

# **Estudio fenotípico de las levaduras presentes en la fermentación de los granos de cacao forastero proveniente de la localidad de Caño Rico, estado Miranda, Venezuela**

*Daniela Sara*

Escuela de Educación UCAB

## **Resumen**

El cacao es la materia prima para la producción de diversos productos en la industria alimentaria; dada su importancia han realizado estudios para mejorar las propiedades organolépticas a partir de la fermentación del grano, dicho proceso es realizado por una sucesión de microorganismos (levaduras, bacterias ácido acéticas y ácido lácticas). Venezuela cuenta con las condiciones agro-climáticas y variedades de cacao, pero, se dispone de poca información de las levaduras presentes en el proceso de fermentación. Por ello, se realizó un estudio fenotípico para describir las levaduras presentes en la fermentación de Caño Rico y así aportar información que permita mejorar el proceso.

**Palabras clave:** fermentación, levaduras, cacao.

# **Phenotypic study of yeasts presents in the fermentation of forastero cocoa beans from the town of Caño Rico, Miranda state, Venezuela**

## **Abstract**

Cocoa is the raw material for producing various products, both in the food and cosmetics industries. The great importance of cocoa has generated many studies to obtain answers to possible improvements in its organoleptic properties. A good part of the studies is on the fermentation of the grain, a process carried out spontaneously and followed by a succession of microorganisms (yeasts, acetic acid, and lactic acid bacteria) that generate significant changes in the grains. Venezuela has Agro-climatic conditions and criollo, forastero, trinitario cacao, and hybridizations of these. However, more information is needed on the yeasts present in the fermentation process. Based on the above, the present study seeks to describe the phenotypic characteristics of the yeasts found in cocoa fermentation from Caño Rico, Miranda state, Venezuela.

**Key words:** fermentation, yeasts, cocoa.

## **1.-Introducción**

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es la materia prima para la producción de polvo y manteca de cacao, así como del chocolate. Debido al uso e importancia del cacao en la industria alimentaria se han realizado estudios para mejorar la calidad y el sabor a través del proceso de poscosecha, el cual está dividido en desgrane, fermentación y secado de los granos. Entre las fases mencionadas resalta la fermentación, debido a que los sabores amargos y astringentes propios del cacao crudo son modificados por la presencia de diversos microorganismos.

El proceso de fermentación es espontáneo y ocurre por una sucesión microbiana, en donde participan esencialmente levaduras, bacterias ácido acéticas, bacterias ácido lácticas. La composición de estos microorganismos varía de acuerdo con el país y la región donde ocurre el proceso. Asimismo, la fermentación es afectada por el tipo de cacao (criollo, forastero, trinitario), intervalos entre cosechas, cantidad de cacao a fermentar, cantidad de pulpa en la semilla, el método de fermentación y las condiciones del medio donde se realiza el proceso (Guzmán, 2007).

Por la importancia de la fermentación se han realizado estudios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos, con el fin de identificar los microorganismos presentes en la fermentación de los granos de cacao de diversas regiones del mundo, con el fin de optimizar el proceso y la calidad de fermentación. En este sentido en Venezuela se ha venido investigando en función de aportar información fenotípica de las levaduras presentes en el proceso de fermentación del cacao.

## **2.-Objetivos**

### *General*

Estudiar las características fenotípicas de las levaduras presentes en el proceso de fermentación artesanal de los granos de cacao forastero obtenidos de la localidad de Caño Rico, estado Miranda, Venezuela.

### *Específicos*

- 1.-Enumerar las levaduras presentes en la fermentación de los granos de cacao forastero provenientes de la localidad de Caño Rico, estado Miranda, Venezuela por medio del aislamiento en medio de cultivos selectivos y diferenciales.
- 2.-Caracterizar fenotípicamente las levaduras presentes en la fermentación de los granos de cacao provenientes de la localidad de Caño Rico, estado Miranda, Venezuela por medio de pruebas morfológicas y fisiológicas.
- 3.-Tipificar las características físicas (largo, ancho, espesor) y grado de fermentación de los granos del cacao fermentados provenientes de la localidad de Caño Rico, estado Miranda, Venezuela.

## **3.-Marco Referencial**

Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO) los parámetros de olor y sabor permiten clasificar los granos del cacao en dos grupos "finos de sabor" y los tipos "a granel u ordinarios". Resaltando los primeros por los sabores específicos de: cacao, floral, frutal y nuez, siendo sabores característicos de la región de origen.

El sabor y el olor son parámetros fundamentales que inciden directamente en la calidad del cacao, y dependen de factores internos y externos. La variable interna es la más influyente y dependerá del genotipo de la variedad a trabajar. En el caso de los factores externos se encuentran las condiciones agroclimáticas, proceso de cosecha, recolección del grano, fermentación, secado y procesamiento, siendo variables que

SARA

influyen en la formación de componentes volátiles y no volátiles que definen la calidad final del producto (Moreno-Martínez et al., 2019).

El mejoramiento de la calidad aromática y sensorial depende de los diferentes pasos por los que debe pasar el grano del cacao durante su beneficio, entre ellos se encuentran: selección de las mazorcas maduras, apertura y desgrane manual, fermentación (que pudiera ser en cestas o en cajones de madera) y secado, siendo la fermentación el proceso que destaca en la poscosecha por los beneficios aportados (Schwan, 1998). En la fermentación ocurren dos cambios importantes que mejoran el sabor y olor de los granos del cacao: 1. Sucesión microbiana, en donde cada microorganismo proporciona las condiciones fisicoquímicas para el crecimiento de otro, iniciando con las levaduras, seguido por las bacterias lácticas y bacterias acéticas (Schwan, 1998). 2. El otro cambio importante ocurre en los cotiledones, ya que se llevan a cabo una serie de reacciones bioquímicas que modifican la composición química del grano y permite la formación de precursores del sabor. Las reacciones que ocurren durante la fermentación de los granos de cacao favorecen el desarrollo y mejora de las propiedades organolépticas del cacao (Torres, 2012).

De los microorganismos presentes en la fermentación las levaduras son el primer grupo en participar de la sucesión microbiana, ya que cuenta con las condiciones físicas y químicas necesarias para su crecimiento. Diversos estudios (Díaz-Muñoz; De Vuyst y Leroy, 2020) han revelado la importancia de las levaduras en el proceso, puesto que permiten la degradación de los azúcares y la pulpa del grano, a su vez generan un aumento de temperatura, siendo esta indispensable para la muerte del embrión. Las levaduras también desarrollan compuestos volátiles que son los precursores del sabor y olor del cacao, por lo que, dicho grupo también es fundamental en el desarrollo de propiedades organolépticas.

En países como Costa de Marfil, Ghana, Malasia y Ecuador han estudiado el proceso de fermentación del cacao y han determinado la presencia de diversos géneros de levaduras, entre las cuales se encuentran: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* y *Kloeckera*. Presentando las levaduras gran diversidad, ya que la especie pueden cambiar en las localidades de un mismo país (Wacher, 2011)

Luego de un tiempo de 24 horas la población de las levaduras decrece, ya que el cambio en las condiciones fisicoquímica no favorece su crecimiento, dándole paso así a las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. Las bacterias ácido lácticas es el segundo grupo en participar en la fermentación, estas degradan los azúcares residuales produciendo ácido láctico, además continúan con el consumo del ácido cítrico. Dicho grupo es importante porque crea un microambiente estable al siguiente grupo de microorganismo, asimismo por medio de su actividad producen alcoholes, ácidos orgánicos, alcoholes (superiores) y aldehídos que inciden positivamente en el sabor y olor del cacao (Díaz-Muñoz; Ouattara y Niamké, 2021).

Posteriormente, participan las bacterias ácido acéticas, las cuales, son las encargadas de oxidar el etanol presente en ácido acético, dicha sustancia penetra en los cotiledones del grano de cacao que impide la germinación del mismo; además desencadena una serie de reacciones enzimáticas que producen las moléculas precursoras de color y sabor (Compañía Nacional de chocolates S.A.S., 2019; Díaz-Muñoz; Ouattara y Niamké, 2021).

#### **4.-Metodología**

La metodología para lograr el objetivo se dividió en 4 fases que se llevaron a cabo en la localidad de Caño Rico, Estado Miranda y en la ciudad de Caracas.

##### **a. Metodología para el proceso de fermentación**

En la investigación se trabajó con cacao forastero proveniente de la localidad de Caño Rico, parroquia El Guapo, municipio Páez del eje Barlovento en el estado Miranda, Venezuela. Las mazorcas usadas en la investigación se encontraban sanas y perfectamente maduras para no afectar la calidad del cacao.

SARA

La apertura y el desgrane de las mazorcas se realizó de forma manual en la localidad de Caño Rico, obteniéndose una masa a fermentar de 4 kg. Los granos obtenidos fueron colocados en una cesta de plástico y tapados con hojas de plátano, iniciando así el proceso de fermentación. La frecuencia de remoción de la masa fue de 24 horas, así como la recolección de las muestras a estudiar; dicho procedimiento se realizó durante 5 días. La muestra tomada por día de fermentación tenía un peso aproximado de 500 g, dichas muestras fueron guardadas en bolsas ziploc para su posterior almacenamiento en nevera, con el fin de detener el proceso de fermentación.

Después de los 5 días de fermentación, los granos fueron extendidos en un piso de cemento para el proceso de secado el cual tardó 96 horas, durante este tiempo se efectuó la remoción/movimiento de los granos de 2 a 3 veces por jornada (jornada: 6-8 horas/día).

### **b. Aislamiento y recuento de microorganismos**

Se pesaron asépticamente 10 g del cacao fermentado de cada uno de los días y agregaron 90 mL de agua peptonada (Oxoid) estéril al 0,1% para ser homogeneizados manualmente. Partiendo de dicha concentración se prepararon diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1% hasta  $10^{-6}$ . Posteriormente cada dilución fue sembrada por duplicado en los diferentes medios de cultivos descritos a continuación.

Para la enumeración de las levaduras se sembraron por superficie en agar -agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (Oxoid) (DRBC) y agar Sabouraud (Himedia) con cloranfenicol posteriormente las placas se incubaron a 25°C por 5-6 días (Marquez, 2019). El recuento obtenido fue multiplicado por el inverso de la dilución, luego se promediaron los resultados, y se expresaron como Unidades Formadoras de Colonia por gramo (UFC/g). Por último, se transformaron los valores a escala logarítmica para expresar los resultados como el promedio de 4 mediciones, y se calcularon los valores de media y desviación estándar.

### **c. Caracterización macroscópica y microscópica**

Para la caracterización macroscópica de las levaduras se sembró por estrías en agar YM (extracto de levadura-extracto de malta-peptona-glucosa) suplementado con oxitetraciclina, luego se incubaron a 25°C por 4 días. En la descripción macroscópica se consideró la coloración, forma, superficie, margen y texturas de las colonias (Kurtzman *et al.*, 2011).

Para la caracterización microscópica inicialmente se sembraron las levaduras en agar Sabouraud e incubaron por 3 días a 25°C, luego los microorganismos fueron sembrados en agar cornmeal usando el método de Dalmau, las muestras se incubaron por 3 días a 25°C. Después de la incubación las levaduras fueron observadas en un examen directo a microscopio, en donde se consideró la forma de la célula, presencia y características de las hifas (Larone, 1939).

En las pruebas de crecimiento se estudió el crecimiento de las levaduras a diferentes temperaturas y concentraciones de etanol para ello se usó agar YPG (peptona, glucosa y extracto de levadura) como medio base, sembrando por estrías en agotamiento; el caso de la prueba de temperatura el medio base se mantuvo y las placas fueron incubada a 25°C, 37°C y 46°C, mientras en las pruebas de etanol se agregó al medio de cultivo base etanol a diferentes concentraciones 5%, 10% y 15% y se incubaron a 25°C durante 4 días.

En la prueba de asimilación de carbohidratos se utilizó un medio basal con: agar, azul de bromotimol y buffer fosfato, el cual estaba compuesto por  $\text{Na}_2\text{POH}$  0,067M y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,067M mezclado en proporción 1:1. Las levaduras se sembraron por agotamiento con hisopos estériles, posteriormente se colocaron los discos impregnando con diferentes azúcares: lactosa, celobiosa, sucrosa, glucosa, maltosa y galactosa. Las muestras se incubaron por 48 horas a 25°C para su posterior lectura.

#### d. Tipificación física de los granos de cacao fermentados

Para la tipificación física de los granos se midió el largo, ancho y espesor de 10 granos de cacao utilizando un vernier con precisión de una décima de milímetro, asimismo de la muestra se contabilizaron 100 granos de cacao y pesaron en una balanza analítica, los resultados se expresaron como peso promedio en gramos. Otra prueba en la tipificación fue el pesado de 100 g y la contabilización de los granos en el peso mencionado, siendo el proceso inverso al dicho inicialmente. Es importante acotar que las pruebas se realizaron por triplicado con el fin de obtener un valor promedio.

En el caso de la prueba de corte se realizó un corte longitudinal a 100 granos de cacao según lo establecido en la Norma COVENIN 442 (1995) a fin de clasificar los granos según la norma COVENIN 50 (1995) en función de la condición de los granos y grado de fermentación. Es necesario mencionar que los granos de cacao usados en la tipificación pasaron por la fermentación durante 5 días, además de 4 días de secado.

#### 5.-Resultados

El primer objetivo del estudio consistió en enumerar las colonias de las levaduras presentes en los granos de cacao fermentados, para lograr el objetivo se realizó la metodología planteada en la investigación y se evidenció la presencia de las levaduras en los 5 días de fermentación. En el día 1, se obtuvo un recuento de 3,98 LogUFC/g, en los días 2 y 3 disminuyó la población a 2,48 y 2,68 LogUFC/g respectivamente, pero en los días 4 y 5 aumentó considerablemente la población de las levaduras a 5,89 y 7,10 LogUFC/g.

Según la literatura, las levaduras están presentes en las primeras 12, 24 y 36 horas del proceso de fermentación, hallándose en estas horas los recuentos más altos, ya que cuenta con las condiciones necesarias para su crecimiento. Entre las condiciones óptimas para su crecimiento se encuentra la presencia del mucílago, el cual genera un ambiente anaeróbico, y a su vez contiene altos niveles de glucosa, fructosa y sacarosa, un pH entre 3-3,5 por la presencia del ácido cítrico y una temperatura que oscila entre de 25°C-30°C (De Vuyst y Leroy, 2020; Gutiérrez-Ríos *et al.*, 2022; Marquez, 2019).

En la presente investigación los resultados obtenidos en los días 4 y 5 no coinciden con lo expuesto anteriormente, dado a que el recuento de las levaduras no disminuyó después de las 72 horas. Sin embargo, según Nielsen *et al.*, (2007) el crecimiento de las levaduras después del tiempo mencionado puede deberse a presencia de levaduras termotolerantes que soportan temperaturas por encima de 37°C y toleran altos niveles de etanol, entre las especies con estas características se encuentran *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis*. Asimismo, los autores mencionan que otros factores que pueden influir en dicho fenómeno son: mayor presencia de oxígeno en la masa de fermentación y levaduras sobrevivientes en las zonas más frías del sistema fermentativo.

**Tabla 1.** descripción macroscópica y microscópica de las levaduras aisladas

cepa	1	2	3	4
Fotografía de la colonia				
Descripción de la colonia	Forma circular, borde y superficie lisa, elevada en el centro, color blanco y opaca	Forma circular, bordes irregulares, superficie rugosa, elevación pulvinada, color blanco y opaco	Forma circular, bordes irregulares, superficie rugosa, elevación pulvinada, color blanco y opaco	Forma circular, borde entero, superficie lisa, elevada en el centro, color blanco
Descripción de la colonia según la literatura	Colonia blanca, margen liso, cremosa y opaca	Colonia blanca, margen rizoide, butirosa y opaca	Colonia blanca, cremosa, húmeda y elevada	Colonia blanca, margen rizoide, butirosa y opaca

Fotografía microscópica				
Descripción microscópica	Células alargadas y con formación de cadenas	Presencia de hifas gruesas y blastoconidios	Presencia de hifas con blastoconidios en ellas	Presencia de hifas gruesas y blastoconidios individuales.
Descripción microscópica según la literatura	 (Larone, 1939)	 (Lagos, 2017)	 (Larone, 1939)	 (Lagos, 2017)
Posibles géneros o especies	<i>Kluveromyces</i> spp.	<i>Pichia</i> spp.	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Pichia</i> spp.
Cepa	5	6	7	8
fotografía de la colonia				
Descripción de la colonia	Margen rizoides, superficie rugosa, elevada en el centro, color blanco y sin brillo	Borde irregular, superficie rugosa, elevación umbilicada, color blanco sin brillo	Forma irregular, borde ondulado, elevación umbilicada, color blanco sin brillo	Forma puntiforme, borde entero, superficie lisa, elevación pulvinada, color blanco sin brillo
Descripción de la colonia según la literatura	Colonia blanca, cremosa, húmeda y elevada		Colonia blanca, cremosa, húmeda y elevada	Colonia blanca, margen rizoides, butirosa y opaca
Fotografía el microscopio				
Descripción microscópica	Presencia de hifas con blastoconidios en ellas.	Presencia de blastoconidios alargados que forman una pseudohifa.	Pseudohifa formado con células alargadas.	Abundancia de hifas gruesas y presencia de blastoconidios
Descripción microscópica según la literatura	 (Larone, 1939)	 (Larone, 1939)	 (Larone, 1939)	 (Lagos, 2017)
Posibles géneros o especies	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Pichia</i> spp.

En función de los resultados obtenidos se pudo presumir que la cepa 1 pertenece al género *Kluveromyces*, mientras las cepas 3, 5 y 7 pueden pertenecer al género *Candida* y específicamente a la especie *C. tropicalis*, la cepa 2, 4 y 8 al género de *Pichia*, por último, la cepa 6 podría ser *C. kefyr*.

Los géneros mencionados han sido encontrados en diversos estudios de la fermentación del cacao (Meersman *et al.*, 2013; Ouattara y Niamké, 2021; Lagos, 2017; Illegheims *et al.*, 2012 y Marquez, 2019), por lo que, concuerdan con los géneros encontrados en otros países y regiones de Venezuela. En función de la morfología, se agruparon las cepas y se realizaron las pruebas fisiológicas y se compararon con las características de cada género.

**Tabla 2.** Pruebas fisiológicas: Crecimiento a diferentes temperaturas y en diferentes concentraciones de etanol.

Grupo, género y/o especie	Cepa	Crecimiento a diferentes temperaturas			Crecimiento en presencia de etanol		
		25 °C	37°C	47°C	5% v/v	10 %v/v	15 %v/v
<i>Kluyveromyces</i>	1	+	+	-	+	+	-
<i>Pichia</i>	2	+	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i>	3	+	+	-	+	+	+
<i>Pichia</i>	4	+	+	-	+	-	-
<i>C. tropicales</i>	5	+	+	-	+	+	+
<i>C. kefir</i>	6	+	-	-	+	+	-
<i>C. tropicales</i>	7	+	+	-	+	+	-
<i>Pichia</i>	8	+	-	-	+	+	-

En función de los autores mencionados y Kutzman *et al.* (2011) se puede decir que las cepas 3, 5 y 7 que presuntamente pertenecen al género *Candida* concuerdan con las características halladas en la literatura, debido a que puede crecer a la temperatura de 37°C, sin embargo, no crecen a 47°C. En el caso de las cepas pertenecientes al género *Pichia* solo se observó crecimiento en la cepa 4, mientras en las cepas 2 y 8 no se evidenció.

La temperatura óptima para el crecimiento de las levaduras es 25°C, pero un aumento de esta variable impide el desarrollo de algunas especies, ya que genera daño en la célula. Si bien es cierto que la temperatura óptima es 25°C existen algunas especies de levaduras que pueden crecer por encima de los 37°C, llamadas levaduras termotolerantes. Estas levaduras resisten los efectos de la temperatura por medio de una respuesta molecular, conocida como choque térmico.

En el caso de las pruebas de etanol a diferentes concentraciones por los resultados obtenidos y la literatura se podría que las pruebas de etanol concuerdan con los géneros de *Pichia* y *Candida*, en el caso de *Kluyveromyces* algunas de sus especies tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de etanol, y estas se pueden encontrar en los últimos días de fermentación, entre las especies se encuentran: *K. marxianus*, *K. thermotolerans* y *K. lactis* (Baruc, 2020).

La siguiente prueba fisiológica realizada fue la asimilación de diferentes carbohidratos entre los que se encontraba: lactosa, celobiosa, sucrosa, glucosa, maltosa y galactosa, los resultados obtenidos se observan en la tabla 3. En la prueba se evidencia que todas las cepas asimilaron glucosa, mientras que la maltosa y galactosa solo fue asimilado por las cepas 3 y 8; la sucrosa fue asimilada por 1, 3, y 4 por su parte la celobiosa fue usada por la cepa 2 y 3, sin embargo, ninguna cepa aislada pudo asimilar la lactosa.

**Tabla 3:** prueba de asimilación de carbohidratos

Grupo, género y/o especie	Cepa	Lactosa	Celobiosa	Sucrosa	Glucosa	Maltosa	Galactosa
<i>Kluyveromyces</i>	1	-	-	+	+	-	+
<i>Pichia</i>	2	-	+	-	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	3	-	+	+	+	+	+
<i>Pichia</i>	4	-	-	+	+	-	-
<i>C. tropicales</i>	5	-	-	-	+	-	-
<i>C. kefir</i>	6	-	-	-	+	-	-
<i>C. tropicales</i>	7	-	-	-	+	-	-
<i>Pichia</i>	8	-	-	-	+	+	+

Según la literatura, las especies de los géneros presumidos en la investigación tienen un comportamiento diferente en cuanto a la asimilación de los azúcares, las levaduras del género *Pichia* y *Candida* tienen la capacidad para asimilar diferentes carbohidratos y esta capacidad varía de una especie a otra. Asimismo, en el caso de la cepa 3 presentó alta capacidad para asimilar los diferentes azúcares, lo cual ocurre en especies pertenecientes al género *Saccharomyces*, sin embargo, las características de la colonia no concuerdan con la descripción de la literatura, por lo que es necesario realizar otros estudios para comprobar los géneros.

También, es necesario mencionar que según la prueba de asimilación de azúcares la cepa 3, también podría pertenecer al género de *Hanseniaspora*, ya que es un grupo donde la mayoría de las especies pueden asimilar la celobiosa, además de la glucosa y sacarosa (Kurtzman *et al.*, 2011).

Como se ha observado las características fenotípicas cambian entre género y entre las especies de un mismo género, por lo que, la identificación de especie por este medio es laboriosa y costosa, ya que implica una gran cantidad de pruebas y tiempo; además muchas veces las pruebas no son suficientes o concluyentes para realizar la identificación completa.

En función de las pruebas realizadas solo se pudo presumir el género de las especies, pero para identificación de especies sería necesario estudios moleculares. Es necesario destacar, que es útil implementar ambos métodos, ya que se puede identificar las especies y además conocer las características fenotípicas, con el fin de mejorar el proceso de fermentación a partir de cultivos iniciadores.

**Tabla 4:** Parámetros físicos de los granos de cacao fermentado

Parámetro	Determinación
Peso mínimo (g) de 100 granos	165,1 ± 7,7
N° de grano por 100 g	68 ± 3,5
Largo (mm)	25,8 ± 4,4
Ancho (mm)	14,1 ± 1,4
Espesor (mm)	9,6 ± 1,4

En el estudio para determinar el tamaño de los granos de manera indirecta se realizó el recuento de granos por 100 g pesados, obteniéndose un recuento de  $68 \pm 3,5$  granos de cacao fermentado, lo que concuerda con los parámetros establecidos por la norma COVENIN 50:1995.

Es necesario mencionar, que el tamaño de los granos del cacao es una de las características físicas consideradas en la comercialización del rubro, dado que influye en el porcentaje de cáscara porque a mayor tamaño, menor será el porcentaje de cascarilla, además es una característica importante en el tostado, debido a que facilita el proceso.

De la misma forma la uniformidad de los granos es una característica influyente en la eficiencia del tostado y en la presente investigación para determinar dicha variable se midió el largo, ancho y espesor de 10 granos por triplicado y posteriormente se realizó un análisis estadístico con un nivel de significancia de 0,05, los resultados se observan en la tabla 4. En el caso del análisis estadístico se observa en la tabla 5 y no se evidenció diferencias significativas en las medidas realizadas, por lo que los granos presentan tamaños aproximados entre ellos, además de un tamaño intermedio de fácil manipulación al momento de ser clasificados.

**Tabla 5.** Resultado de la prueba de Tukey, nivel de significancia 95%

Característica	Media	Agrupación
Espesor	10,01	A
	9,38	A
	9,28	A
Largo	27,79	B
	25,07	B
	25,07	B
Ancho	14,39	C
	14,06	C
	13,94	C

Las letras A, B y C muestran la significancia que existe entre los triplicados de cada variable. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla 6.** Grado de fermentación de los granos de cacao fermentado

<b>Prueba de corte en 100 granos</b>	Granos fermentados	41
	Granos violetas e insuficientemente fermentado	59
	Granos mohosos	0
	Grano pizarroso	0
	Grano negro	0
	Grano infestado	0
	Porcentaje de granos fermentados	41%

Prueba realizada en función de la norma COVENIN 50 (1995).

En el estudio realizado se obtuvo un 41% de granos fermentados siendo clasificado según la norma COVENIN 50 (1995) como granos finos de segunda, esta categoría corresponde al cacao formado por granos de cacao forastero, que se diferencian del cacao fino de primera por el grado de fermentación, ya que sus granos no han sido sometidos al proceso de fermentación o éste se ha realizado en forma deficiente.

El grado de fermentación es influenciado por las cantidades de masa usada en el proceso, ya que bajas cantidades de masa impiden un proceso eficiente, debido a que no se mantiene la temperatura en la masa. La temperatura en el proceso es un factor influyente, debido a que contribuye en la muerte del embrión, y a su vez la muerte del embrión permite las reacciones enzimáticas en los tejidos del cotiledón, lo que repercute directamente en el sabor y aroma a chocolate (CAOBISCO/ECA/FCC 2015; Graziani *et al.*, 2003).

Según Castillo (2019) otro factor que influye en la calidad de la fermentación es la remoción de los granos, ya que aumenta la aireación y propicia el desarrollo de microorganismo aerobios, estos propician reacciones exotérmicas que aumenta la temperatura del sistema, por ende, influencia en los cotiledones y desarrollo de reacciones enzimáticas.

### **Conclusiones**

Lo más importante de la enumeración de las colonias de levaduras fue precisar los días que estuvieron presentes en el proceso de fermentación del cacao, ya que la presencia de estos microorganismos varía en regiones y países por las condiciones fisicoquímicas y especies presentes. Asimismo, las levaduras estuvieron presentes en todos los días de fermentación, encontrándose el recuento más alto en los dos últimos días.

Por las pruebas morfológicas y fisiológicas se pudo presumir los posibles géneros de levaduras presentes en la fermentación del cacao.

La tipificación física de los granos de cacao fermentado permitió determinar que estos están de acuerdo con los estándares nacionales e internacionales en cuanto al tamaño. En el caso del grado de fermentación se evidenció que los granos no cuentan con un nivel de fermentación adecuado, pudiendo ser por factores internos y externos que deberían ser estudiados en próximas investigaciones.

Lo investigado en el presente trabajo contribuye en el conocimiento de las levaduras de una región de Venezuela, lo que permitirá en un futuro contrastarlo con otras regiones del país o localidades, con el fin de mejorar la calidad del cacao.

### **Recomendaciones**

Para optimizar la metodología y resultados obtenidos en la investigación es necesario realizar las pruebas moleculares que permitan identificar las levaduras presentes en la fermentación.

Asimismo, es necesario registrar la temperatura y pH de cada uno de los días de fermentación para conocer cómo varían y su influencia en la fermentación, ya que estas variables inciden directamente en la calidad de la fermentación.

Se recomienda, realizar un estudio de las bacterias ácido acéticas y lácticas asociadas al proceso de fermentación de cacao.

## Referencias

- Baruc, J. (2020). *Estudio de la ecología microbiana en las fermentaciones de cacao*. [Trabajo fin de Máster, Universidad de Almería].
- CAOBISCO/ECA/FCC Cocoa Beans: Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements. September 2015 (End, M.J. and Dand, R., Editors).
- Castillo, J. (2019). *Diseño de un fermentador orientado a mejorar el proceso de fermentación del cacao criollo blanco de Piura* [Tesis de Máster en Ingeniería Mecánico Eléctrica con Mención en Automática y Optimización, Universidad de Piura].
- Compañía Nacional de chocolates S.A.S. (2019) Cosecha, Beneficio y calidad del grano del cacao (*Theobroma cacao* L.). COVENIN. (1995) Granos de cacao (COVENIN 50:1995).
- COVENIN (1995). *Granos de cacao. Prueba de corte*. (COVENIN 442:1995).
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol Revis*. 2020 jul 1;44(4), pp. 432-453.
- Díaz-Muñoz, C. y De Vuyst, L. (2022). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 39–66.
- Guzmán, R. (2007). *Evaluación de los cambios ocurridos durante el beneficio del cacao (theobroma cacao L.) a través de parámetros morfoanatómicos, fisicoquímicos y nutricionales*. [Trabajo para optar al título de *Magíster Scientiarum* en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela].
- Gutiérrez-Ríos, H. G., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Castellanos-Onorio, O. P., Alonso-Villegas, R., Rayas-Duarte, P., Cano-Sarmiento, C., Figueroa-Hernández, C. Y., y González-Ríos, O. (2022). Yeasts as producers of flavor precursors during cocoa bean fermentation and their relevance as starter cultures: A review. *Fermentation*, 8(7), 331.
- Graziani, L., Ortiz B., Alvarez, N., y Trujillo, A. (2003). Fermentación del cacao en dos diseños de cajas de madera. *Agronomía tropical*, 53(2), 175–188.
- Illegheems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z. y Weckx, S. (2012). Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity. *PLoS ONE* 7(5): e38040.
- Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. *Researchgate*.
- Larone, D. (1939) *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. Asm Press
- Marquez, J. (2019). *Estudio morfológico, bioquímico y molecular de la flora microbiana de granos fermentados de cacao (Theobroma cacao L.) cultivados en dos regiones de Venezuela*. [Tesis para optar al título de doctor en ciencias mención tecnología de alimentos, Universidad Central de Venezuela].
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittcox, P., Saels, V., Struyf, N., et al. (2013) El análisis detallado de la población microbiana en las fermentaciones espontáneas de pulpa de cacao de Malasia revela una microbiota central y variable.
- Moreno-Martínez, E., Gavano-Cárdenas, Óscar M., y Rangel-Silva, F. A. (2019). Evaluation of the Physical and Sensory Characteristics of Cocoa Liqueur Associated with Sowing Models. *Ciencia y Agricultura*, 16(3), pp. 75–90.