de granos fermentados en cada tratamiento de acuerdo con la prueba de corte (NTC 1252, 2021), en donde T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial).

Para la determinación colorimétrica, se evidenciaron valores representativos, que indicarían aproximaciones a la coloración de los tratamientos, notándose lo concerniente a lo descrito en la NTC 1252 – 2021, con respecto al color viendo cuando el grano de cacao cuyo proceso de fermentación ha sido completo, posee la almendra con color marrón o chocolate, cuando los granos son insuficientemente fermentados, las almendras mantiene color violeta o marrón violeta, mientras que los granos sin fermentar son de color interno gris oscuro o violeta.

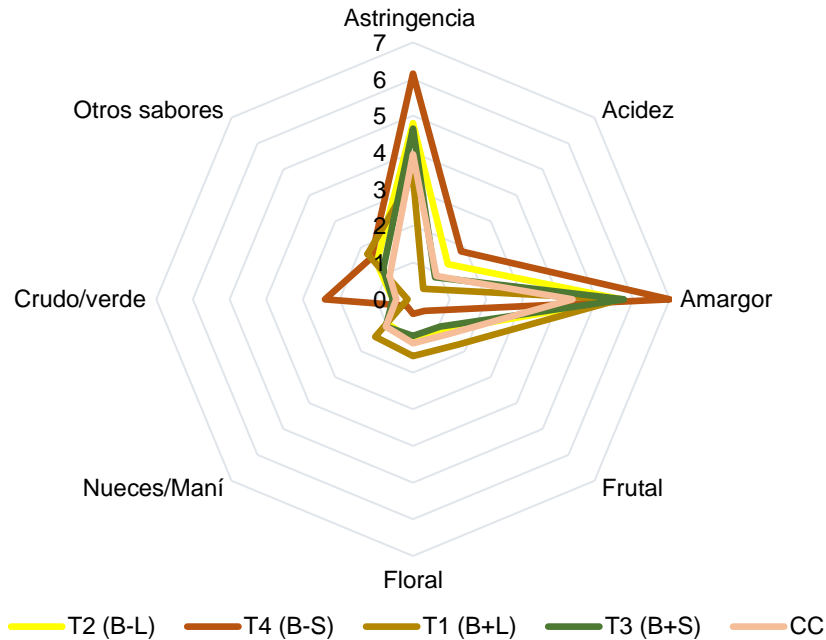
**Tabla 2.** Determinación colorimétrica de los granos fermentados en los tratamientos, en donde T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), y SF (Granos sin fermentar).

L	a	b	Color Registrado	Tratamiento
29	45	34		T3 (B+S)
39	31	25		T4 (B-L)
41	21	7		SF

L	a	b	Color Registrado	Tratamiento
31	24	28		T1 (B+L)
46	33	32		T2 (B-L)

## 6.6. Evaluación sensorial

De acuerdo con los perfiles sensoriales emitidos por los panelistas, se observó que hay diferencias en los distintos tratamientos, notándose que en el tratamiento B-S (Medio sólido sin inoculación inicia) que tiene una mayor astringencia, amargor y sabor a verde o crudo, en comparación de los demás tratamientos, esto puede deberse a que el tratamiento en medio sólido y sin ninguna inoculación, los granos no estaban bien fermentados al final del proceso, dando poca acentuación del sabor, en contraste al tratamiento B+L (*B. bruxellensis* en medio líquido), que logró los valores más suaves respecto a la cuantificación de polifenoles totales (PFT) de cacao en grano seco. El amargor y astringencia, obtenido también sensaciones en boca de frutal y flora en la evaluación sensorial se aprecia en los granos comerciales de cacao (CC) se identifica menor amargor y una astringencia mayor que el tratamiento B+L, es importante recalcar que dadas las condiciones de transporte, almacenamiento y procesos de fermentación varía las condiciones frente a los tratamientos realizados en el laboratorio.



**Figura 7.** Evaluación sensorial de granos en los tratamientos en donde T1 (*B. bruxellensis* en medio líquido), T2 (Medio líquido sin inoculación inicial), T3 (*B. bruxellensis* en medio sólido), T4 (Medio sólido sin inoculación inicial), y evaluación sensorial del cacao comercial (CC). Representando intensidades de: ninguno, muy débil, débil, medio, fuerte y muy fuerte, respectivamente.

### 6.7 Determinación y cuantificación de compuestos fenólicos

La muestra con mejor resultado de la evaluación sensorial fue con el tratamiento de fermentación en medio líquido con inoculación de *B. bruxellesis*. En la Tabla se presentan los compuestos fenólicos identificados en la muestra de cacao obtenida con el tratamiento de fermentación en medio líquido con inoculación de *B. bruxellesis*. Los compuestos identificados en mayor proporción con la teobromina, epicatequina, cafeína, ácido p-hidroxibenzoico, catequina y ácido vanílico. Según investigación de Zapata, Tamayo y Alberto (2015), identificaron compuestos fenólicos en la muestra granos de cacao fermentados y secos de la variedad CCN 51, obteniendo los siguientes compuestos con sus respectivos valores,  $1,25 \pm 0,02$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de Catequina,  $3,31 \pm 0,17$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de Epicatequina,  $3,99 \pm 0,076$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de Teobromina,  $0,96 \pm 0,000$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de cafeína.

**Tabla 3.** Compuestos fenólicos identificados y contenido en la muestra de cacao obtenida en el tratamiento de fermentación en medio líquido con inoculación de *B. bruxellensis*.

Compuesto	Concentración (mg/g)
Teobromina	7,127
Catequina (C)	0,241
Epicatequina (EC)	1,889
Ácido p-hidroxibenzoico	0,913
Cafeína	1,143
Ácido vanílico	0,060

## 7. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación se puede concluir que los dos procesos de fermentación, en medio líquido y sólido, mantienen una diferencia, determinando que la fermentación en medio líquido tiene mayor rendimiento en granos fermentados y sobre todo con la inoculación inicial de *Brettanomyces bruxellensis*, consiguiendo un mayor porcentaje de granos fermentados (B+L: 90,38%; B-L: 87,50%; B+S:71,15% y B-S:63,46%), además durante el proceso fermentativo se observó que en la fermentación en medio líquido se facilita realizar la remoción de los granos lo que permitió que la mayoría de granos alcancen una mejor fermentación, lo que no ocurrió en el medio sólido, además se pudo identificar en la fermentación en medio sólido (sin inoculación) granos con presencia de hongos filamentosos ajenos a los esperados, lo que llevó a que sean retirados para que no contamine a los demás granos, sin embargo, se observó que en la fermentación en medio sólido con inoculación inicial hubo mayor porcentaje de granos fermentados que en T4, presentándose menos granos con hongos filamentosos.

El proceso de fermentación genera cambios que se ven reflejados en parámetros fisicoquímicos que influyen en la calidad del grano, como son el pH, acidez titulable, índice de fermentación y evaluación de corte final, pues con los valores generados se pudo identificar la correlación que existe en los tratamientos evaluados, encontrando que el T1 (B+L) alcanzó resultados positivos referente al

pH, índice de fermentación y corte final. Además, se identifica que el tratamiento en medio líquido contribuye a un mejor procedimiento generando una fermentación más homogénea, cabe señalar que, dadas las condiciones inocuas realizada en el laboratorio, el proceso de fermentación cuenta con una baja cantidad de microorganismos en el ambiente, en relación con los procesos de fermentación que existen en el campo dado que hay un sinnúmero de microorganismos que de alguna manera participan en el proceso fermentativo del cacao.

El análisis sensorial demostró que la aceptabilidad entre las muestras de los tratamientos presenta diferencias significativas, identificando que en los tratamientos 2, 3 y 4 tienen menor aceptabilidad con respecto al T1 (B+L), principalmente por su nivel de amargor y astringencias.

En relación a los tratamientos 1 y 2, realizando una fermentación en medio líquido se pudo determinar que hubo un mayor rendimiento en granos fermentados, logrando mayor aceptabilidad sensorial por los panelistas, cabe notar que la fermentación en medio líquido con inoculación inicial tuvo mejores resultados, y en comparación con la muestra comercial no hubo mayores diferencias, sin embargo es importante aclarar que comercialmente se tomaron muestras de granos fermentados seleccionados de mejor calidad.

## **8. RECOMENDACIONES**

Dentro de la fermentación en medio líquido dada a las condiciones húmedas, los granos se encuentran expuestos a contaminarse, por lo tanto es importante mantener la fermentación en un ambiente adecuado para que no se presente dicha contaminación, siendo necesario además el control de temperaturas, pues si se descende la temperatura posibilita la presencia de microorganismos que afectan con la fermentación, de igual manera cuando se finalice la fermentación y se lleve al secado de los granos es importante que estos se filtren y se lleve al secado de manera inmediata con una temperatura superior a la fermentada.

Una de las desventajas que se observa en la fermentación en medio líquido es el uso de agua, que además después de la fermentación no tiene un uso especial afectando el medio ambiente, sin embargo, queda la necesidad de determinar los componentes de este sustrato y desarrollar alternativas que conlleven al desarrollo de bioprocesos generando un uso adecuado.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Afoakwa, E. O., J. E. Kongor, J. F. Takrama, and A. S. Budu. 2013. "Changes in Acidification, Sugars and Mineral Composition of Cocoa Pulp during Fermentation of Pulp Pre-Conditioned Cocoa (*Theobroma Cacao*) Beans." *International Food Research Journal* 20(3): 1215–22.
- Alvarez-villagomez, K G, C A Ledesma-escobar, and F Priego-capote. 2022. "Food Bioscience Influence of the Starter Culture on the Volatile Profile of Processed Cocoa Beans by Gas Chromatography – Mass Spectrometry in High Resolution Mode." 47(March).
- Arango Angarita, Jessica. 2017. "Evaluación Del Efecto de Técnicas de Fermentación En El Sabor y Aroma de Cacao CCN-51 (*Theobroma Cacao* L.) En La Zona de Tumaco-Nariño." 51: 71.
- Ardhana, Made M, and Graham H Fleet. 2003. "The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentations in Indonesia." 86: 87–99.
- Batista, Nádia Nara et al. 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): 1101–10.
- Cardona, Lina María. 2016. "Influencia Del Proceso de Fermentación Sobre Las Características de Calidad Del Grano de Cacao (*Theobroma Cacao*).": 99. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59884>.
- Castillo Ramos, José. 2019. "Diseño de Un Fermentador Orientado a Mejorar El

Proceso de Fermentación Del Cacao Criollo Blanco de Piura.”

Codini, Melina, Florencia Díaz Vélez, Marina Ghirardi, and Inés Villavicencio. 2004.

“Obtención y Utilización de La Manteca de Cacao.” *Invenio* 7(12): 143–48.

Crafack, Michael et al. 2013. “International Journal of Food Microbiology In FI

Uencing Cocoa FI Avour Using Pichia Kluyveri and Kluyveromyces Marxianus  
in a de FI Ned Mixed Starter Culture for Cocoa Fermentation.”

Elhalis, Hosam et al. 2021. “Microbiological and Chemical Characteristics of Wet

Coffee Fermentation Inoculated With Hansinaspora Uvarum and Pichia  
Kudriavzevii and Their Impact on Coffee Sensory Quality Preparation of Yeast  
Starter Cultures.” 12(August): 1–13.

Elhalis, Hosam, Julian Cox, Damian Frank, and Jian Zhao. 2020. “The Role of Wet  
Fermentation in Enhancing Coffee Flavor , Aroma and Sensory Quality.”

*European Food Research and Technology* 247(2): 485–98.

<https://doi.org/10.1007/s00217-020-03641-6>.

Graziani de Fariñas, L., E. Portillo, and E. Cros. 2006. “Efecto de Algunos Factores

Post-Cosecha Sobre La Calidad Sensorial Del Cacao Criollo Porcelana  
(Theobroma Cacao L.).” *Revista de la Facultad de Agronomía* 23(1): 51–59.

Gutierrez, Marcelo. 2007. “Manual De Practicas De Control De Calidad.”

Horta-Téllez, H B, A P Sandoval-Aldana, M C Garcia-Muñoz, and I X Cerón-

Salazar. 2019. “Evaluation of the Fermentation Process and Final Quality of  
Five Cacao Clones from the Department of Huila, Colombia [Evaluación de La  
Fermentación y Calidad Final de Cinco Clones de Cacao Proveniente Del  
Departamento Del Huila, Colombia].” *DYNA (Colombia)* 86(210): 233–39.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

85081222684&doi=10.15446%2Fdyna.v86n210.75814&partnerID=40&md5=f  
efcec16e193ba39d8ee9ee02ef8eb42.

Kadow, Daniel, Nicolas Niemenak, Sascha Rohn, and Reinhard Lieberei. 2015.

“Fermentation-like Incubation of Cocoa Seeds (Theobroma Cacao L.) -

- Reconstruction and Guidance of the Fermentation Process.” *Lwt* 62(1): 357–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>.
- MADR. 2020. “Cadena de Valor de Cacao.” *Dirección de cadenas agrícolas y forestales*: 27. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf).
- Mehlomakulu, N N, M E Setati, and B Divol. 2015. “Non- Saccharomyces Killer Toxins : Possible Biocontrol Agents Against Brettanomyces in Wine ?” 36(1): 94–104.
- Moreira, Igor et al. 2021. “Influence of *S. Cerevisiae* and *P. Kluyveri* as Starters on Chocolate Flavour.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101(10): 4409–19.
- Nazaruddin, R., L. K. Seng, O. Hassan, and M. Said. 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.
- Penagos Muñetón, Alejandro. 2019. “Estandarización Del Proceso de Fermentación de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) En Función de La Relación Entre La Masa de Grano y El Volumen Del Cajón Fermentador.” : 74.
- Piñeiro-Di-Blasi, Jessica Ingrid et al. 2014. “Development of an Application for Quick Comparison of Pigments from Their Colorimetric Coordinates.” *Dyna* 81(184): 49.
- Pliego-Arreaga, R, C Regalado, A Amaro-Reyes, and B. E. García-Almendárez. 2013. “Revista Mexicana de Ingeniería Química.” *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(3): 505–11.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>.
- Portugal, Cauré Barbosa, and Fernanda Ruiz-Larrea. 2012. “Detección y Caracterización de *Brettanomyces Bruxellensis* y *Trigonopsis Cantarellii* En El Contexto Enológico.” *Agroindustria y Alimentación* PhD: 273.
- Ribeiro, Luciana Silva et al. 2018. “Microbiological and Chemical-Sensory

Characteristics of Three Coffee Varieties Processed by Wet Fermentation.”  
(Conab).

Steensels, Jan et al. 2015. “Brettanomyces Yeasts - From Spoilage Organisms to Valuable Contributors to Industrial Fermentations.” *International Journal of Food Microbiology* 206: 24–38.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>.

Steensels, Jan, and Kevin J Verstrepen. 2014. “Taming Wild Yeast : Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations.”

Sunoj, S., C. Igathinathane, and R. Visvanathan. 2016. “Nondestructive Determination of Cocoa Bean Quality Using FT-NIR Spectroscopy.” *Computers and Electronics in Agriculture* 124: 234–42.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.compag.2016.04.012>.

Teneda, William Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao (Theobroma cacao L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51. 2016. “Mejoramiento Del Proceso de Fermentación Del Cacao (Theobroma Cacao L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51.” *Universidad Internacional de Andalucía*: 140. <https://url2.ci/VB8Tk>.

Trindade, Rita De Cássia et al. 1999. “Identification of Yeasts Isolated from Processed and Frozen Cocoa ( Theobroma Cacao ) Pulp for Wine Production.” : 0–4.

Vázquez, Alfredo et al. 2016. “Alcaloides y Polifenoles Del Cacao, Mecanismos Que Regulan Su Biosíntesis y Sus Implicaciones En El Sabor y Aroma.” *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 656(3): 239–54.

<http://ve.scielo.org/pdf/alan/v66n3/art10.pdf>.

Voigt, Jürgen et al. 2016. “Partial Purification and Characterisation of the Peptide Precursors of the Cocoa-Specific Aroma Components.” *Food Chemistry* 192: 706–13.

Vuyst, L De, and S Weckx. 2016. “The Cocoa Bean Fermentation Process : From

Ecosystem Analysis to Starter Culture Development.” : 5–17.

Zamudio-Palacios B. Ba., Ayora-Talavera T. del Ra., Cervantes-Lugo E. del Ca., Taillandier Pb. y Gastélum-Martínez E\*a. 2021. “Estudio de Un Consorcio de Levaduras Durante La Fermentación de Cacao y Su Efecto En La Generación de Compuestos Aromáticos:” 6: 62–74.

Zapata Bustamante, Sandra, Angélica Tamayo Tenorio, and Benjamín Alberto Rojano. 2015. “Efecto Del Tostado Sobre Los Metabolitos Secundarios y La Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano.” *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 68(1): 7497–7507.