

**Evaluación de la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* para la mitigación de compuestos
neoformados en cacao tostado**

Daniela Quiza Roa

Director

Ph.D(c) Carlos Edwin Carranza Gutiérrez

Co-directora:

Ph.D. Claudia Milena Amorocho Cruz

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAPMA

Agronomía

2024

Dedicatoria

A Dios por darme la fuerza para lograr este objetivo.

A mis padres, Albany Roa y Luis Augusto Quiza Tovar, por su apoyo incondicional y su motivación en los momentos más difíciles. Gracias por recordarme que soy capaz de alcanzar cada meta y sueño que me proponga.

A mi familia, especialmente a mis hermanos Ana Milena Roa y Jesús David Quiza Roa, por estar a mi lado en cada momento importante, incluyendo este significativo cierre de mi formación.

Y a mis amigos: Zoila Yuliany Flórez Meneses, Nayibe Chala Cortés, María Juliana Díaz Suárez, María del Pilar Cortés Gaona, Maira Alejandra Losada, Laura Vanessa Caviedes, María Paula Quevedo Villamil, Daniela Martínez, Anyi Lorena Ramón, Brahian Medina Cardozo, Wilmer Licerio Ladino Garzón, Ricardo Cortés, Juan Eduardo Soto y Nicolás Tovar Jacobo, por su apoyo y motivación incondicional en el transcurso de este viaje, tanto académico como personal.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los profesores Claudia Milena Amorocho Cruz, Yeison Fernando Barrios Rodríguez y Carlos Edwin Carranza Gutiérrez por su valioso acompañamiento y asesoría a lo largo de este proceso académico.

Un agradecimiento especial a María Elena Medina Orjuela, quien, más que una compañera de trabajo es una amiga. Su apoyo, enseñanzas y dedicación fueron fundamentales para la culminación de este proyecto.

También deseo reconocer al profesor Rodolfo Lizcano Toledo por los conocimientos compartidos durante mi carrera.

Finalmente, quiero agradecer al proyecto 2020000100438 “Investigación y desarrollo de estrategias para la mitigación de contaminantes neoformados en cacao y café tostado en el departamento del Huila”, por facilitarme equipos y medios necesarios para llevar a cabo la investigación.

Resumen

Los compuestos neoformados, como la acrilamida, el alcohol furfurílico y el ácido furoico, son tóxicos para la salud; dada la alta demanda de cacao, es fundamental implementar estrategias para reducir su presencia en los alimentos derivados de *Theobroma cacao* L. El estudio se enfocó en evaluar la adición de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación del cacao, con el fin de disminuir la formación de estos contaminantes durante el proceso de tostación. Se realizó la cinética de *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) y (LALCAFE BASIC - LALLEMAND) aislada de café, siendo el primero el que mostró un desarrollo superior, lo que llevó a su selección para el estudio. Se recolectaron aproximadamente 140 mazorcas de cacao de la variedad FEAR-5 en la finca La Maloka, ubicada en el municipio de Rivera, Huila, Colombia. Las mazorcas se lavaron, desinfectaron y luego se procesaron para obtener los granos. Estos fueron distribuidos en dos tratamientos: uno de control sin levaduras (T1) y otro con la adición de *S. cerevisiae* (T2), cada uno por triplicado. Se realizó un recuento microbiológico de levaduras viables cultivables al inicio y al final de la fermentación, observándose un aumento en la población de microorganismos en el tratamiento T2 en comparación con el tratamiento T1. Además, se identificó el género *Aspergillus* mediante técnicas de tinción de esporas en el T1. Finalmente, las muestras fueron sometidas a un proceso de tostación en horno a 120°C durante 70 minutos, con una apertura del 50% en ventanillas y trampillas. La inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación, para mitigar los compuestos neoformados en el cacao tostado, demostró ser eficaz, logrando una reducción del 59,6% en la acrilamida y del 22,1% en el alcohol furfurílico.

Palabras clave: Inocuidad, levadura, Caracterización, fermentación, neocontaminantes.

Abstract

Neoformed compounds, such as acrylamide, furfuryl alcohol and furoic acid, are toxic to health; given the high demand for cocoa, it is essential to implement strategies to reduce their presence in foods derived from *Theobroma cacao* L. This study focused on evaluating the addition of *Saccharomyces cerevisiae* during cocoa fermentation to reduce the formation of these contaminants during the roasting process. The growth of *Saccharomyces cerevisiae* was compared with y (*LALCAFE BASIC - LALLEMAND*) aislada de café, with the former showing superior development, which led to its selection for the study. Approximately 140 cocoa pods of the FEAR-5 variety were collected from the La Maloka farm, located in the municipality of Rivera, Huila, Colombia. The pods were washed, disinfected and then processed to obtain the beans. These were distributed in two treatments: one control without yeast (T1) and the other with the addition of *S. cerevisiae* (T2), each in triplicate. A microbiological count of viable culturable cells was performed at the beginning and at the end of fermentation, and an increase in the population of microorganisms was observed in the T2 treatment compared to the T1 treatment. In addition, the genus *Aspergillus* was identified by spore staining techniques in T1. Finally, the samples were subjected to a roasting process in an oven at 120°C for 70 min, with a 50% opening of windows and hatches. Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation, to mitigate the neoformed compounds in the roasted cocoa, proved to be effective, achieving a 59.6% reduction in acrylamide and a 22.1% reduction in furfuryl alcohol.

Keywords: Safety, yeast, Characterization, fermentation, neocontaminants.

Tabla de contenido

Introducción	7
Planteamiento del problema.....	10
Justificación	12
Objetivos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
Marco conceptual y teórico.....	15
Metodología	20
Resultados y Discusión	31
Evaluación medio de cultivo.....	31
Cinética de crecimiento de la levadura para la inoculación en la fermentación del cacao	31
.....	
Recuento de células viables cultivables	33
Evolución del pH y °Brix durante la fermentación.....	34
Caracterización microbiológica de la fermentación del cacao	36
Tinción de esporas	37
Análisis de precursores al inicio y final de la fermentación	38
Análisis de precursores en cacao seco y tostado.....	41
Formación de compuestos neoformados.....	43
Conclusiones	45
Recomendaciones	46
Referencias Bibliográficas	47

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una materia prima esencial para la producción de chocolate y sus derivados (Samaniego et al., 2020), Colombia se destaca como uno de los principales países exportadores de cacao, junto con Costa de Marfil, Ghana y Ecuador (Abbott et al., 2018), según estudios, aproximadamente 65.000 familias productoras de cacao se benefician de esta actividad (MADR,2021).

Para el año 2022 en Colombia se registró una producción de alrededor de 62.158 t y los departamentos destacados fueron Santander con 22.899 t, Arauca con 10.520 t, Antioquia con 5.188 t, Tolima con 3.593 t, Huila con 3.518 t y Nariño con 3.372 t (Fedecacao, 2023). Los granos de cacao son utilizados para la obtención de productos finales como chocolatería fina, chocolate de mesa, manteca de cacao, entre otros Megias et al. (2020) siendo necesario someter los granos de cacao a un procesamiento postcosecha que incluye fermentación, secado y tostado (Rawel et al., 2019).

La fermentación es una etapa indispensable, donde el mucilago que envuelve las semillas de cacao es metabolizado por microorganismos como las bacterias ácido-lácticas (BAL) y bacterias ácido-acéticas (BAA) que producen compuestos como etanol y ácido acético quienes contribuyen en cambios fisicoquímicos de vital importancia en almendras (Ordoñez et al., 2019).

Durante la fase de tostación, los cambios de temperatura reducen el contenido de agua en las semillas de cacao y favorecen la formación de compuestos aromáticos, como alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, ésteres y pirazinas (Aprotosoai et al., 2016; Huang & Barringer, 2011; Janek et al., 2016; Rojas et al., 2022a; Voigt et al., 2018). Este proceso desencadena una serie de reacciones químicas no enzimáticas, como la reacción de Maillard, en la que participan principalmente azúcares reductores y compuestos amino, procedentes

principalmente de los aminoácidos esenciales como la asparagina. Estas reacciones dan lugar a la formación de compuestos con diferentes pesos moleculares asociados a la calidad sensorial (Hodge, 1953; Martins et al., 2000). No obstante, durante este proceso también pueden inducir la formación de compuestos denominados contaminantes de proceso (NFC), como la acrilamida, el alcohol furfurílico (FFA) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Albouchi & Murkovic, 2020; Becalski et al., 2016; Murkovic & Pichler, 2006; Surma et al., 2017). Estos compuestos pueden aumentar potencialmente el riesgo de cáncer (Voyer & Alvarado, 2019).

Dada la preocupación por los efectos adversos de ciertos compuestos contaminantes, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado la acrilamida y el alcohol furfurílico como probables y posibles carcinógenos en humanos, ubicándolos en las categorías 2A y 2B, respectivamente (IARC & WHO, 1994). Además, el HMF ha demostrado ser mutagénico, carcinogénico y citotóxico (Islam et al., 2014). Estos compuestos neoformados se generan durante el proceso de tostación del cacao. Si bien se han explorado diversas estrategias de mitigación para otros alimentos, la revisión de la literatura revela una notable ausencia de enfoques específicos dirigidos a reducir la formación de compuestos neoformados en el tueste del cacao.

En otras matrices alimentarias como el café han publicado la importancia del control de temperaturas. Bertuzzi et al. (2020), alude la necesidad de emplear una temperatura en tueste de café superior a los 210°C para de tal forma obtener porcentajes bajos de acrilamida. Otros estudios han demostrado que la enzima asparaginasa, que convierte la asparagina en ácido aspártico, ha mostrado excelentes resultados en la mitigación de acrilamida en alimentos como galletas, pan y patatas mediante su adición (Anese et al., 2011; Ciesarová, 2016; Kukurová et al., 2009; Mohan-Kumar et al., 2014; Pedreschi et al., 2008).

La *Saccharomyces cerevisiae* es una de las principales levaduras fermentadoras del mucílago en café (Puertas, 2013). Los requerimientos nutricionales para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* están estrechamente relacionados con la cuantificación del microorganismo. Los factores determinantes en esta etapa incluyen la presión osmótica, temperatura, desecación, luz, pH y concentración de alcohol (Suárez et al., 2016).

Es crucial considerar que la nutrición de este microorganismo es osmótica; por lo tanto, se deben evitar condiciones hipertónicas o hipotónicas para prevenir la plasmólisis y la plasmoptisis. El estrés osmótico puede reducir la eficiencia del proceso de fermentación y la viabilidad celular. Las altas temperaturas disminuyen la biomasa, mientras que las temperaturas bajas pueden inducir un estado de latencia celular, perjudicando su desarrollo. Además, la desecación y la luz dificulta el desarrollo y la actividad del microorganismo, siendo perjudicial para su crecimiento (Suárez et al., 2016).

El pH óptimo para el desarrollo de las levaduras se encuentra entre 4 y 5, aunque estas muestran cierta tolerancia a medios más ácidos. Al finalizar la etapa de fermentación, es recomendable mantener el grado de alcohol en niveles moderados (Suárez et al., 2016).

Por otro lado, el *Saccharum officinarum* (jugo de caña de azúcar) es considerado un aditivo beneficioso para el crecimiento y desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su alto contenido de carbohidratos. Estos carbohidratos son esenciales para el metabolismo de microorganismos (Panigrahi et al., 2021).

En este sentido, se evaluó la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) durante la fermentación de cacao como estrategia de mitigación en la formación de acrilamida, alcohol furfúrico y ácido furoico en el tueste del cacao.

Planteamiento del problema

El procesamiento de los granos de cacao comprende una serie de etapas, donde se encuentra el desarrollo químico, físico y organoléptico, consideradas de vital importancia para las características requeridas en calidad de productos finales como (chocolatería fina, chocolate de mesa, manteca de cacao y otros). Dichas etapas comprenden la fermentación, secado, tostado, descascarillado, molienda y almacenamiento del producto, siendo necesario tener en cuenta que la inocuidad en cada etapa es importante para garantizar la calidad deseada y de tal forma satisfacer al consumidor quien determina el mercado de dicho producto (Pacheco et al., 2021).

La etapa de tostado del cacao es crucial para la calidad final del producto, durante este proceso ocurren reacciones químicas como la reacción de Maillard la cual conduce al desarrollo de propiedades como (color, textura y aromas), favoreciendo la palatabilidad. En dichas reacciones se lleva a cabo interacción de aminoácidos libres con azúcares reductores los cuales quedan disponibles en la fermentación y se le denominan precursores de sabor y aroma característicos de cacao y de vital importancia para la actividad de evaluación sensorial. Sin embargo, durante este proceso también se producen otros tipos de compuestos denominados contaminantes neoformados (NFC) entre los que se destacan la acrilamida, N-carboximetilisina (CML) y 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) donde en ocasiones dichas sustancias pueden estar presentes en subproductos de cacao.

Según estudios realizados al presenciar gran porcentaje de estos compuestos ocasionan impactos negativos en el ser humano. Al pasar del tiempo se ha implementado actividades como el registro de temperatura en secado, lo ideal es que no superen 50°C conduciendo el proceso de secado más lento y de tal forma mitigando la producción de compuestos indeseados (Martínez et al., 2022).

Los compuestos neoformados aumentan potencialmente el riesgo cancerígeno. También, la acrilamida se ha asociado a daños genéticos con alteraciones cromosómicas. Algunos alimentos involucrados son papas fritas, tortas, café, chocolate, galletas y cereales. Por ende, es de vital importancia la participación investigativa para ejercer control sobre los riesgos en productos de consumo (Voyer & Alvarado, 2019).

Es importante controlar el contenido de acrilamida, por tanto, debe considerarse como resultado de reacciones contaminantes de formación y eliminación. Dicho compuesto comienza a formarse a temperatura $>100^{\circ}\text{C}$ después de una fase inicial de latencia durante el cual no se forma acrilamida. Luego, aquella concentración de acrilamida aumenta con el pasar del tiempo hasta llegar a una concentración máxima, cabe resaltar que esta puede disminuir por agotamiento de reactivos o por eliminación de acrilamida. Los mecanismos de eliminación para acrilamida no se han aclarado completamente y en vista de esto se requieren más investigaciones (Capuano & Fogliano, 2011).

Se ha identificado que una de las herramientas con fines de controlar presencia de acrilamida en alimentos sometidos a procesos térmicos es la adición de la enzima asparaginasa. Esta enzima es capaz de catalizar hidrólisis de la asparagina en ácido aspártico y amoníaco, reduciendo de tal forma el contenido de asparagina precursora (Capuano & Fogliano, 2011).

Actualmente investigaciones respecto a la mitigación de concentración de compuestos neoformados son escasas, por ende, surge la necesidad en desarrollar estudios enfocados en tecnologías de mitigación de NFC que permitan garantizar la inocuidad y calidad en el cacao. Por lo anterior, se plantea la pregunta de investigación ¿Cómo la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso de fermentación de cacao influye en la formación de compuestos neoformados y la calidad del cacao tostado?

Justificación

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta perenne tropical endémica de la región amazónica y pertenece a la familia Malvaceae. Es un cultivo de gran valor comercial en regiones tropicales de todo el mundo debido a su fruto, que se utiliza como base en diversos procesos industriales para la obtención de productos como confitería, grasas para cosméticos y aplicaciones médicas (Rodríguez-Velázquez et al., 2022).

Según investigaciones realizadas la acrilamida se forma a partir de aminoácidos, asparagina y azúcares reductores entre estos (glucosa y fructosa) que se encuentra presente en productos como el *T. cacao*. Las primeras vías para la formación de acrilamida incluyen los dicarbonilos y los hidroxicarbonilos, que reaccionan con la asparagina, dando lugar a la liberación de acrilamida, un contaminante neoforado térmico. Además, es crucial considerar factores como la temperatura, la humedad y el pH, ya que estos influyen significativamente en la formación de acrilamida (Stadler & Gökmen, 2023).

Es importante destacar que factores como la variedad del cultivar, las condiciones de almacenamiento y el entorno agroclimático afectan los niveles de asparagina y, por ende, la formación de acrilamida. En general, a mayor temperatura de cocción, mayor es la concentración de acrilamida en el producto final. Sin embargo, se ha observado que la acrilamida puede reducirse a temperaturas superiores a 180°C en algunos alimentos. Los compuestos neoforados, incluida la acrilamida, se consideran neurotóxicos tanto para animales como para humanos (Stadler & Gökmen, 2023).

La fermentación del cacao es esencial para desarrollar los precursores de aroma y sabor en el alimento. Los microorganismos desempeñan un papel crucial en este proceso: las levaduras metabolizan el mucílago que recubre los granos de cacao fresco, rompiendo la pectina en

condiciones anaeróbicas (sin presencia de oxígeno) y fermentando los azúcares para producir etanol. Posteriormente, las bacterias ácido-lácticas (BAL) y bacterias ácido-acéticas (BAA) fermentan los azúcares, generando ácido láctico, ácido acético y manitol. Es importante destacar que, sin la presencia de estos microorganismos, una fermentación adecuada y la obtención del sabor deseado del chocolate serían imposibles (El Salous et al., 2019).

En la búsqueda de literatura, no se han encontrado investigaciones que evalúen la inoculación de levaduras como una técnica para mitigar la formación de compuestos neoformados durante el tueste del cacao. Esta ausencia de estudios destaca una brecha de conocimiento significativa, especialmente considerando la importancia del cacao como un alimento de alta ingesta.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación del cacao como estrategia de mitigación en la formación de acrilamida, alcohol furfurilico y ácido furoico en el tueste del cacao.

Objetivos específicos

- Evaluar un medio de cultivo sólido sostenible a base de agar y jugo de caña de azúcar para el crecimiento de levaduras.
- Analizar la influencia de *Saccharomyces cerevisiae* en la degradación de precursores (glucosa, fructosa y sacarosa) durante la fermentación cacao.
- Estudiar la influencia de *Saccharomyces cerevisiae* en la formación de acrilamida, alcohol furfurilico y ácido furoico durante el tueste del cacao.

Marco conceptual y teórico

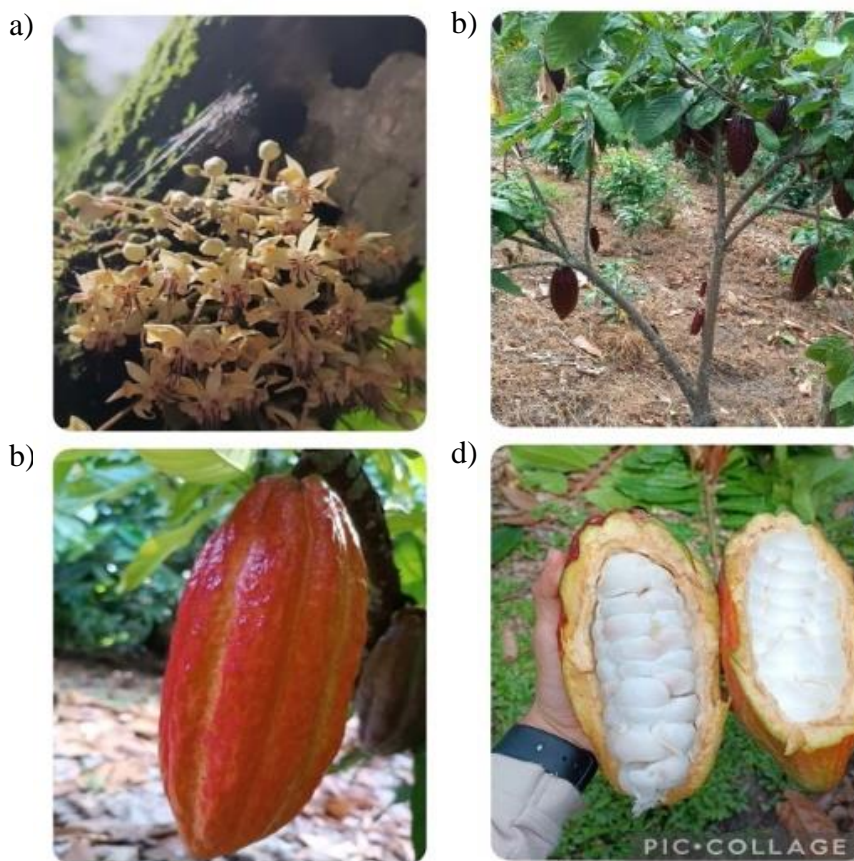
El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol originario de los bosques tropicales de América del Sur. La mayor diversidad genética de esta especie se encuentra en las zonas fronterizas de la Amazonía, entre Perú, Brasil y el sur de Colombia (Osorio et al., 2017). El cacao pertenece al reino *Plantae* y se clasifica dentro de la división *Magnoliopsida*. Forma parte de la familia *Malvaceae* y de la subfamilia *Byttnerioideae*. Dentro de la tribu *Theobromeae*, su género es *Theobroma*, siendo la especie más reconocida *Theobroma cacao* L. (Mendoza, 2011).

La especie del género *T. cacao* es un árbol, de corteza oscura generalmente café o gris, presenta ramas cafés y finamente vellosas, sus hojas son simples y presenta inflorescencias caulinares es decir que se originan desde el tallo y cimosas o cerradas, las flores son pentámeras, hermafroditas, actinomorfas. El fruto es indehiscente carnosos (Mazorca), polimorfa, esférica, de tonalidades púrpura o amarillo en fase de madurez, el endocarpio se encuentra alrededor de 4 a 8 mm en grosor, duro, carnosos y leñoso (Figura 1). Dichas mazorcas son cultivadas para el mercado mundial. Sus semillas son de color café- rojiza, formas ovaladas y ligeramente comprimidas. Sus medidas regularmente son de 10, 20 ó 35 cm de largo 7 cm de ancho y su peso varía de 200 a 1000 g (Arévalo et al., 2017).

Existen tres variedades importantes en el cacao (Criollo, Forasteros y Trinitario) y a partir de estos se originan nuevos híbridos y clones (Arévalo et al., 2017).

Figura 1

Caracterización morfológica de planta a) florescencia en planta planta de *Theobroma cacao* L, b) planta de cacao variedad FEAR 5, c) morfología de cacao, y d) pulpa de cacao.



Fuente: Propia

El origen del criollo es dado en el Norte de Sudamérica y Centro América. Este es caracterizado por presentar sabores suaves y aromáticos, principalmente se encuentra en Venezuela, América central, Las Antillas del caribe, Sri Lanka, Timor Oriental y Java. Dicha tipología de cultivo logro dominar el mercado internacional hasta mediados del siglo XVIII.

Debido a su alto porcentaje de susceptibilidad a enfermedades y bajos porcentajes en productividad, conduciendo en gran parte falencias en el mercado. Los frutos presentan forma

alargada de punta pronunciada, doblada y aguda. Regularmente la superficie del fruto es rugosa, delgada, tonalidad verde con salpicaduras que van desde color rojo a purpura oscura (Arévalo et al., 2017).

El cacao tipo forastero es caracterizado por dominar la producción y el comercio mundial de granos, este es originario de la cuenca amazónica y se producen en los cuatro continentes cacaoteros (África, Asia, América y Oceanía). Sus frutos son de forma ovalada, cortos, con colores que van desde verde y amarillo en fase de maduración, su superficie es lisa, corteza gruesa y lignificada en su interior (Arévalo et al., 2017).

Los trinitarios son generados mediante el cruce de criollos con forasteros. Se caracterizan por ser heterogéneos genética y morfológicamente. La planta suele ser robusta, frutos con tonalidades verdes o pigmentados. El origen es dado en trinidad y Tobago, se deduce que la hibridación es el resultado del cruzamiento espontáneo y natural. Actualmente esta tipología de cultivo es extendida en América (Trinidad, Tobago, Venezuela, Ecuador, México, Centro América) y algunos países de África (Camerún, Samoa y Papúa Nueva Guinea), es resaltar que presenta alrededor del 15% de la producción mundial (Arévalo et al., 2017).

Este cultivo tiene su propia historia en Colombia, teniendo en cuenta que es muy probable que dicha especie tenga origen en cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas, región que hoy en día es parte de Colombia y Venezuela. Sin embargo, para la época de conquista e inicio de la colonia *T. cacao* L. ya era conocido e incluso cultivado en la parte norte de Suramérica y centro de América lo que hoy es México (Agrosavia, 2023).

Conquistadores y colonizadores conocieron el cacao y posteriormente lo llevaron a España como uno de los trofeos en aquella conquista de dicha región del mundo y a la aristocracia española le llamo tanto la atención que se podría decir que la primera exportación de

cacao a Europa se hizo en 1.580 con cargamento proveniente de Norte de Santander (Agrosavia,2023).

El grano de cacao es reconocido a nivel mundial por su excelencia en sabor y aroma, lo que ha generado una alta demanda por parte de empresas chocolateras en América y Europa. Este grano no solo se utiliza para la elaboración de chocolate, sino también en la producción de diversos subproductos, incluyendo dulces, bebidas alcohólicas, cosméticos, perfumes y aplicaciones medicinales (Martínez, 2005).

Para obtener estos productos, los granos de cacao son sometidos a un proceso de tostado que se realiza en equipos de tambor. Este proceso se lleva a cabo a temperaturas que oscilan entre 110 y 150°C, durante un periodo que varía de 20 minutos a 2 horas, hasta que el contenido de agua y la actividad de agua se reducen aproximadamente al 1% y 0,2%, respectivamente (Rojas et al., 2022b). Sin embargo, otras investigaciones indican que el grado de tostado puede variar considerablemente, no solo en el tiempo, que puede ir de 5 a 120 minutos, sino también en la temperatura, que se sitúa entre 120 y 150°C (Żyżelewicz et al., 2016). A pesar de la importancia de este proceso, se evidencia una notable falta de estudios en la modelización matemática del proceso de torrefacción del cacao. En particular, hay escasa información bibliográfica disponible sobre el proceso de tostado del cacao (Rojas, 2020).

Es importante destacar que este proceso de tostado puede dar lugar a la formación de compuestos neoformados NFC que son comunes en alimentos expuestos a altas temperaturas. Entre estos contaminantes se incluyen los productos generados por la reacción de Maillard, la reducción de azúcares, la degradación térmica de polifenoles y la oxidación de lípidos. Ejemplos de NFC son la acrilamida, el furano, el alcohol furfurílico y el hidroximetilfurfural, los cuales han sido asociados con posibles efectos neoplásicos (Medina et al., 2024).

En este contexto en estudios realizados por Akillioglu & Gökmen (2014), se inoculó levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en café para la reducción del contenido de HMF y acrilamida, obteniendo una disminución del 99,2 % de HMF y 62% para la acrilamida.

Metodología

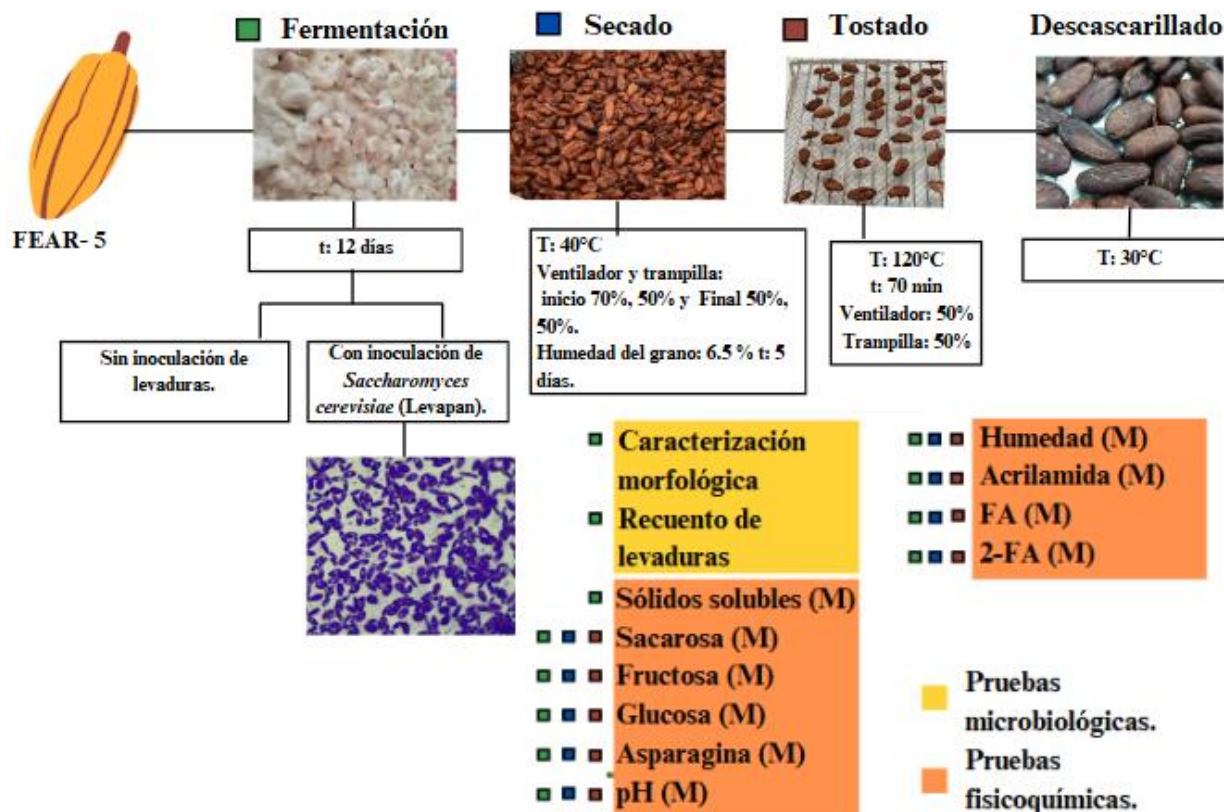
Localización

Los estudios para la investigación se llevaron a cabo en los laboratorios de microbiología, bromatología, análisis de alimentos, así como en la planta piloto de la Universidad Surcolombiana (Neiva).

Diseño experimental

La investigación se desarrolló bajo un diseño completamente al azar (DCA) con dos tratamientos: uno de control, sin levaduras (T1), y otro con la adición de *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) (T2), cada tratamiento fue llevado a cabo por triplicado, conformado cada replica por 4 frascos, siendo un total de 12 frascos por cada tratamiento. Las variables respuesta consideradas fueron catalogadas dentro del componente microbiológico y fisicoquímico, determinadas en diferentes etapas de procesamiento como se evidencia en la figura 2.

Figura 2. Variables evaluadas en los componentes microbiológicos y fisicoquímicos durante los procesos de fermentación, secado y tostado del cacao.



Materia prima

Se llevó a cabo la recolección y selección de 140 mazorcas de cacao en estado de maduración, libres de enfermedades y perforaciones por insectos. Estas mazorcas pertenecen a la variedad FEAR-5 y fueron obtenidas de la finca La Maloka, ubicada en la vereda El Guadual, municipio de Rivera, Huila, Colombia a 800 msnm. Posteriormente, la materia prima fue trasladada a instalaciones del Laboratorio de Bromatología del Programa Ingeniería Agrícola de la Universidad Surcolombiana, se llevó a cabo el lavado de las mazorcas, y luego se sumergieron durante tres minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Posteriormente, se realizó un segundo lavado con agua. Se utilizó material cortopunzante para la apertura de las mazorcas, y

luego se procedió a desgranar. Finalmente, se depositaron 750 g de cacao en cada frasco de vidrio de 1000 mL dejando un espacio de cabeza aproximadamente 1/4 en donde transcurrió la fermentación de la materia prima durante 12 días en una cámara de vida útil (Thermo Scientific, España), bajo las siguientes condiciones: entre las 0 y las 24 horas, la temperatura se mantuvo a 30°C; entre las 24 y 48 horas, a 35°C; de las 48 a las 72 horas, a 45°C; y, finalmente, a 50°C desde las 72 horas hasta la finalización del proceso. Adicionalmente, para el T2 se inoculó *Saccharomyces cerevisiae* en el tiempo 0 de fermentación.

Preparación medio de cultivo

Se preparó un medio líquido utilizando agua de peptona (Agua de Peptona Tamponada ISO 6579, Merck, Alemania) con una dosificación de 25,5 g por L de agua destilada. La mezcla se disolvió en un frasco de 1.000 mL mediante un dispensador y se distribuyó en tubos de ensayo, alcanzando un volumen de 9 mL, y en Erlenmeyer, hasta un volumen de 90 mL. Posteriormente, el material preparado se autoclavó durante 20 minutos. Tras el proceso de esterilización (temperatura de 121°C a 15 psi), se dejó enfriar y se almacenó en refrigeración a 4°C.

Cinética de crecimiento

Se llevó a cabo cinética de crecimiento para determinar las diferentes fases de crecimiento de la levadura respecto al tiempo, la cual representa la fase metabólica óptima del microorganismo para su incorporación en la masa de fermentación. Se tomaron muestras de los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) y (LALCAFE BASIC - LALLEMAND) aislada de café que habían sido previamente activados en agua de peptona y luego incubados durante 24 horas en una incubadora Shaker (Tecnal- TE-4200, Colombia) a 30°C y 90 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente, se midió la densidad óptica de las muestras

utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, España) a una longitud de onda de 600 nm. Las mediciones se realizaron a intervalos de 2, 4, 6, 8, 24, 28, 32 y 48 horas.

Preparación agar guarapo

Para la preparación del medio sólido, se utilizó la centrifuga (Orto alresa, Biocen-22-R, España) para procesar 10 L de jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) bajo condiciones de 7000 fuerza centrífuga relativa (FCR) y a una temperatura de 24°C. Posteriormente, se filtró con papel para eliminar los residuos, se almacenó en bolsas Ziploc y, finalmente, se trasladó al ultracongelador (Haier, China) para prevenir la fermentación de la materia prima.

Posteriormente, se tomó el jugo de caña de azúcar y se le agregó agar-agar. La relación utilizada para la preparación fue de 20 g de agar-agar por L de jugo de caña de azúcar, luego, se llevó la mezcla al microondas (Panasonic Latin America, S.A.) hasta alcanzar el punto de ebullición. Consecutivamente, hasta al alcanzar una temperatura entre 45-50°C se procedió a verter la preparación en cajas de Petri, usando un volumen de 30 mL por placa, para un total de 144 placas. Se dejó enfriar, solidificar, y se refrigeraron a 4°C hasta su uso para siembra.

Inoculación *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación de cacao

Para la activación se añadieron 0,2576 g de *Saccharomyces cerevisiae* en 600 mL de jugo de caña de azúcar que había sido previamente filtrado y centrifugado. La mezcla se incubó en una incubadora Shaker (Tecnal- TE-4200, Colombia) durante 24 horas, a una temperatura de 30°C y a 90 rpm. Pasado las 24 horas se procedió a realizar dos lavados consecutivos de las células mediante centrifugación, eliminación del sobrenadante y suspensión de estas en agua potable. Finalmente, se resuspendió en agua y fue adicionado el cultivo iniciador en masa de granos de cacao recién obtenidas de las mazorcas cosechadas. Los microorganismos fueron

dispensados en los frascos correspondientes al T2. Tras completar esta actividad, se agitó cada frasco para lograr una mayor homogenización.

Secado

Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación en un horno de la (Thermo Scientific, España), a una temperatura constante de 40°C. Inicialmente, se ajustaron las condiciones del ventilador al 70% y de la trampilla al 50%. Al final del secado, se modificaron estas condiciones, dejando ambos ajustes (ventilador y trampilla) al 50%. El secado continuó hasta alcanzar un contenido de humedad del 6,5% en el grano.

Análisis microbiológico

Al inicio y al final de la fermentación de los tratamientos planteados, se tomó una muestra de 10 g en bolsa estéril, a la que se le adicionó 90 mL de agua de peptona, se homogenizó en Stomacher, luego se tomó muestra de 1 mL, se hicieron diluciones seriadas y siembra de 100 ul en superficie de agar guarapo. Las placas se llevaron a incubar a 30°C en aerobiosis. Se llevó a cabo el recuento de células viables a las 24 y 48 horas.

Tueste

Los granos de cacao se almacenaron en bolsas Ziploc durante una semana en un lugar fresco, dentro de cajas de icopor, para facilitar su estabilización. Se clasificaron en dos categorías: granos planos y ovalados. Aquellos que compartían características similares se tostaron en lotes de 200 g, midiendo la humedad y la densidad aparente antes y después del proceso.

Los granos se dispusieron en una capa uniforme en mallas de acero galvanizado de 1 cm x 1 cm y se tostaron en horno a 120°C durante 70 minutos, con una apertura del 50% en ventanillas y trampillas. La temperatura ambiente y humedad relativa durante el tueste fue de

$25,8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa promedio de $53,4 \pm 5,4 \%$. El cacao tostado se descascarilló al alcanzar aproximadamente 30°C .

Potencial de Hidrogeniones (pH).

El potencial de hidrogeno fue determinado de forma directa en las muestras de cacao y en el mucilago con la ayuda de un potenciómetro digital (OHAUS).

Solidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$)

Se determinó la cantidad de solidos solubles usando un refractómetro digital (Milwaukee).

Tinción simple

La actividad consistió en depositar una gota destilada en un portaobjeto limpio y desengrasado, utilizando un asa de platino, se tomó una muestra de la colonia para su posterior examen. La muestra se extendió uniformemente sobre la gota de agua destilada y se pasó rápidamente por la llama de un mechero para fijar la muestra, y luego se dejó enfriar. Posteriormente, se aplicó violeta de genciana sobre la preparación durante un minuto. Transcurrido este tiempo, se enjuagó con agua destilada para eliminar el exceso de reactivo. Finalmente, la preparación se observó en microscopio.

Tinción de esporas

Se realizó tinción de esporas utilizando azul de lactofenol. La actividad consistió inicialmente en realizar una caracterización macroscópica del hongo, que incluyó la identificación de tonalidades, textura y la medición del diámetro de la colonia. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización microscópica. Para ello, se preparó un portaobjetos limpio y desengrasado, al que se añadieron dos gotas de azul de lactofenol. Posteriormente, se tomó una muestra de la colonia utilizando cinta adhesiva, la cual se colocó sobre las gotas de azul de

lactofenol en la superficie del portaobjetos. Finalmente, la preparación se observó en microscopio.

Determinación de azúcares (fructosa, sacarosa, glucosa)

Según lo descrito por Bertuzzi et al. (2018), la extracción de muestras se llevó a cabo pesando 0,5 g de cacao, que se homogenizó en un tubo de centrifuga y se mezcló con 50 mL de acetonitrilo al 80% (v/v). La mezcla se sometió a un baño de ultrasonido a 80°C durante 10 minutos y, posteriormente, se centrifugó. El sobrenadante se filtró y se transfirió a viales utilizando filtros de jeringa de 0,22 µm.

Se utilizó cromatografía UPLC con una columna C18 (tamaño de partícula: 2,5 µm, longitud: 100 mm y diámetro interno: 2,1 mm) a un caudal de 0,2 mL/min. La fase móvil consistió en un solvente A de formato de amonio (NH_4CO_2) 8 mM y un solvente B de acetonitrilo.

Las condiciones cromatográficas UPLC para la cuantificación de azúcares se establecieron de la siguiente manera: se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH (Amide 1.7 µm, Waters Corporation), manteniendo la temperatura de la columna a 15°C y un flujo de 0,2 mL/min. La fase móvil consistió en dos solventes: A, una solución de formato de amonio (NH_4CO_2) a 8 mM, y B, acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%. A los 0 a 5 minutos, se realizó una rampa de 25% al 55% del solvente A; de 5 a 7 minutos, un incremento del 55% al 77% de A; de 7 a 8 minutos, una reducción del 70% al 25% de A; y finalmente, de 8 a 12 minutos, un mantenimiento constante del 25% de solvente A para acondicionar la columna para la siguiente corrida. El modo de adquisición fue MRM (Monitoring Reaction Multiple) para las tres moléculas. El espectrómetro de masas en tándem se configuro en ionización por electrospray (ESI) en modo negativo para la cuantificación de glucosa y fructosa y en ESI positivo para la

sacarosa. El voltaje capilar de pulverización fue de 0.15 kV, con un flujo de gas de desolvatación de 700 L/h y una temperatura de fuente de 350°C. En cuanto a la cuantificación de fructosa, se emplearon los iones moleculares $[M+NH_4^+]$ m/z 224.97 >> 88.94, 113.00 (cuantificación) y 178.96 (identificación); con energías de colisión de 18 V, 26 V y 8 V, y un voltaje de cono de 20 V. Para la glucosa, se utilizó $[M+NH_4^+]$ m/z 225.10 >> 89.06, 119.00 (cuantificación) y 179.09 (identificación); con energías de colisión de 16 V, 20 V y 8 V, y un voltaje de cono de 20 V.

Finalmente, para la sacarosa, la relación de masas de fragmentación se obtuvo a partir del ion $[M+H]$ (365 m/z), generando fragmentos a 185 y 203 m/z , con un voltaje de cono de 10 V y energías de colisión de 22 V y 20 V.

Determinación de asparagina.

De acuerdo con la metodología adaptada de Bertuzzi et al. (2018), se preparó la muestra pesando 500 mg de cacao molido en un tubo Falcon de 50 mL. Luego, se añadieron 25 mL de ácido fórmico al 0,2% (v/v), y la mezcla se agitó en un agitador KS 4000i Control (IKA, Staufen, Alemania) durante 45 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, se realizó una dilución de 1 mL de la muestra en 9 mL de una solución de acetonitrilo: agua (90:10), la cual fue centrifugada en una centrifugadora Bioprocen 22 R (Orto Alresa, Madrid, España). El sobrenadante se filtró y se transfirió a viales utilizando filtros de jeringa de 0,22 μ m.

Para el análisis, se empleó una columna X-Select HSS T3 (tamaño de partícula de 2,5 μ m, 150 \times 2,1 mm de diámetro interno, Waters Corporation) con un flujo de 0,2 mL/min. La fase móvil consistió en: A) agua con 0,2% de ácido fórmico y B) acetonitrilo con 0,2% de ácido fórmico, utilizando un gradiente de elución que consistió en 100% del solvente A durante 2,5 minutos; un gradiente lineal al 15% de solvente B en 0,5 minutos, seguido de un periodo

isocrático de 1 minuto. El tiempo total de corrida fue de 10 minutos, incluyendo un condicionamiento de la columna de 7 minutos.

Para el detector MS/MS, se utilizó el modo ESI positivo con un voltaje capilar de pulverización de 3,5 kV. La presión del gas envolvente y auxiliar se estableció en 35 y 12 psi, respectivamente, y la temperatura del capilar se fijó en 270°C. La fragmentación de los iones $[M + H]^+$ (133 m/z) se realizó con una presión de colisión de argón de 1,5 mTorr y una energía de colisión de 15 V, generando fragmentos a 88 y 46 m/z.

Determinación de acrilamida

Se preparó una solución madre de estándar de acrilamida (AA) a 1.000 mg/L, pesando 25 mg del estándar y enrasando con 25 mL de agua tipo I. Para la acrilamida-d3 (AA-d3) a una concentración de 10 mg/L, se tomaron 20 μ L y se diluyeron en 10 mL de agua (Medina et al., 2024).

El extracto de las muestras se obtuvo pesando 500 mg de cacao tostado, al que se le adicionó 1 mL de la solución madre de AA-d3. Se agitó durante 5 minutos en un vórtex (Thermo Scientific, Madrid, España) a 2500 rpm. Luego, se añadieron 4 mL de agua tipo I y se agitó nuevamente. Luego, se adicionaron 5 mL de diclorometano y se centrifugó en una centrífuga Bioprocen 22 R (Orto Alresa, Madrid, España) a 7000 G durante 5 minutos.

Se tomaron 4 mL del sobrenadante obtenido y se mezclaron con 5 mL de acetonitrilo y 2 g de NaCl, agitando durante 5 minutos en un vórtex (Thermo Scientific, Madrid, España) a 3000 rpm. Posteriormente, se tomó 4 mL del sobrenadante y se dispensaron en un tubo que contenía 1200 mg de $MgSO_4$ y 400 mg de PSA, agitándose durante 5 minutos en un vórtex (Thermo Scientific, Madrid, España) a 2500 rpm. Luego, se centrifugó nuevamente a 7000 G durante 5

minutos en la centrífuga Bioprocen 22 R (Orto Alresa, Madrid, España). El sobrenadante se filtró y se transfirió a viales mediante filtros de jeringa de 0,22 μm (Medina-Orjuela et al., 2024).

Las determinaciones se realizaron en un Acquity UPLC H Class Plus (Waters Corporation, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolos en tándem MS/MS Xevo TQ-S micro (Waters Corporation, Estados Unidos). La columna utilizada fue una Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm x 100 mm, 1,8 μm) (Waters Corporation, Estados Unidos) a 30°C, con un flujo de 0,2 mL/min y una fase móvil compuesta por: A) 0,1% de ácido fórmico en agua y B) 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo, con un tiempo de corrida de 7 minutos.

Las condiciones de la fuente de electrospray fueron un voltaje capilar de 0,5 kV, con una temperatura de la fuente y del gas envolvente de 150°C y 500°C, respectivamente. El flujo de gas de desolvatación y del cono fue de 1000 L/h y 50 L/h, respectivamente. Los iones precursores $[M+H]^+$ para la acrilamida fueron m/z 72,8616 > 44,9627, 55,8925, con un voltaje de cono de 20 V y voltajes de colisión de 8 V y 14 V, respectivamente. Para la acrilamida-d3, los iones precursores fueron m/z 75.0000 > 32.9900, 58.1000, con un voltaje de cono de 24 V y voltajes de colisión de 8 V y 10 V.

Determinación de FFA y FA

En cuanto al extracto, se preparó a 40.000 mg/L utilizando 200 mg de cacao tostado y molido, el cual se homogeneizó en 5 mL de agua tipo I. La clarificación se llevó a cabo mediante un tratamiento con Carrez, añadiendo 0,75 mL de Carrez I (15 g de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada tipo I) y Carrez II (30 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada tipo I). La mezcla se agitó durante 30 segundos en un vortex y se centrifugó a 7500 G durante 10 minutos (Albouchi & Murkovic, 2019a). Finalmente, se separó el sobrenadante y se transfirió a viales mediante filtros de jeringa de nylon de 0,22 μm .

El análisis se realizó en un cromatógrafo de alta precisión serie 1200 (Agilent Technologies, EE. UU.) acoplado a un detector de arreglo de diodos, utilizando una columna PROTECOL C8 H de 125 mm x 4,6 mm (Macherey Nagel, Alemania). La temperatura del horno se mantuvo a 30°C y el volumen de inyección fue de 20 µL. La fase móvil consistió en un 80% de ácido acético al 0,1% en agua (A) y un 20% de metanol (B), operando de forma isocrática durante 15 minutos a un flujo de 1 mL/min. Las longitudes de onda utilizadas para la cuantificación de FFA y FA fueron 284 nm, 217 nm y 250 nm, respectivamente (Albouchi & Murkovic, 2019b)

Análisis estadístico

Los datos de glucosa, fructosa, sacarosa, asparagina, acrilamida, alcohol furfurílico y ácido furoico fueron analizados mediante un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95%. Posteriormente, se aplicó el método LSD de Fisher para identificar diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados y Discusión

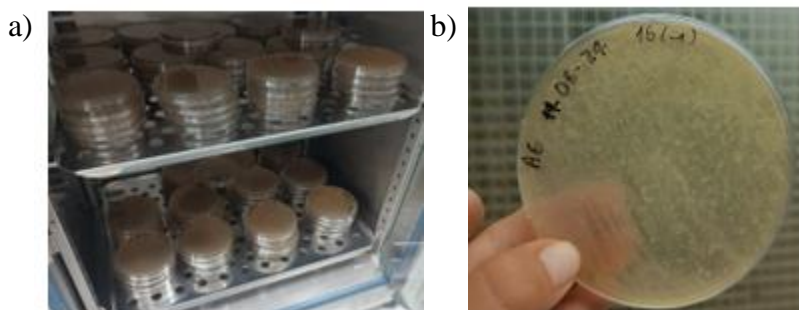
Evaluación medio de cultivo

El medio de cultivo, compuesto por agar con jugo de caña de azúcar, favoreció el crecimiento de levaduras (Figura 2). Esto está respaldado por lo que indican (Solomon & Singh, 2009), quienes señalan que el pH ácido del jugo de caña, que oscila entre 5,0 y 5,5, promueve el desarrollo de microorganismos acidófilos, incluidas levaduras y bacterias ácido lácticas.

Además, se observó la proliferación del género *Aspergillus*. Las observaciones microscópicas y las mediciones realizadas confirmaron que las estructuras observadas correspondían a levaduras.

Figura 3.

Medio solido de jugo de caña de azúcar previamente incubadas. a) Incubación de los tratamientos T1 y T2 a 30°C en el tiempo inicial de fermentación, b) Recuento de las colonias en la placa después de 48 horas de incubación.



Fuente: Propia

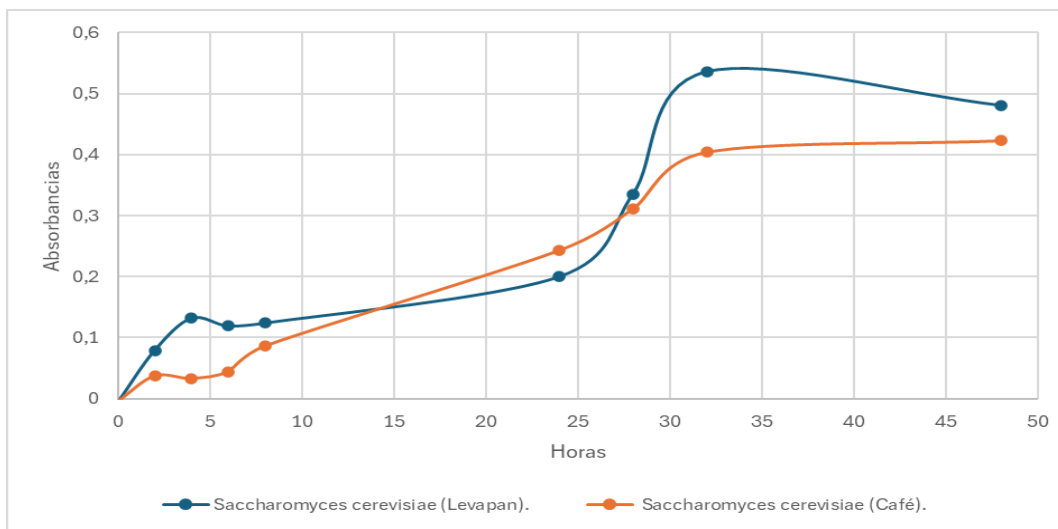
Cinética de crecimiento de la levadura para la inoculación en la fermentación del cacao

Para la selección del microorganismo, se evaluó el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) para uso de panificación y *Saccharomyces cerevisiae* aislada de café

mediante mediciones de densidad óptica a 600 nm en intervalos de 2, 4, 6, 8, 24, 28, 32 y 48 horas. A partir de las 8 horas, se identificó un incremento lento en ambos microorganismos, correspondiente a la fase estacionaria del crecimiento (Figura 3). Posteriormente, se observó un crecimiento exponencial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) entre las 24 y 32 horas, alcanzando una absorbancia de 0,536, en comparación con la levadura aislada de café. Después de las 32 horas, se pudo identificar la fase de latencia. Con base en estos resultados, se seleccionó *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) para inocularla en el proceso de fermentación de cacao del presente estudio.

Figura 4.

Cinética de crecimiento de Saccharomyces cerevisiae (Levapan) y Saccharomyces cerevisiae (Aislada de café) mediante espectrofotometría.



Fuente: Propia

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en la calidad del cacao durante la etapa de fermentación (Nielsen & Arneborg, 2007, Schwan et al., 1995; Schwan et al., 1997). En este proceso, *Saccharomyces cerevisiae* se destaca por sus características importantes, como

su tolerancia al etanol y a altas temperaturas, lo que la convierte en un organismo eficiente en la metabolización de carbohidratos. Además, esta levadura tiene una notable capacidad para crecer en ambientes tanto aeróbicos como anaeróbicos (Meersman et al., 2015).

El predominio de *Saccharomyces cerevisiae* en el proceso de fermentación se debe a su habilidad para prosperar a un pH ligeramente más alto, así como a su actividad pectinolítica y su resistencia al etanol y al calor (Heide et al., 2009). Esta levadura no solo aumenta la eficiencia de la fermentación, sino que también minimiza el deterioro del grano y mejora el perfil sensorial del producto final. Estas ventajas han llevado a su amplia implementación en la industria (Steensels & Verstrepen, 2014).

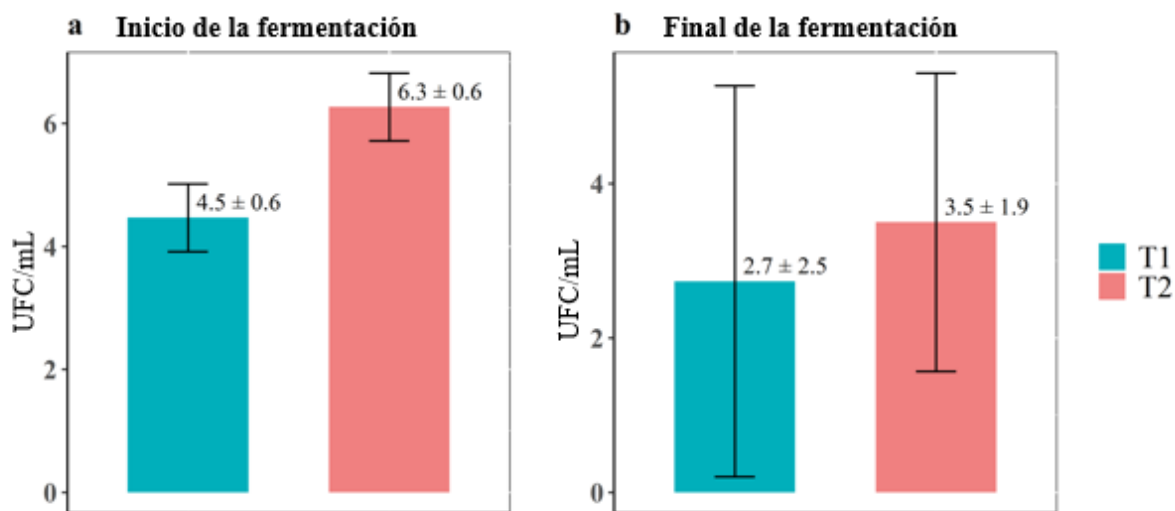
En un estudio realizado por Batista et al. (2015), se investigó la inoculación de tres especies de levaduras, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*. Los resultados mostraron que *Saccharomyces cerevisiae* predominó durante las fermentaciones espontáneas, subrayando su relevancia en el proceso fermentativo del cacao.

Recuento de células viables cultivables

Se observó un aumento en la población de microorganismos en el tratamiento T2 en comparación con el tratamiento T1 (Figura 5). Sin embargo, los datos del recuento de células viables cultivables indican una reducción en esta población al finalizar la fermentación, lo que está relacionado con su dependencia de azúcares simples como la glucosa y la fructosa, que utilizan como fuente de energía.

Figura 5.

Resultados recuento de levaduras durante la fermentación.



Fuente: Propia

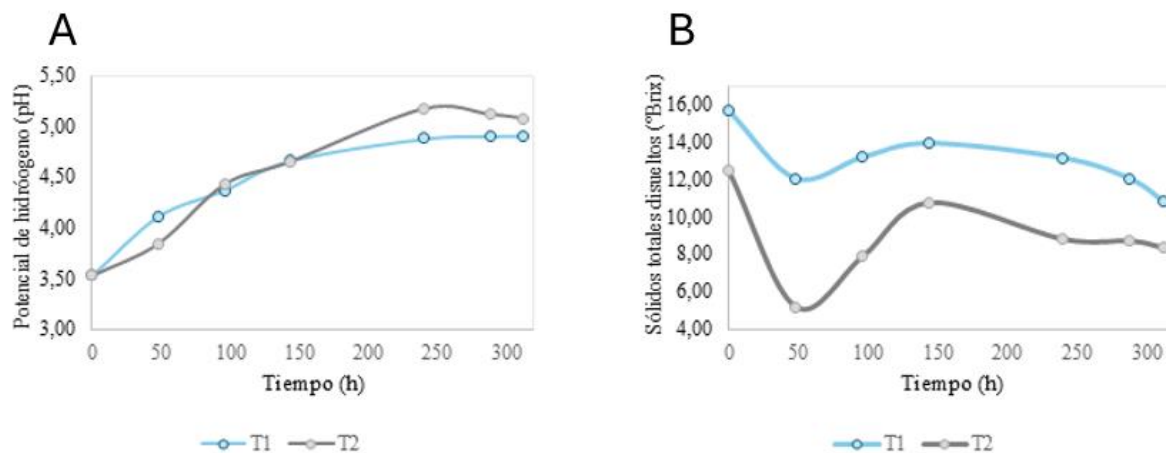
Durante las etapas iniciales de la fermentación del cacao, se produce una proliferación de levaduras. Sin embargo, esta población tiende a disminuir a lo largo del proceso debido a varios factores, como la prolongada actividad fermentativa, el aumento del pH, la presencia de etanol, la conversión de ácido acético y el incremento de la temperatura (Rodríguez et al., 2022). Otro factor involucrado en la disminución de población microbiana es por el bajo porcentaje de azúcares fermentables en el medio como fructosa, glucosa y sacarosa finalizando la fermentación (Warren et al., 2020; Moreno et al., 2018).

Evolución del pH y °Brix durante la fermentación

El pH tiene un impacto directo en el crecimiento y el proceso de fermentación de la levadura, así como en la composición de los productos resultantes de esta fermentación (Arroyo-López et al., 2009; Karasu & Ozbas, 2008; Nielsen & Arneborg, 2007). Los rangos de pH entre 4,00 y 5,00 favorecieron el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan) (Figura 6A), lo que concuerda con los hallazgos de Narendranath & Power (2005).

Figura 6.

Evolución del pH y °Brix durante la fermentación.



El rango óptimo de pH para el crecimiento de levaduras se establece entre 4,00 y 6,00, siendo influenciado por factores como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, el tipo de cultivo y la cepa de levadura utilizada.

En la Figura 6B, se puede observar que, durante el proceso de fermentación, los sólidos solubles (grados Brix) se encontraron inicialmente en un rango de 12 a 16; sin embargo, al finalizar el proceso, se registró una disminución significativa. Este descenso se relaciona con el aumento de las temperaturas y la disminución de la glucosa, factores que influyen tanto en el crecimiento como en la muerte de las levaduras durante la fase anaeróbica de la fermentación del cacao (Kouamé et al., 2021). Por lo tanto, a medida que disminuyen los sólidos solubles, se registra una reducción adicional en la población de microorganismos.

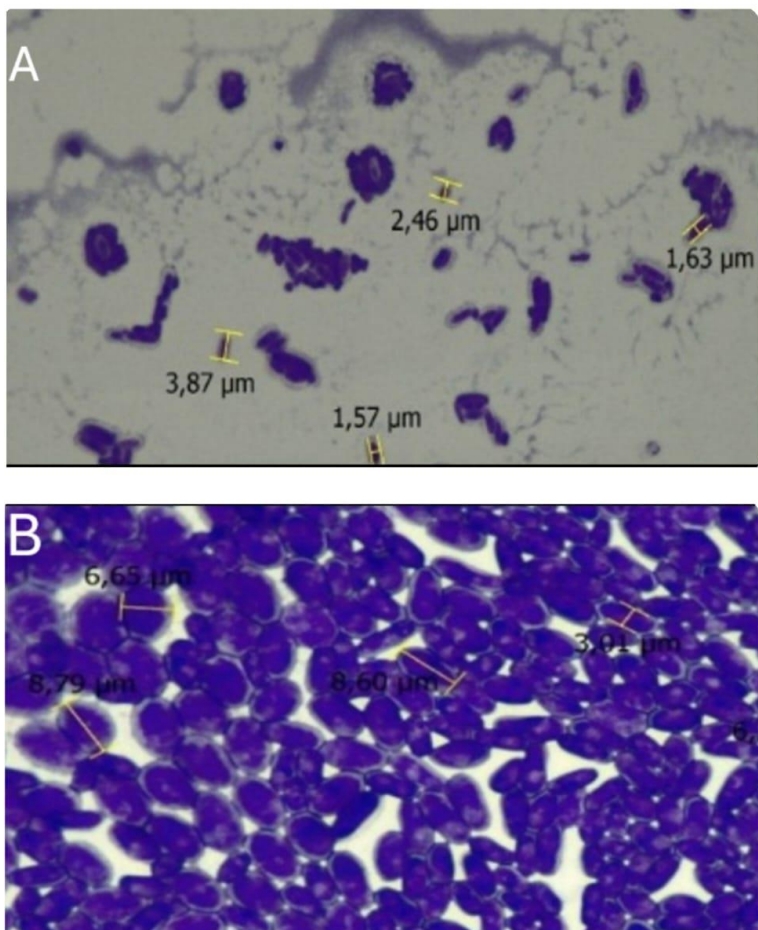
Según Vuyst & Weckx (2016) al inicio de la fermentación se produce una fase anaeróbica en la que las levaduras generan etanol a partir de los azúcares fermentables presentes en la pulpa de cacao.

Caracterización microbiológica de la fermentación del cacao

Se realizó la técnica de tinción simple, que permitió identificar colonias con tonalidades blanquecinas, formas cóncavas y ovaladas, con diámetros que variaron entre 1,59 μm y 8,79 μm . Las colonias observadas corresponden a las grampositivas (Figura 5).

Figura 5.

Observación macroscópica de levaduras en los tratamientos T1 y T2. A. Diámetro de las levaduras del tratamiento T1. B. Diámetro de las levaduras del tratamiento T2.



Fuente: Propia

Las imágenes (Figura 5) confirman la presencia de microorganismos del tipo 'levaduras' en ambos tratamientos. Esto indica que, al crecer en el medio, son viables y cultivables. El

microorganismo inoculado, *Saccharomyces cerevisiae* (Levapan), estuvo activo durante la fermentación, al igual que los microorganismos nativos."

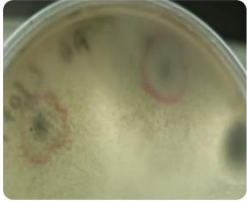
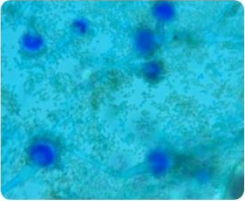

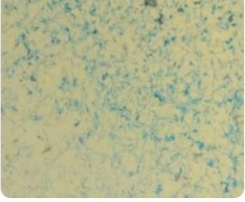
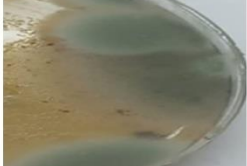
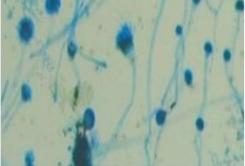
Tinción de esporas

La técnica de tinción de esporas permite observar microorganismos en función de su capacidad para retener o no determinadas sustancias colorantes, lo cual depende de la carga de la célula y del tipo de colorante utilizado Moreno & Albarracín (2012). En este estudio, se realizó una tinción de esporas con azul de lactofenol, seguido de una caracterización macroscópica y microscópica que permitió identificar el género *Aspergillus* utilizando claves de identificación de acuerdo con (Guevara, 2007). Esta identificación es especialmente relevante, ya que la presencia de hongos durante la fermentación del cacao se considera indeseable; su aparición suele estar relacionada con la formación de sabores desagradables, el deterioro del producto y la acumulación de micotoxinas (Copetti et al., 2010; Schwan & Wheals, 2004).

Las características observadas coincidieron con lo señalado por Samson et al. (2014), quienes indican que *Aspergillus* spp. produce conidios y presenta típicas cabezas conidiales (Tabla 1). Además, otros estudios realizados por Agyirifo et al. (2019) y Viesser et al. (2020) indican que durante la etapa de fermentación intervienen diversos microorganismos, entre los que se incluyen levaduras, bacterias lácticas (BAL), bacterias del ácido acético (BAA) y hongos.

Tabla 1.

Identificación género Aspergillus spp. en tratamiento T1.

Vista macroscópica	Vista microscópica (Objetivo10X)
	
	
	

Fuente. Propia

Análisis de precursores al inicio y final de la fermentación

En la Tabla 2, se presentan los resultados de la concentración de azúcares y asparagina, se puede afirmar que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la composición de sacarosa, fructosa y glucosa en el tratamiento T2 entre el inicio y el final de la fermentación. También se observaron diferencias en la concentración de fructosa entre los tratamientos T1 y T2 al finalizar la etapa de fermentación.

Tabla 2.

Concentración de azúcares y asparagina al inicio y final de la fermentación en grano.

Compuestos	Inicio		Final	
	T1	T2	T1	T2
Sacarosa (g/Kg)	2,09±1,42 ^{aA}	1,68±0,42 ^{aA}	0,02±0,001 ^{aA}	0,001± 0,001 ^{aB}
Fructosa (g/Kg)	1,07±0,63 ^{aA}	1,56±0,69 ^{aA}	0,78±0,02 ^{aA}	0,21±0,08 ^{bB}
Glucosa (g/Kg)	0,84 ±0,46 ^{aA}	1,15±0,52 ^{aA}	0,39±0,25 ^{Aa}	0,25±0,04 ^{aB}
Asparagina (mg/Kg)	67,98±12,18 ^{aA}	54,30±14,18 ^{aA}	53,19±3,32 ^{aA}	49,84±4,53 ^{aA}

Nota: Esta tabla presenta la concentración de sacarosa, fructosa, glucosa y asparagina al inicio y al final de la fermentación en grano. *Fuente.* Propia

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativamente ($P < 0.05$) entre tratamiento en cada una de las etapas.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre un mismo tratamiento al inicio y final de la fermentación.

Los datos presentados en la figura 6 reflejan un aumento de sólidos totales disueltos a partir de las 50 horas de fermentación. Este aumento puede asociarse a las levaduras hidrolizan disacáridos como la sacarosa, que se degrada en glucosa y fructosa. La disminución de la sacarosa, que se confirma en la tabla 3, está respaldada por estudios de (Brunetto et al. (2020); Megias et al. (2020); Rottiers et al. (2019) quienes indican que la sacarosa comienza a disminuir durante la fermentación debido a la presencia de invertasa endógena en el cotiledón. Como consecuencia, este compuesto se convierte en glucosa y fructosa.

Sin embargo, al final de la fermentación, se evidenció una disminución de fructosa y glucosa. Esto se debe a que estos compuestos son utilizados en el metabolismo de los microorganismos, especialmente las levaduras, como se muestra en la figura 5. Durante el

proceso de fermentación, se presenta un mayor contenido de fructosa en comparación con la glucosa. La glucosa se consume entre las 48 y 72 horas, mientras que la fructosa se consume después de las 120 horas (Viesser et al., 2021). Esto es atribuible a la presencia de microorganismos como levaduras y bacterias lácticas (BAL) (Herrera et al., 2021; Mota et al., 2018).

En cuanto al compuesto asparagina, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) durante la etapa de fermentación, sin embargo, se evidenció una disminución de este compuesto en la materia prima.

En investigaciones llevadas a cabo por (Brunetto et al., 2020) se observó que la asparagina, en relación con el tiempo de fermentación, tiene un efecto pequeño pero significativo en el contenido de azúcares reductores. Esto sugiere que la influencia del tiempo de fermentación sobre los azúcares reductores está directamente relacionada con los niveles de asparagina presentes en el sistema. Además, la levadura utiliza asparagina durante la fermentación para llevar a cabo su actividad metabólica.

Tabla 3.

Concentración de compuesto al inicio y final de la fermentación en mucilago.

Compuestos	Inicio		Final	
	T1	T2	T1	T2
Glucosa (g/Kg)	0,7±0,07 ^{aA}	1,38±0,23 ^{aA}	0,2±0,1 ^{aB}	0,21±0,12 ^{aB}
Fructosa (g/Kg)	1,73±0,39 ^{aA}	2,19±0,66 ^{bA}	0,22±0,11 ^{aB}	0,26±0,29 ^{aB}
Sacarosa (g/Kg)	4,04±2,91 ^{aA}	4,09±1,62 ^{aA}	0,01±0,02 ^{aB}	0,07±0,06 ^{aB}
Asparagina(mg/Kg)	24,99±6,63 ^{aA}	25,52±1,42 ^{aA}	23,55±5,37 ^{aA}	25,72±1,95 ^{aA}

Nota: Esta tabla presenta la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y asparagina al inicio y al final de la fermentación en mucilago. *Fuente.* Propia

Se realizó una evaluación de los compuestos al inicio y al final de la fermentación en grano y mucílago. En el mucílago, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos T1 y T2 al inicio de la fermentación. También, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa dentro del mismo tratamiento antes y después de la fermentación. Por otro lado, la asparagina no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La pulpa de cacao presenta un elevado contenido de azúcar, lo que crea un entorno favorable para que los microorganismos generen etanol y CO_2 a partir de la glucosa. Además, la pulpa acuosa genera condiciones anaeróbicas durante la fermentación en masa, lo que favorece el crecimiento de levaduras. En esta fase, el metabolismo de las levaduras influye en la fermentación de los carbohidratos, la producción de compuestos orgánicos volátiles y la hidrólisis de la pectina a través de la enzima pectinasa (Marwati et al., 2024). Se asume que los metabolitos generados durante la fermentación llegan al interior del grano de cacao.

Análisis de precursores en cacao seco y tostado

Los resultados obtenidos revelan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los procesos de secado y tostado en cuanto a los niveles de fructosa y asparagina (Tabla 4). Este hallazgo sugiere que las condiciones térmicas y de humedad influyen notablemente en la composición química de los productos. Mientras que la fructosa y la asparagina mostraron un comportamiento diferenciado, la glucosa presentó un patrón opuesto, lo que podría indicar interacciones complejas entre los azúcares y los aminoácidos durante los procesos de transformación.

Tabla 4.*Concentración de compuesto en secado y tostado.*

Compuestos	Seco		Tostado	
	T1	T2	T1	T2
Glucosa (g/Kg)	1,07±0,44 ^{aA}	0,51±0,15 ^{aA}	1,18±0,32 ^{aA}	0,81±1,01 ^{aA}
Fructosa (g/Kg)	1,12±0,97 ^{aA}	0,75±0,65 ^{aA}	1,69±0,83 ^{aB}	1,31±0,46 ^{aB}
Sacarosa (g/Kg)	0,21±0,3 ^{aA}	0,04±0,07 ^{aNS}	0±0 ^{nsB}	0±0 ^{NS}
Asparagina(mg/Kg)	32,66±1,84 ^{aA}	30,67±0,77 ^{aA}	16,41±2,14 ^{aB}	25,04±5,47 ^{aB}

Nota: Esta tabla presenta la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y asparagina al inicio y al final de la fermentación en mucilago. *Fuente.* Propia

La degradación total de la sacarosa observada durante el proceso de tostación coincide con las investigaciones previas (Clarke et al., 1997; Eggleston, 2006) que evidencian las altas temperaturas favorecen la hidrólisis de la sacarosa, transformándola en glucosa y fructosa en condiciones de pH ácido. Este fenómeno no solo subraya la importancia del control de temperatura en el procesamiento de alimentos, sino que también resalta la conexión entre la caramelización y la reacción de Maillard, que juega un papel crucial en el desarrollo del sabor y aroma en productos como el cacao.

Adicionalmente, según lo señalado por Tamimi et al. (2023), durante el proceso de tostación del cacao, se generan compuestos precursores de aroma, que incluyen aminoácidos y azúcares reductores. Estos compuestos se forman a partir de la hidrólisis de proteínas y sacarosa presentes en los granos de cacao.

Es relevante mencionar la relación entre la asparagina y los azúcares reductores en la formación de acrilamida. La literatura indica que, la asparagina libre y los azúcares reductores

son considerados los sustratos principales en la síntesis de acrilamida. Sin embargo, es importante destacar que la acrilamida también puede generarse a partir de la asparagina simple, en ausencia de azúcares, a través de reacciones como la descarboxilación y la desaminación a temperaturas elevadas (Granvogl & Schieberle, 2006). Este aspecto destaca la necesidad de un manejo cuidadoso de las condiciones de procesamiento para minimizar la formación de compuestos indeseables, mientras se busca maximizar el desarrollo de aromas y sabores deseables.

Formación de compuestos neoformados

En relación con el grano tostado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los compuestos neoformados asociados a ciertos peligros para la salud. Sin embargo, se observó una reducción del 59,6% en la concentración de acrilamida y del 22,1% en alcohol furfúrico, mientras que el ácido furoico mostró un aumento del 1,1% (Tabla 5). Este último se presentó en mayor cantidad en el tratamiento T2 (sin adición de levadura) en comparación con el tratamiento T1 (con adición de levadura), que registró concentraciones significativamente menores. Esto sugiere que la adición de *Saccharomyces cerevisiae* influye en la formación de acrilamida, ya sea reduciendo los precursores o interfiriendo en las vías de formación.

Tabla 5.

Concentración de compuesto AA, FFA Y FA en grano tostado.

Compuestos	T1	T2
AA (mg/Kg)	5,66±2 ^a	2,29±0,13 ^a
FFA (mg/Kg)	17,15±1,1 ^a	13,37±8,57 ^a
FA (mg/Kg)	11,97±8,1 ^a	14,13±3,7 ^a

Nota: Esta tabla presenta la concentración de acrilamida (AA), alcohol furfurílico (FFA), Ácido furoico (FA) en grano tostado. *Fuente.* Propia

Respecto a los otros dos compuestos, el alcohol furfurílico y el ácido furoico, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Esto podría indicar que las levaduras no afectan los precursores más relevantes para la formación de estos compuestos.

Se considera que las principales vías de formación de acrilamida durante el procesamiento de alimentos están relacionadas con la asparagina (Guo et al., 2024). Estas vías se refieren a alimentos que contienen un alto porcentaje de carbohidratos, principalmente en forma de azúcares reductores, y proteínas ricas en asparagina. Cuando estos alimentos se deshidratan, pueden formar bases de Schiff inestables a temperaturas de cocción superiores a 120°C (Nematollahi et al., 2021).

El alcohol furfurílico se encuentra en diversas fuentes naturales, como frutas, café, té y cacao. Este compuesto se genera durante la hidrólisis ácida o el calentamiento de polisacáridos que contienen hexosas o pentosas. Se han reportado concentraciones más altas de alcohol furfurílico en cacao y café, con niveles que oscilan entre 55 y 255 mg/kg (Petisca et al., 2014)

Conclusiones

La prueba piloto utilizando un medio sólido (agar con jugo de caña de azúcar) favoreció el crecimiento de microorganismos nativos y de *Saccharomyces cerevisiae*.

La inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación logró una reducción de los compuestos neoformados en el cacao tostado del 59,6% en la acrilamida y del 22,1% en el alcohol furfurílico. Estos resultados son muy positivos, ya que se mitiga la presencia de estos compuestos tanto para la inocuidad como la calidad del producto final.

La *Saccharomyces cerevisiae* utiliza la glucosa como su principal fuente de energía durante la fermentación. Los resultados indican una disminución de este precursor tanto al inicio como al final del proceso de fermentación. Además, se observa una reducción de la sacarosa, ya que esta se hidroliza casi por completo a fructosa y glucosa mediante la acción de la enzima invertasa. Esto resulta en un aumento de las concentraciones de los precursores (glucosa y fructosa), que son metabolizados por la microbiota presente en la matriz.

Recomendaciones

Exploración del uso de diversas cepas de levaduras durante la inoculación en la fermentación del cacao, evaluando y comparando los porcentajes de reducción de compuestos neoformados en el proceso de tostación de la materia prima.

Desarrollo de un análisis sensorial para evaluar la eficiencia de *Saccharomyces cerevisiae* en relación con los sabores y aromas característicos del cacao.

Evaluación de diferentes clones representativos del departamento del Huila mediante la inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación, con el propósito de analizar las variaciones en la reducción de compuestos neoformados en el cacao tostado.

Referencias Bibliográficas

- Abbott, P. C. , Benjamin, T. J., Burniske, G. R., Croft, M. M., Fenton, M., Kelly, C. R., Lundy, M., Rodriguez Camayo, F., & Wilcox M.D. (2018). *Análisis de la cadena productiva del cacao en Colombia*.
https://www.researchgate.net/publication/331155301_Analisis_de_la_Cadena_Productiva_d_el_Cacao_en_Colombia
- Agyirifo, D. S., Wamalwa, M., Otwe, E. P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., & Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*, 5(7).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170>
- Akillioglu, H. G., & Gökmen, V. (2014). Mitigation of acrylamide and hydroxymethyl furfural in instant coffee by yeast fermentation. *Food Research International*, 61.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.057>
- Albouchi, A., & Murkovic, M. (2019a). LC method for the direct and simultaneous determination of four major furan derivatives in coffee grounds and brews. *Journal of Separation Science*, 42(9), 1695–1701. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900061>
- Albouchi, A., & Murkovic, M. (2019b). LC method for the direct and simultaneous determination of four major furan derivatives in coffee grounds and brews. *Journal of Separation Science*, 42(9). <https://doi.org/10.1002/jssc.201900061>
- Albouchi, A., & Murkovic, M. (2020). Investigation on the mitigation effects of furfuryl alcohol and 5-hydroxymethylfurfural and their carboxylic acid derivatives in coffee and coffee-related model systems. *Food Research International*, 137.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109444>

- Anese, M., Quarta, B., Peloux, L., & Calligaris, S. (2011). Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. *Food Research International*, *44*(9), 2837–2842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.025>
- Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Arevalo, M., González, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya, P. (2017). *Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas*. www.iica.int.
- Arroyo-López, F. N., Orlic, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, *131*(2–3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>
- Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT*, *63*(1), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- Becalski, A., Halldorson, T., Hayward, S., & Roscoe, V. (2016). Furan, 2-methylfuran and 3-methylfuran in coffee on the Canadian market. *Journal of Food Composition and Analysis*, *47*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.01.006>
- Bertuzzi, T., Martinelli, E., Mulazzi, A., & Rastelli, S. (2020). Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. *Food Chemistry*, *303*, 125372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125372>

- Bertuzzi, T., Mulazzi, A., Rastelli, S., Sala, L., & Pietri, A. (2018). Mitigation measures for acrylamide reduction in dough-based potato snacks during their expansion by frying. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(10), 1940–1947. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1512757>
- Brunetto, M. D. R., Galignani de Bernardi, M. A., Orozco Contreras, W. J., Clavijo Roa, S. D. S., Delgado Cayama, Y. J., Ayala Montilla, C. D., & Zambrano García, A. (2020). RP-HPLC-DAD determination of free amino acids in cocoa samples during fermentation and roasting. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 11–19. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v1n49.77811>
- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT*, 44(4), 793–810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>
- Ciesarová, Z. (2016). Impact of l-Asparaginase on Acrylamide Content in Fried Potato and Bakery Products. In *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. National Agricultural and Food Centre / VUP Food Research Institute Bratislava, Slovakia · Department of Chemistry and Analysis of Foods. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00021-8>
- Clarke, M. A., Edey, L. A., & Eggleston~, G. (1997). Sucrose decomposition in aqueous solution, and losses in sugar manufacture and refining. In *ADVANCES IN CARBOHYDRATE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY* (Vol. 52). Sugar Processing Research Insritute, Inc.
- Copetti, M. V., Pereira, J. L., Iamanaka, B. T., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2010). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International*

Journal of Food Microbiology, 143(1–2), 67–70.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031>

De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 121, Issue 1, pp. 5–17). <https://doi.org/10.1111/jam.13045>

Eggleston, G. (2006). Reasons for the chemical destruction of sugars during the processing of sugarcane for raw sugar and fuel alcohol production. In *Article in International Sugar Journal*. <https://www.researchgate.net/publication/286488219>

El Salous, A., Angulo-González, A., & Solís Flores, L. (2019). Acceleration of cocoa fermentation through the action of bacteria (*Acetobacter aceti*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Espirales Revista Multidisciplinaria de Investigación*, 3(28), 1–20.

<https://doi.org/10.31876/er.v3i28.572>

Granvogl, M., & Schieberle, P. (2006). Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5933–5938. <https://doi.org/10.1021/jf061150h>

Guevara Robles, M. (2007). *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas*.

www.ins.gob.pe

Guo, Z., Feng, X., He, G., Yang, H., Zhong, T., Xiao, Y., & Yu, X. (2024). Using bioactive compounds to mitigate the formation of typical chemical contaminants generated during the thermal processing of different food matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(5), e13409. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13409>

- Heide-Marie, D., Vrancken, G., Takrama, J., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9(5), 774–783. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- Herrera, F., Cala, M. P., Aguirre Mejía, J. L., Rodríguez-López, C. M., Chica, M. J., Olarte, H. H., Fernández-Niño, M., & Gonzalez Barrios, A. F. (2021). Dissecting fine-flavor cocoa bean fermentation through metabolomics analysis to break down the current metabolic paradigm. *Scientific Reports*, 11(1), 21904. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01427-8>
- Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), 928–943. <https://doi.org/10.1021/jf60015a004>
- Huang, Y., & Barringer, S. A. (2011). Monitoring of Cocoa Volatiles Produced during Roasting by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science*, 76(2), C279-86. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01984.x>
- IARC, & WHO. (1994). Some industrial chemicals. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. (Vol. 60).
- Islam, M. N., Khalil, M. I., Islam, M. A., & Gan, S. H. (2014). Toxic compounds in honey. In *Journal of Applied Toxicology* (Vol. 34, Issue 7, pp. 733–742). <https://doi.org/10.1002/jat.2952>
- Janek, K., Niewianda, A., Wöstemeyer, J., & Voigt, J. (2016). Dataset of cocoa aspartic protease cleavage sites. *Data in Brief*, 8, 700–708. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.06.021>
- John, W. A., Böttcher, N. L., Behrends, B., Corno, M., D'souza, R. N., Kuhnert, N., & Ullrich, M. S. (2020). Experimentally modelling cocoa bean fermentation reveals key factors and

their influences. *Food Chemistry*, 302, 125335.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125335>

Karasu, Y., & Ozbas, Y. (2008). Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 325–332.

Kouamé, C., Loiseau, G., Grabulos, J., Boulanger, R., & Mestres, C. (2021). Development of a model for the alcoholic fermentation of cocoa beans by a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 304116.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108917>

Kukurová, K., Morales, F. J., Bednáriková, A., & Ciesarová, Z. (2009). Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(12). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800600>

Martínez Álvarez O.L., Ardila Castañeda M.P., Porras Barrientos L.D., Ocampo Arango C.M., Alzate Tamayo L.M., Bedoya Vergara C., González Álvarez D., Gallego Londoño V., Gil Garzón M.A., Zapata Muñoz L.M., & Lizarazo Medina P.X. (2022). *La sinfonía microbiana, química y sensorial: un deleite de aromas y sabores de la mano del cuidado y saberes del cultivador*.

Martínez, C. (2005). *Cadena productiva del cacao: diagnóstico de libre competencia*.

<https://www.sic.gov.co/sites/default/files/files/Cacao.pdf>

Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & Van Boekel, M. A. J. S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9–10). [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)

- Marwati, T., Djaafar, T. F., Hatmi, R. U., Kobarsih, M., Indrasari, S. D., Fitrotin, U., Fajariyah, A., Wibowo, N. A., Anantama, M. S., Wikandari, R., Tunjung Sari, A. B., Sutardi, Laksono, P., Widodo, S., & Rahayu, E. S. (2024). Alternative fermentation method of cocoa beans: The use of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* HL-15 as starter culture and valorization of cocoa pulp by-product. *Journal of Agriculture and Food Research*, *18*. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101398>
- Medina-Orjuela, M. E., Barrios-Rodríguez, Y. F., Carranza, C., Amorocho-Cruz, C., Gentile, P., & Girón-Hernández, J. (2024). Enhancing analysis of neo-formed contaminants in two relevant food global commodities: Coffee and cocoa. *Heliyon*, *10*(10), e31506. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31506>
- Medina-Orjuela, M. E., Barrios-Rodríguez, Y. F., Carranza Gutierrez, C. E., Amorocho-Cruz, C. M., & Girón-Hernández, J. (2024). In-house validation of analytical methods for the determination of NFCs in roasted coffee and cocoa. *Proceedings of the LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education and Technology*, 1–8. <https://doi.org/10.18687/LACCEI2024.1.1.1711>
- Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M., Koffi, J., Vrancken, G., & Verstrepena, K. J. (2015). Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6166–6176. <https://doi.org/10.1128/AEM.00133-15>
- Megias, R., Moreno-Zambrano, M., Behrends, B., Corno, M., & 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*, 108865. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108865>

- Mendoza-López, A., Gallardo-Méndez, R. A., & Avendaño-Arrazate, C. H. (2018). El mundo del cacao (*Theobroma cacao* L.), Kakaw (Maya) Cacahuatl (Nahuatl). *Agro Productividad*, 4(2), 1.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). (2021). *Cacao en Colombia* .
<https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Colombia-registr%C3%B3-la-mayor-producci%C3%B3n-de-cacao-de-la-historia,-en-el-%C3%BAltimo-a%C3%B1o-cacaotero.aspx>
- Mohan-Kumar, N. S., Shimray, C. A., Indrani, D., & Manonmani, H. K. (2014). Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with l-Asparaginase Treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 741–748. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1108-6>
- Moreno, J. R., & Albarracín, V. H. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 5(5), 79–93.
- Moreno-Zambrano, M., Grimbs, S., Ullrich, M. S., & Hütt, M. T. (2018). A mathematical model of cocoa bean fermentation. *Royal Society Open Science*, 5(10), 180964.
<https://doi.org/10.1098/rsos.180964>
- Mota, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Coccolin, L. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01164-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Murkovic, M., & Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(9), 25–32.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200500262>

- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(5), 2239–2243.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005>
- Nematollahi, A., Mollakhalili Meybodi, N., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). An overview of the combination of emerging technologies with conventional methods to reduce acrylamide in different food products: Perspectives and future challenges. *Food Control*, *127*, 108144.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108144>
- Nielsen, M. K., & Arneborg, N. (2007). The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*, *24*(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.005>
- Ordoñez Choez, S. E., Vera Chang, J. F., Tigselema Zambrano, S. M., Ordoñez Choez, S. E., Vera Chang, J. F., & Tigselema Zambrano, S. M. (2019). Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) De líneas híbridas para la elaboración de rehiletes de chocolate. *Revista Universidad y Sociedad*, *11*(2), 136–141.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2218-36202019000200136
- Osorio-Guarín, J. A., Berdugo-Cely, J., Coronado, R. A., Zapata, Y. P., Quintero, C., Gallego-Sánchez, G., & Yockteng, R. (2017). Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of *Theobroma cacao* L. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1944. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01994>
- Pacheco, M., Palencia, C., Paz, H., Carreño, L., & Lozada, M. (2021). *Etapas del Procesamiento del Cacao*. (2021st ed.). Instituto Universitario de la Paz- UNIPAZ. www.unipaz.edu.co

- Panigrahi, C., Shaikh, A. E. Y., Bag, B. B., Mishra, H. N., & De, S. (2021). A technological review on processing of sugarcane juice: Spoilage, preservation, storage, and packaging aspects. *Journal of Food Process Engineering*, *44*(6), e13706.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.13706>
- Pedreschi, F., Kaack, K., & Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*, *109*(2), 386–392.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.057>
- Petisca, C., Pérez-Palacios, T., Pinho, O., & Ferreira, I. (2014). Optimization and Application of a HS-SPME-GC-MS Methodology for Quantification of Furanic Compounds in Espresso Coffee. *Food Analytical Methods*, *7*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9601-0>
- Puertas. (2013). *Factores, procesos y controles en la fermentación del café*. .
<https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/327/1/avt0422.pdf>
- Rawel, H. M., Huschek, G., Sagu, S. T., & Homann, T. (2019). Cocoa bean proteins- Characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing. *Nutrients*, *11*(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu11020428>
- Rodríguez-Velázquez, N. D., Chávez-Ramírez, B., Gómez de la Cruz, I., Vásquez-Murrieta, M. S., & Estrada de los Santos, P. (2022). El cultivo del cacao, sus características y su asociación con microorganismos durante la fermentación. *Alianzas y Tendencias BUAP*, *7*(25), 36–51. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/3ed86837-5f91-4a6b-889e-224e966097ec>
- Rodríguez-Velázquez Nadia Denisse Chávez-Ramírez Belén Gómez de la Cruz Irene Vásquez-Murrieta María-Soledad Estrada de los Santos Paulina. (2022). *El cultivo del cacao, sus*

características y su asociación con microorganismos durante la fermentación.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.6326782>

Rojas, M., Hommes, A., Heeres, H. J., & Chejne, F. (2022a). Physicochemical Phenomena in the Roasting of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Engineering Reviews*, 14(3), 509–533.

<https://doi.org/10.1007/s12393-021-09301-z>

Rojas, M., Hommes, A., Heeres, H. J., & Chejne, F. (2022b). Physicochemical Phenomena in the Roasting of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In *Food Engineering Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 509–533). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09301-z>

Rojas-Salas, M. C. (2020). *Analysis of the cocoa roasting process (Theobroma cacao L)* [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional de Colombia.

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.

<https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>

Samaniego, I., Espín, S., Quiroz, J., Ortiz, B., Carrillo, W., García-Viguera, C., & Mena, P. (2020). Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis*, 88, 103448.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103448>

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the

genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78(1), 141–173.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>

Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221.

<https://doi.org/10.1080/10408690490464104>

Solomon, S., & Singh, P. (2009). *Efficacy of electrolyzed water to minimize postharvest sucrose losses in sugarcane*. 11(2), 228–230.

Stadler, R. H., & Gökmen, V. (2023). Acrylamide formation mechanisms. In *Acrylamide in Food* (pp. 1–17). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99119-3.00017-5>

Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>

Suárez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>

Surma, M., Sadowska-Rociek, A., Cieślík, E., & Sznajder-Katarzyńska, K. (2017). Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. *Microchemical Journal*, 131, 98–102.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.021>

Tamimi, K. Al, Hidayat, C., Utami, T., & Witasari, L. D. (2023). Flavor precursor formation of non-fermented forastero cocoa beans after flavourzyme® and glucose treatment. *LWT*, 184, 114910. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114910>

- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Rogez, H., Góes-Neto, A., Azevedo, V., Brenig, B., Aburjaile, F., & Soccol, C. R. (2021). Co-culturing fructophilic lactic acid bacteria and yeast enhanced sugar metabolism and aroma formation during cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109015.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109015>
- Viesser, J. A., de Melo Pereira, G. V., de Carvalho Neto, D. P., Vandenberghe, L. P. de S., Azevedo, V., Brenig, B., Rogez, H., Góes-Neto, A., & Soccol, C. R. (2020). Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136, 109478.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109478>
- Voigt, J., Textoris-Taube, K., & Wöstemeyer, J. (2018). pH-Dependency of the proteolytic formation of cocoa- and nutty-specific aroma precursors. *Food Chemistry*, 255, 209–215.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.045>
- Voyer, L., & Alvarado, C. (2019). Medicina : organo de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. *Medicina (Buenos Aires)*, 79(2), 137–143.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802019000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Żyżelewicz, D., Krysiak, W., Oracz, J., Sosnowska, D., Budryn, G., & Nebesny, E. (2016). The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. *Food Research International*, 89, 918–929.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.026>

