UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de inóculos microbianos en el proceso de fermentación de cacaos especiales para la mitigación del contenido de cadmio en grano

Johanna Hurtado Dávila

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2024

Evaluación de inóculos microbianos en el proceso de fermentación de cacaos especiales para la mitigación del contenido de cadmio en grano

Johanna Hurtado Dávila

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Biotecnología

Director:

Ph.D en Microbiología, Juan Carlos Bedoya Pérez

Codirector:

Ph.D en Ciencias del Suelo, Ramiro Ramírez Pisco

Línea de Investigación:

Biotecnología Microbiana - Biorremediación

Grupo de Investigación:

Unidad de Fitosanidad y Control Biológico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2024

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”- Mahatma Ghandi

A mi familia

Agradecimientos

A mi familia y amigos por ser luz, fuerza, apoyo y motivación en cada paso de este proceso

Al Dr. Juan Carlos Bedoya por su compromiso, sus valiosos aportes y la constante exigencia. Al Dr. Ramiro Ramírez por su acompañamiento y orientación experta. Ambos fortalecieron cada etapa de este trabajo y su contribución fue fundamental para alcanzar los objetivos propuestos.

A la Corporación para Investigaciones Biológicas por permitir el uso de instalaciones y equipos. A la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico en especial a Miguel Lopeda, Vanessa Gil y Juan Diego Medina por su excelente disposición y apoyo técnico en la ejecución de experimentos.

A la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, en especial a la Docente Sara Ramírez por su apoyo en la planeación y coordinación logística de experimentos.

A la compañía Colombiana de Cacao y a la empresa Cacao Betulia, por permitir el acceso y la toma de muestras.

A la Compañía Nacional de Chocolates, con un especial reconocimiento al Ingeniero Óscar Hincapié, a los Doctores Alejandro Gil y Lucas Penagos por su apoyo en la planeación y ejecución del ensayo en campo.

Resumen general

El cacao colombiano es reconocido por los mercados internacionales como fino y de aroma, característica que ha incrementado su valor comercial. Por tal razón, el cultivo de cacao se ha convertido en una opción cada vez más atractiva para los agricultores y de mayor importancia económica para el país. Sin embargo, en algunas zonas cacaoteras de Colombia se superan los límites de cadmio establecidos en el reglamento de la Unión Europea impactando de manera negativa las exportaciones. Aunque existen diferentes metodologías para la extracción de metales pesados, la mayoría no son compatibles con el sistema de producción de cacao o son altamente costosas. En respuesta a esta problemática, en esta investigación se evaluó la capacidad de inóculos microbianos para disminuir el contenido de cadmio en los granos de cacao durante el proceso de fermentación. Para tal fin, se aislaron microorganismos del proceso fermentativo y se seleccionaron dos cepas de bacterias y una de levadura con capacidad para disminuir el contenido de cadmio en medio acuoso (10 mg Cd^{+2}/L) a diferentes valores de pH inicial (3,5; 4,5 y 5,5). Las cepas seleccionadas fueron evaluadas de manera individual y en combinación durante el proceso de fermentación de cacao bajo condiciones de campo. Además, se definieron condiciones apropiadas para el crecimiento de uno de los microorganismos seleccionados. Estas condiciones incluyeron el diseño de un medio de cultivo de bajo costo y la definición de parámetros de operación adecuados (pH y temperatura) para la producción de biomasa a través de diseños factoriales fraccionados. La cepa *Bacillus subtilis* M21HB (46,23 mg Cd^{+2}/gBS), tanto de manera individual como en cultivo mixto con *Bacillus megaterium* M17HB (50,18 mg Cd^{+2}/gBS) a pH 4,5, demostró la máxima capacidad para secuestrar cadmio. Además, se observó que a este pH se favorece la captura del metal tanto para las cepas individuales como para aquellas en cultivo mixto. Sin embargo, los microrganismos seleccionados en las pruebas a nivel *in vitro*, al ser inoculados en el grano durante el proceso de fermentación bajo condiciones

de campo, no disminuyeron la concentración de cadmio en el grano. Aunque los microorganismos obtenidos e identificados en este trabajo demostraron ser potencialmente útiles para la biorremediación de metales pesados, es necesario realizar estudios posteriores que permitan definir condiciones adecuadas para su implementación durante el proceso de fermentación de cacao.

Palabras clave: *Theobroma cacao*, microorganismos, cadmio, cacaos especiales, fermentación de cacao.

Evaluation of microbial inoculms in the fermentation process of special cocoas to mitigate the cadmium content in the beans.

Abstract

Colombian cocoa is recognized by international markets as fine-flavor-cocoa. This characteristic increases its commercial value and makes cocoa cultivation an important economic alternative for farmers and the country. However, in some cocoa-growing areas of Colombia, high levels of cadmium (Cd^{+2}) exceed the limits established by European Union regulations, negatively impacting exports. Although there are different methodologies to extract heavy metals in foods, these are very expensive or incompatible with the cocoa production system. In response, this research evaluated the bioremediation capacity of microbial to mitigate cadmium content in cocoa beans during fermentation process. First, microorganisms involved in cocoa fermentation process were isolated. The capacity to reduce cadmium content in liquid medium (10 mg Cd^{+2}/L) was evaluated and two bacterial and one yeast strains were selected. The selected strains were evaluated individually and in consortium under field conditions at a scale of 100 kg. In addition, the appropriate conditions for the in vitro production of biomass (culture medium, pH and T) of one of the selected microorganisms were defined by using fractional factorial designs. The strain *Bacillus subtilis* M21HB (46.23 mg Cd^{+2}/gBS) inoculated individually, or in mixed culture with *Bacillus megaterium* M17HB (50.18 mg Cd^{+2}/gBS), exhibited the maximum capacity to sequester cadmium in the liquid medium at pH 4.5. In addition, it was observed that at this pH the capture of the metal is favored both for individual strains and for those in mixed culture. However, these strains did not have the capacity to decrease cadmium levels in cocoa beans during the fermentation process. Although the microorganisms obtained and identified in this work proved to be potentially useful for the bioremediation of heavy metals, it is necessary to carry out subsequent studies to define suitable conditions for their implementation.

Keywords: *Theobroma cacao*, microorganisms, cadmium, special cocoa, cocoa fermentation.

Tabla de contenido

Pág.

Resumen general ..... **VII**

Lista de tablas ..... **XIX**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XX**

Introducción **1**

Marco teórico **6**
1.1 El cacao (*Theobroma cacao* L.) 6
1.2 Importancia del cacao 9
1.3 Poscosecha 12
1.3.1 Fermentación 13
1.3.2 Secado 22
1.4 Cacaos especiales 24
1.4.1 Cacao Premium de Origen (CPO) 24
1.4.2 Cacao Fino de Aroma (CFA) 24
1.4.3 Cacao de Producción Sostenible (CPS) 25
1.5 Cadmio 25
1.5.1 Cadmio en el suelo y en el cultivo de cacao 27
1.6. Estrategias de mitigación de cadmio en cacao 33
1.6.1. Delimitación de zonas de alto riesgo para el establecimiento de plantaciones 34
1.6.2. Aplicación de enmiendas al suelo 35
1.6.3 Manejo de residuos de poda y cosecha 36
1.6.4. Mezcla de granos 37
1.6.5. Germoplasma con baja acumulación de cadmio 37
1.6.6. Fitorremediación 38
1.6.7. Biorremediación 39
1.7. Condiciones de cultivo de microorganismos 45

Capítulo 1. Microorganismos aislados de la fermentación de cacao con capacidad para disminuir concentraciones de cadmio en medio acuoso **47**
1.1 Introducción 48
1.2 Materiales y métodos 49
1.2.1 Localización del estudio 49
1.2.2 Muestreo 50
1.2.3 Aislamiento de microorganismos en medio de cultivo suplementado con cadmio 51
1.2.4 Selección de microorganismos con capacidad para disminuir cadmio en medio acuoso 51
1.2.5 Cuantificación de cadmio 53
1.2.6 Conservación de los microorganismos seleccionados 53
1.2.7 Extracción y purificación de ADN de bacterias y levaduras 54
1.2.8 PCR para la amplificación de ADN de bacterias y levaduras 54
1.2.9 Edición y clasificación de secuencias 55
1.2.10 Determinación de pH para la biorremediación de cadmio 55

1.2.11 Análisis de espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)..... 55
1.2.12 Análisis estadístico..... 56
1.3 Resultados 56
1.3.1 Microorganismos aislados de la fermentación de cacao con capacidad para crecer en medio de cultivo suplementado con cadmio 56
1.3.2 Identificación molecular..... 57
1.3.3 Microorganismos con capacidad para disminuir cadmio en medio acuoso..... 61
1.3.4 Efecto del pH sobre la capacidad de los microorganismos para capturar cadmio 62
1.3.5 Análisis de espectros FTIR 63
1.4 Discusión..... 65
1.5 Conclusiones 71

Capítulo 2. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Wickerhamomyces anomalus* 73
2.1 Introducción..... 74
2.2 Materiales y métodos..... 76
2.2.1 Determinación de condiciones de crecimiento a escala de erlenmeyer..... 76
2.2.2 Microorganismo 77
2.2.3 Medio de cultivo comercial 77
2.2.4 Fuente de carbono 77
2.2.5 Fuente de nitrógeno 77
2.2.6 Relación carbono/nitrógeno (C:N) 78
2.2.7 Tamizaje estadístico de componentes para el medio de cultivo 78
2.2.8 Optimización y validación del medio de cultivo..... 79
2.2.10 Análisis estadístico..... 79
2.3 Resultados 81
2.3.1 Fuente de carbono y nitrógeno..... 81
2.3.2 Tamizaje estadístico de componentes para el medio de cultivo 85
2.3.3 Optimización de las condiciones de crecimiento 85
2.3.5 Validación del diseño del medio de cultivo 86
3.4 Discusión..... 87
3.5 Conclusiones..... 90

Capítulo 3. Mitigación de cadmio en granos de cacao durante la fermentación mediante microorganismos 92
3.1 Introducción..... 93
3.2 Materiales y métodos..... 95
3.2.1 Localización del estudio 95
3.2.2 Crecimiento de microorganismos 96
3.2.3 Material vegetal y adecuación de los cajones de fermentación 97
3.2.4 Diseño experimental 98
3.2.5 Preparación de los tratamientos..... 99
3.2.6 Inoculación de microorganismos en la fermentación 99
3.2.7 Muestreo..... 100
3.2.8 Medición de pH durante la fermentación 100
3.2.9 Medición de cadmio 101
3.2.10 Evaluación sensorial 101
3.2.11 Análisis estadístico..... 102
3.3 Resultados 102

3.3.1 Temperatura y pH.....102
3.3.2 Efecto de la inoculación externa de microorganismos sobre el contenido de cadmio durante la fermentación 104
3.3.3 Evaluación Sensorial 105
3.4 Discusión 107
3.4.1 Temperatura y pH.....107
3.4.2 Análisis sensorial.....108
3.4.3 Cadmio.....109
3.5 Conclusiones 117

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones generales 119
4.1 Conclusiones 119
4.2 Recomendaciones 120

A. Anexo: Aislamientos de la fermentación de cacao cultivados en medio sólido suplementado con 20 mg Cd^{+2}/L 123

B. Anexo: Resultados de la medición de cadmio de las cepas individuales en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L 127

C. Anexo: Resultados de la medición de cadmio de las cepas individuales y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L..... 131

D. Anexo: Resultados de la medición de cadmio de las cepas individuales y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L con diferentes valores de pH inicial..... 137

E. Anexo: Ensayo de antagonismo entre bacterias y levaduras con capacidad para disminuir cadmio en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L. 141
Bacteria-Bacteria 141
Levadura-Levadura.....142
Levadura-Bacteria 142
Bacteria-Levadura 143

F. Resultados evaluación sensorial de los granos con y sin aplicación externa de inóculos microbianos a la fermentación 145

Bibliografía..... 151

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Población microbiana durante la fermentación de cacao. BAL: bacterias ácido-lácticas, BAA: bacterias ácido-acéticas. 15

Figura 1-2. Top 10 de países productores de cacao a nivel mundial.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1-3. Factores que influyen en la absorción de cadmio por raíces o brotes en cacao. *Fuentes contaminadas con cadmio. 27

Figura 1-4. Distribución de cadmio pseudototal en el suelo de 1837 fincas productoras de cacao en Colombia. 30

Figura 1-5. Mecanismos de remediación microbiana para reducir metales pesados y pesticidas..... 42

Figura 1-1. Mapa con ubicación del sitio de muestreo. A.Hacienda Betulia, Maceo, Antioquia, Colombia., B. Hacienda Monteoscuro, Cimitarra, Santander, Colombia. 50

Figura 1-2. Morfología microscópica de bacterias con tinción de Gram (A y B) y levaduras (C y D) con capacidad para crecer en medio suplementado con 20 mg Cd^{+2}/L. 57

Figura 1-3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de ADN de las levaduras M1, M4, M6, M14 aisladas de la fermentación de cacao con capacidad de biosorción de cadmio. CP: control positivo, M: marcador de peso molecular 58

Figura 1-4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de ADN de las bacterias M17 y M21 aisladas de la fermentación de cacao con capacidad de biosorción de cadmio. CP: control positivo, M: marcador de peso molecular 58

Figura 1-5. Dendrograma de las secuencias de genes ARNr 16S de cepas de bacterias con capacidad de biorremediación de cadmio. Filogenia realizada bajo el método árbol bayesiano con estimador bootstrap de 1000.....60

Figura 1-6. Dendrograma de las secuencias de genes rDNA 26S de cepas de levaduras con capacidad de biorremediación de Cd. Filogenia realizada bajo el método árbol bayesiano con estimador bootstrap de 1000. 60

Figura 1-7. Biosorción de cadmio por microorganismos seleccionados en experimentos realizados en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L. 61

Figura 1-8. Biosorción de cadmio por microorganismos inoculados de manera individual y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L 62

Figura 1-9. Biosorción de cadmio por microorganismos inoculados de manera individual y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L con diferentes valores de pH inicial 63

Figura 1-10. Espectros FTIR de biomasa de *W. anomalus* M4HMO sin cadmio y expuesta a 10 mg Cd^{+2}/L. 64

Figura 1-11. Espectros FTIR de biomasa de *B. subtilis* M21HB sin cadmio y expuesta a 10 mg Cd^{+2}/L. 65

Figura 2-1. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en medios de cultivo comerciales: YPG, PDB, SDB, RB. 83

Figura 2-2.Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en diferentes fuentes de carbono. 84

Figura 2-3.Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en diferentes fuentes de nitrógeno. 84

Figura 2-4.Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO a diferentes relaciones C:N (la concentración de sacarosa se mantuvo en 20 g/L en todos los experimentos).
.....85

Figura 2-5.Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO a diferentes concentraciones de carbono manteniendo la relación C:N en 10:1.....86

Figura 2-6.Tamizaje estadístico de componentes para el diseño de un medio de cultivo para el crecimiento de *W. anomalus* M4HMO 87

Figura 2-7. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en diferentes temperaturas 88

Figura 2-8. Validación del medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *W. anomalus* M4HMO. 89

Figura 3-1. Mapa con ubicación del sitio del ensayo. Granja Yariguíes. Barrancabermeja, Santander 996

Figura 3-2. Módulo de beneficio de cacao de la Granja Yariguíes..... 98

Figura 3-3. Cajones de fermentación con divisiones. 99

Figura 3-4. Diseño experimental. L: Levadura M4HMO, B1: Bacteria M21HB, B1+B2: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, L+B1+B2: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, FE: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos). 100

Figura 3-5. Temperatura de la masa de cacao durante la fermentación. L: Levadura M4HMO, B1: Bacteria M21HB, B1+B2: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, L+B1+B2: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, FE: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos). 104

Figura 3-6. pH interno y externo de los granos de cacao durante la fermentación. L: Levadura M4HMO, B1: Bacteria M21HB, B1+B2: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, L+B1+B2: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, FE: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos). 105

Figura 3-7. Cambio en la concentración de Cd en el grano de cacao durante la fermentación con aplicación externa de inóculos microbianos. L: Levadura M4HMO, B1: Bacteria M21HB, B1+B2: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, L+B1+B2: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo

mixto, FE: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos).....106

Figura 3-8. Análisis sensorial del grano de cacao con y sin aplicación externa de inóculos microbianos a la fermentación. L: Levadura M4HMO, B1: Bacteria M21HB, B1+B2: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, L+B1+B2: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, FE: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos). 107

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-2. Concentraciones máximas de cadmio en productos de cacao según Reglamento 488/2014 de la EU (EU 2014) 33

Tabla 1-1. Número de microorganismos aislados de la fermentación de cacao con capacidad para crecer en medio sólido y líquido suplementado con 20 y 120 mg Cd^{+2}/L, respectivamente. 57

Tabla 1-2. Identificación a partir del análisis por BLASTn de bacterias y levaduras aisladas de la fermentación de cacao con capacidad de biosorción de cadmio. 59

Tabla 2-1. Medios de cultivo evaluados mediante el diseño Plackett-Burman. Valores en g/L. En todos los medios de cultivo las concentraciones de sacarosa y PHS se mantuvieron en 20 y 2 g/L, respectivamente. ...**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2-1 Continuación…… 81

Tabla 2-2. Medios de cultivo evaluados mediante el diseño Box Behnken. Valores en g/L. En todos los medios de cultivo las concentraciones de $CaCl_2$, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, se mantuvieron en 0,1; 0,5 y 1.0 g/L, respectivamente. ..... 8**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2-2 Continuación…… 82

Tabla 2-3.Medios de cultivo evaluados para la validación del diseño del medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *W. anomalus* M4HMO. Valores en g/L. . **¡Error! Marcador no definido.**2

Tabla 3-1. Descripción de los tratamientos empleados en la fermentación de cacao 99

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
q	Coeficiente de unión específica. Metal absorbido por gramo de biomasa	mg/g	Ec1.1
Ci	Concentración inicial de cadmio	mg/L	Ec 1.1
Cf	Concentración final de cadmio	mg/L	Ec. 1.1
m	Biomasa seca de las cepas	g	Ec. 1.1
V	Volumen de la solución de cadmio	L	Ec. 1.1

Abreviaturas

Abreviatura	Término
BAL	Bacterias ácido lácticas
BAA	Bacterias ácido acéticasl
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
BS	Biomasa seca
MOS	Materia orgánica del suelo
PHS	Proteína hidrolizada de soya

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao*) es uno de los productos agrícolas de mayor importancia a nivel mundial en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica con una producción de 4,8 millones de toneladas anuales (11 billones de dólares) (ICCO, 2022). Dentro del portafolio de productos derivados del cacao se incluyen desde el mismo cacao en grano, hasta sólidos de cacao como la manteca, el licor y la cocoa; y productos finales como el chocolate de mesa, golosinas y bombonería (Ho et al., 2014). Aunque el cacao es originario de la cuenca amazónica, en África se produce más del 74% (3.594.000 toneladas) del cacao mundial. Por su parte, América y Asia, aportan el 20 y el 6%, respectivamente (ICCO, 2022). Sin embargo, solo el 5% del cacao producido en el planeta es clasificado como fino y de aroma, siendo el más apetecido en el mercado internacional por sus altas cualidades organolépticas. En este sentido, América Latina y el Caribe tienen una ventaja comparativa y competitiva respecto a África y Asia, por producir casi la totalidad del cacao fino y de aroma ofertado a nivel mundial. De hecho, en países como Bolivia, Colombia, Costa Rica, México, Nicaragua y Venezuela, más del 95% del cacao exportado se clasifica bajo esta denominación (Arvelo et al., 2016).

El cacao en Colombia ha adquirido gran importancia en los últimos años, convirtiéndose en uno de los productos agrícolas priorizados por el Plan Nacional de Desarrollo 2022 – 2026 y el Plan de Ordenamiento Productivo (MADR, 2023). Gracias a la calidad de los genotipos cultivados en Colombia, éste es reconocido como fino y de aroma en los mercados internacionales (ICCO, 2020). Por lo anterior, se ha incentivado no solo el aumento en las áreas sembradas, sino también en la producción y en las exportaciones de grano seco y sus derivados. Uno de los principales retos que afronta la cacaocultura colombiana para lograr altos niveles y mejores precios de exportación es el cumplimiento de la normatividad establecida por la Unión Europea en cuanto a los niveles permisibles de cadmio en algunos alimentos. El Reglamento 1881 de 2006 de la Unión Europea

(modificado con el decreto No.488/2014) (UE, 2014) regula estrictamente los contenidos de este metal en los productos derivados del cacao. Las mediciones de cadmio en grano en algunas regiones del país indican que en varias zonas productoras sobrepasan los niveles permisibles exigidos por el mercado mundial (0,1 mg/kg – 0,8 mg/kg), generando así un impacto negativo sobre las exportaciones al continente europeo, principal comprador mundial de cacao, lo que se traduce en preocupantes repercusiones económicas y sociales si se tiene en cuenta que la producción de cacao proviene principalmente de pequeños productores con mínimos ingresos (Meter et al., 2019).

El cadmio es un metal pesado tóxico, que se encuentra de manera natural en la corteza terrestre en forma de minerales. Su presencia en el suelo depende de diferentes factores, tales como: la meteorización de las rocas, la actividad volcánica, los incendios forestales, la erosión, los bajos niveles de zinc, las actividades mineras e industriales, propiedades fisicoquímicas del suelo (textura, pH, composición de materia orgánica) y la contaminación por uso de agroquímicos o agua de riego con alto contenido de cadmio. Este metal, puede ser absorbido por las plantas y posteriormente ser ingerido por el ser humano, convirtiéndose en un riesgo para su salud (Hamid et al., 2019). La planta de cacao tiene una afinidad natural por el cadmio y por lo tanto una alta capacidad para mover este metal pesado desde el suelo hasta sus diferentes órganos, entre ellos el fruto y las semillas. Como las semillas de cacao son procesadas a través de procesos de poscosecha (fermentación y secado), y se utilizan como materia prima para la producción del chocolates que finalmente son consumidos por el hombre, el cadmio absorbido representa un alto riesgo para la salud humana (Vanderschueren et al., 2021).

Existen métodos convencionales para eliminar metales pesados, tales como precipitación química, filtración por membrana, intercambio iónico, tratamiento electroquímico, adsorción sobre carbón activado, entre otros. Sin embargo, muchas de estas tecnologías no son compatibles con la producción de cacao en grano o pueden ser ineficientes y de alto costo de operación (Kapahi & Sachdeva, Kure et al., 2018; 2019; Singh & Gupta, 2016). Consecuentemente, en algunos países de América Latina y el Caribe se han realizado estudios enfocados a la investigación del comportamiento del cadmio en el cultivo de cacao (Chavez et al., 2015; Gramlich et al., 2017; Gramlich et al., 2018; Ramtahal et al., 2016) y la medición del contenido de este metal en diferentes órganos de la planta y en suelos cultivados (Arévalo-gardini et al., 2017; Argüello et al., 2019; Barraza et al., 2021;

Gil et al., 2022; Tantalean & Huauya, 2017). Además, se han evaluado diferentes estrategias para disminuir la absorción por parte de la planta y durante el proceso de poscosecha, basadas principalmente en la aplicación de enmiendas al suelo y biorremediación mediada por microorganismos (Canchignia et al., 2021; Ramtahal et al., 2012; Revoredo & Hurtado, 2017;Zug et al., 2019; Ramtahal et al., 2019) (Cedeño et al., 2020; Morales-Rodríguez et al., 2022).

En Colombia, la mitigación de cadmio ha sido abordada por algunos organismos de investigación y del sector privado, a través de estudios con diferentes enfoques tales como: evaluación de fuentes antropogénicas y geogénicas (Albarracín, 2017; Bravo et al., 2014; Rodriguez-Sánchez et al., 2019), enmiendas para la inmovilización del metal en el suelo (fertilizantes químicos enriquecidos con zinc y abonos orgánicos) (Chica & Lopez, 2020; Vanderschueren & Pulleman, 2021), medición de cadmio en suelo y en tejidos de la planta (Bravo et al., 2021; Bravo & Benavides-Erazo, 2020; Rodríguez-Albarracín et al., 2019), fitorremediación (Casteblanco, 2018), evaluación de bacterias tolerantes (Ayubb et al., 2017; Bravo et al., 2018; Cáceres & Torres, 2017; Córdoba-Novoa et al., 2021; Quiroga-Mateus et al., 2022), uso de micorrizas para su inmovilización (Fernández- Lizarazo, 2018; Pérez-Moncada et al., 2019) y reducción en granos de cacao mediante estrategias de nanotecnología y biotecnología (Meter et al., 2019).

Específicamente, los procesos mediados por microorganismos como la biorremediación tienen lugar en los ecosistemas a través de una fuerte interacción entre las fuentes de metales pesados y los microorganismos nativos de estos ambientes. Los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia únicos que les permiten sobrevivir y, en algunos casos, formar complejos o atrapar fuertemente los metales pesados, disminuyendo su concentración en determinados entornos (Monachese et al., 2012a), mediante diferentes procesos como la biosorción, bioacumulación, biotransformación, biomineralización y biodegradación (Zhang et al., 2020). Los organismos con esta capacidad pertenecen a varios grupos de bacterias, hongos, levaduras, cianobacterias y algas (Delangiz et al., 2020; Kapahi & Sachdeva, 2019). Este mecanismo de biorremediación a partir de biomasa microbiana se convierte en una alternativa con potencial para la mitigación de cadmio en cacao debido a su selectividad, compatibilidad con los procesos de obtención de cacao, tiempo de contacto, facilidad de escalado,

viabilidad económica y compatibilidad con el medio ambiente (Bravo et al., 2018; Feria-Cáceres et al., 2022; Kure et al., 2018; Revoredo & Hurtado, 2017; Wang & Chen, 2009).

Se han reportado géneros de bacterias tales como *Bacillus* y *Lactobacillus* y de levaduras como *Saccharomyces*, los cuales hacen parte de la microbiota de la fermentación de cacao (Almeida et al., 2018; Ardhana & Fleet, 2003; Schwan et al., 2014) y han demostrado capacidad para disminuir naturalmente niveles de metales pesados (Abioye et al., 2018; Kapahi & Sachdeva, 2019; Monachese, 2012a; Monachese et al., 2012b). Además, los estudios que implementan microorganismos para mitigar cadmio en cacao durante la fermentación han demostrado que no hay una afectación significativa en las características sensoriales del producto y pueden ayudar al cumplimiento de la reglamentación de cadmio para cacaos especiales con fines de exportación (Meter et al., 2019). Con el objetivo de contribuir al desarrollo de estrategias para la mitigación de cadmio en cacao, en este trabajo se planteó la obtención de inóculos microbianos a partir de aislados de la fermentación de cacao con capacidad para disminuir concentraciones de cadmio en medio acuoso y su posterior evaluación para mitigar cadmio en granos de cacao durante el proceso de fermentación bajo condiciones de campo. Además, con el fin de evaluar la viabilidad técnica de producción in vitro de inóculos microbianos, se definieron condiciones de cultivo a escala de laboratorio para el crecimiento de una levadura seleccionada por su capacidad para secuestrar cadmio en medio acuoso.

Hipótesis

La inoculación de microorganismos exógenos durante el proceso de fermentación de cacao puede disminuir los niveles de cadmio en los granos.

Objetivos

General

Evaluar la capacidad de inóculos microbianos para la mitigación del contenido de cadmio durante el proceso de fermentación de cacaos especiales.

Específicos

1. Aislar microorganismos con capacidad para reducir niveles de cadmio en soluciones acuosas a partir de la fermentación de cacao.

2. Diseñar un medio de cultivo de bajo costo para la propagación de un microorganismo con potencial para reducir niveles de cadmio en soluciones acuosas.

3. Seleccionar inóculos microbianos con capacidad para disminuir niveles de cadmio en granos de cacaos especiales durante el proceso de fermentación en condiciones de campo.

Marco teórico

1.1 El cacao (*Theobroma cacao* L.)

El cacao es originario de las selvas tropicales de América del Sur, siendo el centro de diversidad la región del Alto Amazonas. Sin embargo, el cultivo actual se extiende a través de los trópicos húmedos y la mayor proporción se encuentra en África occidental (Daymond & Bekele, 2022). El cacao es un arbusto perenne perteneciente a la familia Malvaceae, que crece en una franja geográfica fundamentalmente tropical y que se extiende unos 20° de latitud hacia ambos hemisferios (Prabhakaran, 2010). Se clasifica como cultivo permanente, con un ciclo de duración de casi cuarenta años. Las plantas de cacao pueden alcanzar entre cuatro y diez metros de altura, son amantes a la sombra, por lo que normalmente se encuentran bajo árboles más grandes como el cedro (*Cedrela odorata* L.), el bucare (*Erythrina poeppigiana*), el mango (*Mangifera indica*) y el plátano (*Musa paradisiaca*) (Cheesman, 1944).

A nivel mundial, el cacao se clasifica en tres variedades principales: i., criollo reconocido por su calidad en el sabor y aroma, y utilizado en la elaboración de los chocolates premium. Esta variedad, cultivada principalmente en Centro y Sur América, el Caribe e Indonesia, es de delicado manejo, con una alta susceptibilidad a plagas y enfermedades y con baja productividad por árbol respecto a las demás variedades; ii., forastero, es una variedad originaria del Amazonas y es el más cultivado en el mundo, principalmente en África (Costa de Marfil y Ghana). Es una árbol resistente y vigoroso que produce granos con un sabor fuerte; iii., Trinitario, resultante del cruzamiento sexual entre criollo y forastero con el fin de mejorar la calidad, productividad, precocidad y respuesta a plagas y enfermedades, ha

sido ampliamente extendido por todo el mundo. Este híbrido se cultiva principalmente en Colombia y América Central, pero también en Camerún y Nueva Guinea. (FINAGRO, 2020; Abbott et al., 2019; Jürgen & Díaz, 2010). Como su nombre lo indica, trinitario se origina en la nación insular de Trinidad. Hoy, esta variedad junto con el criollo produce los reconocidos "cacaos finos y de aroma" (ICCO, 2020).

Theobroma cacao L. comienza la formación de los frutos a los tres años y alcanza su máximo rendimiento y productividad después de los ocho años. El fruto se desarrolla en el tronco y en las ramas del árbol. Al madurar, la vaina contiene entre 20 y 40 almendras, recubiertas por una pulpa mucilaginosa. Las almendras y la pulpa se extraen del fruto y se utilizan como la principal materia prima para la producción de chocolate (Vásquez, 2019).

Las semillas de cacao tienen dos grandes cotiledones de almacenamiento y un eje embrionario cubierto por una cáscara endurecida. Adheridas a la cáscara de la semilla, las células del endocarpio ricas en pectina forman la pulpa de la fruta (Andersson et al., 2006; Figueira et al., 1993). La composición de las sustancias de almacenamiento en los cotiledones se caracteriza por la presencia de grasa (50%), compuestos fenólicos (15%), proteína (12%), almidones (5%) y sacarosa (2%), todo ello expresado como porcentajes en relación con el peso seco. La pulpa acuosa contiene agua (80%), monosacáridos y disacáridos (12%), ácido cítrico y otros ácidos orgánicos (2%), y trazas de ésteres, aldehídos, metilcetonas, alcoholes secundarios y terpenos (Dircks, 2009; Figueira et al., 1993; Pino et al., 2011).

La producción mundial de cacao es altamente dependiente de las condiciones climáticas. La lluvia, la temperatura y la humedad relativa son parámetros que tienen un fuerte impacto sobre la producción cacaotera. La variabilidad de los factores climáticos afecta el ciclo fisiológico del cultivo y además condicionan la probabilidad de incidencia de plagas y enfermedades (Arvelo et al., 2016). El desarrollo óptimo del cacao se presenta en el rango de temperatura media anual de 22 a 30°C. con temperaturas medias diarias alrededor de 27°C durante todo el año.

Las mejores regiones para cultivar cacao presentan una pluviosidad entre 1.500 y 2.500 milímetros anuales, con la condición de que los períodos de lluvia deben estar bien

distribuidos a lo largo del año, pues temporadas secas prolongadas mayores de dos meses, afectan notablemente la producción y amenazan con secamiento de los árboles. Cuando se tienen condiciones de menor precipitación de la señalada como mínima, es indispensable la disponibilidad de riego suficiente y seguro.

Para un mejor desarrollo y una alta productividad, los árboles de cacao deben ser cultivados en un suelo profundo y fértil, bien drenado, con estructuras altamente porosas y textura preferiblemente franca a franco arcillosa. Debido a su sistema de raíces primarias, el árbol de cacao necesita una profundidad efectiva de más de 150 cm y una zona radicular bien aireada y permeable. Los suelos pesados arcillosos y arenosos no son adecuados, los primeros por su falta de aireación, los segundos por su poca capacidad de retención de agua y nutrientes (Mejía et al., 2012).

El pH del suelo es importante debido a los efectos que este parámetro tiene sobre las actividades biológicas y químicas que afectan el metabolismo de las raíces de las plantas. El cacao prefiere un suelo con pH de 5,5 a 7; relación C/N de 10-12; contenido de carbono orgánico de al menos 3%; y una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 8-15 me/100 g de suelo. Se toleran valores de pH menores y mayores, pero afectan sustancialmente el rendimiento y la calidad del grano. Un pH más alto (> 7,6) puede inducir una deficiencia de nutrientes de hierro, zinc y manganeso. Los niveles de pH determinan el hecho de que la planta no sea capaz de absorber los nutrientes o algunos de ellos y puede ser el factor definitivo de la baja productividad e incluso del deficiente desarrollo del cultivo, por tanto, debe ser tenido en cuenta de manera especial a la hora de fertilizar (Jürgen & Díaz, 2010).

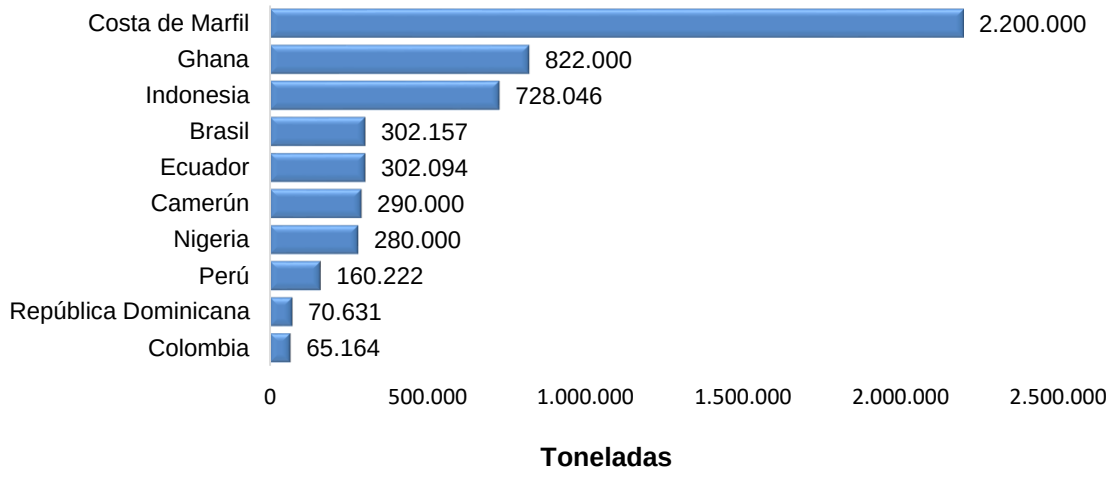
El árbol de cacao produce varias cosechas al año. Aunque los frutos maduran a lo largo de todo este tiempo, las áreas con un patrón de precipitaciones bimodal suelen tener dos períodos de cosecha: una temporada de cultivo principal y otra intermedia. La cosecha principal se recoge durante el período de menor precipitación y puede extenderse entre tres y cinco meses; la cosecha intermedia suele ser más corta, sin embargo, esto depende de cada país (Beg et al., 2017). La cosecha de frutos se realiza cuando las mazorcas de cacao han alcanzado su óptimo grado de maduración (variedades con frutos verdes se tornan amarillos y variedades con frutos rojos o vinotinto se tornan rojo intenso o anaranjados). Durante el procedimiento se utiliza una tijera podadora manual u horquilla (media luna), cortando adecuadamente el pedúnculo sin afectar los cojines florales. Antes

de partir las mazorcas, se deben separar las sanas de las enfermas (con daños de insectos o animales) ya que esto deteriora la calidad final del producto. El corte de las mazorcas para retirar los granos y separarlos de la placenta, debe ser transversal y sobre una plataforma de corte sin filo, este es un método seguro que evita que se dañe el grano el cual puede ser susceptible a la infección por hongos y también ayuda a contribuir con la seguridad del recolector. Los granos son depositados en un recipiente limpio de plástico o fibra exclusivos para la labor de cosecha, con la finalidad de evitar la contaminación cruzada por tierra o basura. Después de la extracción, los granos pasan por un proceso de fermentación y secado antes de ser empacados para su transporte y entrega a la industria transformadora (CNCH, 2019).

1.2 Importancia del cacao

El cacao es uno de los principales productos agrícolas comercializados en el mundo, principalmente como materia prima para la producción de chocolate (chocolate de mesa, las golosinas de chocolate y la bombonería) y de semielaborados (pasta, manteca, cocoa) (Beg et al., 2017). Según las cifras publicadas por la FAO (Food and Agriculture Organization), para el año 2021, la producción mundial de cacao se encuentra principalmente concentrada en África (Costa de Marfil, Ghana, Camerún y Nigeria, que comprenden el 74,5%), Asia (Indonesia, con un 5,5%) y América Latina (Brasil, Ecuador, Perú, República Dominicana y Colombia, con el 20%) (Figura 1-2).

Figura 1-2. Top 10 de países productores de cacao a nivel mundial.



Fuente:http https://www.fao.org/faostat/en/?#rankings/countries_by_commodity, 2021

El cacao contiene más antioxidantes fenólicos que la mayoría de los alimentos. Los flavonoides, que incluyen catequina, epicatequina y procianidinas, predominan en la actividad antioxidante. Los efectos antioxidantes del cacao pueden influir directamente en la resistencia a la insulina y, a su vez, reducir el riesgo de diabetes (Ishaq & Jafri, 2017). Además, el consumo de cacao puede estimular cambios en las vías de señalización involucradas en la expresión génica y la respuesta inmune (Katz et al., 2011). El cacao puede reducir el riesgo o retrasar el desarrollo de enfermedades crónicas, tales como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras relacionadas con la edad, puede proteger la piel del daño oxidativo que genera la radiación UV en las preparaciones tópicas y tener efectos beneficiosos sobre la saciedad, la función cognitiva y el estado de ánimo (Martin & Ramos, 2021).

Se reconoce la existencia de al menos cinco millones y medio de productores de cacao en el mundo y se estima para América Latina y el Caribe una población superior a los 350.000 cacaoteros. El cacao juega un papel económico, social y cultural muy importante, el 95% de la producción mundial de cacao está en manos de la “agricultura familiar”, con productores que se caracterizan por residir y trabajar en predios pequeños, con poca inversión e infraestructura, donde el trabajo lo realizan principalmente los miembros de la familia y el ingreso familiar depende predominantemente de la producción de cacao (Arvelo et al., 2016). Por otra parte, actualmente este cultivo es clave para concretar procesos de

paz, constituyéndose en varios países en una opción viable para sustituir cultivos ilícitos y otros cultivos menos rentables (Sánchez et al., 2019)

El cacao es una de las apuestas productivas agroindustriales de Colombia, por su importancia en el desarrollo y apoyo a la sostenibilidad social. En tal sentido, como respuesta a la iniciativa de fortalecer el sector productivo, las políticas públicas de Colombia han priorizado el cacao como materia prima de interés para incrementar la productividad, eficiencia, calidad, investigación y desarrollo (MADR, 2019; Ríos et al., 2017). Este interés del país está alineado con las oportunidades que presenta el modelo de negocio de cacao para Colombia, debido al reconocimiento mundial de la calidad de los genotipos que en el país se cultivan, y por ende al tipo de grano de cacao que puede producirse, el cual, según los reconocimientos otorgados en el año 2011, 2015 y 2019 por la Organización Mundial del Cacao – ICCO, el 95% del cacao cultivado y exportado por Colombia se considera como fino y de aroma, caracterizado por sus altas cualidades organolépticas para la obtención de elaborados Premium (Ginatta et al., 2020). Sin embargo, su producción corresponde sólo al 5% de la oferta mundial, la cual se encuentra concentrada principalmente en varios países latinoamericanos, tales como Bolivia, Colombia, Costa Rica, México, Nicaragua, Venezuela, Perú, Ecuador, Honduras, Guatemala y Panamá. Esta categoría es un sello diferenciador en el mercado mundial, y Colombia puede constituirse en un comercializador potencial de productos con calidad reconocida, obteniendo así ventajas económicas en los nichos de mercados de los cacaos especiales (Contreras, 2017).

Debido a las condiciones agroecológicas de Colombia, el país cuenta con una potencialidad de 17 millones de hectáreas aptas para el desarrollo de cultivos de cacao, ubicadas en los departamentos de Meta, Vichada, Antioquia, Caquetá y Córdoba. Actualmente, el país cuenta con 144.000 hectáreas de producción de 175.000 sembradas, generando más de 55.000 toneladas al año en promedio de las cuales se exportan cerca de 11.000 (Cobaleda, 2022). El cultivo está presente en 30 departamentos y en más de 400 municipios se cultiva cacao, siendo Santander (40,6%), Arauca (11,4%) Antioquia (9,6%), Tolima (5,8%) Huila (5,1%) y Nariño (5%) los principales productores, con más del 70% de la producción total nacional (FEDECACAO, 2022). Aunque Colombia no se encuentra dentro de los principales exportadores mundiales de este producto, el sustento

de aproximadamente 52.000 familias de productores pequeños depende de la producción agrícola, transformación agroindustrial y comercialización de este cultivo (FINAGRO, 2020).

Para el periodo 2020/2021, las exportaciones registradas de cacao en grano en el mundo superaron los 3,25 millones de toneladas anuales, siendo lideradas por cinco países (Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Ecuador y Nigeria) que exportan más del 85% de ese total. África, aporta el 76% de las exportaciones globales de cacao, le sigue América con el 16% y los países de Asia y Oceanía con el 8% (MIDAGRI, 2022). El cacao en su mayoría es exportado como materia prima para la elaboración de chocolates, siendo el grano seco el principal producto. En cuanto a la exportación de cacao como grano seco, Ecuador ocupa el primer lugar en Latinoamérica seguido por República Dominicana, Perú y Colombia. La exportación de cacao como producto procesado (pasta, torta, manteca, polvo de cacao y chocolate de mesa) lo realiza en mayor medida Brasil, seguido por Ecuador, Perú y Colombia (Sánchez et al., 2019).

Las exportaciones de cacao en Colombia han presentado una tendencia creciente desde el año 2011 hasta el 2015, llegando a este último a un total de 13.744 toneladas exportadas. Para el año 2017 superaron las 11 mil toneladas valoradas en USD $27 millones, siendo los principales destinos México, Países Bajos, Italia, España, Malasia, Bélgica, Estados Unidos, Argentina, Holanda e Indonesia que en conjunto suman cerca del 98% del total de las exportaciones de cacao colombiano. En el año 2021 Colombia exportó 11.689 toneladas de grano seco, equivalentes a USD $29,9 millones, lo que representa un crecimiento de 4,9% con respecto al año anterior. Año tras año, así como se ha evidenciado un incremento en la producción nacional de cacao y en sus exportaciones, también se han constituido nuevas empresas, las cuales han enfocado su mercado a la comercialización del grano de cacao en el exterior como una buena oportunidad de negocio (FEDECACAO, 2022).

1.3 Poscosecha

El beneficio o poscosecha del cacao comprende dos actividades fundamentales: fermentación y secado. Estos procesos permiten el desarrollo de las características

organolépticas de los granos de cacao relacionadas con los precursores de sabor, color y aroma a chocolate.

1.3.1 Fermentación

Es un proceso bioquímico fundamental en el beneficio del cacao que permite la degradación de la pulpa (mucílago) y la producción de alcoholes (etanol) y ácidos orgánicos (láctico y acético) a partir de microorganismos (levaduras y bacterias) bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Estos microrganismos generalmente provienen del medio ambiente, del personal que manipula los cultivos, de los contenedores de transporte, las herramientas, las superficies de las mazorcas, etc. Al inicio de la fermentación (24/36h), la pulpa de los granos reduce la difusión de oxígeno dentro de la masa, creando condiciones anaeróbicas, que junto con la acidez inicial (pH 3,0-4,0, debido al ácido cítrico) favorece la colonización por levaduras, las cuales utilizan los carbohidratos de la pulpa para producir etanol y CO_2 (Schwan et al., 2014). Despues de las 48 horas, la masa de cacao se voltea y se mezcla, además, la cantidad de mucílago ha disminuido, lo cual genera un ambiente más aeróbico, favoreciendo el crecimiento de bacterias acido lácticas (BAL) y bacterias acido acéticas (BAA). Las BAL convierten azucares y algunos ácidos orgánicos (ácido cítrico) en ácido láctico (De Vuyst & Weckx, 2016). Los productos del proceso heterofermentativo del ácido cítrico por parte de BAL (ácido láctico, etanol, ácido acético y CO_2), genera un ligero incremento en el pH, lo que promueve el crecimiento de BAA. Este tipo de microorganismos están durante toda la fermentación, pero su concentración aumenta hacia el final cuando la aireación es mayor. Las BAA son responsables de la conversión del alcohol en ácido acético, reacción fuertemente exotérmica que contribuye a un aumento gradual de la temperatura de la masa en fermentación hasta aproximadamente 50°C en 72 a 96 h (De Vuyst et al. 2010a; Schwan & Wheals 2004). El calor y la actividad del ácido acético provocan la muerte de los embriones de las semillas, con la consiguiente pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana. Los productos de la fermentación (etanol, acetato y lactato) más el aumento de la temperatura afectan directamente a los componentes del grano, provocando importantes cambios bioquímicos que conducen al desarrollo de los precursores típicos del color, sabor y aroma del chocolate (De Vuyst & Weckx, 2016; Schwan et al., 2014).

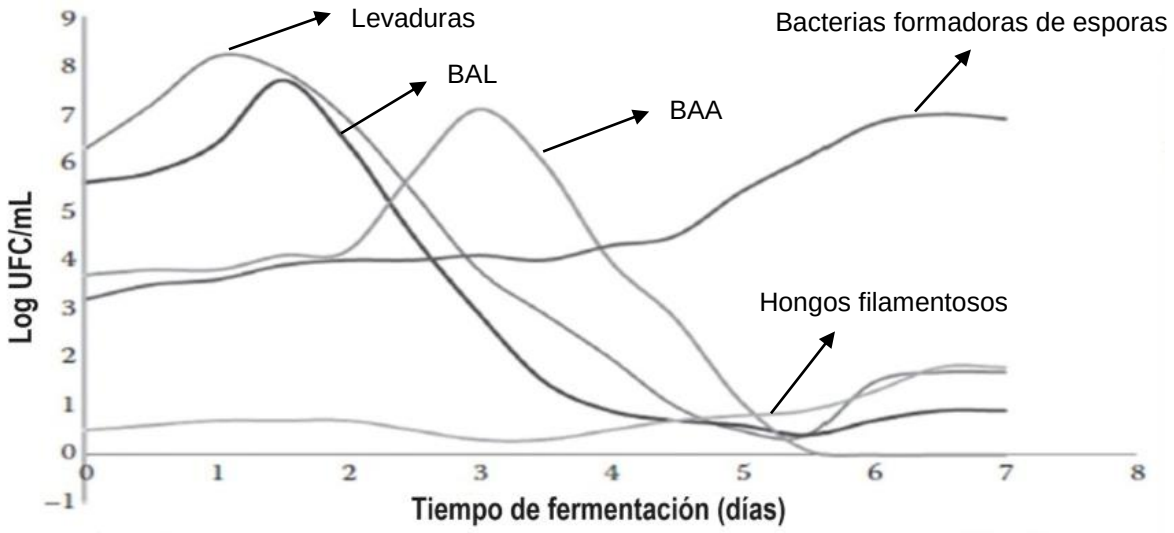
El tiempo de fermentación depende de las condiciones de temperatura del lugar y puede ser de dos a ocho días según se trate de cacaos de origen criollo, trinitario o forastero. Debido al bajo contenido de compuestos polifenólicos, la fermentación del tipo criollo requiere de tres a cuatro días en condiciones favorables. Los cultivares forastero y trinitario se dejan fermentar por un período más largo (6-8 días) (Jürgen & Díaz, 2010). Es importante revolver, mezclar o voltear la masa de granos durante la fermentación con el propósito de facilitar la aireación, romper los granos adheridos ("bolas"), prevenir la formación de mohos y hacer más uniforme el proceso. Las condiciones y prácticas de fermentación inadecuadas reducen la calidad de los granos, lo cual representa un grave problema para muchos fabricantes.

En relación con lo anterior, la fermentación de cacao es considerada una etapa clave en las características del grano final, dado que para que se generen los precursores de aroma, sabor y color en el grano son necesarias las reacciones y transformaciones bioquímicas que suceden en el interior y exterior de los granos generadas por la actividad de los microorganismos presentes en el proceso (Caligiani et al., 2015; Dircks, 2009).

▪ Microorganismos en la fermentación de cacao

El mucílago de los granos de cacao es rico en azúcares fermentables como glucosa, fructosa y sacarosa, y tiene un pH bajo de 3,0 a 3,5, principalmente debido a la presencia de ácido cítrico. Estas condiciones permiten el crecimiento inicial de levaduras y BAL (Figura 1-1). Las levaduras realizan la fermentación alcohólica, lo cual implica el crecimiento secuencial de los géneros *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces*. Las BAL también fermentan azúcares de la pulpa y utilizan ácido cítrico, dentro de este grupo se encuentran *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*. Las BAA (*Acetobacter* y *Gluconobacter*.) eventualmente crecen, oxidando el etanol, (inicialmente producido por las levaduras), a ácido acético. Finalmente, las bacterias aerobias formadoras de esporas del género *Bacillus* se desarrollan cuando la acidez de la masa disminuye y la temperatura aumenta a 40-50 °C. También, se han aislado varias especies de hongos de los granos en fermentación, pero su papel en el proceso aún no está claro (Schwan et al., 2014).

Figura 1-1. Población microbiana durante la fermentación de cacao. BAL: bacterias ácido-lácticas, BAA: bacterias ácido-acéticas.



Fuente: Schwan et al., 2014

▪ Levaduras

Las levaduras son los microorganismos dominantes en la fermentación de cacao, especialmente durante las primeras etapas, además, son consideradas esenciales para el desarrollo del sabor y aroma del chocolate. Las funciones más importantes de las levaduras durante la fermentación de cacao parecen ser: i., la producción de etanol en condiciones anaeróbicas y alto contenido de azúcar, que finalmente se consume por oxidación; ii., la descomposición del ácido cítrico en la pulpa, lo que conduce a un aumento del pH de 3,5 a 4,2, permitiendo el crecimiento de bacterias; iii., producción de ácidos orgánicos (ácidos oxálico, fosfórico, succínico, málico y acético), que permeabilizan la membrana celular y producen la muerte de los cotiledones de los granos; iv., producción de algunos compuestos orgánicos volátiles que pueden contribuir al sabor y aroma del chocolate o, más probablemente, a los precursores de sabor y aroma; v., secreción de pectinasas que reducen la viscosidad de la pulpa, permitiendo la aireación de la masa (Schwan et al., 2014).

Existe una alta diversidad de levaduras durante la fermentación, sin embargo, los géneros que predominan en el proceso son: *Saccharomyces, Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida* y *Torolospura*. *Hanseniaspora guillermondii / opuntiae* generalmente inicia la fermentación debido a su baja tolerancia al etanol y al calor, buena tolerancia a ambientes ácidos y no competitividad con las BAL creando condiciones necesarias para el crecimiento de especies como *Saccharomyces cerevisiae* (cepa más abundante), *Pichia kudriavzevii*, y *Pichia membranifaciens* que pueden crecer en ambientes ácidos, con etanol y algunas son termoresistentes (Ardhana & Fleet 2003; Ho et al., 2014; Meersman et al., 2016). Por otro lado, la presencia y el tiempo de desarrollo individual de estas especies dominantes durante la fermentación puede variar debido a varios factores como la geografía, las prácticas de la fermentación y las propiedades del grano de cacao utilizado (Otárola, 2018; Schwan & Wheals; 2004).

▪ Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las BAL están presentes desde el inicio de la fermentación, sin embargo, las levaduras son dominantes. La actividad de las levaduras se inhibe por la concentración de alcohol, incremento del pH y aumento de la aireación. Después de 48-96 horas, las condiciones microaerófilas, la hidrólisis de los azúcares de la pulpa y pH bajo se vuelven favorables para las BAL, las cuales dominan la población microbiana durante este tiempo (Dircks, 2009). Las BAL comúnmente involucradas en la fermentación de cacao incluyen especies pertenecientes a los géneros: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella*. Al comienzo de la fermentación, se pueden encontrar especies como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Fructobacillus tropeaoli*, *Liquorilactobacillus cacaonum*, *Limosibacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Sin embargo, las BAL de las especies *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum* son las predominantes durante la fermentación de cacao (De Vuyst y Weckx, 2016).

Metabólicamente, las BAL realizan tres reacciones principales durante la fermentación del grano: i., fermentan los azúcares de la pulpa, ii., utilizan ácido cítrico, y iii., algunas pueden reducir la fructosa a manitol. Estas reacciones contribuyen a cambios en la composición de la pulpa que impactan en la calidad del cacao y del chocolate y, posiblemente, en la

ecología microbiana de la fermentación. Las especies homofermentativas (*L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*) fermentan los azúcares de la pulpa a través de la vía de Embden-Meyerhof, para producir principalmente ácido láctico (más del 85%). Las especies heterofermentativas (*L. fermentum*. *Leuconostoc spp*. y *Weissella spp*.) fermentan los azúcares a través de la ruta del monofosfato de hexosa, que produce una mezcla principalmente de ácido láctico, etanol, ácido acético y CO_2. El ácido láctico puede difundirse en el cotiledón y, dado que no es volátil, permanece en el grano después del secado y tostado. De esta forma, afecta la acidez y calidad de los granos y del chocolate. Por lo tanto, es probable que un predominio de especies heterofermentativas produzca granos menos ácidos. Sin embargo, no todo el ácido láctico entra al grano, ya que parte de él puede ser utilizado por levaduras y BAL (Lefeber et al., 2010; Pereira et al., 2012; Schwan & Wheals, 2004). El metabolismo de la fructosa a manitol varía según la cepa, encontrándose una tendencia más fuerte en algunas cepas de *L. fermentum* (Lefeber et al. 2010). Cuanta más fructosa se utilice en esta reacción, menos estará disponible para la fermentación en ácido láctico, lo que dará menos granos ácidos.

El ácido cítrico es utilizado por muchas especies de BAL, incluidas las asociadas con la fermentación del cacao. Se metaboliza en gran medida en una mezcla de ácido láctico, ácido acético, etanol y diacetilo (De Vuyst et al., 2010; Pereira et al., 2012). Se considera que su utilización por las BAL es el factor principal para disminuir la acidez de la pulpa y equilibrar el pH del grano a valores de 5,0 a 5,5 que se consideran óptimos para las actividades proteolíticas endógenas y otras actividades enzimáticas (De Vuyst et al., 2010). Al igual que las levaduras, su metabolismo de azúcares de hexosa produce una amplia gama de metabolitos secundarios, como alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos y cetonas, que podrían ingresar al grano y afectar el sabor (Illeghems et al., 2016; Sarbu & Csutak, 2019). Además de los ácidos orgánicos, se sabe que las BAL producen sustancias con actividad antimicrobiana y antifúngica, como las bacteriocinas, que podrían tener un impacto en la actividad de las levaduras y en la ecología microbiana de la fermentación (Crowley et al., 2013; Fleet, 2003; Sadiq et al., 2019), así como en la prevención del crecimiento de hongos toxigénicos o de deterioro en los granos durante el secado y almacenamiento (Dircks, 2009; Fahrurrozi et al., 2019)

▪ Bacterias ácido-acéticas (BAA)

El consumo de la pulpa de los granos, la disminución de las poblaciones de levaduras y BAL y el mezclado de la masa, causa un incremento en la temperatura (30 a 37°C) y aireación de la fermentación. Esto crea condiciones adecuadas para el desarrollo de BAA, las cuales son responsables de la oxidación del etanol a ácido acético y de la posterior conversión de este último a CO_2 y agua. La producción de ácido acético es un proceso exotérmico que eleva la temperatura de los granos de cacao por encima de 50°C (Ho, 2014; Lefeber et al., 2011). Este ácido tiene varias implicaciones en la calidad del grano y del chocolate. Primero, se difunde a través del grano, donde, en combinación con el etanol y la temperatura elevada, provoca la pérdida de la integridad celular y la muerte del embrión. Estos cambios, junto con la disminución del pH, desencadenan la activación de enzimas endógenas del grano de cacao con actividad hidrolítica como las carboxipeptidasas, endoproteasas y galactosidasas. Estas modificaciones bioquímicas en el interior del grano conllevan a la síntesis de los precursores de color y sabor del cacao (Dircks, 2009; Ho, 2014; Sarbu & Csutak, 2019; Schwan & Wheals, 2004).

El ácido acético contribuye a la acidez volátil del grano y, si es excesivo y no se elimina correctamente en el procesamiento posterior (secado y tostado), puede disminuir la calidad del grano. Además, el ácido acético es antimicrobiano y su presencia en la pulpa puede influir selectivamente en el crecimiento posterior de levaduras, bacterias y hongos filamentosos que, a su vez, pueden tener impactos en la calidad del grano. De hecho, el ácido acético residual puede limitar el crecimiento de hongos micotoxigénicos y de descomposición durante la etapa de secado (Copetti et al., 2012). Las BAA también pueden oxidar los azúcares de la pulpa y los compuestos producidos durante la fermentación (p.ej. ácido láctico) para formar metabolitos como ácido glucónico, aldehídos, cetonas y otros volátiles que pueden tener un efecto en la calidad del grano (Pereira et al., 2012).

La diversidad de BAA que se encuentran en las fermentaciones del grano de cacao, globalmente y en cualquier fermentación en particular, es mucho menor que la diversidad de levaduras o BAL. La especie *Acetobacter pasteurianus* es la más prevalente de las BAA presentes durante la fermentación de granos de cacao, posiblemente por su capacidad de metabolizar etanol, manitol y ácido láctico, además de presentar termoresistencia, pero

también pueden prevalecer otras, como *G. oxydans*, *A. tropicalis*, *A. lovaniensis* y *A. syzgii*. (Schwan et al., 2014). Las especies de *Gluconoacetobacter* son menos comunes y pueden indicar una fermentación inadecuada ya que oxidan glucosa a ácido glucónico, y este azúcar no debería estar disponible en esta etapa de la fermentación. Además, el ácido glucónico puede permitir el crecimiento de otras levaduras al final de la fermentación, que podrían generar sabores desagradables (De Vuyst & Weckx, 2016; Ho, 2014).

Las altas temperaturas en combinación con el etanol son factores de estrés que limitan el crecimiento o destruyen las células vegetativas de muchos microorganismos. En las últimas fases de la fermentación, las condiciones ambientales con un aumento del pH (3,5 a 5,0) y la aireación, se vuelven favorables para el crecimiento de bacterias aerobias formadoras de esporas del género *Bacillus* (Ho, 2014; Schwan & Wheals, 2004).

▪ Bacterias aerobias formadoras de esporas

Las bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* proliferan principalmente en la etapa final de la fermentación de cacao. Son microorganismos ubicuos en el ambiente, aerobios y anaerobios facultativos, con diversidad metabólica dado que pueden utilizar una variedad de fuentes de carbono y además crecer bajo condiciones extremas. En las últimas horas de la fermentación, las principales fuentes de carbono para estas bacterias son los ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido láctico y el manitol (Ardhana & Fleet 2003). Varios estudios han informado que las especies del género *Bacillus* están presentes a lo largo de la fermentación a un nivel más alto que las levaduras, BAL y BAA (Lima et al., 2012). Además, son, al igual que las BAL y las BAA, responsables de la acidificación (Kouame et al., 2015a; Kouame et al., 2015b).

Las funciones de estas bacterias durante la fermentación no se han dilucidado completamente, sin embargo, se ha considerado que *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* producen ácidos grasos de cadena corta (C3-C5) durante la fase aeróbica, los cuales generan sabores desagradables en el producto final (Ardhana & Fleet 2003; Sarbu & Csutak, 2019; Schwan, 1998). Contrariamente, Ouattara et al. (2008, 2011), han sugerido que *Bacillus spp.* tiene una función importante como productor de enzimas pectinolíticas durante la fermentación. La descomposición de la pectina contenida en la pulpa por acción de enzimas pectinolíticas es un proceso fundamental para la penetración

de compuestos en el grano, principalmente etanol y ácido acético. Estos compuestos, a su vez, activan enzimas de proteólisis dependientes del pH, lo que lleva a la degradación de las proteínas almacenadas en aminoácidos y péptidos que son precursores del aroma y sabor del chocolate (Schwan y Wheals, 2004). Por lo tanto, las enzimas que degradan la pectina parecen tener un impacto positivo significativo en la calidad de los granos de cacao fermentados (Bhumibhamon & Jinda, 1997; Cempaka et al., 2014; Crafack et al., 2014; Schwan & Wheals, 2004; Yao et al., 2017).

También se ha informado sobre la purificación y caracterización de pectato liasa, una clase de enzima pectinolítica producida por tres cepas de *Bacillus (B. pumilus* BS22, *B*. *subtilis* BS66 y *B. fusiformis* BS90) aisladas de granos de cacao en fermentación (Ouattara et al., 2011). Estas enzimas muestran propiedades interesantes, ya que pueden degradar una amplia gama de compuestos de pectina, incluidas las que son altamente metiladas (Ouattara et al., 2010). Otro estudio demostró que la asociación de la bacteria *B. subtilis* BS38 con la levadura *P. kudriazevii* YS201 aumenta la degradación de la pulpa y la producción de etanol, características deseables para lograr una fermentación adecuada (Ouattara et al., 2020).

Por otra parte, se ha demostrado que la adición de la cepa ATCC 10792 de *Bacillus thuringiensis* (aislada de granos de cacao en fermentación) durante la fermentación de los granos de cacao inhibe el crecimiento de hongos filamentosos micotoxigénicos y mejora la calidad de los granos de cacao. En cuanto a la evaluación sensorial de los chocolates elaborados a partir de granos de cacao inoculados con *B. thuringiensis* cepa ATCC 10792 y de los granos control (no inoculados), los panelistas no reportaron una preferencia significativa por ninguno de los dos chocolates (Kadjo et al., 2023).

▪ Otras bacterias

Los géneros de bacterias distintas a las de BAL, BAA y *Bacillus* crecen durante el proceso de fermentación, sin embargo, no dominan la microbiota. Géneros como *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Tatumella*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Frateuria*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Zymomonas*, *Brevundimonas* y *Xanthomonas* han sido aislados a partir de granos en fermentación (Ardhana & Fleet 2003; Papalexandratou et al., 2013; Pereira et al., 2012).

Los géneros de *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Tatumella* y *Pantoea* son fitopatógenos de varias plantas y frutas que podrían incluir las mazorcas de cacao. Estas bacterias no toleran la acidez de la pulpa ni los metabolitos etanólicos, acéticos y lácticos de las levaduras, BAL y BAA y, en consecuencia, mueren durante las primeras horas de fermentación. Sus poblaciones rara vez superan las 10^4 ufc/g y representan menos del 10% de la población bacteriana total. Sin embargo, algunas de estas bacterias pueden comenzar a crecer y volverse más frecuentes si los tiempos de fermentación se extienden más allá de 6 a 8 días (García-Armisen et al., 2010).

La temperatura elevada de la masa en fermentación al final del proceso favorece el crecimiento de bacterias termotolerantes, como *Streptococcus thermophilus*. Sin embargo, se han hecho pocos intentos para aislar y caracterizar estas bacterias de las fermentaciones de granos de cacao. Ejemplos de especies identificadas son *Zymomonas mobilis*, *Aerobacter aerogenes*, *Arthrobacter oxydans*, *Micrococcus conglomerates*, *M. roseus*, *Staphylococcus aureus*, *S. capitis*, *M. kristinae* y *Pseudomona cepacea* (Ardhana & Fleet, 2003; Moreira et al., 2017; Ostovar & Keeney, 1973). Por lo general, estas bacterias solo se han aislado desde el comienzo de la fermentación (0-12 h), o de forma transitoria y con poblaciones bajas. Ardhana & Fleet (2003) encontraron que algunas cepas de *Staphylococus* y *Pseudomonas spp*. aisladas de fermentaciones en Indonesia tuvieron actividad lipolítica y proteolítica. La contribución de muchas de estas bacterias a la fermentación de cacao sigue sin estar clara y cuenta con poca investigación. Se ha prestado cierta atención a la presencia de *Zymomonas mobilis* en las fermentaciones de cacao, debido a la capacidad de esta bacteria para fermentar azúcares en etanol de manera eficiente (Ardhana, 1990; Billah et al., 2020; Moreira et al., 2017; Ostavar & Keeney, 1973).

▪ Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos no se consideran una parte importante de la sucesión microbiana de la fermentación de cacao. Sin embargo, se han encontrado con frecuencia en las partes más aireadas de la masa en fermentación (etapa final) y durante el proceso de secado. La baja presencia de algunos hongos filamentosos durante la fermentación puede explicarse no solo por la influencia competitiva de bacterias y levaduras (p. ej. producción de alcohol

y ácidos orgánicos) sino también por la temperatura restrictiva que puede superar los 45°C después de 48 h (Ardhana & Fleet, 2003; Copetti et al., 2014).

La mayor parte de la atención que se tiene hacia los hongos filamentosos en la fermentación de cacao se relaciona con sus impactos negativos. Se ha reportado la presencia de especies que producen carbonilos, lo cual genera notas de sabor a jamón y anisoles que imparten aromas a moho (Afoakwa et al., 2008; Misnawi et al., 2003; Schwan et al., 1995). El aspecto mejor investigado de los hongos filamentosos en los granos de cacao se refiere a la capacidad de muchas especies para producir micotoxinas. Amezqueta et al. (2005) y Bonvehi (2004) informaron altas concentraciones de ocratoxina A en muestras de cacao. Del mismo modo, Mounjouenpou et al. (2008) confirmaron que el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Aspergillus. carbonarius* durante la fermentación estuvo acompañado de la producción de niveles significativos de ocratoxina A. Como medida de control para evitar la presencia de estos contaminantes, se debe garantizar que los granos de cacao fermentados se sequen de manera adecuada y rápida, una vez finaliza la fermentación y baja la temperatura de los granos.

Copetti et al. (2011) estudiaron la micobiota de los granos en varias etapas del procesamiento del cacao brasileño, incluidos los procesos de fermentación, secado y almacenamiento. Durante los 6 días de fermentación, los hongos más comúnmente aislados fueron *Monascus ruber*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor racemous, Penicillium paneum*, *Geotrichum candidum* y *Absidia corymbifera*.

1.3.2 Secado

Al final de la fermentación, los granos de cacao contienen aproximadamente un 40-60 % de agua. Para prevenir el crecimiento de moho durante el almacenamiento y transporte, los granos deben secarse hasta un contenido de humedad final entre el 6 y 7% (Kongor et al., 2016; Nair, 2010). Durante este proceso, continua la oxidación del ácido acético, mejorando el desarrollo del sabor (Engeseth & Pangan, 2018). Además, durante el secado disminuyen los azúcares en el grano debido a la participación de reacciones de pardeamiento que incluyen la oxidación de polifenoles con reducción del sabor astringente y amargo, la disminución de la concentración de proteínas debido a su continua hidrólisis

y el incremento de los ácidos grasos libres causado por la acción de enzimas presentes en el grano. Como resultado de la pérdida de integridad del grano de cacao, se forman compuestos de aroma y sabor, y ocurren cambios en la coloración de los granos adquiriendo un color marrón. (Engeseth & Pangan, 2018; Predan et al., 2019). Además, la velocidad de secado influye en la calidad final del grano, el proceso no debe ser muy rápido dado que los granos tienden a retener una cantidad excesiva de ácido acético a causa del endurecimiento de su cáscara, evitando la difusión del ácido, lo cual perjudica el sabor del grano. Por otro lado, un secado muy lento disminuye la acidez del grano, aumenta la posibilidad de presencia de mohos y causa cambios de color indeseables.

Los métodos de secado de cacao se dividen generalmente en dos tipos, el secado solar (natural) y el secado artificial, sin embargo, la técnica más utilizada es el secado solar debido a su capacidad para inducir un sabor a chocolate más pronunciado, además es práctico y económico (Predan et al., 2019). El secado solar normalmente se realiza sobre plataformas de madera elevadas del piso, donde se colocan los granos en capas con un grosor no mayor de cinco centímetros. Según las horas de sol y la intensidad de los rayos solares, el secado puede tardar entre tres y nueve días. Durante este tiempo se deben cubrir los granos antes de la lluvia y en las noches. Mientras el grano está expuesto al sol y a la sombra, se recomienda removerlo con rastrillos de madera cada media hora los primeros tres días, del cuarto día en adelante cada 60 minutos. Se recomienda un secado lento al inicio, es decir, exponer el grano al sol suave de la mañana o la tarde por dos horas el primer día, cuatro horas el segundo día, seis horas al tercer día y a partir del cuarto día se deja secando todo el día al sol (Cubillos et al., 2008).

En áreas con alta humedad o lluvias frecuentes, es necesario secar de forma artificial en un secador de aire caliente. El secador artificial más simple es básicamente una plataforma permeable (de madera, metálica o una lámina de aluminio perforada) empotrada horizontalmente sobre una cámara provista de un quemador de carbón o combustible acoplada a un tubo metálico con su extremo posterior unido a una chimenea (Dzelagha et al., 2020; Garcia-Alamill et al., 2007; Kongor et al., 2016).

1.4 Cacaos especiales

Los cacaos especiales además de poseer propiedades y sabores destacados, también se caracterizan por tener atributos tales como: calidad física, manejo post-cosecha, trazabilidad, origen y certificaciones obtenidas por sus productores. En la actualidad también se ha introducido el término “cacaos especiales” para referirse a la oferta de cacaos que tienen atributos consistentes y verificables, que los diferencian del cacao corriente y que no necesariamente están ligados de manera exclusiva a las propiedades organolépticas típicas del cacao fino o de aroma (Ríos, 2017).

En este contexto, el mercado de cacaos especiales está ligado a procesadores y consumidores que demandan productos con atributos consistentes, verificables y diferenciadores, por los que están dispuestos a pagar precios superiores, que se traducen en mejores ingresos y un mayor bienestar para los productores. Los mercados especiales se han dividido en tres categorías: Cacao Premium de Origen, Cacao Fino de Aroma y Cacao Sostenible.

1.4.1 Cacao Premium de Origen (CPO)

Se obtiene a partir de cosechas que se originan en una región, hacienda o finca y poseen características especiales, debido a que crecen en lugares específicos y son cultivados, cosechados y beneficiados (pos-cosecha) de acuerdo con estándares que son conocidos por sus compradores. El CPO mantiene la pureza varietal y no se mezcla con otros tipos de cacao, por lo que la trazabilidad es fundamental para asegurar su procedencia. Dentro de esta categoría se encuentran: cacao con denominación de origen, cacao de origen geográfico, cacao de hacienda o finca y cacaos exóticos (Ríos, 2017).

1.4.2 Cacao Fino de Aroma (CFA)

Se caracteriza por la presencia de notas aromáticas especiales tales como florales y afrutadas ausentes en el cacao a granel. Para diferenciar el cacao fino o de aroma se usa una combinación de criterios y técnicas, entre las que podemos destacar: origen genético del material de siembra, características morfológicas de la planta, características de sabor, características químicas, color de los granos, grado de fermentación y secado. Además,

se considera la ausencia de defectos en los granos de cacao como: acidez acética, presencia de sabores desagradables, porcentaje de moho interno, infestación de insectos y porcentaje de impurezas (ICCO, 2018). Sin embargo, la medición de algunos de estos criterios es subjetiva y no establece de manera objetiva que el cacao en cuestión tenga las características de cacao fino o de aroma, ya que muchos de los criterios son el resultado de un adecuado manejo de cosecha y pos-cosecha. Dentro de esta categoría podemos encontrar: complejos Nacionales, selecciones regionales y cacaos varietales.

1.4.3 Cacao de Producción Sostenible (CPS)

En esta categoría se incluyen los cacaos que se destacan por generar beneficios socio-ambientales y productivos. Por lo tanto, este cacao es cultivado por agricultores que siguen una determinada forma de producción, en zonas de particular interés. En esta categoría se incluyen: cacaos certificados, cacaos de relevancia social, cacaos con relevancia étnica y cacaos con relevancia ambiental (Ríos, 2017).

1.5 Cadmio

Los metales pesados difieren en su frecuencia (plomo > zinc > cadmio > cobre) y en su disponibilidad para las células vivas. Algunos, como cobalto, cromo, cobre, níquel y zinc, son esenciales para las plantas y, por lo tanto, no son tóxicos en bajas concentraciones, mientras que otros, como plata, arsénico, cadmio, mercurio, plomo y antimonio, son tóxicos en cualquier nivel y no tienen una función biológica conocida (Holm et al., 1995; Hoseini & Zargari 2013). Particularmente el cadmio (Cd; número atómico 48, peso atómico 112,41) pertenece al grupo XII de la tabla periódica de elementos químicos. Este metal se encuentra naturalmente en la corteza terrestre como un catión divalente (Cd^{2+}) en forma de minerales, en concentraciones que normalmente oscilan entre 0,1 y 1,0 mg/kg. Las fuentes constantes de contaminación por cadmio están relacionadas con su aplicación en la industria como reactivo corrosivo, estabilizador en productos de PVC, pigmentos y baterías de Niquel-Cadmio (Genchi et al., 2020).

La concentración de cadmio en el suelo representa solo fracciones diminutas del total de cationes intercambiables o de los cationes de la solución del suelo. Por lo tanto, es poco

probable que la presencia de cadmio afecte la química del suelo, por el contrario, puede afectar la función del ecosistema en niveles mínimos debido a su pronunciada toxicidad, que puede persistir, no solo por su tiempo de permanencia durante décadas, sino porque su biodisponibilidad no disminuye. (Smolders et al., 1999).

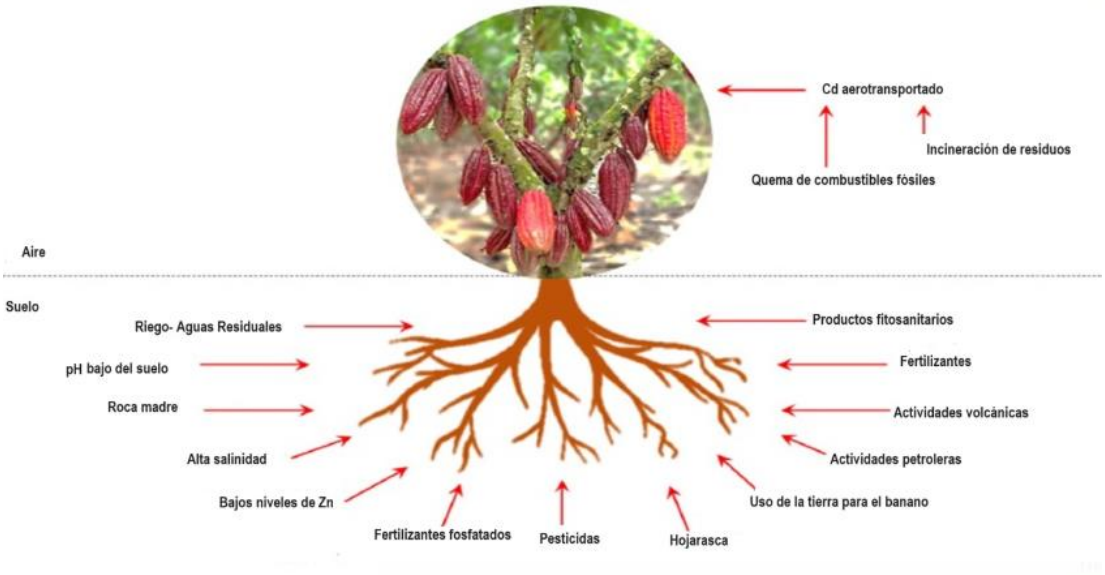
La biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo está influenciada por varias propiedades, especialmente el pH, la materia orgánica y la textura del suelo (Chen et al., 2020). Entre ellos, se ha demostrado que el pH del suelo tiene una influencia mayor en la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados (Lu et al., 2017). Esto se debe a que existe una correlación positiva entre el pH del suelo y la carga negativa en la superficie de los coloides. Por lo tanto, esto mejora la interacción electrostática de las partículas del suelo y la adsorción de los coloides a los iones Cd^{+2} (Hassan et al., 2020). Se ha informado que, a niveles de pH por debajo de 6,5, aumenta la biodisponibilidad de cadmio en el suelo, lo cual se atribuye al incremento de carga positiva que se acumula en la superficie del suelo. Esto crea competencia entre Cd^{2+} con otros cationes, principalmente H^{+} y Al^{3+}, por los sitios de unión, limitando la adsorción de Cd^{2+} (Du et al., 2018). Por el contrario, la biodisponibilidad de Cd disminuye en condiciones de pH del suelo superiores a 6,5. Este fenómeno está relacionado con el aumento de la adsorción de Cd^{2+} en la superficie del suelo con carga negativa (Wang et al., 2019).

El cadmio se mueve fácilmente a través del suelo y se incorpora a la cadena alimentaria mediante la absorción por parte de algunas especies de plantas (hortalizas, tubérculos, cereales, granos) y animales (vacas, cerdos, ovejas, aves de corral, crustáceos, moluscos). La exposición al cadmio en los alimentos puede provocar su acumulación en tejidos, particularmente en los riñones, lo que puede causar disfunción tubular y daño renal con el tiempo (EFSA, 2009; WHO, 2011). Este metal compite con el calcio (Ca^{+2}), debido a que tiene carga idéntica, radio iónico y comportamiento químico similar, lo cual puede reducir la absorción de calcio en el cuerpo, generando efectos tóxicos sobre el sistema esquelético (Lata et al., 2019). Sin embargo, los efectos tóxicos que puede causar el Cd en los humanos dependen de la cantidad del elemento en los alimentos, la frecuencia y la cantidad en que estos se consuman, y la edad y el peso de las personas. De este modo, podrían presentarse daños en ciertos órganos del cuerpo después de una ingesta muy alta y sostenida en el tiempo de alimentos con este metal pesado (Bravo et al., 2021a).

1.5.1 Cadmio en el suelo y en el cultivo de cacao

La presencia de cadmio en el suelo se debe tanto a fuentes geogénicas (meteorización de las rocas y actividad volcánica) como antropogénicas (incendios forestales, fundición y refinación de cobre y níquel, quema de combustibles fósiles, erosión, actividades mineras e industriales, contaminación por uso de agroquímicos y agua de riego con alto contenido de cadmio) (Figura 1-3). Se ha informado que las concentraciones actuales de cadmio en el suelo son más altas que las generadas por fuentes geogénicas, lo cual se atribuye a las adiciones históricas de origen antropogénico (Maddela et al., 2020).

Figura 1-3. Factores que influyen en la absorción de cadmio por raíces o brotes en cacao. *Fuentes contaminadas con cadmio.



Fuente: Maddela et al., 2020.

Se ha informado que la planta de cacao posee una afinidad natural por el cadmio, la cual puede estar influenciada por su origen genético (Jiménez, 2015; Maddela et al., 2020; Meter et al., 2019). El cadmio es absorbido por las plantas de cacao a través del suelo y se acumula principalmente en las semillas, éstas son procesadas a través de la poscosecha (fermentación y secado) y son la materia prima para la producción del chocolate, principal producto derivado del cacao, lo que genera riesgos potenciales para la salud humana por la ingestión de productos contaminados. Sin embargo, las diferentes concentraciones de cadmio en los granos no sólo dependen de la variedad sino también

del sitio geográfico. De acuerdo con Vanderschueren et al. (2021), quienes realizaron un metanálisis sobre diferentes encuestas de cadmio-cacao a nivel mundial, las concentraciones medias de Cd en los granos oscilan entre 0,02 y 12 mg/kg, siendo notablemente más altas en América Latina, donde más de la mitad de las muestras de grano, superaron el umbral aplicado por la EU para exportación (0,60 mg/kg). Este mismo estudio concluye que el enriquecimiento regional está relacionado con concentraciones de cadmio relativamente más altas en los suelos jóvenes de Latinoamérica. Por lo tanto, es probable que la fuente de cadmio tenga un origen geogénico en lugar de la derivada a partir de fertilizantes fosfatados o contaminación ambiental. En la tabla 1, se resume la concentración de cadmio en grano para los 10 países con mayor producción.

Tabla 1-1. Concentraciones de cadmio en grano de cacao en los principales países productores

País origen	Promedio (mg Cd^{+2}/kg)	Muestras analizadas	Referencia
Costa de Marfil	0,05	9	Yapo et al., 2014
Ghana	0,05	30	Nnuro et al., 2020
Indonesia	0,52	1	Knezevic, 1979
Brasil	0,55	36	De Araujo et al., 2017
Ecuador	0,90	560	Argüello et al., 2019
Camerún	0,05	3	Vītola & Ciproviča, 2016
Nigeria	0,02	3	Vītola & Ciproviča, 2016
Perú	1,13	70	Arévalo-Gardini et al., 2017
Rep. Dominicana	0,13	-	Kruszewski et al., 2018
Colombia	**12,00**	**57**	**Rodríguez- Albarrcín et al., 2019**

Fuente: Vanderschueren et al., 2021.

La concentración total del cadmio en el suelo comprende la contribución del material parental más las incorporaciones de fuentes externas, principalmente desde la actividad antropogénica (Alloway, 2013); mientras que el cadmio disponible varía en tamaño y carga, siendo la forma química presente en la solución del suelo. Esta puede manifestarse como cationes hidratados libres o como componentes adsorbidos en estructuras coloidales de naturaleza inorgánica (arcilla) u orgánica (humus). En esencia, corresponde al cadmio

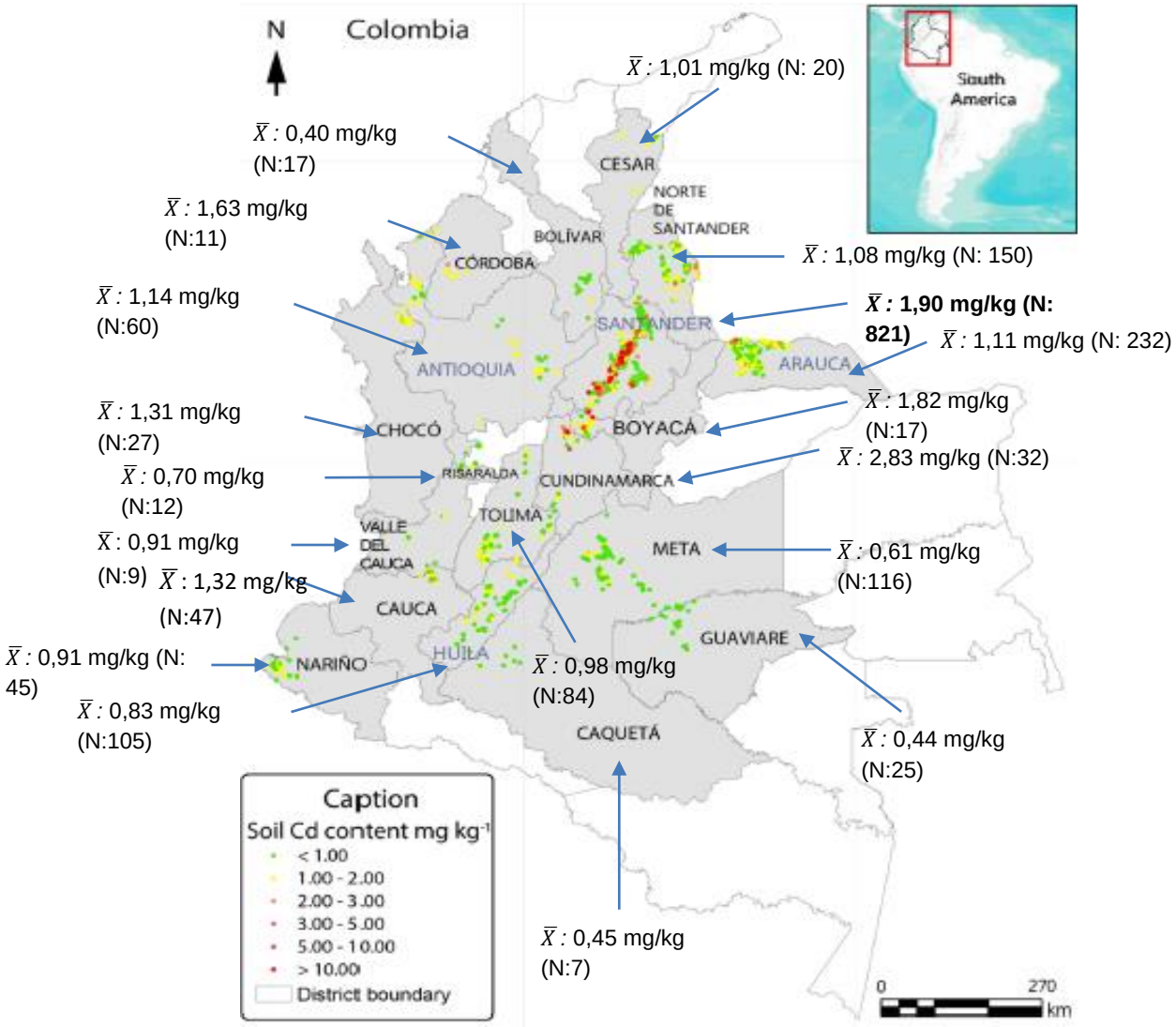
disponible para las plantas de cacao, el cual posee movilidad y capacidad para reaccionar químicamente en el suelo (Helmke, 1999).

Las características del suelo (textura, pH, materia orgánica, contenido y tipo de arcillas, capacidad de intercambio catiónico, carbonatos y óxidos del hierro y manganeso), la ubicación geográfica, concentración de cadmio total en el suelo, la genética de los cultivos, la rotación de cultivos y las técnicas agrícolas, son algunos de los factores a los cuales se les ha atribuido la variabilidad de las concentraciones de cadmio en los granos de cacao de diferentes sitios (Bravo et al., 2021b; Nazar et al., 2012; Villanueva, 2019). Se ha demostrado que el pH es el principal factor que interviene en la disponibilidad y posterior absorción de cadmio por parte de las plantas (Gramlich et al., 2017). Un suelo ácido hace más disponible el cadmio ya que al disminuir el pH aumenta la solubilidad de los metales y la absorción a través de las raíces. A pH menores de seis el cadmio se adsorbe débilmente en la materia orgánica, arcillas y óxidos; mientras que a pH mayores de siete o en suelos alcalinos, el cadmio no es móvil, ya que puede coprecipitar con $CaCO_3$, o precipitar como $CdCO_3$, disminuyendo de esta manera su absorción por parte de las plantas. (Alloway, 2013; Tantalean, 2017)

El cadmio total en el suelo es un predictor útil de la absorción de este metal solo si se combina con el conocimiento de los factores anteriormente mencionados (Gramlich et al., 2018; Norvell et al., 2000). Estudios han informado correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre las concentraciones totales de cadmio en suelos y en granos de cacao (Gramlich et al., 2018; Ramtahal et al., 2016; Zug et al., 2019). Por el contrario, Aguirre-Forero et al. (2020) encontraron concentraciones de cadmio en grano de cacao (0,5 mg/kg) que superan el límite permisible, mientras que la concentración de cadmio en el suelo (0,1 mg/kg) fue óptima para el cultivo de cacao, lo que sugiere que el origen del cadmio es antropogénico y está relacionado con el manejo del cultivo. Por otra parte, en Ecuador (Argüello et al., 2019; Barraza et al., 2021; Chávez et al., 2015), Honduras (Gramlich et al., 2018) y Perú (Arévalo-Gardini et al., 2017; Tantalean & Huauya, 2017), realizaron mediciones de los niveles de cadmio en suelos y granos de cacao donde se encontraron concentraciones que indican suelos contaminados con este metal y granos que sobrepasan los límites permisibles por la UE. Del mismo modo, Bravo et al. (2021) publicó la primera encuesta de concentración de cadmio en suelos cultivados con cacao

en Colombia, donde se identificaron áreas problemáticas o “puntos calientes” según la distribución espacial de este metal, cuya concentracion promedio fue de 1,43 mg/kg. En la figura 1-4, se muestra la concentracion de cadmio en suelo para los departamentos productores de cacao en Colombia.

Figura 1-4. Distribución de cadmio pseudototal en el suelo de 1837 fincas productoras de cacao en Colombia.



Fuente: Bravo et al., 2021.

El cadmio es absorbido especialmente por los pelos radicales y células epidérmicas, luego es transportado hacia el interior de la raíz mediante las células parenquimatosas, para entrar finalmente a los haces vasculares (xilema) y ser traslocado a través del flujo

transpiratorio hacia las partes aéreas (Song et al., 2017). La velocidad de translocación del cadmio desde las raíces hasta los tejidos aéreos está influenciada por procesos como el secuestro vacuolar, la carga en el xilema y la transferencia entre vasos del xilema y el floema. Durante el transporte radial a través de las células de la raíz, el cadmio puede ser almacenado en vacuolas como una medida protectora para reducir su movilidad hacia otros tejidos. Un transportador clave en este proceso de secuestro vacuolar es la ATPasa 3 de metales pesados (HMA3), presente en la membrana de las vacuolas, que se ha demostrado ser crucial en la retención de cadmio en las raíces de diversas plantas como arroz (Wang et al., 2019), soja (Wang et al., 2012) y col china (Zhang et al., 2019).

Se ha informado que las concentraciones de cadmio en los frutos de cacao disminuyen en el siguiente orden, basado en el peso: cascarilla > nibs ~ placenta ~ cáscara de la mazorca > mucílago (Vanderschueren et al., 2020). Se destaca que la cascarilla presenta el contenido más alto de cadmio, con valores que son de 1,5 a 1,8 veces mayores en comparación con las concentraciones encontradas en los nibs. Sin embargo, esta relación de concentración (cadmio en la cascarilla sobre cadmio en nibs) varía dependiendo del genotipo de cacao, oscilando entre 1,2 hasta >7 (Lewis et al., 2018). A pesar de su elevada concentración de cadmio, la cascarilla representa solo una pequeña parte del peso total del grano, por lo tanto, también es responsable de solo una pequeña fracción del cadmio total del mismo. Por ejemplo, Vanderschueren et al. (2020) informaron que, en los granos de cacao no fermentados, el 91% del cadmio total del grano se encontró en los nibs y solo el 9% provenía de la cascarilla.

Por otra parte, se ha reportado la existencia de diferentes vías de distribución de nutrientes entre las cáscaras de las mazorcas de cacao y los granos (De Araujo et al., 2020). Engbersen et al. (2019) han informaron que el fraccionamiento de cadmio dentro del fruto de cacao puede cambiar durante su maduración en el árbol. Sus resultados mostraron una disminución en las concentraciones de cadmio en la cáscara de la mazorca y un aumento en el grano (sin pelar) durante la maduración, lo que sugiere la posibilidad de una removilización de cadmio desde la cáscara hacia el grano. Sin embargo, se requiere llevar a cabo investigaciones adicionales para respaldar esta información, ya que las diferencias observadas en las concentraciones de cadmio entre los frutos podrían estar relacionadas

más con la variabilidad en la concentración de cadmio entre los frutos de un mismo árbol que con un efecto de la maduración en sí misma.

A pesar de los avances, la información sobre la distribución y especiación de cadmio en los granos de cacao y otros tejidos de la planta sigue siendo limitada. Thyssen et al. (2018) llevaron a cabo un mapeo bidimensional de la distribución de cadmio en secciones de granos de cacao fermentados utilizando espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente por ablación láser (LA-ICP-MS). Sus resultados evidenciaron que el cadmio estaba predominantemente en la cascarilla en comparación con los nibs, y también informaron un ligero enriquecimiento de este metal en la parte meristemática de los nibs (radícula e hipocótilo). Además, observaron que la distribución de cadmio era similar a la de Zn y, en cierta medida, a la de Mg, K y P. Del mismo modo, Vanderschueren et al. (2020) también utilizaron imágenes LA-ICP-MS para visualizar la distribución de cadmio en granos de cacao sin fermentar, evidenciando que la capa de la cascarilla era visiblemente distinguible de la semilla debido a su elevado contenido de cadmio. Sin embargo, la especiación y la localización del cadmio suelen investigarse en sistemas vegetales expuestos a altas concentraciones de este metal. Estos estudios no permiten establecer comparaciones con las condiciones naturales del campo que afectan al cacao. Es fundamental realizar más investigaciones sobre la especiación y la distribución en cultivos bajo condiciones reales de campo, con el fin de comprender mejor los mecanismos utilizados por la planta de cacao para almacenar el cadmio.

Además, en un suelo cultivado interactúan muchos procesos al mismo tiempo. Lo que se conoce como capa cultivable o capa arable (primeros 30 cm del suelo) es la responsable de contener y entregar los nutrientes que la planta requiere. Luego, debajo de ella se encuentra el llamado “subsuelo”, que influye directamente en la composición y formación de la anterior capa. En algunas regiones de Colombia este subsuelo puede ser rico en metales pesados como el cadmio. Del mismo modo, las diferentes causas antropogénicas (actividades humanas) mencionadas anteriormente, como el uso de agroquímicos y la minería cercana al cultivo, también pueden ser fuente de cadmio en los cultivos en algunos sitios (Bravo et al., 2021ª). Teniendo en cuenta que la acumulación de cadmio en las capas superficiales del suelo podría generar un exceso de este metal en los granos de cacao (Chávez et al., 2015), esto representaría un riesgo para la economía de varias zonas productoras en el país, pues en Santander, Boyacá y Arauca se han encontrado zonas con

altos niveles de cadmio en suelo, lo cual podría generar acumulación de altas concentraciones de este metal en los granos, sobrepasando de esta manera los niveles permisibles exigidos por el mercado mundial (Bravo et al., 2018; Bravo & Benavides-Erazo, 2020).

Por consiguiente, los productos terminados a base de cacao que son exportados a países con alto consumo de este alimento, como el continente europeo, que consume el 36% del cacao que se produce a nivel mundial, son regulados a través de legislaciones que limitan la concentración de cadmio. En este sentido, el reglamento N°488/2014 de la Unión Europea UE (EU, 2014) que entró en vigor en el año 2019, establece diferentes niveles permisibles para cuatro categorías de productos específicos de cacao y chocolate (Tabla. 1-2). Es importante resaltar que la regulación de la UE no aplica para materia prima, es decir, para cacao en grano. Sin embargo, los compradores se basan en los límites de los granos de cacao para garantizar que los productos finales estén por debajo de los niveles máximos permitidos (Meter et al., 2019).

Tabla 1-2. Concentraciones máximas de cadmio en productos de cacao según Reglamento 488/2014 de la EU (EU 2014)

Producto	Materia seca (%)	Límite máximo permitido (mg Cd^{+2}/kg)
Chocolate con leche	<30	0.10
Chocolate con leche	≥30	0.30
Chocolate	<50	0.30
Chocolate	≥50	0.80
Cacao o ingrediente de cacao en polvo	---	0.60

Fuente: Unión Europea. Diario Oficial de la UE (2014)

1.6. Estrategias de mitigación de cadmio en cacao

Considerando la heterogeneidad de la problemática identificada, debido a condiciones ambientales y del suelo, es realmente un desafío mitigar la bioacumulación de cadmio en los cultivos de cacao, en consecuencia, es necesario implementar un conjunto de alternativas integradas para la mitigación de este metal desde el cultivo hasta el producto

final. Estas alternativas deben ser económica y técnicamente viables para los agricultores, de tal manera que permitan obtener un producto inocuo, de calidad y altamente competitivo en el mercado nacional e internacional.

1.6.1. Delimitación de zonas de alto riesgo para el establecimiento de plantaciones

Los análisis de suelo debe ser un requisito para que los productores de cacao actuales y los nuevos identifiquen los suelos y agua con niveles más bajos de cadmio, de este modo, el muestreo del suelo se debe abordar ampliamente, ya que los contenidos de cadmio no son homogéneos. Además, factores como el pH, conductividad eléctrica, carbonato de calcio, materia orgánica, fósforo, potasio, propiedades físicas, textura, capacidad de intercambio de cationes, cationes cambiables (Ca^{+2}, Mg^{+2}, K^{+}, Na^{+}, Al^{+3} + H^{+}), suma de cationes, (suma de bases, saturación de bases) deben ser considerados para la caracterización de los suelos. Por otra parte, los laboratorios de análisis de caracterización de suelos para plantaciones de cacao deben ser acreditados; así como también los métodos de determinación incluyendo el material de referencia certificado, estándares y la incertidumbre (Comisión del Codex Alimentarius, 2018).

Las zonas que se encuentran en riesgo de contaminación con cadmio deben evitarse para nuevas plantaciones de cacao. Aunque esto no es sencillo debido a la variabilidad en la respuesta de los árboles de cacao a los niveles de cadmio del suelo. Es importante tener en cuenta que, si bien muchos agricultores no pueden elegir o cambiar la ubicación de sus tierras agrícolas, pueden decidir qué cultivo plantar. En áreas de altos niveles de cadmio en el cacao, puede ser recomendable plantar otro cultivo que no presente esta problemática, al menos a corto plazo (Meter et al., 2019). Además, los límites para el cadmio en el suelo en nuevas plantaciones deberían estar relacionados con las propiedades del suelo: la arcilla, los óxidos de hierro (Fe) y manganeso (Mn) y la materia orgánica, y zinc (Zn), esta información sería importante en las decisiones del lugar de instalación de los cultivos (Comisión del Codex Alimentarius, 2018).

1.6.2. Aplicación de enmiendas al suelo

La fitodisponibilidad de cadmio está fuertemente influenciada por el pH del suelo (Li et al., 2016; Ramtahal et al., 2019; Xiao et al., 2017) ya que la solubilidad de los metales pesados es significativamente más alta en condiciones ácidas (pH bajo = 3,0 a 5,0). Esta es precisamente la razón por la cual se realiza la aplicación de enmiendas, práctica agrícola que contribuye a la disminución de la biodisponibilidad de cadmio en los suelos (Ramtahal et al., 2019; Shi et al., 2019; Xiao et al., 2017). Dicha reducción tiene lugar cuando los niveles de pH del suelo son superiores a 6, ya que el cadmio tiende a unirse con la materia orgánica y otros minerales. Se han realizado esfuerzos para mitigar el cadmio fitodisponible en suelos utilizando turba leñosa y Fe $(NO3)_3$ (Wang et al., 2019), hierro cero valente y biocarbón (biomasa de origen vegetal) (Qiao et al., 2018; Ramtahal et al., 2019), cal (Zhu et al., 2016), aplicación foliar de sílice o selenio (Cui et al., 2018), sustancias inorgánicas (fósforo y zinc), zeolitas (Hamid et al., 2019), nanopartículas de plata (Ji et al., 2017), adición exógena de ácido málico (Hawrylak-nowak et al., 2015), pretratamiento de la planta con ácido salicílico (Guo et al., 2007) . Dichos tratamientos pueden inducir la formación de grupos funcionales en los adsorbentes como biocarbón, turba leñosa, entre otros e inmovilizar el cadmio del suelo.

Es importante tener en cuenta que las enmiendas con sustancias orgánicas e inorgánicas pueden causar cambios en los microambientes del suelo como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés oxidativo y peroxidación de lípidos en las membranas celulares. Sin embargo, no hay conocimiento sobre la calidad del rendimiento de los cultivos en los entornos que han sido intervenidos a través de la aplicación de dichas enmiendas (Maddela et al., 2020).

Por otra parte, se sugiere evitar el uso excesivo de fertilizantes fosfatados (Meng et al., 2019) dado que la contaminación con cadmio de varios sistemas agrícolas está relacionada con la presencia de este metal en la roca fosfórica (Roberts, 2014). Además, estos fertilizantes pueden restringir la absorción de zinc por parte de los cultivos, puesto que estos metales son muy similares químicamente y compiten entre sí en los procesos de absorción y transporte al interior de la planta, lo que permite una mayor movilidad de cadmio (Roberts, 2014). En tal sentido, se debe aplicar una adecuada nutrición con zinc y con fosforitas de origen ígneo pues tienen un menor contenido de cadmio comparado con

los fertilizantes fosfatados y la roca fosfórica sedimentaria; así mismo, la fertilización debe ser suficiente y balanceada, verificando los contenidos de metales pesados en estos, pues se sabe que en suelos bien provistos de nutrientes son bajas las probabilidades de bioacumulación de cadmio (Comisión del Códex Alimentarius, 2018).

Además de los fertilizantes, el agua de riego que contiene cloruro puede aumentar la solubilidad y la movilidad de cadmio en las plantas. La absorción de cadmio por parte de las plantas es mayor en suelos salinos o en suelos irrigados con agua que contiene altos niveles de cloruro (Olaniran et al., 2013). Por lo tanto, analizar el agua de riego para verificar los niveles de cloruro y cadmio es fundamental para minimizar su absorción en los cultivos.

1.6.3 Manejo de residuos de poda y cosecha

Cuando se detectan altas concentraciones de cadmio en los granos de cacao, estas también son altas o incluso más altas en las hojas y en las cáscaras de las mazorcas. Las hojas muertas y las cáscaras de mazorcas generalmente se dejan degradar en las plantaciones para reducir la pérdida de nutrientes y mejorar la materia orgánica del suelo. El cadmio presente en estos tejidos se lixiviará a través del suelo o se reciclará dentro del sistema (Meter et al., 2019). Por tanto, en zonas en que los niveles de cadmio en el suelo son altos, se recomienda retirar el material de poda y cosecha del terreno (Comisión del Codex Alimentarius, 2018).

En Colombia, se ha reportado que la hojarasca de cacao tiene un mayor contenido de cadmio que los granos y hojas, con un promedio de 85,5 mg/kg, lo que según los autores implica un alto nivel de ciclos de cadmio en sus áreas de estudio. Sin embargo, la importancia relativa de esto en comparación con otros procesos aún no se ha entendido. El uso de isótopos de cadmio estables para rastrear el reciclaje de cadmio entre el tejido en descomposición y el tejido vivo podría ser útil para abordar esta brecha de conocimiento (Albarrcín et al., 2019).

1.6.4. Mezcla de granos

La mezcla de granos de cacao con alto contenido de cadmio con granos de otras regiones o incluso de países con un contenido bajo de cadmio puede ser una solución efectiva a corto plazo para garantizar que los productos no excedan los límites reglamentarios. Además, la mezcla con ingredientes tales como azúcar, leche y mantequilla reduce la concentración de cadmio en los productos. Sin embargo, esto no resuelve el problema de base y se pierde identidad y origen que caracteriza a países productores de cacao fino de aroma. Asimismo, es necesario establecer una trazabilidad del contenido de cadmio (Meter et al., 2019).

1.6.5. Germoplasma con baja acumulación de cadmio

El uso de herramientas de la ingeniería genética es considerado otra opción para mitigar la bioacumulación de cadmio en el cacao. Se ha informado de un gen que codifica la proteína de unión a cadmio en plantas de cacao, lo que ofrece un gran aporte para la solución del problema de cadmio en cacao a través de la selección y modificación genética (Ullah et al., 2018). Estas proteínas de unión a cadmio podrían ser las responsables de la alta tasa de transferencia de cadmio del suelo a la planta (Satarug et al., 2010)

El enfoque basado en genes ofrece la posibilidad de seleccionar cultivares de cacao con baja absorción de cadmio, pues se ha informado que *Theobroma cacao* posee proteínas conservadas evolutivamente para la absorción de cadmio (Ullah et al., 2018). Los genotipos seleccionados no solo disminuyen la absorción de cadmio a través de las raíces, sino que también tienen una baja predisposición para transferir cadmio de las raíces a las hojas y los frutos. Por tanto, la identificación o pérdida de función inducida por mutaciones en los genes específicos podría ayudar a la generación de clones de cacao con menor capacidad de absorción y acumulación de cadmio (Maddela et al., 2020). Sin embargo, esta estrategia sería a largo plazo ya que la planta tarda entre 5 y 7 años en alcanzar la etapa de fructificación.

1.6.6. Fitorremediación

La fitorremediación es una estrategia que se basa en el crecimiento de plantas en suelos contaminados a fin de que ellas remuevan los metales pesados por procesos de fitoextracción y fitovolatilización o que sean estabilizados a formas menos tóxicas gracias a la fitoinmobilización y fitoestabilización (Gong et al., 2018; Raza et al., 2020; Zhang et al., 2020). Hay una variedad de vías involucradas en la fitorremediación (Lata et al., 2019). Dichos procesos dependen en gran medida del tipo de contaminantes, ya que involucran diferentes mecanismos dependiendo de su naturaleza (Kasiuliene & Paulauskas, 2013). En el caso del cadmio, la fitorremediación se da por procesos de fitoestabilización para retenerlo en el suelo e impedir su movilización y fitoextracción para sacarlo de la matriz ambiental, mientras que otros contaminantes, tales como compuestos clorados e hidrocarburos se remedian a través volatilización, rizorremediación y degradación (Kuiper et al., 2014; Meagher, 2000).

Las plantas utilizadas en fitorremediación poseen características como crecimiento y desarrollo rápido, alta producción de biomasa, un sistema radicular profundo y denso, facilidad para cultivar y un alto coeficiente de bioacumulación (Kathal et al., 2016). Para la selección de una especie vegetal para la fitorremediación, se deben considerar varios factores, incluido el sistema de raíces (grifo o fibroso, dependiendo de la toxicidad del contaminante), el grado en que el contaminante es perjudicial para la planta, la tasa de crecimiento de la planta en presencia del contaminante, y el tiempo para alcanzar la cantidad deseada de remediación. Además, la remediación de cadmio por parte de las plantas depende de ciertos factores del suelo, tales como la concentración del metal, el pH, la concentración de nutrientes y la temperatura (Radziemska, 2017).

Se ha demostrado que la planta del asma (*Euphorbia hirta* L.), la pamplina (*Ageratum conyzoides* L.) y el pasto indio (*Eleusine indica* L.) reducen los niveles de cadmio en el suelo en un 51,8, 52,2 y 58,8%, respectivamente (Lata et al., 2019). Las plantas fitorremediadoras pertenecen a varias familias de Poaceae, Violaceae, Lamiaceae, Febaceae, Cyperaceae, Euphorbioceae, Asteraceae, Caryophyllaceae, Cunouniaceae y Brassicaceae (Vijayalakshmi et al., 2018). Se ha demostrado que la colza y el girasol son plantas favorables para la remediación eficaz de cadmio (Li et al., 2018a). Otros estudios han reportado plantas nativas hiperacumuladoras de cadmio como Leucaena, Vetiver

grass, Desmodium, Igna, Acacia holosericea. (Lamb et al., 2010; Gramlich et al., 2017). A través de la microscopía electrónica de transmisión también se reveló una alta propensión a la hiperacumulación de metales pesados en las raíces de *Parthenium hysterophorus*, *Cannabis sativa*, *Solanum nigrum* y *Ricinus communis* (Chandra et al., 2016).

Esta estrategia de remediación constituye un método económicamente viable, por lo cual es ampliamente aceptada, además de los beneficios que aporta a las propiedades fisicoquímicas del suelo, así como a la calidad biológica de suelos contaminados. Es importante mencionar que, a pesar de no ser ampliamente estudiada la fitorremediación de cadmio en suelos cultivados con plantas de cacao, si existen reportes en la literatura de diferentes especies vegetales, fúngicas y microbianas que puedan captar e inmovilizar este metal, reduciendo así su biodisponibilidad para la absorción por las plantas de cacao (Gramlich et al., 2017; Lata et al., 2019; Pérez-Moncada et al., 2019).

1.6.7. Biorremediación

La biorremediación se define como el uso de microrganismos, plantas, animales u otros tipos de biomasa viva o inactiva, con el fin de degradar biológicamente, y bajo condiciones controladas, contaminantes presentes en un ecosistema o disminuir su acción toxica sobre el medio ambiente y los seres vivos (Singh & Gupta, 2016). Entre los microrganismos utilizados con tal propósito se destacan diferentes géneros de bacterias (p.ej. *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*) (Arce-Inga et al 2022; Bravo et al 2018), levaduras (p.ej. *Saccharomyces*; *Pichia*) (Aibeche et al 2022; Hadiani et al., 2018), hongos (p.ej: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicilium*, *Trichoderma*) (Guerra et al. 2014; Pérez-Moncada et al. (2019), y algas (p.ej: *Chlorella*, *Padina*) (Cheng et al., 2017; Kaewsarn & Yu, 2001). La biorremediación mediada por microorganismos tiene lugar en los ecosistemas a través de una fuerte interacción entre las fuentes de metales pesados y los microorganismos nativos de estos ambientes. Los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia únicos que les permiten sobrevivir y, en algunos casos, formar complejos o atrapar fuertemente los metales pesados disminuyendo su concentración en determinados entornos (Monachese et al., 2012b). La remediación microbiana se puede agrupar principalmente en cinco subclases: biosorción, bioacumulación, biotransformación, biomineralización y biodegradación (Figura 1-5).

Varios estudios indican que ciertas especies de *Bacillus* ayudan de manera eficiente a eliminar la toxicidad de contaminantes como plomo, niquel, hierro, cobre, cromo, cadmio y argón en suelos agrícolas contaminados o efluentes industriales (Radhakrishnan et al., 2017; Sabae et al., 2006). Del mismo modo, se ha informado sobre la remediación eficiente de iones de niquel, plomo, cobre, cromo y cadmio por parte de algunas especies de *Pseudomonas* (Chellaiah, 2018; Karimpour et al., 2018). Los estudios sobre el plomo y el cadmio a menudo se realizan juntos, ya que son elementos que parecen reaccionar con géneros bacterianos de manera similar. Ibrahim et al. (2006), demostró que los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pueden unir plomo y cadmio en solución acuosa. Observaron un fenómeno de unión rápida en todas las especies estudiadas, con las concentraciones más altas de plomo y cadmio unidas entre cinco minutos y una hora. Más importante aún, el metal permaneció fuertemente secuestrado por la célula sin disociarse, incluso 48 horas después de la prueba.

A través de ciertos estudios, algunos microorganismos han sido identificados como altamente tolerantes al cadmio y capaces de reducir su disponibilidad para las plantas. Bravo et al. (2018), evaluaron el contenido de cadmio total del suelo y la presencia de bacterias cultivables tolerables al cadmio (CdtB) en suelos de cacao del noreste de Colombia, donde se aislaron 129 cepas, lo que indica que hay un amplio grupo filogenético con la habilidad de tolerar elevadas concentraciones de cadmio. De este grupo, la cepa de *Enterobacter sp*. CdDB41 presentó la mayor capacidad de inmovilización de cadmio. Sin embargo, los investigadores también destacan que, en campo, las bacterias deben adaptarse a diferentes niveles de cadmio y propiedades del suelo, las cuales serán definitivas en su acción inmovilizadora del metal. Para esto sugieren un estudio a nivel de invernadero con el fin de determinar el impacto de la adición de la CdtB *Enterobacter sp* CdDB41 en experimentos de invernadero con plántulas de *T. cacao* durante la exposición a cadmio, con el propósito de comprender el proceso metabólico que controla la absorción de este metal en las células bacterianas y el bloqueo del transporte de cadmio disponible en la planta hacia las semillas.

Ramtahal et al. (2012), a través de un estudio a nivel in vitro en cacao, encontraron que la adición de un producto comercial a base de micorrizas dio lugar a un aumento de la concentración de cadmio en las plántulas. Jacome et al. (2016), reportó una disminución en la concentración de cadmio en plántulas de cacao en suelos con 12 y 24 mg Cd^{+2}/kg,

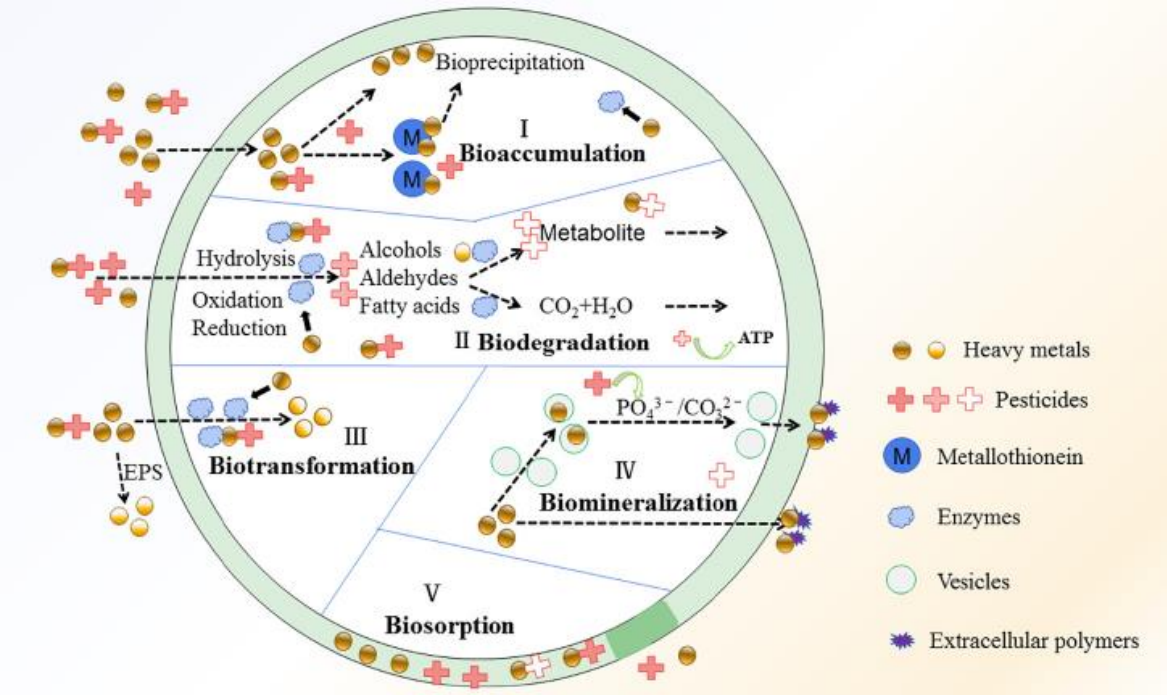
al aplicar un producto con micorrizas similar al anterior. Del mismo modo, Pérez-Moncada et al. (2019), demostró una reducción en el contenido de cadmio en los granos de cacao cuando se cultivaron con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) nativos en suelos con concentraciones de 24 mg Cd^{+2}/kg. Otro estudio realizado por Guerra et al. (2014), en el cual cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados con cadmio en cultivos de cacao del municipio de San Vicente de Chucuri y el Carmen de Chucurí (Santander) y de suelos mineros de la región de California (Santander), presentaron porcentajes de biosorción de este metal in vitro de 98,6 % y 96%, respectivamente.

También se han realizado estudios sobre la evaluación de tratamientos químicos, físicos, enzimáticos y biológicos para disminuir concentraciones de cadmio durante la fermentación de cacao. Morales-Rodríguez et al. (2022), evaluó la enzima pectintranseliminasa (PTE) en dos variedades de cacao (Nacional y CCN-51). El cacao nacional presentó menor contenido de cadmio en el grano tratado cuando se aplicó PTE sobre cacao en baba, seguido de un lavado completo y el secado por tamiz. Resultados similares se obtuvieron en el cacao CCN-5. Adicionalmente, el uso de PTE tuvo un efecto positivo en la calidad física y sensorial de los granos de cacao. De manera similar, Cruz-Prada et al. (2021), encontraron que el pre-escurrido del grano en baba disminuye la presencia de cadmio en el producto final. Los autores reportaron concentraciones de cadmio de 20,48 mg Cd^{+2}/kg cuando se realizaba el pre-escurrido y 23,72 mg Cd^{+2}/kg sin realizar este proceso. En otro estudio, se evaluó la combinación de sustancias acidificantes y quelantes con presecado y lavado, donde la reducción de cadmio en el grano estuvo influenciada significativamente por el lavado (49.2 %) y presecado (28.6%) (Cedeño, 2020). En cuanto a los métodos biológicos (microorganismos) estudiados, Morrejon (2022), reportó que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en combinación con la enzima Polifenol oxidasa (PPO), permitieron una disminución del contenido de cadmio en las almendras de cacao seco. Asimismo, para el efecto principal de tiempos de fermentación, el menor contenido de cadmio se alcanzó a las 120 horas.

Dado que la implementación de microorganismos en el proceso de fermentación de cacao para disminuir los niveles de cadmio en grano es una línea de investigación nueva, existe poca información disponible al respecto en la literatura. Sin embargo, el sector privado y

varios centros de investigación del país han adelantado estudios de mitigación de cadmio en grano a través del uso de microorganismos, obteniendo una reducción en el contenido de cadmio entre 20 y 25%, pero hasta el momento no hay resultados disponibles. En tal sentido, el mecanismo de biosorción a partir de biomasa microbiana se convierte en una alternativa con potencial para la mitigación de Cd en cacao debido a su selectividad, compatibilidad con los procesos de obtención de cacao y compatibilidad con el medio ambiente.

Figura 1-5. Mecanismos de remediación microbiana para reducir metales pesados y pesticidas



Fuente: Zhang et al., 2020.

▪ Biosorción

La biosorción es un proceso fisicoquímico independiente del metabolismo celular (Hlihor et al., 2017). Los iones de los metales pesados se adsorben en la superficie de la célula o en el sitio activo de los biosorbentes (Podstawczyk et al., 2015), siendo los más utilizados células vivas y muertas de bacterias, algas y hongos (Delangiz et al., 2020; Kapahi & Sachdeva, 2019). La adsorción, la quelación/complejación, el intercambio iónico y la

precipitación superficial son los procesos involucrados en la biosorción, entre ellos, el intercambio iónico se considera el principal mecanismo, que se produce a través de diferentes grupos funcionales presentes en la superficie de la biomasa (Vijayaraghavan et al., 2015). Las paredes celulares de los biosorbentes constan de varios grupos funcionales, como grupos amino, carboxilo, hidroxilo y carbonilo, que eliminan los iones metálicos formando un complejo químico (Ramrakhiani et al., 2016; Li et al., 2018b). Varios autores han informado que varias cepas de bacterias vivas y muertas son eficientes para la biosorción de metales pesados (Boeris et al., 2018; Lu et al., 2018; Vishan et al., 2019).

- **Bioacumulación**

La bioacumulación, es un proceso metabólicamente activo y depende del sistema de almacenamiento. En este sistema, los iones de los metales pesados se transportan a través de la bicapa lipídica de la membrana celular hacia los espacios intracelulares o el citoplasma con la ayuda de proteínas transportadoras (Pande et al., 2020). La bioacumulación depende de mecanismos físicos, químicos y biológicos, como la endocitosis, canales iónicos, transporte mediado por proteínas, permeación de complejos y lípidos (Shahpiri & Mohammadzadeh, 2018). Ahemad (2012), informó sobre estudios de bioacumulación de diversos metales como plomo, níquel, plata, mercurio y cadmio. El estudio realizado por Rani & Goel (2009) demostró la acumulación de cadmio periplásmico e intracelular por *Pseudonomas putida* 62 BN mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión. Además, Naskar et al. (2020), demostró que las células en crecimiento de *Bacillus cereus* M116 acumulan alrededor del 20% de Ni^{+2} intracelularmente.

- **Biotransformación**

La biotransformación es un proceso en el que se altera estructuralmente un compuesto químico, por lo que se sintetiza una molécula relativamente más polar (Pervaiz et al., 2013). Este contacto entre el metal y los microorganismos hace que los metales tóxicos y los compuestos orgánicos se alteren a una forma comparativamente menos peligrosa. El desarrollo de este mecanismo en los microorganismos hace que estos se aclimaten a los cambios ambientales. Las transformaciones microbianas se pueden lograr mediante la

producción de nuevos enlaces de carbono, isomerización, introducción de grupos funcionales, oxidación, reducción, condensación, hidrólisis, metilación y desmetilación. Se ha informado de la transformación de metales mediante la aplicación de *Micrococcus sp*. y *Acinetobacter sp*. para oxidar As^{3+} en As^{+5}, el cual es menos tóxico y soluble (Nagvenkar & Ramaiah, 2010). Thatoi et al. (2014) informaron que *Bacillus sp* SFC 500-1E, tolerante a Cr^{+6}, reduce Cr^{+6} a Cr^{+3}, convirtiéndolo en una forma menos tóxica.

▪ Biodegradación

El término biodegradación se refiere al proceso mediante el cual se producen cambios inducidos biológicamente en un sustrato. Durante este proceso, los organismos microbianos alteran el material a través de vías metabólicas o enzimáticas (Cravens et al., 2019), por tanto, el crecimiento y el metabolismo son componentes críticos en este sistema. Los contaminantes se convierten en carbono y energía, permitiendo la eliminación (mineralización) de estos. Existen varios factores que afectan la capacidad de los microorganismos para utilizar contaminantes como sustratos o metabolizarlos. En este sentido, la velocidad y el alcance de la degradación parecen estar regulados por el potencial genético y factores ambientales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y fósforo (Ali et al., 2023).

▪ Biomineralización

La biomineralización se refiere al proceso de transformación de metales iónicos en minerales sólidos, llevado a cabo en células y tejidos específicos bajo el control o influencia de materia orgánica biológica. El mecanismo se divide en mineralización inducida biológicamente y mineralización controlada biológicamente, dependiendo del grado en que el producto esté controlado. La mineralización inducida biológicamente ocurre fuera de la célula, donde los polímeros extracelulares secretados proporcionan sitios de nucleación para iones metálicos. La mineralización controlada biológicamente generalmente implica dos vías. En primer lugar, los cationes se transportan activamente al interior de la célula y luego se propagan a la matriz orgánica. En segundo lugar, los cationes se acumulan en la célula para formar vesículas, las cuales se transportan al exterior de la célula y se rompen en la matriz orgánica para liberar cationes y formar minerales (Zhang et al., 2020) Se ha

reportado la existencia de bacterias mineralizadoras de carbonatos que utilizan la ureasa para descomponer el sustrato y generar carbonato. Este carbonato, a su vez, facilita la mineralización de los iones metálicos (Li et al., 2013).

1.7. Condiciones de cultivo de microorganismos

La optimización de condiciones de cultivo es uno de los fenómenos más investigados antes de llevar a cabo una escala mayor. En la actualidad, esta optimización se ha vuelto más dinámica, efectiva, eficiente, económica y robusta en la obtención de resultados, puesto que se identifican las condiciones de fermentación más adecuadas como pH, temperatura, velocidad de agitación, entre otros; así mismo, se identifican los componentes adecuados del medio de cultivo como la fuente de carbono, nitrógeno, entre otros; permitiendo así alcanzar la concentraciones máximas del producto de interés (Franco-Lara et al., 2006; Wang et al., 2020). Por todo esto, las condiciones de operación y el desarrollo del ambiente de producción son parámetros específicos para cada cepa y son indispensables a la hora de determinar la eficiencia del proceso biotecnológico para obtener grandes cantidades de biomasa (Vehapi et al., 2022).

Capítulo 1. Microorganismos aislados de la fermentación de cacao con capacidad para disminuir concentraciones de cadmio en medio acuoso

Resumen

La contaminación por metales pesados es un motivo de gran preocupación, ya que no son biodegradables y se acumulan en el suelo, el agua y el aire, lo que altera los ecosistemas y provoca graves daños en la salud humana. El uso de microorganismos para la remediación de metales pesados ha sido de interés investigativo en las últimas décadas. Por tanto, en este estudio, se evaluó la capacidad para secuestrar cadmio (Cd) en medio acuoso de manera individual y en cultivo mixto de dos cepas de bacterias y dos de levaduras aisladas de la fermentación de cacao a una concentración de 10 mg Cd^{+2}/L y a tres valores de pH inicial (3,5, 4,5 y 5,5). La medición de la concentración del metal en el sobrenadante se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito. Las cepas de bacterias *Bacillus megaterium* M17HB y *Bacillus subtilis* M21HB en cultivo mixto a pH 4,5 mostraron la mayor capacidad para secuestrar cadmio (50,187 mg Cd^{+2}/gBS), seguido la cepa M21HB individual con 46,230 mg Cd^{+2}/gBS a pH 4,5, mientras que la levadura *Wickerhamomyces anomalus* M4HMO tuvo la menor capacidad en todos los valores de pH evaluados. La menor acumulación de cadmio se registró a un pH de 5,5 en la mayoría de los tratamientos, a excepción de la levadura M4HMO, donde se observó la menor acumulación a un pH de 3,5.

Palabras clave: cadmio, microorganismos, pH.

1.1 Introducción

El proceso de fermentación de cacao es un paso muy importante para el desarrollo de precursores del sabor del chocolate que son atribuibles al metabolismo de los microorganismos. La fermentación de los granos de cacao es un proceso espontáneo que está guiado por una sucesión ordenada de microorganismos, que incluye una amplia variedad de levaduras, bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias ácido-acéticas (BAA), algunas bacterias aeróbicas formadoras de esporas y varias especies de hongos filamentosos (Ho et al., 2014). El crecimiento inicial de levaduras y BAL es favorecido por el mucílago de los granos de cacao, el cual es rico en azúcares fermentables como glucosa, fructosa y sacarosa, y a la presencia de ácido cítrico que genera condiciones de bajo pH (3,0-3,5). Las levaduras realizan la fermentación alcohólica, lo cual implica el crecimiento secuencial de los géneros *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces*. Las BAL también fermentan azúcares de la pulpa y utilizan ácido cítrico, dentro de este grupo se encuentran *Lactobacillus, Leuconostoc* y *Lactococcus*. Las BAA (*Acetobacter* y *Gluconobacter*) eventualmente crecen, oxidando el etanol, (inicialmente producido por las levaduras), a ácido acético. Finalmente, las bacterias aerobias formadoras de esporas del género *Bacillus* se desarrollan cuando la acidez de la masa disminuye y la temperatura aumenta a 40-50 °C (Schwan et al., 2014).

Existe una gran biodiversidad microbiana presente durante los procesos naturales de fermentación de granos de cacao (Almeida et al., 2018; Ardhana & Fleet, 2003; Schwan et al., 2014). Diferentes estudios han reportado que algunos géneros de bacterias (p.ej. *Bacillus* y *Lactobacillus*) y levaduras (p.ej. *Saccharomyces*), tienen la capacidad para disminuir naturalmente niveles de metales pesados (Abioye et al., 2018; Delangiz et al., 2020; Kapahi & Sachdeva, 2019; Monachese, 2012a; Monachese et al., 2012b). Este proceso conocido como biorremediación mediada por microorganismos, se genera por la fuerte interacción entre las fuentes de metales pesados y los microorganismos nativos presentes, a través del desarrollo de mecanismos de resistencia únicos. Estos mecanismos (biosorción, bioacumulación, biotransformación, biomineralización y

biodegradación) permiten a los microrganismos sobrevivir y, en algunos casos, formar complejos o atrapar fuertemente los metales pesados, disminuyendo su concentración en determinados entornos (Monachese et al., 2012b; Zhang et al., 2020).

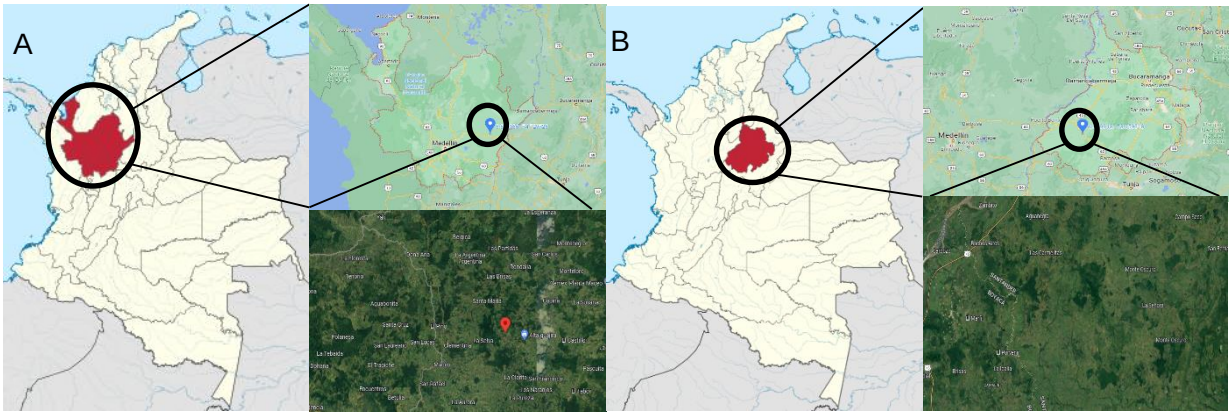
En este sentido, la biorremediación a partir de microorganismos puede ser considerada como una alternativa para disminuir los niveles de cadmio en los granos de cacao durante el proceso de fermentación, debido a su alta selectividad por metales pesados, su compatibilidad con los procesos de producción de cacao y la capacidad para preservarse es estos ambientes. Por tanto, el objetivo de este estudio fue aislar microrganismos propios de la fermentación de cacao en dos localidades (Maceo-Antioquia y Cimitarra-Santander) y evaluar su potencial para disminuir concentraciones de cadmio en medios acuosos, teniendo en cuenta el pH como parámetro determinante en este proceso. Además, se identificaron grupos funcionales presentes en la biomasa de dos microorganismos, los cuales podrían desempeñar una función importante en la disminución de cadmio. Este estudio representa un primer paso para la implementación de procesos biotecnológicos en procesos de producción de cacao encaminados a la reducción del contenido de metales pesados en cacaos especiales producidos en Colombia.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Localización del estudio

El muestreo de los granos de cacao se realizó durante procesos de fermentación bajo condiciones de campo en dos localidades: La Hacienda Betulia ubicada en el municipio de Maceo-Antioquia (6°34′39.30″N 74°43′52.56″W) a 954 m.s.n.m (metros sobre el nivel del mar), temperatura promedio de 22.5 °C y precipitación media anual de 1920 mm, y la Hacienda Monteoscuro del municipio de Cimitarra-Santander (6°12′52.6″N 74°19′38.74″W) a 158 m.s.n.m, temperatura promedio de 30 °C y precipitación media anual de 3.900mm (Figura 1-1). Las actividades a nivel de laboratorio se realizaron en la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (Medellín-Antioquia).

Figura 1-1. Mapa con ubicación del sitio de muestreo. **A**. Hacienda Betulia, Maceo, Antioquia, Colombia., **B**. Hacienda Monteoscuro, Cimitarra, Santander, Colombia.



Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Maceo#/media/Archivo:Colombia_-_Antioquia_-_Maceo.svg; https://es.wikipedia.org/wiki/Santander_(Colombia)#/media/Archivo:Santander_in_Colombia_(mainland).svg

1.2.2 Muestreo

La colecta de microorganismos se realizó bajo el Permiso Marco de Recolección de Especímenes otorgado por la Autoridad Nacional de Ciencias Ambientales – ANLA emitido con la resolución 1467 del 3 de diciembre de 2014.

En cada una de las localidades se realizó la fermentación de granos de cacao en 10 cajones, cada uno conteniendo 400 kg de grano fresco. Los clones utilizados en la Hacienda Betulia fueron B6, B8 y B9 (variedades propias de esta finca, producto de mezclas entre criollo y trinitario); y en la hacienda Monteoscuro se utilizó la variedad CCN-51. Por cada tiempo de muestreo (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas), se seleccionaron dos cajones al azar (por sorteo). De cada cajón se tomaron cuatro submuestras (mitad de la superficie, mitad del fondo, un extremo de la superficie y del fondo), que en conjunto consistieron en 10-12 granos de cacao. Las cuatro submuestras de cada cajón fueron mezcladas para conformar una muestra compuesta en ambos sitios de muestreo (Hacienda Betulia y Hacienda Monteoscuro). Posteriormente, los granos fueron depositados en un recipiente plástico conteniendo 50 mL de NaCl al 0,9% p/v (Mendoza et al., 2022). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico en cajas de icopor, manteniéndolas a una temperatura de 4°C para su

conservación hasta su procesamiento, el cual se realizó en máximo 48 horas posterior a la toma de la muestra.

1.2.3 Aislamiento de microorganismos en medio de cultivo suplementado con cadmio

Cada muestra proveniente de campo fue agitada vigorosamente en vortex durante un minuto para posteriormente realizar diluciones seriadas 1:10. 100 µL de cada una de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} fueron sembrados en cajas de petri conteniendo 20 mL de agar YPG (En g/L: peptona, 20; extracto de levadura, 10; glucosa, 20; agar, 15. Merck Milipore) suplementado con 100 mg/L de cloranfenicol o TSA (En g/L: peptona, 20; glucosa, 2,5; NaCl, 5; K_2HPO_4, 2,5; agar, 15. Merck Milipore), con el fin de aislar levaduras y bacterias respectivamente (Da Cruz et al., 2017). En ambos casos se adicionó al medio de cultivo la cantidad necesaria de una solución patrón comercial a 1000 mg Cd^{+2}/L (Cd $(NO_3)_2$ en 0.5 mol/L de HNO_3, Certipur®) para alcanzar una concentración final de 20 mg Cd^{+2}/L Las cajas Petri fueron incubadas a 37°C (bacterias) y 30°C (levaduras) durante 48 horas. Pasado este tiempo, se hizo una descripción morfológica macroscópica (tamaño, color, borde, brillo, forma, superficie) de cada una de las colonias observadas y se purificaron en los medios de cultivo y bajo las condiciones anteriormente mencionadas. (Quiroga-Mateus et al., 2022). Finalmente, se llevó a cabo una nueva descripción morfológica macroscópica para confirmar su pureza. Además, se realizó una tinción de gram para diferenciar entre bacterias y levaduras.

1.2.4 Selección de microorganismos con capacidad para disminuir cadmio en medio acuoso

Las bacterias y levaduras que presentaron crecimiento en medio sólido fueron seleccionadas para experimentos en medio líquido con el fin de evaluar su tolerancia a mayores concentraciones de cadmio. Para esto, a las 24 horas de incubación se tomó una porción de la colonia del microorganismo crecido en los medios sólidos, la cual se depositó en medio de cultivo líquido TSB (En g/L: peptona, 20; glucosa, 2,5; NaCl, 5; K_2HPO_4, 2,5. Merck Milipore) y YPG (En g/L: peptona, 20; extracto de levadura, 10; glucosa, 20, Merck Milipore) para bacterias y levaduras respectivamente, y se llevó a incubación bajo las condiciones descritas anteriormente. La biomasa necesaria se resuspendió en solución

salina (NaCl 0,9%p/v) hasta obtener una concentración de 2 $\times 10^8$ células/mL (Quiroga-Mateus et al, 2022) utilizando patrones McFarland mediante medición en un nefelómetro BD PhoenixSpec™ y conteo en cámara de Neubauer para bacterias y levaduras, respectivamente (Souza et al., 2018; Kadaikunnan et al., 2015). Estas soluciones fueron utilizadas como inóculos en todos los experimentos posteriores. 5 µL de inóculo bacteriano fueron adicionados a microplacas conteniendo 200 µL de TSB (En g/L: peptona, 20; glucosa, 2,5; NaCl, 5; K_2HPO_4, 2,5) suplementado con 120 mg Cd^{+2}/L e incubados a 37°C durante 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento para levaduras utilizando YPG (En g/L: peptona, 20g; extracto de levadura, 10; glucosa, 20) y una temperatura de 30°C. Con el fin de determinar si se presentó crecimiento del microorganismo bajo estas condiciones, se determinó la variación de absorbancia a 595 nm utilizando un lector de absorbancia de microplacas (Bio-Rad 680 XR) durante el tiempo de incubación (Gerbino et al., 2014).

Las bacterias y levaduras con mayor crecimiento (aumento de absorbancia a 595 nm) fueron seleccionadas para los experimentos de cuantificación de cadmio. A erlenmeyers de 125 mL conteniendo 25 mL de TSB (bacterias) o YPG (levaduras) se les adicionó 5 mL de inóculo. Los erlenmeyers fueron mantenidos a 37°C (bacterias) y 30°C (levaduras) durante 24 h a 150 rpm. A las 24 horas la biomasa fue separada por centrifugación a 7745 xg a 4°C durante 15 min. Se resuspendió suficiente biomasa en 20 mL de solución a 10 mg Cd^{+2}/L para alcanzar una concentración final de $2x10^8$ células/mL El pH fue ajustado a un valor de 5,5 utilizando NaOH 3M. Después de una hora a 100 rpm, la biomasa se recuperó por centrifugación (7745 xg a 4°C durante 10 min), se resuspendió en 10 mL de agua destilada y se filtró a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa (Advantec®, 0,45 µm) (Huang et al., 2020; Ibrahim et al., 2006; Quiroga-Mateus et al, 2022). Finalmente, la biomasa se secó en estufa de aire caliente a 80°C durante 24 h para determinar el peso seco de cada muestra.

El valor de absorción del cadmio (q) se calculó utilizando la siguiente ecuación (Salinas et al. 2000):

$$q = \frac{Ci - Cf}{m} x\, V \quad (1.1)$$

donde V es el volumen de solución metálica, Ci y Cf son las concentraciones inicial y final de metal, respectivamente, y m es la masa seca de las cepas.

1.2.5 Cuantificación de cadmio

Se seleccionaron cuatro microorganismos (dos bacterias y dos levaduras) que demostraron mayor capacidad para disminuir concentraciones de cadmio en medio acuoso. Cada uno de estos microrganismos fue evaluado de manera individual y en cultivo mixto siguiendo la metodología de cultivo descrita anteriormente. Se tomaron muestras del sobrenadante libre de células para determinar la concentración de cadmio mediante espectroscopía de absorción atómica (Agilent 240FS, módulo para Horno de Grafito GTA 120) y de acuerdo con el protocolo interno P-DA-48 establecido por el laboratorio. A cada muestra de sobrenadante se le realizaron diluciones seriadas 1:10 utilizando agua Milli-Q® EQ 7000, y se les adicionaron de 2-3 gotas de HNO_3 al 65% (EMSURE® Reag. Ph Eur,ISO) para simular el entorno ácido de una digestión. Luego, se realizó una lectura preliminar a una longitud de onda de 228,8 nm con un intervalo lineal permitido para el cadmio de 0,008 - 1,500 mg/L. La medición por la técnica de llama se hizo con el fin de estimar la concentración de cadmio en cada una de las muestras y preparar las diluciones necesarias que permitieran la lectura por horno de grafito dentro del intervalo lineal permitido por el equipo para el Cd (0,201 – 2,010 µg/L). Para este caso, se prepararon diluciones 1:100 en agua tipo II con 2-3 gotas de HNO_3 al 65 %.

1.2.6 Conservación de los microorganismos seleccionados

Se tomó una asada de cada una de las bacterias y levaduras incubadas a 30°C durante 24 h en medio TSA y agar YPG y se sumergió en un tubo de ensayo conteniendo 5 mL de medio de cultivo suplementado con 20 mg Cd^{+2}/L. El asa fue retirada del primer tubo y sumergida en un segundo tubo con la misma cantidad de medio. El procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente, los tubos fueron llevados a incubadora a 30°C (levaduras) y 37°C (bacterias) durante 18-20 horas. Pasado este tiempo, se tomaron 700 µL de los tubos tres y cuatro y se depositaron en crioviales que contenían 300 µL de glicerol puro estéril. Cada suspensión microbiana fue agitada en vortex durante un minuto. Los crioviales fueron cubiertos con papel aluminio, sumergidos en nitrógeno líquido durante 2-4 min y finalmente se llevaron a -20°C (Perry, 1998).

1.2.7 Extracción y purificación de ADN de bacterias y levaduras

Las bacterias y levaduras fueron cultivadas en erlenmeyers de 125 mL con 25 mL de medio de cultivo TSB a 37°C y YPG a 30°C, respectivamente, e incubadas durante 18 horas a 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 mL y la biomasa se recuperó mediante centrifugación a 5000xg durante 10 min. Para la extracción de ADN se utilizó el Kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Germany). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%p/v de tampón Tris-borato-EDTA (TBE), a 80 V durante 60 min y una medición de las relaciones de absorbancia ADN/Proteína (260/280) y ADN/Sales (260/230) a través de espectrofotometría en Nanodrop OneC (ThermoScientific).

1.2.8 PCR para la amplificación de ADN de bacterias y levaduras

Para la amplificación del dominio D1/D2 de la región 26S ADNr de las levaduras se utilizaron los iniciadores NL-1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′) y NL-4 (5′ -GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′) (Kurtzman & Robnett, 1998). Las reacciones de amplificación se prepararon en volumen total de 25 µL, tomando 2,5 µL de taq buffer (10X) con KCl (Thermo Scientific), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP´s (desoxinucleótidos Trifosfatos), 0,2 µM de cada cebador, 5 U/µL de taq polimerasa (Thermo Scientific) y 2 µL del extracto de ADN. El programa de amplificación comprendió un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 min, 30 ciclos de amplificación a 94 °C durante 45 seg, 57 °C durante 45 seg, 72 °C durante 3 min y un paso final de elongación a 72 °C durante 10 min (Almeida et al., 2018).

Para la amplificación del gen 16s de las bacterias, se utilizaron los cebadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Monciardini et al., 2002). El mix de reacción se preparó en 25 µL adicionando 2,5 µL de taq buffer (10X) con KCl (Thermo Scientific), 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP´s (desoxinucleótidos Trifosfatos), 1 µM de cada cebador, 5 U/µL de taq polimerasa (Thermo Scientific) y 2 µL del extracto de ADN. El programa de amplificación tuvo una desnaturalización a 94°C durante 45 seg, 30 ciclos de amplificación a 94°C durante 15 seg, 53°C durante 30 seg, 72 °C durante 90 seg y un paso final de elongación a 72°C durante 10 min (Machuca-Guevara et al., 2019). Para la amplificación de las bacterias y levaduras se utilizó como control

positivo la cepa *Bacillus subtilis* M2 (Colección MICROCIB #223 perteneciente a la Corporación para Investigaciones Biológicas) y la cepa *Candida albicans* CAP F13 respectivamente, mientras que el agua destilada estéril fue el control negativo.
Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis a 80 V durante 60 min utilizando gel de agarosa al 1% en tampón TBE 10 X, teñidos con GelRed® (Biotium, Inc., USA) y visualizados en un transiluminador (BioRad Laboratories, Inc.CA, USA). Los amplicones fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

1.2.9 Edición y clasificación de secuencias

Las secuencias nucleotídicas fueron editadas usando el software BioEdit, mediante la herramienta Contig Assembly program. El análisis bioinformático se realizó a través de BLAST del algoritmo BLASTn para encontrar regiones de similitud entre secuencias biológicas comparadas con la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información biotecnológica (NCBI).

1.2.10 Determinación de pH para la biorremediación de cadmio

Los microorganismos seleccionados previamente (en cultivo mixto o de manera individual) fueron cultivados en erlenmeyers de 125 mL con 25 mL de medio de cultivo TSB y YPG a 37°C (bacterias) y 30°C (levaduras) con agitación permanente durante 24 horas a 150 rpm. El experimento se llevó a cabo siguiendo la metodología con modificaciones de Quiroga-Mateus et al., 2022; Ibrahim et al., 2006 y Huang et al., 2020 descrita anteriormente en el numeral 2.2.4. Los valores de pH inicial evaluados fueron 3,5, 4,5 y 5,5 a una concentración de 10 mg Cd^{+2}/L.

1.2.11 Análisis de espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La biomasa de la cepa de bacteria (*B subtilis* M21HB) y de levadura (*W. anomalus* M4HMO) tanto en presencia (10 mg Cd^{+2}/L) como en ausencia de cadmio, fue centrifugada (7745 xg por 10 min a 4 °C) y posteriormente liofilizada. Se prepararon discos de cada muestra a partir de 2 mg de biomasa liofilizada, la cual fue encapsulada en 200 mg de KBr. La biomasa se analizó mediante un equipo infrarrojo Spectrum Two UATR, utilizando un

rango de barrido de 400 – 4000 cm^{-1} y una resolución de espectro de 4 cm^{-1} (Li et al., 2018c).

1.2.12 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% utilizando el programa R (https://www.r-project.org).

1.3 Resultados

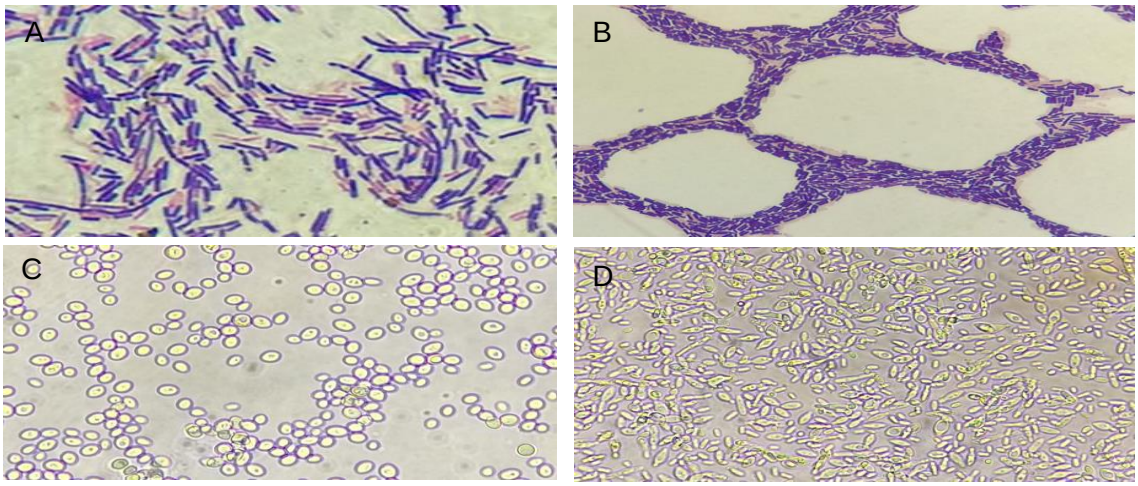
1.3.1 Microorganismos aislados de la fermentación de cacao con capacidad para crecer en medio de cultivo suplementado con cadmio

En la tabla 1-1 se muestran todos los asilamientos obtenidos durante el proceso de fermentación de cacao en cada una de las zonas de muestreo. De la Hacienda Betulia, de un total de 40 aislamientos, el 45% creció en agar YPG + 20 mg Cd^{+2}/L y el 55% en medio TSA + 20 mg Cd^{+2}/L. De la Hacienda Monteoscuro, estos porcentajes fueron del 64% y 36%, respectivamente, de un total de 44 aislamientos. El porcentaje de microorganismos que mostró capacidad para crecer en medio de cultivo líquido fue de 55% (Hacienda Betulia: 15 cepas en medio YPG + 120 mg Cd^{+2}/L y 7 en TSB + 120 mg Cd^{+2}/L) y 14% (Hacienda Monteoscuro: 5 cepas en medio YPG + 120 mg Cd^{+2}/L y 1 en TSB + 120 mg Cd^{+2}/L). En ambos sitios, los microorganismos aislados en el medio YPG líquido + cadmio correspondieron a las muestras de grano del primer y segundo día de fermentación, mientras que los aislados que crecieron en medio TSB + cadmio provenían de las muestras obtenidas entre el quinto y el séptimo día de fermentación. Además, el número de microorganismos que crecieron en medio YPG líquido suplementado con 120 mg Cd^{+2}/L fue mayor que el obtenido en el medio TSB + 120 mg Cd^{+2}/L para ambos sitios de muestreo. En este sentido, se encontró un mayor número de levaduras con capacidad de crecer en medio de cultivo suplementado con cadmio comparado con las bacterias. En cuanto a la morfología microscópica, todas las bacterias fueron Gram positivas con forma de bastones, por su parte las levaduras presentaron formas circulares y ovaladas (Figura 1-2).

Tabla 1-1. Número de microorganismos aislados de la fermentación de cacao con capacidad para crecer en medio sólido y líquido suplementado con 20 y 120 mg Cd^{+2}/L, respectivamente.

Hacienda Betulia			Hacienda Monteoscuro		
Medio de cultivo	**Aislados**	**Día**	**Medio de cultivo**	**Aislados**	**Día**
Agar YPG + 20 mg Cd^{+2}/L	18	1, 2,3,4	Agar YPG + 20 mg Cd^{+2}/L	28	1,2,3
YPG + 120 mg Cd^{+2}/L	15	1,2	YPG + 120 mg Cd^{+2}/L	5	1,2
TSA + 20 mg Cd^{+2}/L	22	5,6,7	TSA + 20 mg Cd^{+2}/L	16	5,6
TSB + 120 mg Cd^{+2}/L	7	5,7	TSB + 120 mg Cd^{+2}/L	1	6

Figura 1-2. Morfología microscópica de bacterias con tinción de Gram (A y B) y levaduras (C y D) con capacidad para crecer en medio suplementado con 20 mg Cd^{+2}/L.



1.3.2 Identificación molecular

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos para la amplificación del dominio D1/D2 de la región 26S rDNA de las levaduras utilizando los cebadores NL1-NL4 fueron de aproximadamente 400pb (Figura 1-3). Los fragmentos visualizados de la amplificación de la región V1-V9 del gen 16s para las bacterias fueron de 1500pb aproximadamente (Figura 1-4).

Figura 1-3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de ADN de las levaduras M1, M4, M6, M14 aisladas de la fermentación de cacao con capacidad para secuestrar cadmio. **CP**: control positivo, **CN**: control negativo, **M:** marcador de peso molecular

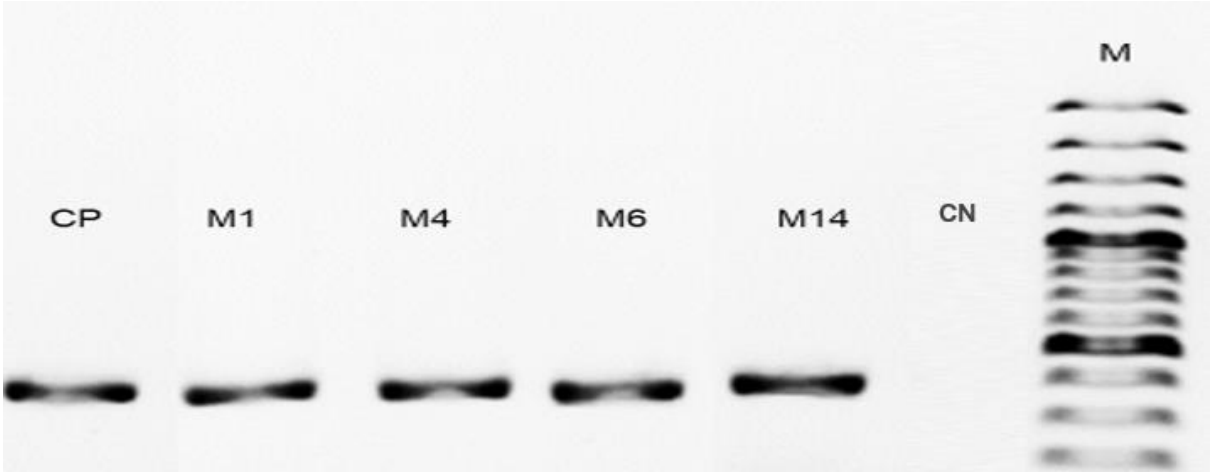
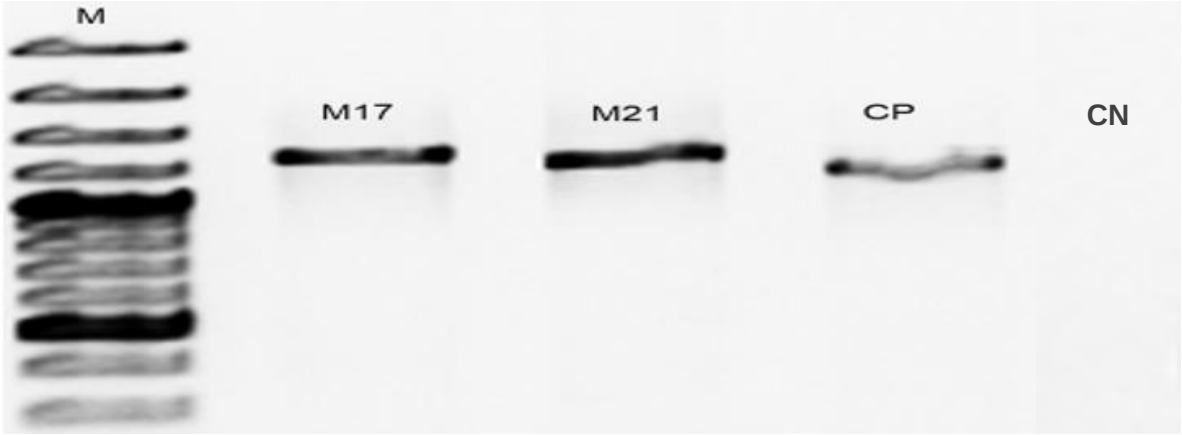


Figura 1-4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de ADN de las bacterias M17 y M21 aisladas de la fermentación de cacao con capacidad para secuestrar cadmio. **CP**: control positivo, **CN**: control negativo, **M**: marcador de peso molecular



El análisis por BLASTn para la amplificación del dominio D1/D2 de la región 26S ADNr de las levaduras mostró que la cepa M6 HB pertenece al género *Saccharomyces*. Además, se halló un representante de *Wickerhamomyces*, *Hanseniaspora* y *Torulospora*. Para todas las cepas fue posible obtener una identidad a nivel de especie, para un total de cuatro cepas identificadas. De estos aislamientos, *Saccharomyces cerevisiae* M6 HB y *Torulaspora delbrueckii* M14 HB correspondieron a la fermentación de la Hacienda Betulia

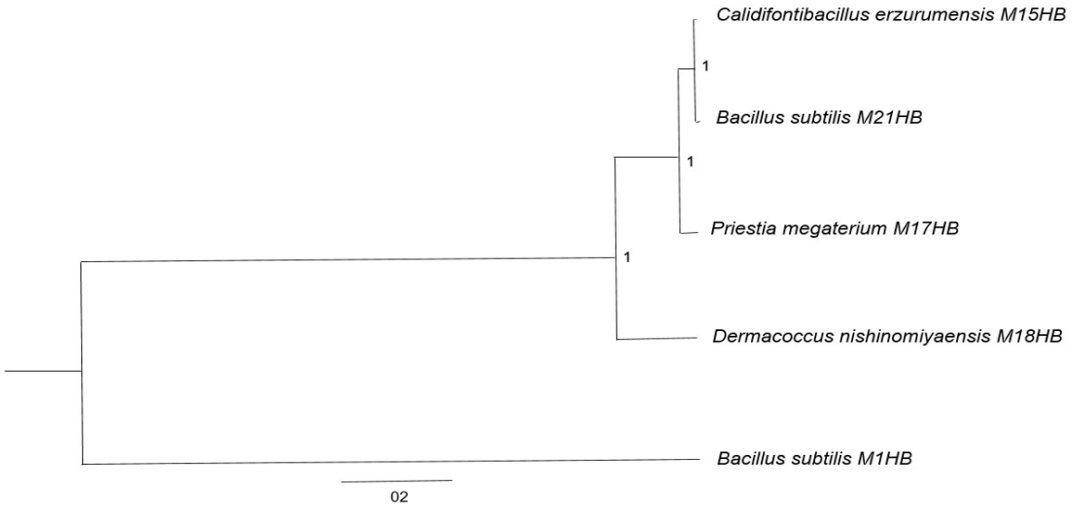
(Maceo, Antioquia). *Hanseniaspora opuntiae* M1 HMO y *Wickerhamomyces anomalus* M4 HMO provenían de la Hacienda Monteoscuro (Cimitarra Santander) (Tabla 1-2). Respecto a la identificación molecular de las bacterias, se confirmó la presencia de dos cepas de *Bacillus,* que podrían corresponden a la especie *subtilis* y *megaterium*, (Tabla 1-2). Ambas cepas de bacterias fueron aisladas de la fermentación de la Hacienda Betulia.

Tabla 1-2. Identificación a partir del análisis por BLASTn de bacterias y levaduras aisladas de la fermentación de cacao con capacidad para secuestrar cadmio.

N	Cepa	Lugar de aislamiento	ID	Similaridad (%)
1	M17HB	Hacienda Betulia	*Bacillus megaterium*	99.93
2	M21HB	Hacienda Betulia	*Bacillus subtilis*	99.57
3	M1HMO	Hacienda Monteoscuro	*Hanseniaspora opuntiae*	100
4	M4HMO	Hacienda Monteoscuro	*Wickerhamomyces anomalus*	99.81
5	M6HB	Hacienda Betulia	*Saccharomyces cerevisiae*	99.66
6	M14HB	Hacienda Betulia	*Torulaspora delbrueckii*	100

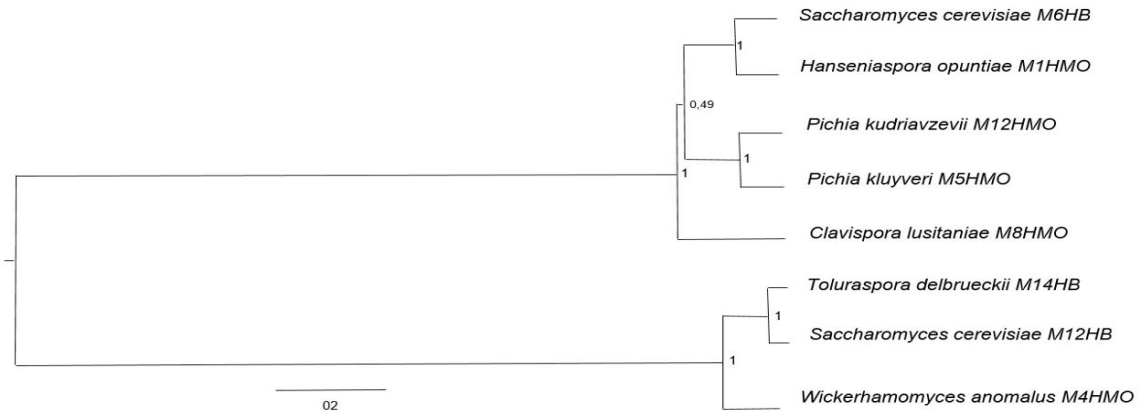
Según la relación filogenética representada en el dendrograma (Figura 1-5) generado por el programa Treeanotator (https://beast.community/treeannotator), muestra que las cepas de bacterias *B. subtilis* M21HB y *B. megaterium* M1HB son consideradas hermanas y con una edad evolutiva menor. Tanto la cepa *B. megaterium* M17HB como *B. subtilis* M21HB son especies cercanas ya que se encuentran en el mismo grupo monofilético, sin embargo, M21HB es una cepa más reciente evolutivamente.

Figura 1-5. Dendrograma de las secuencias de genes ARNr 16S de cepas de bacterias con capacidad para capturar cadmio. Filogenia realizada bajo el método árbol bayesiano con estimador bootstrap de 1000.



Respecto a las cepas de levaduras, *S. cerevisiae* M6HB es la especie más reciente evolutivamente, comparada con *W. anomalus* M4HMO que corresponde a la especie más antigua del grupo (Figura 1-6).

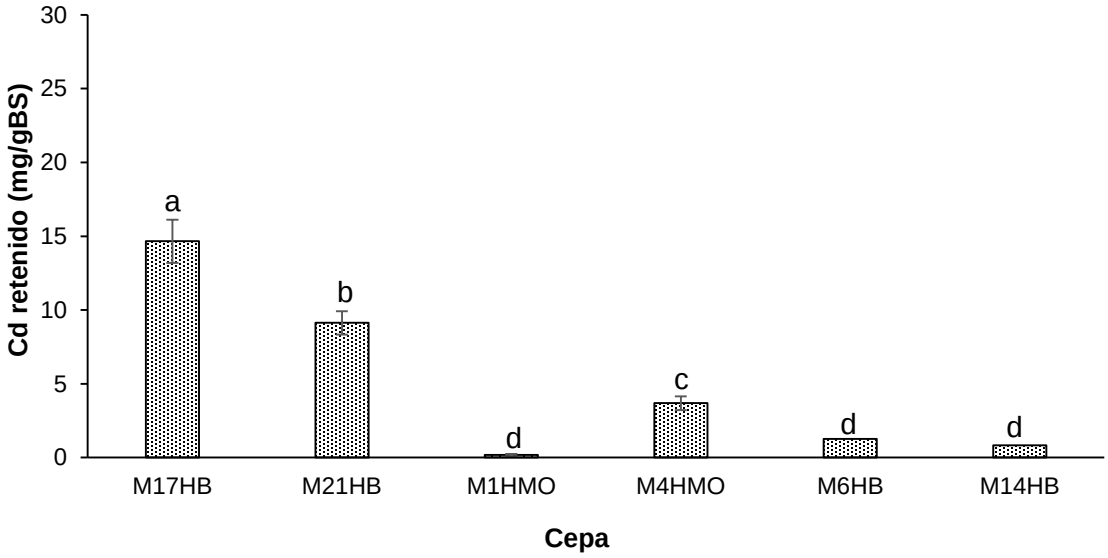
Figura 1-6. Dendrograma de las secuencias de genes rDNA 26S de cepas de levaduras con capacidad para capturar cadmio. Filogenia realizada bajo el método árbol bayesiano con estimador bootstrap de 1000.



1.3.3 Microorganismos con capacidad para disminuir cadmio en medio acuoso

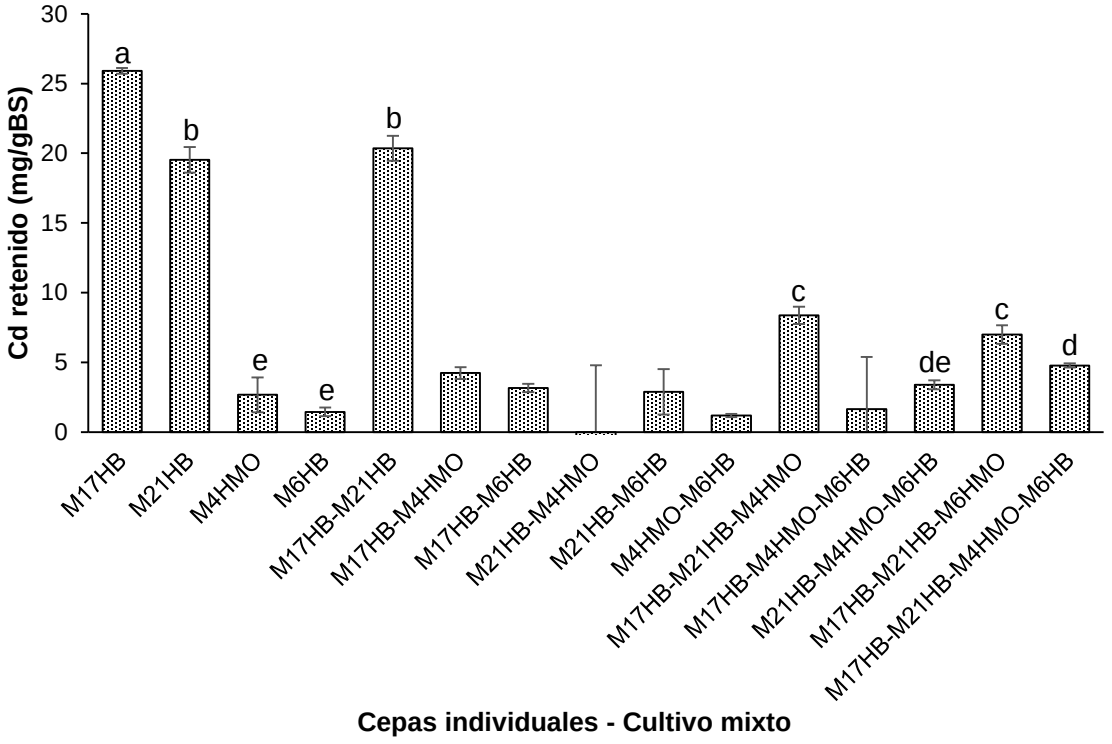
Las cepas de bacterias *B. megaterium* M17HB y *B. subtilis* M21HB mostraron mayor potencial para capturar cadmio (14,65 y 9,12 mg Cd^{+2}/gBS, respectivamente) con una diferencia estadísticamente significativa respecto a las cepas de levaduras *W. anomalus* M4HMO y *S. cerevisiae* M6HB, las cuales presentaron valores de 3,68 y 1,26 mg Cd^{+2}/gBS respectivamente. Las cepas de levaduras *Hanseniaspora opuntiae* M1HMO y *Torulaspora delbrueckii* M14HB fueron las de menor capacidad para secuestrar cadmio (Figura 1-7)

Figura 1-7. Cadmio retenido por unidad de biomasa de cada microorganismo seleccionado en experimentos realizados en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L. (p = 0,05)



Respecto a los aislados individuales, la bacteria *B. megaterium* M17HB y *B. subtilis* M21HB tuvieron la mayor capacidad para capturar cadmio (25,9 mg y 19,5 mg Cd^{+2}/gBS, respectivamente) con diferencia estadísticamente significativa entre estos tratamientos (Figura 1-8). Las levaduras *W. anomalus* M4HMO y *S. cerevisiae* M6HB inoculadas de forma individual, mostraron una menor capacidad (2,67 y 1,45 mg Cd^{+2}/gBS, respectivamente). Las bacterias M17HB-M21HB inoculadas en cultivo mixto, lograron mantener los niveles de cadmio retenido estimados en experimentos realizados de manera individual (20,34 mg Cd^{+2}/gBS), siendo estadísticamente diferente y superior, con respecto a todas las demás combinaciones.

Figura 1-8. Cadmio retenido por unidad de biomasa de cada microorganismo inoculado de manera individual y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/ con diferentes valores de pH inicial (p = 0,05).



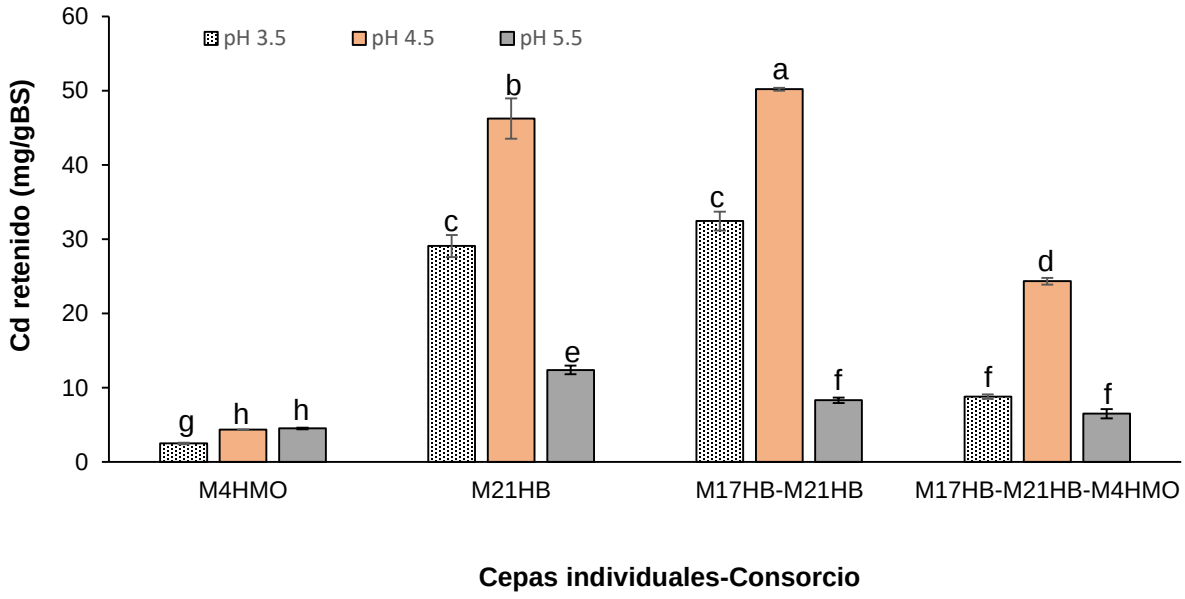
1.3.4 Efecto del pH sobre la capacidad de los microorganismos para secuestrar cadmio

La bacteria *B. megaterium* M17HB y *B. subtilis* M21HB en cultivo mixto a pH 4,5 mostraron la mayor capacidad para capturar cadmio (50,18 mg Cd^{+2}/gBS). Este valor fue ligeramente superior al obtenido con la cepa *B. subtilis* M21 de manera individual (46,23 mg Cd^{+2}/gBS) a pH 4,5, mientras que la levadura *W. anomalus* M4HMO mostró la menor capacidad en todos los valores de pH evaluados. La menor cantidad de cadmio retenido se registró a un pH de 5,5 en la mayoría de los tratamientos, a excepción de la levadura *W. anomalus* M4HMO, donde se observó la menor acumulación a un pH de 3,5 (Figura 1-9).

Aunque los resultados de la figura 1-7, muestran que la bacteria *B. megaterium* M17HB presentó la mayor capacidad para capturar cadmio, no se tuvo en cuenta para evaluar su capacidad de manera individual a diferentes valores de pH, debido a la disminución de la

viabilidad celular durante la conservación en glicerol. Sin embargo, en cultivo mixto con *B. subtilis* M21HB lograron retener 20,34 mg Cd^{+2}/gBS, en comparación con los 25,9 mg Cd^{+2}/gBS obtenidos por la cepa *B. megaterium* M17HB de manera individual.

Figura 1-9. Cadmio retenido por unidad de biomasa de cada microorganismo inoculado de manera individual y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L con diferentes valores de pH inicial. (p = 0,05)



1.3.5 Análisis de espectros FTIR

Los espectros FTIR (Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier) de la biomasa de las cepas *B. subtilis* M21HB y *W. anomalus* M4HMO sin cadmio y expuesta a 10 mg Cd^{+2}/L, se utilizaron para identificar los grupos funcionales involucrados en el proceso de captura de cadmio. Los espectros de absorbancia para las células de las dos cepas sin cadmio y expuestas a 10 mg Cd^{+2}/L Cd se muestran en la Fig. 1-10 y 1-11, que exhiben cambios en las áreas de los picos de absorción. Además, en la biomasa expuesta a cadmio, se notó un cambio significativo en la transmitancia de estos grupos funcionales que puede atribuirse a la unión del metal (Figura 1-10)

Los espectros de la biomasa de *B. subtilis* M21HB tanto sin cadmio como la expuesta a cadmio se caracterizaron por picos más nítidos en diferentes regiones de onda (3281-3287 cm^{-1}, 1641-1644 cm^{-1}, 1533-1536 cm^{-1}, 1397-1394 cm^{-1}, 1233-1230 cm^{-1}, 1063-1060 cm^{-1}, 528-522 cm^{-1}).

Figura 1-10. Espectros FTIR de biomasa de *W. anomalus* M4HMO sin cadmio y expuesta a 10 mg Cd^{+2}/L.

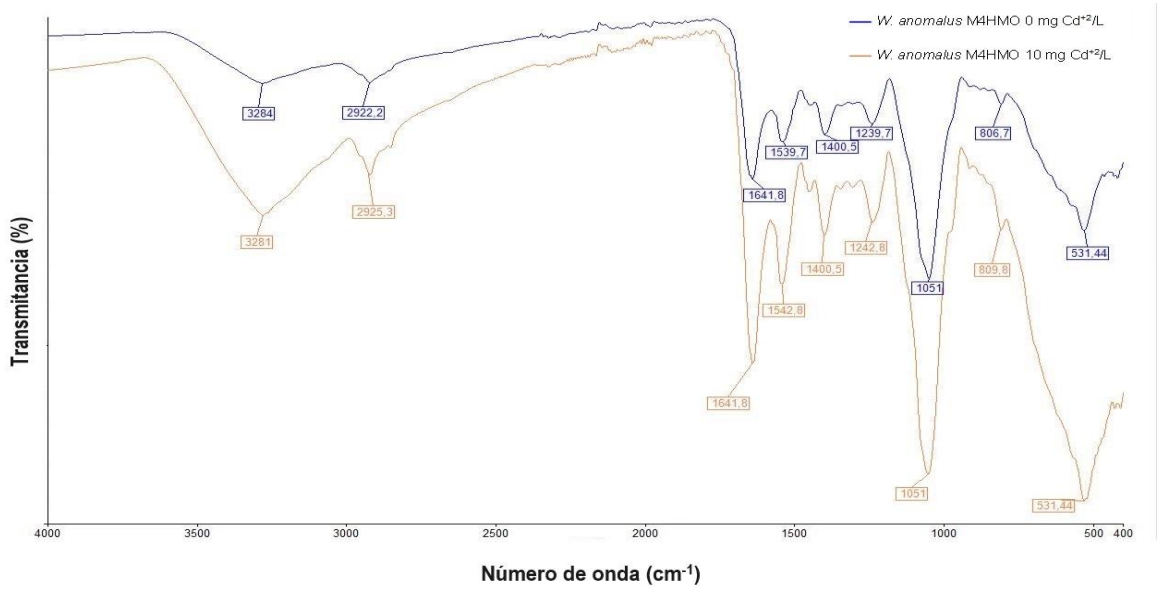
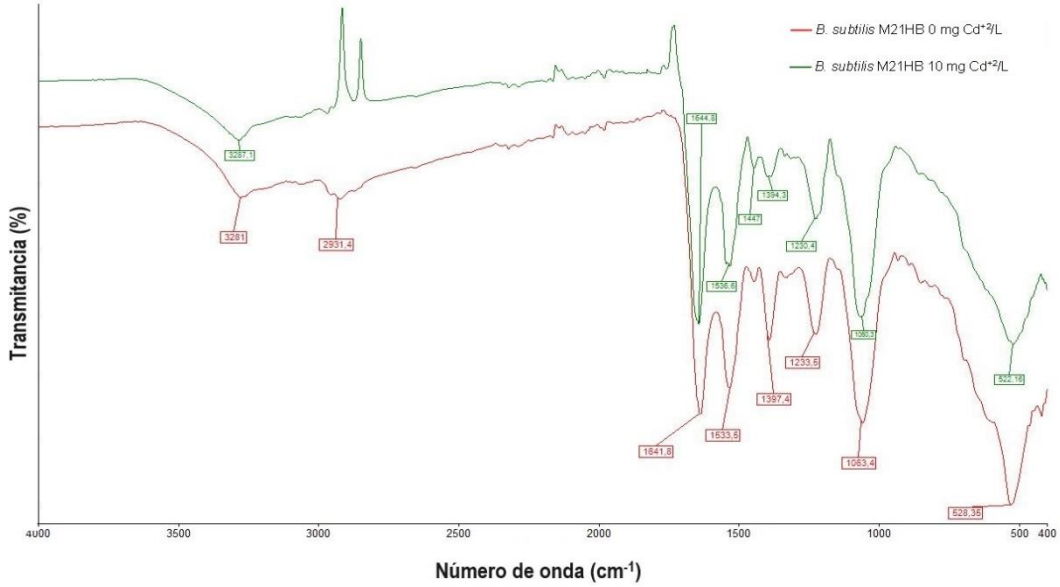


Figura 1-11. Espectros FTIR de biomasa de *B. subtilis* M21HB sin cadmio y expuesta a 10 mg Cd^{+2}/L.



1.4 Discusión

Existen pocos estudios sobre el aislamiento de microorganismos de la fermentación de cacao con capacidad para secuestrar cadmio. Hasta la fecha, sólo se ha documentado un trabajo sobre el aislamiento de bacterias acido lácticas con capacidad para disminuir concentraciones de cadmio y arsénico en medios acuosos. Los porcentajes de remoción de cadmio alcanzados fueron de hasta 100% (empleando 1 mg Cd^{+2}/L, a pH 5 y a una concentración de biomasa de 1,5 g/L) con cepas de *L. plantarum* (JCM 1055, A19 y C16), y de arsénico de 20% con *L. plantarum* C16 (empleando 0,1 mg As^{+3}/L, pH 5 y concentración de biomasa de 1,5 g/L) (Rodríguez-López et al., 2021). Sin embargo, otros autores han aislado cepas de bacterias tolerantes a cadmio (CdtB) a partir de suelos utilizados para la producción de cacao en el Departamento de Antioquia-Colombia. Se identificaron cinco bacterias del género *Bacillus* sp., dentro de estas, la cepa CdtB14 mostró mejor crecimiento y capacidad para la inmovilización de este metal con 0,6 mg Cd^{+2}/L seguida de la cepa CdtB7 con 0,41 mg Cd^{+2}/L (Quiroga-Mateus et al., 2022). En un trabajo similar, Bravo et al. (2018), aislaron microorganismos del suelo a partir de fincas cacaoteras pertenecientes a los departamentos de Boyacá, Arauca y Santander. Las

cepas que presentaron capacidad de inmovilización a 6 mg Cd^{+2}/L fueron *Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Cupriavidus* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., sin embargo, cuando se aumentó la concentración a 12 y 24 mg Cd^{+2}/L, solo *Enterobacter* sp. mostró mayor capacidad de inmovilización determinada como la producción máxima de calor (Qmax de 2,21 y 2,32 J a 6 y 24 mg Cd^{+2}/L). Así mismo, se encontraron géneros dominantes de bacterias como *Burkholderia* y *Pseudomonas* a partir de suelos con concentraciones altas de cadmio. *P. putida* GB78, *P. aeruginosa* NB2 y *Burkholderia* sp. NB10 fueron los únicos morfotipos que crecieron en suelos a concentraciones de cadmio de 90 (GB78) y 140 mg Cd^{+2}/kg (NB2-NB10); sin embargo, GB78 mostró la mayor bioacumulación (5,92 mg Cd^{+2}/gBS) (Cordoba-Novoa et al, 2021). Se ha reportado que las especies del género *Bacillus*, poseen una alta capacidad para llevar a cabo procesos de biorremediación de metales pesados en elevadas concentraciones. Arce-Inga et al. (2022), encontraron dos especies del género *Bacillus* presentes en la rizosfera de suelos cultivados con cacao que mostraron una eficiencia de remoción de cadmio del 40,38% a una concentración de 200 mg Cd^{+2}/L, además de la acumulación intracelular de este metal.

En otros estudios, cepas de *S. cerevisiae, B. megaterium* y *B. subtilis* que no han sido aisladas de la fermentación de cacao, se han utilizado para evaluar la capacidad de biosorción de metales pesados como el cadmio y el plomo. En este sentido, Abioye et al. (2018) midieron la capacidad de microorganismos para reducir metales pesados en efluentes de la industria del procesamiento del cuero. *B. megaterium* registró la mayor reducción de plomo (2,13 a 0,03 mg Pb^{+2}/L), seguida de *B. subtilis* (2,13-0,04 mg Pb^{+2} /L), mientras que *B. subtilis* exhibió la mayor capacidad para reducir la concentración de cadmio (0,40-0,03 mg Cd^{+2}/L), seguida de *B. megaterium* (0,40-0,06 mg Cd^{+2}/L) después de 20 días. Así mismo, Huang et al. (2020), aislaron e identificaron cepas de *S. cerevisiae* y *B. subtilis* a partir de suelos no contaminados, las cuales presentaron una capacidad máxima de biosorción de 22,44 y 56,50 mg Cd^{+2}/gBS, respectivamente. Esta capacidad de biorremediación fue similar a la presentada por el cultivo mixto conformado por las cepas *B. megaterium* M17HB y *B. subtilis* M21HB con un pH inicial de 4,5.

Se han encontrado resultados similares a los obtenidos en este estudio para *W. anomalus,* considerándose como una nueva cepa con interesantes capacidades para resistir concentraciones relativamente altas de metales pesados tóxicos. Aibeche et al. (2022), aislaron y seleccionaron siete cepas de levaduras de un lago altamente contaminado con

cadmio y plomo, las cuales fueron seleccionadas en función de su resistencia a siete metales pesados (Hg, Cr, Cd, Pb, Cu, Zn y Fe). La concentración más alta de iones de plomo y cadmio tolerada por *W. anomalus* fue de 200 y 100 mM, respectivamente, con una eficiencia de eliminación de plomo de 12,68 mg Pb^{+2}/gBS. Según Cai et al. (2022) *W. anomalus* registró tasas de crecimiento constantes cuando se expuso a dosis de cadmio que oscilaban entre 10 y 100 mg Cd^{+2}/L, mientras que valores de hasta 1000 mg Cd^{+2}/L disminuyeron significativamente la acumulación de biomasa. En otro estudio, *W. anomalus* redujo la mayor cantidad de cadmio en una solución con una baja concentración de este metal (0,05 mg Cd^{+2}/L), mientras que *B. subtilis* presentó mayor capacidad de reducción bajo concentraciones más altas (0,5 y 5 mg Cd^{+2}/L) (Li et al., 2019)

Se ha informado que la biosorción de metales pesados mediante biomasa microbiana se ve afectada por varios parámetros como el pH, temperatura, dosis de biomasa, concentración inicial del metal, iones/coiones competitivos, tiempo de contacto, tipo de metal pesado y de biosorbente (Fathollahi et al., 2021). Entre estos factores, el pH es el más importante ya que tiene un efecto significativo sobre la especiación de los iones metálicos, las cargas electrostáticas, el grado de ionización y los grupos funcionales disponibles en la superficie del biosorbente (Fears et al., 2009). Además, juega un papel importante en el crecimiento microbiano y la actividad enzimática (Karthik et al., 2017). El pH de la solución cambia la composición de las paredes celulares microbianas, el metabolismo de la biomasa viva y los patrones de transporte de metales, lo que lleva a un cambio en la capacidad del biosorbente (Ramstedt et al., 2014).

El pH óptimo varía para diferentes sistemas de biosorción. Un aumento del pH hasta 5 genera un incremento en la capacidad de biosorción (98%), pero por encima de este valor conduce a una reducción. La protonación y desprotonación de grupos funcionales presentes en la célula de los microorganismos está controlada por el pH del medio, lo que afecta la capacidad de biosorción: a pH bajo, los grupos carboxílicos, al ser ácidos, están en estado protonado debido al exceso de H^+ y H_3O^+, por lo tanto, las fuerzas repulsivas de estos grupos protonados con iones de metales pesados cargados positivamente son responsables de la disminución de la capacidad de biosorción (Ahmad et al., 2018). Con el aumento del pH, los grupos funcionales como los grupos amina, carboxilo e hidroxilo quedan expuestos por desprotonación, lo que mejora la atracción electrostática con iones

de metales pesados debido a una carga negativa. Sin embargo, un aumento significativo del pH conduce a la formación de complejos aniónicos de hidróxido, lo que da lugar a la precipitación. Este fenómeno es una de las causas que explican la reducida capacidad de biosorción (Jiang et al., 2017).

Varios estudios han abordado el efecto del pH en la eficiencia y capacidad de biorremediación de diferentes cepas de microorganismos. Boyanov et al (2003) evaluaron valores de pH en un rango de 3,4 a 7,8 en el proceso de biosorción de cadmio por parte de *B. subtilis*, encontrando poca disminución de este metal a pH 3,4, además se identificó que el cadmio se une predominantemente a ligandos de fosforilo por debajo de pH 4,4, mientras que, a un pH más alto, la adsorción a grupos carboxilo es mayor. Sin embargo, la cepa *B. subtilis* M21 HB utilizada en el presente estudio, tuvo la menor capacidad de biosorción a pH 5,5 y la mayor a pH 4,5. Por el contrario, *Bacillus subtilis* KC6 mostró la mayor capacidad para eliminar cadmio a un pH de 7 (Xie et al., 2021) y *B megaterium* a pH 6 y 8 (Alzahrani et al., 2022; Chi et al., 2020). De la misma manera, varios estudios han informado que los valores de pH óptimos para la biosorción de cadmio se encuentran entre 6 y 7,5 (Ding et al., 2021; Park & Chon, 2016; Tarbaoui et al., 2016). Contrario a estos reportes, Rosca et al. (2018), encontraron la mayor capacidad de eliminación de cadmio por parte de *B. megaterium* a un pH de 4. No obstante, es importante destacar que los valores de pH que favorecen la biosorción de metales pesados pueden variar entre distintos microorganismos, debido a las diferencias en su composición celular y presencia de grupos funcionales. En el caso de *S. cerevisiae*, se ha observado que la tasa de biosorción de cadmio aumenta a medida que el pH de la solución se incrementa en un rango comprendido entre 4 y 5. Sin embargo, valores de pH por encima o por debajo de este intervalo han demostrado disminuir la eficiencia de biosorción (Ghorbania et al., 2008; Hadiani et al., 2018). Otros estudios han demostrado que cepas de levaduras como *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *W. anomalus*, tienen una alta capacidad para reducir iones de Pb^{+2}(hasta un 96%) y Cd^{+2} (hasta un 40%) utilizando un pH neutro (Nicula et al., 2023). El efecto del pH en la biorremediación de cromo (Cr) por *W. anomalus* también ha sido objeto de estudio, encontrando un rango óptimo de pH entre 2 y 4, siendo 4 el valor de pH en el que se logra la máxima acumulación del metal (Acosta et al., 2018; Asri et al., 2018; Bahafid et al., 2013).

La eficiencia de la biorremediación también puede lograrse mediante el uso de microorganismos en cultivo mixto en lugar de una sola cepa. En el estudio de Kang et al. (2016) se demostró el efecto sinérgico de mezclas bacterianas en la biorremediación de plomo, cadmio y cobre de suelos contaminados utilizando cuatro cepas: *Viridibacillus arenosi* B-21, *Sporosarcina soli* B-22*, Enterobacter cloacae* KJ-46 y *E. cloacae* KJ-47. Observaron que las mezclas bacterianas tenían mayor resistencia y eficiencia para la remediación de metales pesados en comparación con el uso de cepas de manera individual después de 48 h, con eficiencias de remediación del 98,3% para plomo, 85,4% para cadmio y 5,6% para cobre.

Por otra parte, la cinética de biosorción y el tiempo de retención se utilizan para comprender mejor la dinámica de los iones metálicos en la superficie del biosorbente (Al-Qahtani, 2016). Srivastava et al. (2015) afirmaron que los modelos cinéticos se utilizan para identificar los posibles mecanismos en el proceso de biosorción y que las reacciones de biosorción constan de cuatro pasos: (1) transferir iones de metales pesados desde el interior de la solución a la capa límite cerca del biosorbente, (2) transición de capa límite a la superficie absorbente, (3) transferencia desde la superficie del biosorbente a los sitios activos del biosorbente y, finalmente (4) establecimiento de una conexión entre los iones de metales pesados y los grupos funcionales en los sitios activos del biosorbente. Además, es importante considerar el tiempo de equilibrio, que se refiere al punto en el cual, pasado este tiempo, no se biosorben cantidades significativas de iones o en el que algunos de los iones biosorbidos en la superficie del biosorbente se desprenden. Frecuentemente el tiempo óptimo para estos procesos es entre 20 y 60 min, mientras que el tiempo de equilibrio es de 120 min (Beni & Esmaeili, 2020).

Los espectros F-TIR para *W. anomalus* M4HMO, muestran picos alrededor de 3000-3500 cm^{-1} indicando la existencia de vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (-OH) y/o amino ($-NH_2$), que se encuentran entre los grupos funcionales del quitosano y los aminoácidos en la pared celular de *W. anómalus* (Stafussa et al., 2016). Los picos en 2927-2924 cm^{-1} están en la región de absorción de cadenas lipídicas acilo (3050-2800 cm^{-1}) que corresponden al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos metileno y metilo en los fosfolípidos de membrana (Ami et al., 2014). Los picos a 1642, 1542 y 1539 cm^{-1} detectados en la región entre 1700 y 1500 cm^{-1} indican la presencia de bandas de amida

(I y II), principalmente de enlaces peptídicos de proteínas (estiramiento C = O y flexión N-H), correspondientes a varios ácidos urónicos y aminoácidos presentes en la pared celular (Zhang et al., 2010) La absorción infrarroja en el espectro a 1400 cm^{-1} puede ser causada por los grupos azufre (-SO-) y fósforo (-PO-), que oscilan entre 1500 y 1300 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de ácidos grasos y proteínas (Stafussa et al., 2016). Las bandas observadas a 1073, 1239 y 1242 cm^{-1} se asignan a vibraciones de estiramiento C-O de alcoholes y ácidos carboxílicos que están relacionadas principalmente con vibraciones complejas de carbohidratos (Naja & Volesky, 2011).

Respecto a *B. subtilis*, la banda alrededor de 1060 cm^{-1} se atribuyó a vibraciones de estiramiento de C–O, C–C, C–O–C y C–O–P en polisacáridos (D'Souza et al., 2008). Las bandas cercanas a 1230 cm^{-1}, expresaron el P=O del grupo fosfodiéster de ácidos nucleicos y fosfolípidos (Yee et al., 2004). El C–H de los grupos CH_3, CH_2 y el C–O de los grupos COO- (1397 cm^{1}) demostraron la presencia de exopolímeros (EPS) producidos por la bacteria, incluidos polisacáridos, proteínas y ácidos de bajo peso molecular (Naik et al., 2012). Los exopolímeros podrían unir eficientemente iones metálicos utilizando la capacidad de intercambio catiónico, disminuyendo de esta manera la toxicidad de los metales (Kepenek et al., 2018). Los picos cerca de 1540 cm^{-1} (flexión N-H y el estiramiento C-N) y de 1640 cm^{-1} (estiramiento C--O en el grupo amida) podrían ser uno de los componentes importantes de las paredes celulares (Wei et al., 2011). Los enlaces alrededor de 2930 cm^{1} podrían deberse al estiramiento C-H del grupo alquilo (Wu et al., 2019). Los enlaces amplios cerca de 3280 cm^{-1} se atribuyeron al estiramiento simétrico de O–H, N–H, C-H (Guo & Zhang, 2004) (Figura 1-11).

También se ha informado que la composición de la pared celular es diferente en bacterias (peptidoglicano), hongos (quitina) y algas (alginato, polisacáridos sulfonados); por lo tanto, la variación en la presencia de grupos funcionales en la superficie de la pared celular es responsable de la diferencia en los mecanismos (Farooq et al., 2010). Además de la pared celular, las sustancias poliméricas extracelulares secretadas por microorganismos también desempeñan un papel importante en la biosorción (Kirillova et al., 2017).

1.5 Conclusiones

Se obtuvieron cepas individuales y en cultivo mixto de bacterias y levaduras aisladas de la fermentación de cacao que demostraron capacidad para capturar cadmio a una concentración de 10 mg Cd^{+2}/L en un medio acuoso, además de la tolerancia para crecer a una concentración de 120 mg Cd^{+2}/L. La cepa *B. subtilis* M21HB individual y en cultivo mixto con *B. megaterium* M17HB a pH 4,5, exhibieron la mayor capacidad para disminuir cadmio. De manera general, de los valores de pH evaluados, 4,5 favoreció la acumulación del metal por parte de las cepas individuales y en cultivo mixto.

Este estudio se considera el primero en aislar microorganismos de la fermentación de cacao para evaluar su capacidad de secuestrar cadmio. Las cepas de bacterias y levaduras aisladas se consideran promisorias para la biorremediación de metales pesados, sin embargo, es necesario un enfoque que pueda proporcionar información sobre las condiciones fisicoquímicas óptimas para una mayor eliminación del metal.

Capítulo 2. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Wickerhamomyces anomalus*

Resumen

De acuerdo con los resultados de reducción de cadmio obtenidos en medios acuosos, tres microorganismos fueron seleccionados para realizar experimentos en la fermentación de cacao bajo condiciones de campo. Teniendo en cuenta su potencial de implementación en procesos de biorremediación de cadmio, la levadura *Wickerhamomyces anonmalus* M4HMO fue seleccionada con el fin de diseñar un medio de cultivo, y definir condiciones operacionales básicas (temperatura y pH), que favoreciera la obtención de biomasa a bajo costo. Inicialmente, se realizó la selección de fuentes de carbono y nitrógeno, y la definición de concentraciones adecuadas para favorecer el crecimiento de la levadura mediante un diseño unifactorial. Posteriormente, se realizó la selección y tamizaje de factores nutricionales a través de un diseño estadístico fraccionado (Plackett-Burman) seguido de un proceso de optimización de concentraciones mediante la metodología de superficie de respuesta. Finalmente, se realizó la validación del medio de cultivo y la determinación de temperatura y pH que favorecieran un adecuado rendimiento de biomasa. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en medios comerciales. Los resultados muestran que la producción de biomasa fue afectada significativamente por diferentes factores nutricionales y la temperatura, obteniéndose una concentración celular máxima de 9,7 × 10^8 células/mL (9,5 gBS/L) en 24 horas de fermentación a 30°C, 180 rpm y pH inicial de 5,6. La composición óptima del medio de cultivo fue en g/L: extracto de levadura, 6;

sacarosa, 8,6; Proteína hidrolizada de soya, 8, donde la concentración celular alcanzada por *W. anomalus* M4HMO no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con la obtenida utilizando el medio de cultivo comercial YPG.

Palabras clave: optimización, biomasa, *W. anomalus*, medio de cultivo

2.1 Introducción

Los microorganismos necesitan de condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para su desarrollo. El principal objetivo de los medios de cultivo es crear un ambiente adecuado para el crecimiento, simulando las condiciones lo más cercanas posibles a las naturales, asegurando así el apropiado funcionamiento de su maquinaria enzimática, lo cual implica un adecuado balance de los componentes (Martínez et al., 2010). Teniendo en cuenta los requerimientos de cada microorganismo en particular y de los fines del investigador, se han desarrollado una gran variedad de medios de cultivo con diferentes propósitos y usos.

La optimización de condiciones de cultivo es uno de los fenómenos más investigados recientemente, que se realiza antes de llevar a cabo cualquier bioproceso a una escala mayor (Bardhan et al., 2021; Vehapi et al., 2022; Wang et al., 2020). Para optimizar la producción de biomasa microbiana y de metabolitos de interés a un costo razonable, es necesario diseñar medios de cultivo, bien sean definidos (constituidos por compuestos químicamente definidos y en una cantidad precisa) o complejos (contiene elementos orgánicos cuya composición nutricional no está completa y precisamente descrita), mediante el manejo de variables independientes tales como concentración de nutrientes, agitación, pH, temperatura o inyección de oxígeno, que van a tener un efecto sobre variables dependientes o de respuesta como producción de biomasa, enzimas o metabolitos (Martínez et al., 2010).

Para lograr este objetivo, existen modelos clásicos basados en evaluar cada factor con los demás factores constantes, los cuales, además de requerir tiempo y material, no toman en cuenta las interacciones que puedan tener las variables independientes entre sí. Por lo tanto, los diseños estadísticos con base en modelos matemáticos permiten valorar las

interacciones que tienen las variables respuesta entre ellas y con ello obtener resultados con mejor soporte, facilitando a su vez aspectos técnicos a nivel de laboratorio al minimizar el tiempo y la cantidad de combinaciones en el diseño (Gupte & Kulkarni, 2003; Wang et al., 2011).

Diseños factoriales fraccionados como la metodología Plackett-Burman (Plackett & Burman 1946), se emplea para identificar las variables significativas en un sistema, clasificarlas según su importancia y seleccionar aquellas que se explorarán en mayor detalle. Esta técnica es especialmente útil para la elección de componentes relevantes en el medio de cultivo, permitiendo la eliminación de factores insignificantes. Este proceso conduce a un conjunto más reducido de variables, simplificando así su gestión y análisis (Sreekumar & Krishnan 2010). La otra técnica utilizada en el proceso de optimización de medios de cultivo es la metodología de superficie de respuesta (MSR) (Chen et al., 2010), la cual consiste en un grupo de procedimientos matemáticos y estadísticos que pueden ser usados para estudiar la relación entre una o más respuestas y un número independiente de variables, que también permite obtener la mayor cantidad de información con pocos experimentos (Sreekumar & Krishnan 2010) y ahorrar tanto tiempo como trabajo. Las técnicas MSR más usadas son la de Diseño Central Compuesto (DCC) y el diseño Box-Behnken (DBB), en las cuales normalmente se optimizan cinco y tres factores, respectivamente (Zhong et al., 2014).

Un aspecto relevante en la optimización de un medio de cultivo no es sólo el logro de una formulación racional del medio, sino también la posible inclusión de materia prima de bajo costo que haga rentable el proceso. Por tanto, la posibilidad de implementar un sistema productivo en biorreactor, a escala piloto o comercial, está determinada por la capacidad de establecer condiciones apropiadas para el crecimiento microbiano y lograr concentraciones adecuadas específicas para cada proceso en particular del producto de interés. Por razones económicas, estas condiciones son definidas a partir de un trabajo de optimización a escala de erlenmeyer. Estos procesos a pequeña escala representan la base, y proporcionan la información necesaria para iniciar el proceso de escalado ascendente. Normalmente, el escalado en este tipo de procesos se realiza en proporciones 1:10, lo cual ha demostrado ser adecuado porque permite ajustar más fácilmente los

parámetros de desempeño a los niveles optimizados previamente en menor escala (Liu, 2017).

Tanto las levaduras como las bacterias son organismos unicelulares por lo que su crecimiento es relativamente simple y fácil de cambiar de escala y a muchos de estos microorganismos se les considera como microorganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) (da Silva et al., 2005; Souza et al., 2003). Teniendo en cuenta que el costo de los medios de fermentación es uno de los factores determinantes en la producción de biomasa, es importante formular medios de cultivos con el menor costo posible y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción enzimática (Nighojkar et al., 2006). En este sentido, el objetivo de este trabajo fue diseñar un medio de cultivo adecuado y de bajo costo para levadura *Wickerhamomyces anomalus*, seleccionada para evaluar su capacidad para disminuir niveles de cadmio en grano de cacao durante la fermentación.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Determinación de condiciones de crecimiento a escala de erlenmeyer.

Para determinar condiciones adecuadas de cultivo (fuente de carbono y nitrógeno, sales, pH y temperatura) de la cepa M4HMO, se utilizaron erlermeyers bafleados de 125 mL con un volumen de trabajo de 30 mL. Inicialmente, la cepa M4HMO fue reactivada en medio de cultivo sólido YPG (En g/L: peptona, 20; extracto de levadura, 10; glucosa, 20; agar, 15) durante 24 horas a 30 °C. A las 24 horas de incubación se tomó una asada y se depositó en erlenmeyers de 125 mL conteniendo 30 mL de medio de cultivo líquido YPG (En g/L: peptona, 20; extracto de levadura, 10; glucosa). Los erlenmeyers fueron mantenidos a 30°C durante 18-20 horas a 180 rpm. Pasado este tiempo se realizó conteo en cámara de Neubauer (BOE02-EQ) del pre-inóculo y se tomó el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 1×10^6 células/mL en cada uno de los tratamientos, los cuales fueron ajustados a un pH inicial de 5,6. De acuerdo con la literatura, las condiciones de operación para la selección y optimización de componentes nutricionales fueron 180 rpm y 30 °C, con tiempo de incubación de 24 horas. La medición de la concentración celular se realizó

mediante conteo en cámara de Neubauer (Díaz et al., 2005). Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

2.2.2 Microorganismo

Se empleó la cepa de levadura *Wickerhamomyces anomalus* M4HMO, la cual fue obtenida a partir de la fermentación de cacao realizada en la hacienda Monteoscuro (Cimitarra-Santander). Esta cepa se encuentra conservada en la colección de microorganismos de la Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB ubicada en Medellín-Colombia.

2.2.3 Medio de cultivo comercial

Se seleccionaron cuatro medios de cultivo líquidos comerciales: SDB (En g/L: peptona de carne,5; peptona de caseína, 5; glucosa, 20), PDB (En g/L: dextrosa, 20; infusión de patatas, 6,5) y RB (En g/L: peptona de soya, 5; dextrosa, 10; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4$, 0,5) (Escalante et al., 2011; Da Cruz Pedrozo et al., 2017), para evaluar el crecimiento de la cepa M4HMO. El medio de cultivo donde se obtuvo la mayor concentración celular fue seleccionado como medio de referencia para los experimentos posteriores.

2.2.4 Fuente de carbono

Tomando como base la composición del medio comercial seleccionado en la etapa anterior, incluyendo otros componentes (en g/L: KH_2PO_4, 1; $MgSO_4$, 0,5; $CaCl_2$ 0,1; extracto de levadura, 2; $(NH_4)_2$ SO_4, 2) (Joshi et al., 2019; Raimondi et al., 2022) se evaluó el efecto individual de variaciones en la fuente de carbono (glucosa, sacarosa, glicerol, lactosa, maltosa) a una concentración de 20 g/L sobre el crecimiento celular de la cepa *W. anomalus* M4HMO.

2.2.5 Fuente de nitrógeno

Se evaluaron las fuentes de nitrógeno: sulfato de amonio $(NH_4)_2$ SO_4, peptona, urea, proteína hidrolizada de soya (PHS) y extracto de levadura (Ext lev) a una concentración de 2g/L, utilizando el medio de cultivo base (en g/L: KH_2PO_4, 1; $MgSO_4$, 0,5; $CaCl_2$ 0,1;

extracto de levadura 2) y la fuente de carbono seleccionada en la etapa anterior (Djelal et al., 2005; Joshi et al., 2019).

2.2.6 Relación carbono/nitrógeno (C:N)

La fuente de carbono y nitrógeno seleccionada en las etapas anteriores, se evaluaron en proporciones de 10:1, 20:1, 5:1, 4:1 y 1:1, manteniendo como factores fijos la concentración de la fuente de carbono a 20 g/L y demás componentes del medio de cultivo base. Una vez seleccionada la relación C:N que favoreciera la producción de biomasa, se realizaron variaciones en la concentración de carbono (10, 20, 30 y 40 g/L) manteniendo la misma relación C:N (Bardhan et al., 2021).

2.2.7 Tamizaje estadístico de componentes para el medio de cultivo

Se evaluaron 15 combinaciones por duplicado empleando una matriz Plackett-Burman para seis factores en dos niveles (STATGRAPHICS Centurion XVI.I) (Tabla 2-1). La fuente de carbono y nitrógeno, así como las concentraciones seleccionadas en las etapas anteriores, se mantuvieron constantes como factores fijos para el diseño del medio de cultivo (Vehapi et al., 2022).

Tabla 2-1 Medios de cultivo evaluados mediante el diseño Plackett-Burman. Valores en g/L. En todos los medios de cultivo las concentraciones de sacarosa y PHS se mantuvieron en 20 y 2 g/L, respectivamente.

Medio de cultivo	KH_2PO_4	$MgSO_4$	$CaCl_2$	Extracto de levadura	$(NH_4)_2SO_4$	pH
1	3	0,5	0,3	1	1	4,5
2	1	0,5	0,1	1	1	4,5
3	3	1,5	0,3	1	3	6,5
4	1	1,5	0,1	1	1	6,5
5	3	0,5	0,3	3	1	6,5
6	3	1,5	0,1	3	3	4,5
7	1	0,5	0,1	3	3	6,5
8	3	0,5	0,1	1	3	6,5
9	3	1,5	0,1	3	1	4,5
10	1	0,5	0,3	3	3	4,5
11	1	1,5	0,3	3	1	6,5
12	1	1,5	0,3	1	3	4,5

Tabla 2-1 (Continuación)

Medio de cultivo	KH_2PO_4	$MgSO_4$	$CaCl_2$	Extracto de levadura	$(NH_4)_2SO_4$	pH
13	2	1	0,2	2	2	5,5
14	2	1	0,2	2	2	5,5
15	2	1	0,2	2	2	5,5

2.2.8 Optimización y validación del medio de cultivo

Los factores que afectaron positivamente, y en mayor medida, el crecimiento celular en la etapa anterior, junto con la fuente de carbono y nitrógeno, se analizaron mediante MSR utilizando el diseño Box-Behnken (STATGRAPHICS Centurion XVI.I) (Tabla 2-2) (Souza et al., 2018). Los componentes que no presentaron ningún efecto sobre el crecimiento de la cepa M4HMO se fijaron en las concentraciones mínimas evaluadas. De acuerdo con información bibliográfica, el valor de pH inicial se ajustó a 5,6 para todos los tratamientos. Además, a través de un diseño unifactorial se evaluaron tres condiciones de temperatura (30 °C, 40 °C y 50 °C) utilizando el medio de cultivo (componentes y concentraciones) optimizado obtenido mediante MSR. Finalmente, se realizó el proceso de validación del medio diseñado y los resultados fueron comparados con los obtenidos utilizando medio comercial YPG (Tabla 2-3).

2.2.10 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% utilizando el programa R (https://www.r-project.org).

Tabla 2-2 Medios de cultivo evaluados mediante el diseño Box Behnken. Valores en g/L. En todos los medios de cultivo las concentraciones de $CaCl_2$, $MgSO_4$, $(NH_4)_2$ SO_4, se mantuvieron en 0,1; 0,5 y 1.0 g/L, respectivamente.

Medio de cultivo	KH_2PO_4	Extracto de levadura	Sacarosa	PHS
1	3	3	20	4
2	4,5	4,5	30	6
3	4,5	1,5	10	2
4	4,5	4,5	10	2
5	3	3	20	8

Tabla 2-2 (Continuación)

Medio de cultivo	KH_2PO_4	Extracto de levadura	Sacarosa	PHS
6	1,5	4,5	30	2
8	4,5	4,5	30	2
9	4,5	1,5	30	2
10	3	6	20	4
11	4,5	1,5	10	6
12	1,5	1,5	10	2
13	1,5	1,5	30	2
14	1,5	1,5	30	6
15	3	3	40	4
16	6	3	20	4
17	3	3	20	4
18	3	3	20	4
19	3	0	20	4
20	4,5	1,5	30	6
21	1,5	4,5	30	6
22	1,5	4,5	10	2
23	3	3	0	4
24	3	3	20	0
25	1,5	4,5	10	6
26	3	3	20	4
27	1,5	1,5	10	6
28	0	3	20	4

Tabla 2-3. Medios de cultivo evaluados para la validación del diseño del medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *W. anomalus* M4HMO. Valores en g/L.

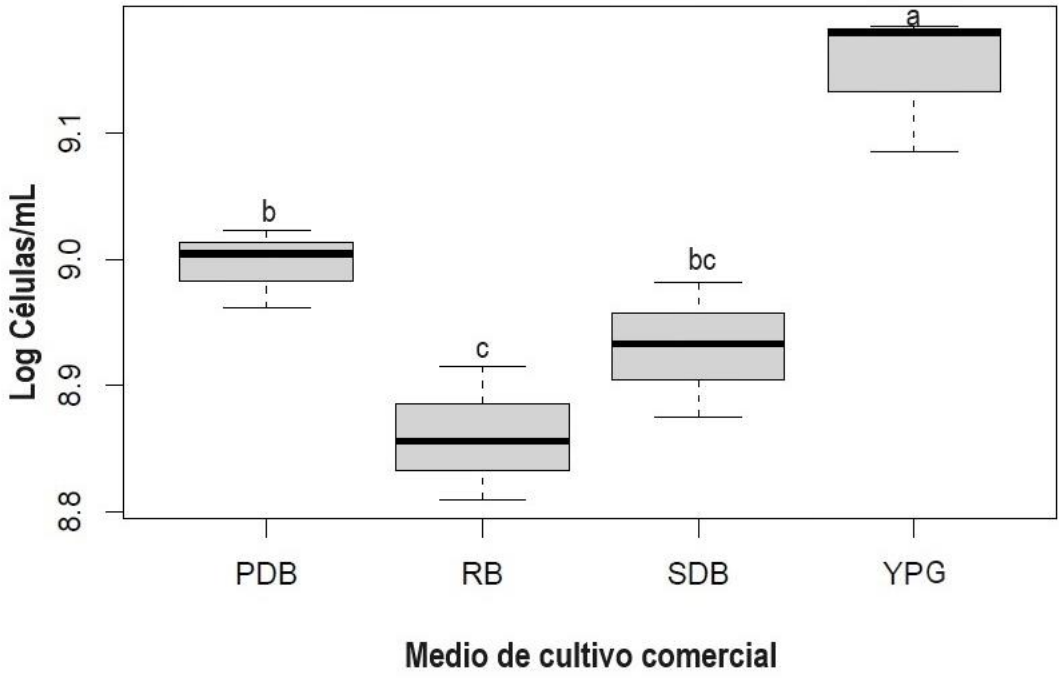
Medio cultivo	Extracto de levadura	Sacarosa	PHS	$CaCl_2$	$MgSO_4$	$(NH_4)_2SO_4$
M1	6	8,6	8	0,1	0,5	1
M2	6	8,6	8	0	0,5	0
M3	6	8,6	8	0	0	0
M4	YPG (En g/L: glucosa, 20; peptona, 20; extracto de levadura, 10)					

2.3 Resultados

2.3.1 Fuente de carbono y nitrógeno

Las variaciones en la fuente de carbono y nitrógeno se realizaron teniendo como base el medio de cultivo comercial YPG en el cual se obtuvo la mayor concentración celular (1,4 × 10^9 células/mL) de *W. anomalus* M4HMO (Figura 2-1).

Figura 2-1. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en medios de cultivo comerciales: YPG, PDB, SDB, RB.



La sacarosa resultó ser la mejor fuente de carbono para el crecimiento la cepa *W. anomalus* M4HMO, obteniendo una concentración final de 8,2 × 10^8 células/mL (Figura 2-2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la maltosa, glucosa y glicerol. Por otro lado, la lactosa fue la fuente de carbono donde se obtuvo el crecimiento más bajo.

La fuente de nitrógeno que generó la concentración celular más alta fue la peptona (1,3 × 10^9 células/mL) siendo significativamente diferente con las demás fuentes de nitrógeno (Figura 2-3). No se encontró diferencia estadística significativa entre los resultados obtenidos con PHS, extracto de levadura y sulfato de amonio, además, los valores obtenidos con estos componentes fueron 50, 56, y 66%, respectivamente, más bajos que los alcanzados con peptona. Teniendo en cuenta estos resultados, la proteína hidrolizada de soya fue seleccionada para experimentos posteriores debido a que su costo es más bajo en comparación con la peptona y el extracto de levadura.

Figura 2-2. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en diferentes fuentes de carbono.

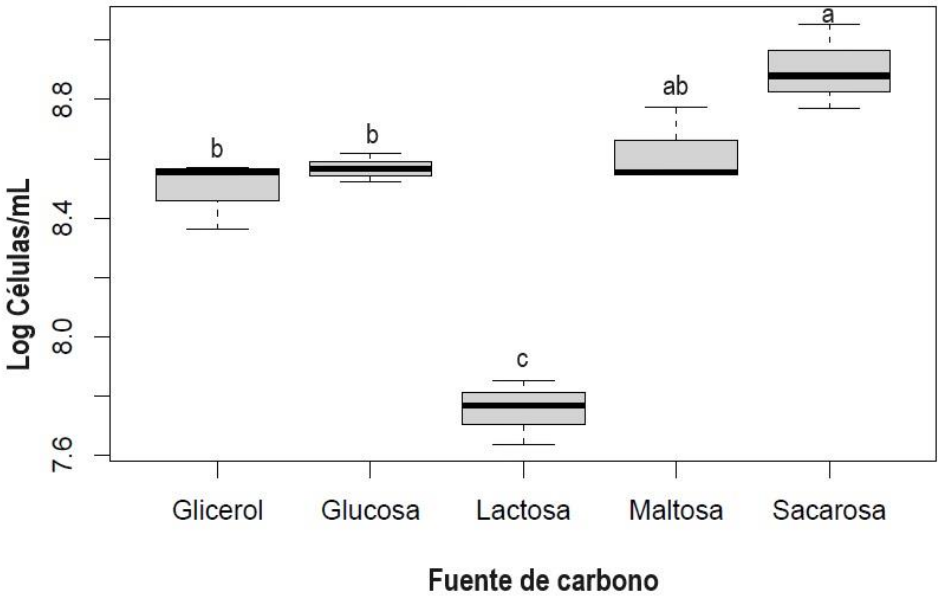
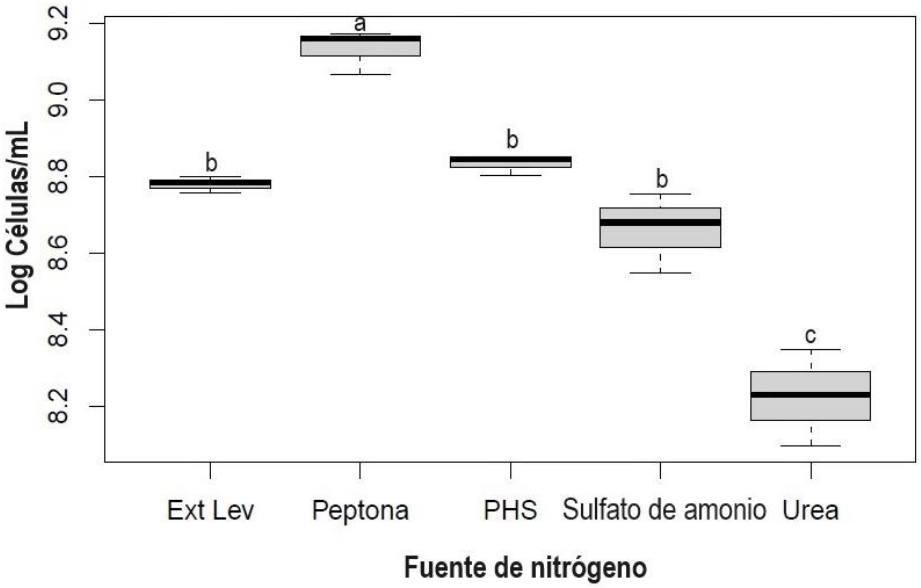


Figura 2-3. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en diferentes fuentes de nitrógeno.



No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración final de *W.anomalus* M4HMO utilizando relaciones C:N 10:1, 5:1, 4:1 y 1:1. Por lo tanto, se seleccionó la relación 10:1 (20g/L de sacarosa y 2g/L de PHS), dado que implica el uso de una menor cantidad de fuente de nitrógeno, lo que se traduce en un menor costo de producción de biomasa. Bajo estas condiciones se alcanzó una concentración de $7{,}6 \times 10^8$ células/mL (Figura 2-4). Las posteriores variaciones de concentración de fuente de carbono manteniendo la relación C:N en 10:1 mostraron mayores rendimientos de biomasa al utilizar 40 y 20 g/L de sacarosa, sin diferencia estadística significativa (Figura 2-5). Consecuentemente, se eligió 20 g/L de sacarosa y 2 g/L de PHS para realizar los experimentos posteriores.

Figura 2-4. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO a diferentes relaciones C:N (la concentración de sacarosa se mantuvo en 20 g/L en todos los experimentos).

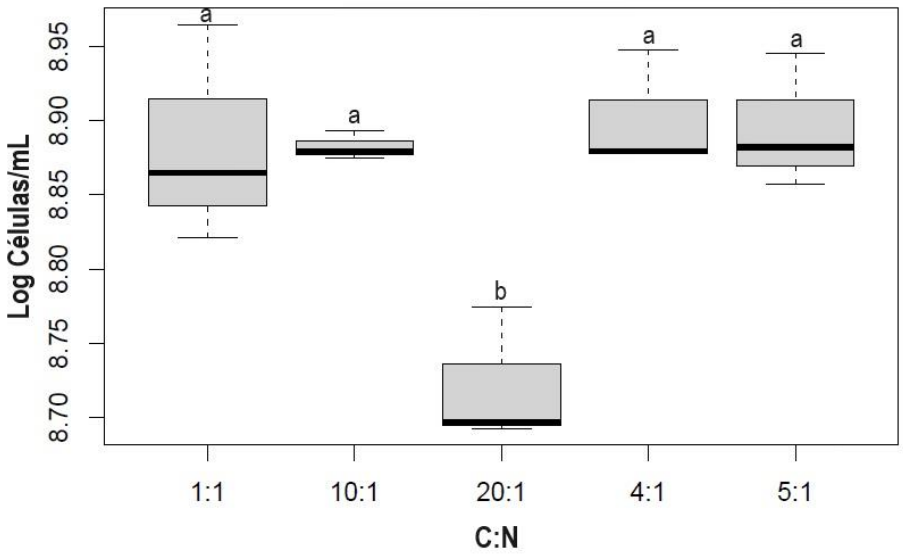
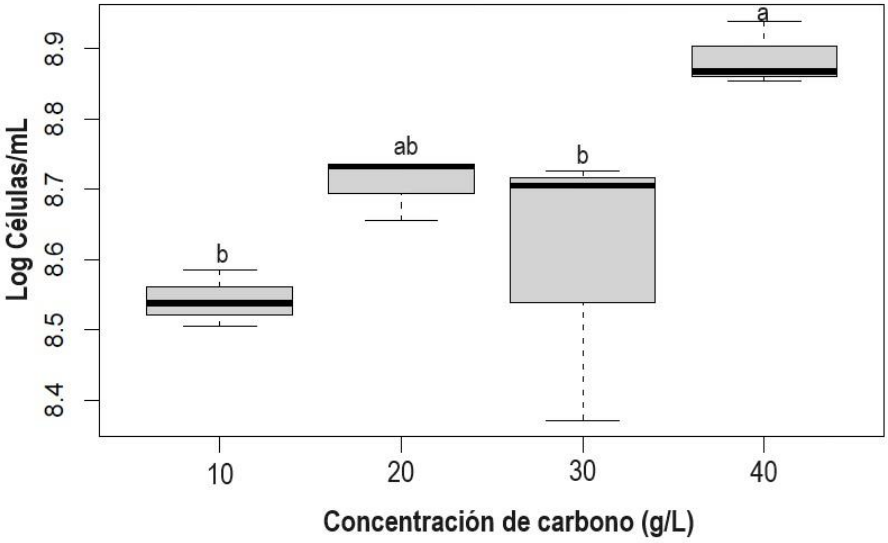


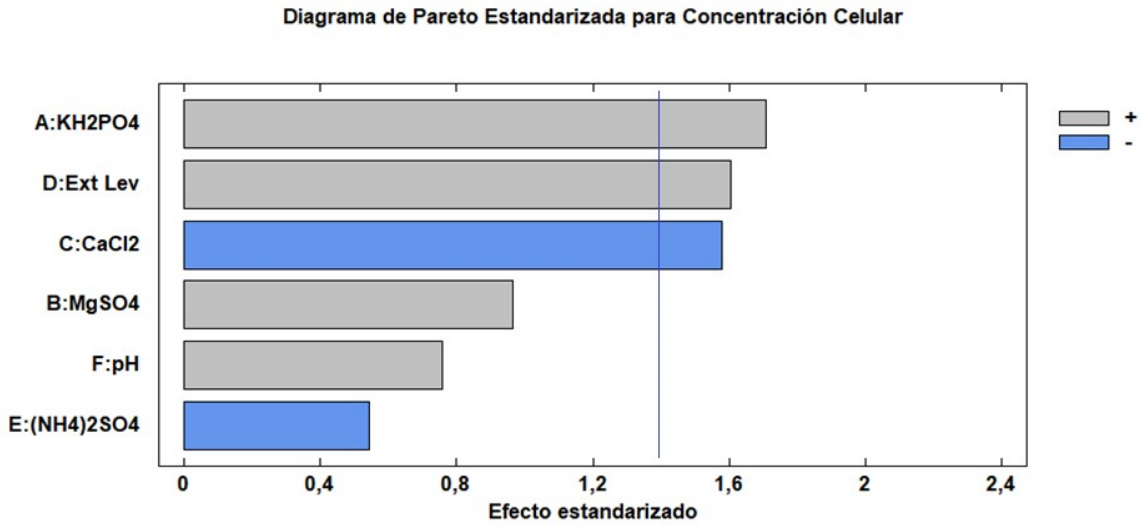
Figura 2-5. Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO a diferentes concentraciones de carbono manteniendo la relación C:N en 10:1



2.3.2 Tamizaje estadístico de componentes para el medio de cultivo

Entre los componentes del medio de cultivo, se observó que el fosfato de potasio (KH_2PO_4) y el extracto de levadura favorecieron la producción de biomasa de la cepa *W. anomalus* M4HMO. En contraste, el cloruro de calcio ($CaCl_2$) tuvo un impacto negativo en el crecimiento de esta cepa. En cuanto al resto de los componentes evaluados, como el $MgSO_4$, el pH y el $(NH_4)_2SO_4$, no se identificó ningún efecto significativo en la variable respuesta (Figura 2-6).

Figura 2-6. Tamizaje estadístico de componentes para el diseño de un medio de cultivo para el crecimiento de *W. anomalus* M4HMO



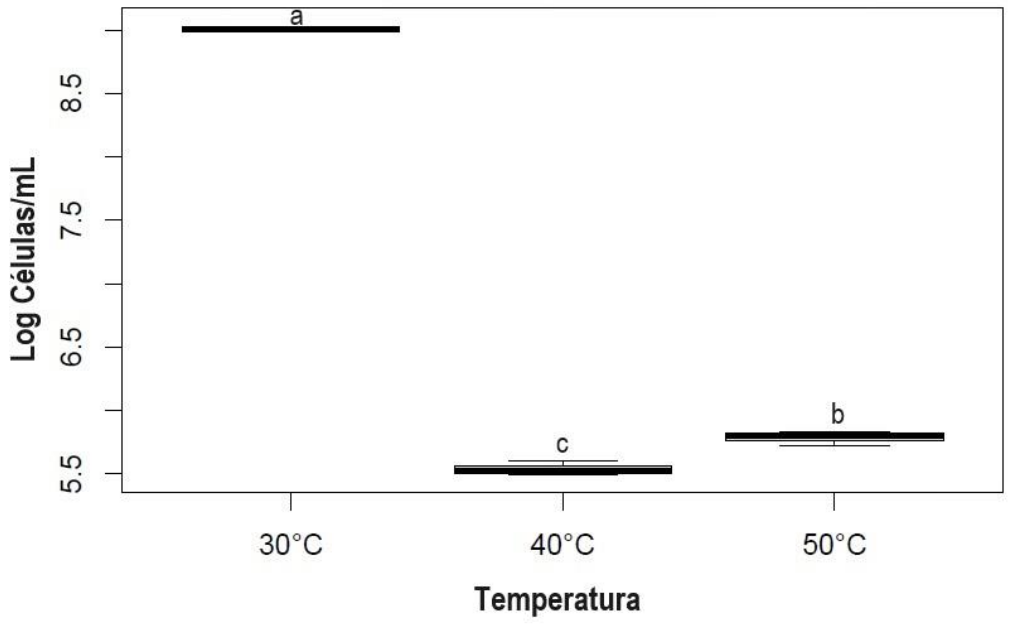
2.3.3 Optimización de las condiciones de crecimiento

Mediante el diseño Box Behnken se estimaron las concentraciones óptimas de cada componente (en g/L: extracto de levadura, 6; sacarosa, 8,6; PHS, 8) con una concentración máxima esperada de $1,4 \times 10^9$ células/mL El KH_2PO_4 fue excluido de la formulación del medio de cultivo, ya que no tuvo efecto sobre el crecimiento de la cepa de levadura.

Respecto a la temperatura, se observó un mayor crecimiento de *W. anomalus* M4HMO a 30°C, logrando una concentración celular de 1×10^9 células/mL. En contraste, las

temperaturas de 40 y 50 °C tuvieron un impacto negativo y significativo en el desarrollo de esta cepa (Figura 2-7).

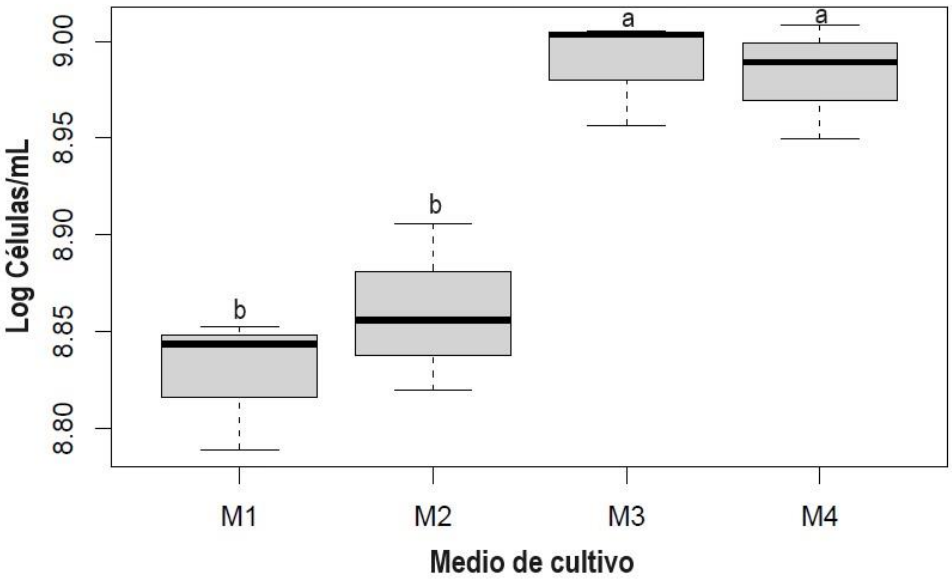
Figura 2-7 Concentración celular de *W. anomalus* M4HMO en diferentes temperaturas



2.3.5 Validación del diseño del medio de cultivo

La cepa *W. anomalus* M4HMO tuvo el mayor crecimiento en los medios de cultivo M3 y M4, con una concentración celular de 9,7 $\times 10^8$ células/mL (67% del valor esperado), sin diferencia estadísticamente significativa entre estos medios (Figura 2-8). La presencia de $CaCl_2$, $MgSO_4$ y $(NH_4)_2SO_4$ no mostraron tener un efecto significativo en el crecimiento de *W. anomalus* M4HMO. Por lo tanto, se seleccionó el medio de cultivo M3 (en g/L: extracto de levadura, 6; sacarosa, 8,6; PHS, 8) como el medio más adecuado para producción de biomasa.

Figura 2-8. Validación del medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *W. anomalus* M4HMO.



3.4 Discusión

Se han realizado estudios de optimización para la producción de biomasa y otros compuestos de interés de *W. anomalus*. Fernández et al. (2017), aplicaron un diseño de Plackett-Burman, donde se evaluaron factores como sacarosa, $(NH_4)_2SO_4$, extracto de levadura, K_2HPO_4, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$ sobre el crecimiento de W. *anomalus* M10. De acuerdo con esto, se formuló un medio en g/L que consistió en sacarosa, 60; $(NH_4)2SO_4$, 0,6; extracto de levadura, 1; K_2HPO_4, 1,2; $MgSO_4$, 0,5; NaCl, 0,1; $CaCl_2$, 0,1, el cual permitió alcanzar una concentración de biomasa de 6,93 gBS/L después de 72 h de crecimiento, esta concentración fue inferior a la alcanzada en este estudio, donde se obtuvo una cantidad de biomasa de 13.8 gBS en un periodo de tiempo más corto (24 h). De manera similar, se optimizó un medio de cultivo que contenía glucosa y NH_4^+ como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, obteniendo una concentración de biomasa de 3,6 g/L de la levadura *W. amomalus* CBS 5759. Además, se encontró que el aumento en la concentración de NH_4^+ tuvo un impacto positivo en el crecimiento de esta cepa. (Djelal et al., 2005). En contraste con el presente estudio, se encontró que el $(NH_4)_2SO_4$ no afectó

significativamente la concentración de biomasa de *W. anomalus* M4HMO. En otro estudio, Raimondi et al. (2022), destacaron la notable capacidad de *W. anomalus* WC 1501 para transformar glicerol puro en d-arabitol. Además, alcanzó una concentración celular de 5,5 $\times 10^9$ células/mL, utilizando un medio de cultivo que contenía 20 g/L de glicerol puro, 3 g/L de extracto de levadura, 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 3 g/L de KH_2PO_4, 1 g/L de K_2HPO_4, y 1 g/L de $MgSO_4$. Sin embargo, otros autores, reportaron un mejor crecimiento de *W. anomalus* SZ1 con azúcares fermentables (glucosa, manosa y fructosa) en comparación con azúcares no fermentables (manitol y glicerol) (Gupta & Bhathena, 2020).

Los estudios sobre fuentes de carbono y nitrógeno mostraron que, junto con la peptona (20 g/L) y la manosa (20 g/L), el extracto de levadura (10 g/L) debe ser un ingrediente del medio de cultivo esencial similar al YPG para el crecimiento de la cepa *W. anomalus* SZ1 (Gupta & Bhathena, 2020). Batista et al. (2013) utilizaron frijol extruido como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo y recomendaron 1% de frijol extruido y 1% de extracto de levadura o 1% de extracto de levadura y 1% de peptona, lo que dio un crecimiento comparable al del medio comercial YPG para cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* GS115. Martins et al. (2014) utilizaron la digestión péptica de tejidos animales como fuente de nitrógeno en lugar de peptona para *W. anomalus* CE009 e informaron que el crecimiento fue similar al obtenido con peptona. Estos estudios revelaron que la peptona se puede reemplazar con otras fuentes de nitrógeno, mientras que el extracto de levadura al 1% es el ingrediente más esencial de las células de levadura para lograr un crecimiento óptimo. Sin embargo, en algunos estudios, el extracto de levadura no se ha incluido en la composición de los medios de cultivo. Mieres (2017), utilizó un medio de cultivo que contenía glucosa, 10 g/L; pectina de citrus, 5 g/L; urea, 1,4 g/L; KH_2PO_4, 1 g/L; $MgSO_4$, 0,5 g/L; $CaCl_2$, 0,1 g/L, el cual permitió alcanzar una concentración de biomasa de *W. anomalus* de 3,03 ± 0,905 g/L.

En el estudio de Arous et al. (2016) la fuente de carbono preferida para el cultivo de *Schwanniomyces etchellsii* y *Candida pararugosa* fueron las sales de NH_4^+ (NH_4Cl y $(NH_4)_2SO_4$). En comparación con la adición de KNO_3, proteína de soya y extracto de levadura, se obtuvo un rendimiento de biomasa entre 3 y 8 veces menor. En otro estudio, Umesh et al. (2017), el mayor rendimiento de biomasa se obtuvo de *S. cerevisiae* cuando el medio contenía extracto de carne y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno sobre NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, urea y $NaNO_3$.

La relación inicial de carbono/nitrógeno (C:N) es un factor muy importante para la reducción del sustrato y la producción de biomasa (Arous et al., 2016; Zheng et al., 2005). La relación C:N de 10:1 se informa como el resultado más apropiado ya que una proporción mayor provocará la desaparición del nitrógeno antes de que se consuma todo el carbono y no se obtendrá la biomasa requerida (Sharif et al., 2021). Cuando el nitrógeno es limitado, las células de levadura ralentizan su crecimiento, mientras que, en el caso extremo de agotamiento del nitrógeno, las células dejan de crecer incluso con todos los demás nutrientes disponibles en exceso y entran en un estado pasivo específico del nitrógeno (Broach, 2012). En una proporción de 1:1, la mayor parte del nitrógeno no puede ingresar a las células y se desperdiciará (Sharif et al., 2021). A una conclusión similar se llegó en trabajos de otros investigadores. Arous et al. (2016) informaron que la relación C:N óptima fue de 8:1 - 10:1 para *S. etchellsii* y *C. pararugosa* con mayor producción de biomasa en un medio a base de aguas residuales de almazara suplementado con NH_4Cl. En el estudio de Spalvins et al. (2020) el mayor contenido de biomasa de *Yarrowia lipolytica* se observó en una proporción de C:N de 5:1 - 10:1 cultivada en un medio suplementado con aceite de cocina usado.

La temperatura y el pH son parámetros que afectan en gran medida los procesos de fermentación. Una temperatura baja puede inhibir el ingreso de los nutrientes a la membrana celular, mientras que una temperatura alta genera inactivación de las enzimas que participan en las diferentes vías metabólicas (Arous et al., 2016).

El pH del entorno que rodea a la célula incide directamente en el pH intracelular, generando modificaciones en la actividad enzimática interna. Estas alteraciones en la actividad enzimática, a su vez, influyen en el proceso de crecimiento celular (Wang & Lu, 2004). El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras se sitúa en un intervalo de 4,0 a 7,0 (Kot et al., 2017; Siddique et al., 2016); Dentro de este rango, el pH más adecuado para un crecimiento máximo es de 5,0 a 5,5. Tao et al. (2011) estudiaron los efectos del pH en el crecimiento de *W. anomalus* e informaron que el crecimiento disminuyó en un rango de pH entre 3,0 y 4,5, mientras que la fluctuación del pH del medio entre 5,0 y 6,0 no afectó la tasa de crecimiento, aunque dentro del rango 6,5 y 7,5, experimentó una notable disminución en su crecimiento. Como resultado de sus hallazgos, recomendaron un valor de pH inicial óptimo de 5,0 para *W. anomalus*, identificando un límite de tolerancia entre

4,5 y 6,0. De manera similar, Gao et al. (2012) informaron que el contenido máximo de biomasa de *Candida tropicalis* se alcanzó cuando el pH inicial se ajustó a 5,5 a 30 °C. Otros autores reportaron que las condiciones óptimas para el cultivo *de C. tropicalis* fueron 37 °C y pH 7 (Siddique et al., 2016) y para *Y. lipolytica* se establecieron en 30°C y pH 5,0 (Umesh et al., 2017).

Según el estudio realizado por Tao et al. (2011) los recuentos de células viables de *W. anomalus* aumentaron a medida que la temperatura se incrementó de 25 a 30 °C, sin embargo, se observó una disminución abrupta cuando la temperatura aumentó de 35 a 45°C. Estos resultados sugieren que la temperatura óptima se encuentra alrededor de los 32°C, mientras que temperaturas de 40 °C y superiores podrían resultar letales para *W. anomalus.* Así mismo, Martins et al. (2014) informaron que el crecimiento óptimo de *W. anomalus* CE009 se alcanzó a una temperatura que oscilaba entre 25 y 30°C.

En este sentido, el medio de cultivo diseñado en este estudio resultó en una composición más simple, compuesto únicamente por tres componentes con una concentración menor de fuente de carbono en comparación con lo informado en los estudios realizados por Fernández et al. (2017); Raimondi et al. (2022) y Mieres (2017). Además, el medio de cultivo propuesto contiene materias primas de bajo costo como la sacarosa y la proteína hidrolizada de soya (PHS), que, junto con el extracto de levadura, permitieron alcanzar una concentración celular mayor con respecto a la reportada en los estudios de Gupta & Bhathena (2020) y Batista et al. (2013).

3.5 Conclusiones

El análisis demostró que el extracto de levadura es uno de los factores más determinantes en el crecimiento de este microorganismo. Además, permitió la formulación de un medio de cultivo con características nutricionales similares al medio de cultivo comercial YPG, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de la cepa de levadura entre ambos medios de cultivo. Por lo tanto, estos resultados presentan ventajas económicas, ya que, al ampliar la escala de producción de biomasa de esta cepa,

se podrían utilizar medios de cultivo con materias primas de bajo costo, como la sacarosa y la proteína hidrolizada de soya.

Capítulo 3. Mitigación de cadmio en granos de cacao durante la fermentación mediante microorganismos

Resumen

La reciente normativa de la Unión Europea respecto al contenido de cadmio en productos derivados del cacao (*Theobroma cacao* L.) ha generado un impacto significativo en el mercado global de este producto. En la actualidad, la comisión europea ha establecido valores máximos permitidos (0,1-0,8 mg Cd^{+2}/L) lo que tiene implicaciones sobre las exportaciones, generando rechazo de productos como chocolate (contenido de materia seca menor o mayor al 50%) y cacao en polvo. Esto ha afectado especialmente a los países de América Latina, conocidos por sus niveles elevados de este metal pesado. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue utilizar inóculos microbianos de manera individual y en cultivo mixto de microrganismos aislados del proceso fermentativo del cacao (dos bacterias y una levadura) que demostraron capacidad para secuestrar cadmio en medio acuoso, como estrategia para disminuir el contenido de cadmio durante la fermentación de cacao. El experimento se llevó a cabo en condiciones de campo en una central de beneficio. Se utilizó un diseño completamente al azar conformado por cuatro tratamientos y un control (levadura individual, bacteria 1 individual, cultivo mixto dos bacterias, cultivo mixto una levadura y dos bacterias, fermentación espontánea). Ninguno de los tratamientos, incluida la fermentación espontánea, logró reducir la concentración de

cadmio en los granos. Sin embargo, las características sensoriales de los granos de cacao inoculados con los microorganismos se vieron favorecidas.

Palabras clave: cadmio, fermentación, microorganismos*, Theobroma cacao*

3.1 Introducción

La contaminación de suelos con metales pesados es un problema creciente a nivel mundial y una amenaza para el medio ambiente, ya que estos no son degradables y pueden acumularse fácilmente hasta niveles tóxicos en suelos y plantas utilizados en nutrición humana o animal (Jalbani et al., 2009). Algunos metales como el zinc (Zn), el magnesio (Mg), el hierro (Fe), el cobre (Cu) y el manganeso (Mn), se consideran micronutrientes esenciales para las plantas, los cuales desempeñan diferentes funciones biológicas, especialmente en el crecimiento de raíces y brotes. Sin embargo, otros metales pesados, como aluminio (Al), arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg), no tienen ninguna función biológica conocida (Lajayer et al., 2019).Las formas más tóxicas de estos metales en sus especies iónicas son aquellas que tienen los estados de oxidación más estables, por ejemplo, $Cd^{2+,}$ Pb^{2+}, Hg^{2+}, As^{3+}, los cuales reaccionan con las biomoléculas del cuerpo para formar compuestos biotóxicos extremadamente estables que son difíciles de disociar, ocasionando graves problemas de salud (Das & Al-Naemi, 2019; Nava-Ruiz & Méndez-Armenta, 2011).

La acumulación de metales pesados en las plantas varía entre elementos y especies de plantas. El cadmio es uno de los elementos más móviles con un factor de bioconcentración en las plantas mayor que algunos nutrientes esenciales (Li et al., 2017). Las elevadas concentraciones de este metal en el suelo pueden originarse tanto por fuentes geogénicas como por actividades de origen humano. La meteorización del material parental constituye la fuente geogénica, mientras que las actividades mineras e industriales, así como el uso de agroquímicos o agua de riego con alto contenido de Cd representan las principales causas antropogénicas de contaminación (Li et al., 2014; Vanderschueren et al., 2021).

Se afirma que los niveles de cadmio en los granos de cacao se deben a su absorción por las plantas desde el suelo. Algunos suelos, especialmente los de origen volcánico, pueden contener altos niveles de cadmio, que puede ser absorbido por la planta y posteriormente transportarlo a sus diferentes tejidos, como hojas, frutos y semillas (Gramlich et al., 2018). Los contenidos de cadmio en los granos de cacao varían significativamente de una región a otra, siendo América Latina la que registra los niveles más altos. En esta región, las concentraciones de cadmio suelen superar los límites máximos permitidos por la regulación de la Unión Europea, que establece un rango de 0,1 a 0,8 mg Cd^{+2}/kg para el chocolate y otros productos derivados del cacao. (Argüello et al., 2019; Barraza et al., 2021; Bravo et al., 2021; Chávez et al., 2015; Gramlich et al., 2018). También se han encontrado variaciones considerables en los contenidos de cadmio en los granos de cacao de América Latina, entre y dentro de los países (Chávez et al., 2015; Gramlich et al., 2017). La variabilidad en las concentraciones de cadmio en los granos de cacao de diversos lugares se ha atribuido a diferentes materiales parentales del suelo, pero también se deben considerar otros factores, como los aportes de cadmio con fertilizantes de fósforo (P) y las propiedades del suelo que influyen en la disponibilidad del metal, como pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, mineralogía y presencia de otros microelementos (Alloway, 2013; Chávez et al., 2015).

Particularmente en Colombia, en algunas regiones cacaoteras, se han encontrado altas concentraciones de cadmio en el suelo, lo cual podría verse reflejado en la acumulación de elevados contenidos de este metal en los granos (Bravo et al. 2018; Chávez et al., 2015). Aunque no existen límites de cadmio en los granos de cacao, se han utilizado umbrales de 0.6 y 0.8 mg Cd^{+2}/kg como valores que permiten la fabricación de productos de cacao que cumplen con los límites permisibles de cadmio exigidos por la UE (Arévalo-Gardini et al., 2017; Chávez et al., 2015; Gramlich et al., 2018; Bravo & Benavides-Erazo, 2020).

En este sentido, la elevada concentración de metales pesados en los granos de cacao representa un riesgo tanto para la seguridad alimentaria como para el desarrollo económico del país. Esta situación afecta negativamente las exportaciones de grano, principal insumo para la fabricación de semielaborados y productos finales. Por tanto, existe una gran necesidad de abordar esta problemática desde el cultivo hasta el producto final mediante estrategias biotecnológicas que contribuyan a la obtención de un producto

inocuo, de calidad y competitivo en el mercado nacional e internacional. Dentro de estas estrategias, se encuentra la biorremediación de metales pesados por biomasa microbiana, la cual ha sido objeto de importante interés de investigación en las últimas décadas debido a su eficiencia, costo relativamente bajo y efectos negativos mínimos para el medio ambiente.

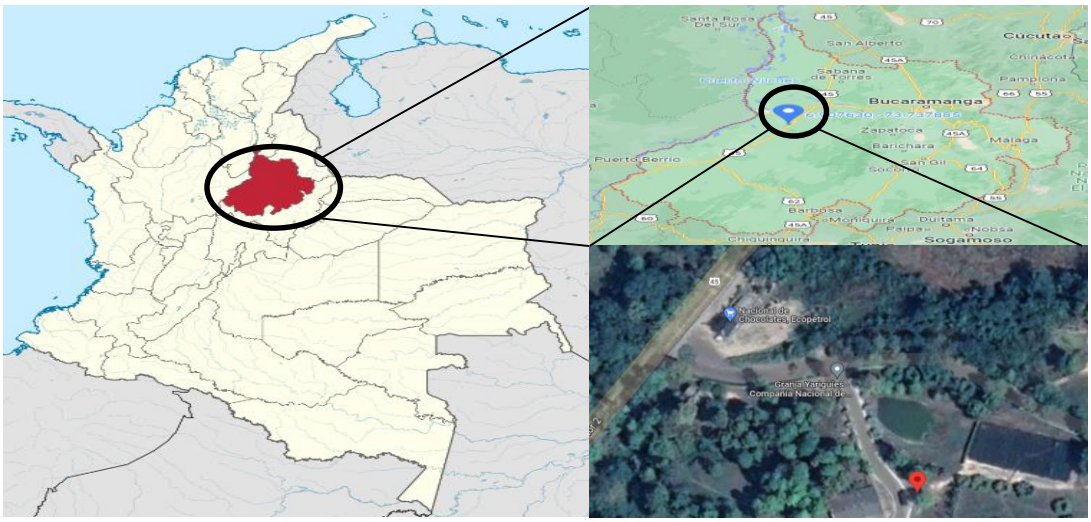
Se han descubierto microorganismos (bacterias, hongos y microalgas) con capacidad de biorremediación, los cuales han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten formar complejos o atrapar metales pesados, transformándolos a sus formas menos tóxicas (Gautam et al., 2015; Monachese et al., 2012a;). Géneros de bacterias como *Bacillus* y *Lactobacillus*, así como de las levaduras *Saccharomyces*, *Wickerhamomyces* y *Hanseniaspora*, han demostrado capacidad de biorremediación de cadmio (Abioye et al., 2018; Kapahi & Sachdeva, 2019; Monachese et al., 2012b). Es así como la implementación de inóculos microbianos para disminuir concentraciones de cadmio durante la fermentación, se considera una alternativa con potencial para la mitigación de cadmio en cacao. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue seleccionar inóculos microbianos con capacidad para mitigar contenidos de cadmio en granos de cacao durante la fermentación, teniendo en cuenta la evaluación sensorial como criterio fundamental para determinar el efecto en sabor y aroma generado por la adición de los microorganismos

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Localización del estudio

El ensayo se realizó en la granja Yariguíes de la Compañía Nacional de Chocolates, ubicada entre Barrancabermeja y San Vicente de Chucurí, departamento de Santander (6°54’30’’N73°44’08’’W) (Figura 3-1), a 120 metros sobre el nivel del mar, temperatura promedio de 28°C y precipitación media anual de 2.984 mm. El experimento se llevó a cabo en el módulo utilizado para el beneficio del cacao de la granja (Figura 3-2)

Figura 3-1. Mapa con ubicación del sitio del ensayo. Granja Yariguíes. Barrancabermeja, Santander



Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Santander_(Colombia)#/media/Archivo:Santander_in_Colombia_(mainland).svg

Figura 3-2. Módulo de beneficio de cacao de la Granja Yariguíes.

Fuente: Autor, autorizado por la Compañía Nacional de Chocolates - CNCH

3.2.2 Crecimiento de microorganismos

Para realizar el ensayo en grano de cacao durante la fermentación se utilizaron las cepas *B.subitlis* M21HB, *B. megaterium* M17HB y *W. anomalus* M4HMO, las cuales fueron

seleccionadas previamente por su capacidad para secuestrar cadmio en medio acuoso. Además, se realizó un ensayo de antagonismo para confirmar que no hubiera competencia entre las cepas evaluadas (Anexo E). Las bacterias y la levadura fueron reactivadas en medios de cultivo sólido TSA (en g/L: peptona, 20; glucosa, 2,5; NaCl, 5; K_2HPO_4, 2,5; agar, 15) y YPG (en g/L: peptona, 20; extracto de levadura, 10; glucosa, 20; agar, 15) respectivamente, durante 24 horas a 30 °C. A las 24 horas de incubación se tomó una asada y se depositó en erlenmeyers de 125 mL conteniendo 25 mL de TSB (bacterias) o medio optimizado para la levadura *W. anomalus* M4HMO (en g/L: extracto de levadura, 6; sacarosa, 8,6; PHS, 8). Los erlenmeyers fueron mantenidos a 37°C y 150 rpm (bacterias) y 30°C y 180 rpm (levaduras) durante 18-20 horas. Pasado este tiempo, se tomaron 7,5 mL y se transfirieron a erlenmeyers de 500 mL conteniendo 150 mL de medio de cultivo líquido TSB o medio optimizado. Los erlenmeyers se incubaron durante 18-20 horas bajo las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, 100 mL de cada fermentación fueron utilizados para inocular erlenmeyers de 2 L que contenían 1 L de medio (TSB ó medio optimizado). Los erlenmeyers se dejaron en incubación durante 24 horas bajo las condiciones de agitación y temperatura anteriormente mencionadas. La biomasa se recuperó mediante centrifugación a 7745 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 L de medio de cultivo TSB (15g/L) para las cepas M21HB y M4HMO, y en 0,5 L para la cepa M17HB (Martos et al., 2014; Visintin et al., 2017). Para conocer la concentración de cada uno de los inóculos se realizó siembra en placa en medio de cultivo sólido TSA y YPG. Estas suspensiones celulares fueron utilizadas como pre-inóculos en los procesos de fermentación real de cacao.

3.2.3 Material vegetal y adecuación de los cajones de fermentación

Se utilizaron 1500 kg de grano de cacao en baba a partir de una mezcla de las variedades CNCH12, CNCH13 (variedades propias de la granja, clasificadas como cacao trinitario) y CCN51. Estos granos se depositaron en cajones de madera con el fin de permitir un pre-escurrido durante 24 horas antes de la inoculación de los microorganismos. Para el montaje del experimento se utilizaron 15 cajones de madera (80 x 80 x 80 cm), los cuales se adecuaron mediante la instalación de divisiones en madera, creando así dos compartimentos: uno destinado para la masa de cacao de cada tratamiento y otro vacío para facilitar el volteo correspondiente (Figura 3-3).

Figura 3-3. Cajones de fermentación con divisiones.

Fuente: Autor, autorizado por la Compañía Nacional de Chocolates - CNCH

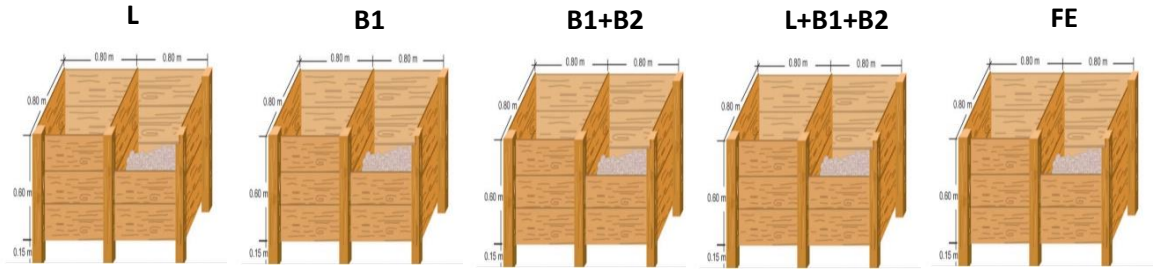
3.2.4 Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar conformado por cuatro tratamientos y un control, cada uno con tres repeticiones (Figura 3-4). Los tratamientos fueron definidos como se indica en la **Tabla 3-1**:

Tabla 3-1. Descripción de los tratamientos empleados en la fermentación de cacao

Tratamiento	Descripción
L	Levadura M4HMO
B1	Bacteria M21HB
B1+B2	Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto
L+B1+B2	Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto
FE	Fermentación espontánea

Figura 3-4. Diseño experimental. L: Levadura M4HMO, B1: Bacteria M21HB, B1+B2: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, L+B1+B2: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, FE: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos).



3.2.5 Preparación de los tratamientos

Los pre-inóculos previamente obtenidos fueron transportados durante cuatro horas desde Medellín hasta la Granja Yariguíes en frascos de vidrio (SCHOTT DURAN®) a una temperatura de 4°C en una caja de icopor con pilas refrigerantes. Trascurrido este tiempo, los inóculos fueron almacenados en nevera a 4°C durante 24 horas hasta su uso.

Cada inóculo fue diluido en suficiente agua de grifo para alcanzar una concentración final de 1×10^{7} UFC/mL (equivalente a 2×10^{5} UFC/g de cacao en baba) (Da Cruz et al., 2017; Zamudio-Palacios et al., 2021). Estas suspensiones se utilizaron como inóculos de los experimentos en cajones de fermentación. De acuerdo con los tratamientos (individual o cultivo mixto) se tomó el volumen correspondiente de cada inóculo para completar un volumen final de 6 L. En el caso del tratamiento B1+B2 y B1+B2+L se mezclaron 3 y 2 L de cada cepa, respectivamente.

3.2.6 Inoculación de microorganismos en la fermentación

A partir de la mezcla de 1500 kg de cacao en baba pre-escurridos de las variedades mencionadas anteriormente, se utilizaron 100 kg de cacao para cada uno de los cajones. Durante el proceso de llenado de los cajones, los 100 kg se distribuyeron en porciones de 10 kg, sobre las cuales se aplicó una aspersión de la solución de cada uno de los tratamientos, hasta completar 100 kg en cada cajón. Esta solución fue aplicada utilizando una bomba de émbolo de la marca Royal Condor (Ramos et al., 2014; Visintin et al., 2017).

El volumen de la solución aplicada por cajón fue de 2 L (equivalente al 2% de la masa total de cacao en cada cajón) (Moens et al., 2014) de inóculo a una concentración de 1×10^{7} UFC/mL (equivalente a 2×10^{5} UFC/g de cacao) (Mendoza et al., 2022; Moreira et al., 2017; Zamudio-Palacios et al., 2021). Los cajones se cubrieron con sacos de fique y se realizaron volteos cada 48 horas hasta completar el proceso de fermentación (6 días). La determinación del tiempo de fermentación se realizó mediante la prueba de corte que consistió en cortar longitudinalmente a la mitad 20 granos de cada cajón utilizando una tijera podadora, y posteriormente, determinar el porcentaje de fermentación según los criterios establecidos por el personal técnico de la granja. La temperatura de la masa dentro de cada cajón fue monitoreada mediante termómetros digitales (Halten) y el pH interno y externo de los granos fue medido con un pH metro portátil (Milwaukee pH51/pH54). Se tomó registro de la temperatura y el pH cada 24 horas hasta finalizar la fermentación. Una vez finalizada la fermentación, los granos de cacao de cada tratamiento se llevaron a secado individualmente en casa elba durante 4 días o hasta alcanzar una humedad del 7%.

3.2.7 Muestreo

En cada cajón se recolectaron 5 kg de grano, al inicio y al final de la fermentación. Estos fueron llevados a secado durante cuatro días y luego se transportaron hacia la Compañía Nacional de Chocolates – CNCH donde se realizaron las mediciones de cadmio por absorción atómica en horno de grafito, así como la evaluación sensorial.

3.2.8 Medición de pH durante la fermentación

Se tomó una muestra de cada cajón, que constó de 15 granos (mitad de la superficie y mitad del fondo. Para la determinación del pH externo, diez granos tomados al azar fueron depositados en un recipiente de vidrio que contenía 30 mL de agua Mili -Q® EQ 7000 y se agitaron hasta obtener una mezcla viscosa Para la medición del pH interno (nibs) se utilizó el protocolo de John et al. (2019) con modificaciones. Los granos restantes fueron descascarillados y los nibs obtenidos se molieron utilizando un molino de cuchillas (IMUSA 3 oz 200w 5861032166), el producto resultante fue resuspendido en 20 mL de agua Mili-

Q® EQ 7000. En ambos casos se midió el pH utilizando un pH-metro portátil (Milwaukee pH51/pH54).

3.2.9 Medición de cadmio

La medición de cadmio se realizó según el protocolo interno de la Compañía Nacional de Chocolates. Para esto, se tomaron 500 g de grano de cada muestra, los cuales fueron tostados durante 18 min a una temperatura de 104°C. La cascarilla fue retirada y los nibs se molieron en un premolino CocoaT Mini. Se pesaron entre 0,3 y 0,6 g de muestra previamente molida y se adicionaron 5 mL de HNO_3 al 65% (EMSURE® Reag. Ph Eur,ISO). Se llevaron a un horno microondas (MARS-Xpress – CEM) durante 60 min, alcanzando una temperatura de 200°C durante 15 min, seguido de un enfriamiento durante 45 min. Luego se adicionaron 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y las muestras fueron sometidas a una segunda digestión bajo los mismos parámetros mencionados anteriormente. Una vez completado el proceso de digestión, el volumen de cada una de las muestras se llevó a un balón volumétrico de 25 mL y se ajustó con agua Mili-Q® EQ 7000. Después de homogenizar las muestras, se llevaron a un espectrofotómetro de absorción atómica ICE 3500 para su medición por la técnica de llama.

3.2.10 Evaluación sensorial

Para la preparación del licor de cacao y la evaluación sensorial se siguió el protocolo interno de la Compañía Nacional de Chocolates, el cual consistió en tostar 900 g de grano de cada muestra en un tostador comercial CocoaT a 120°C durante 18 min para facilitar la eliminación de la cascarilla y la obtención de nibs (almendra), los cuales fueron quebrados con un martillo de goma. Los nibs fueron molidos utilizando un premolino CocoaT y luego se depositaron en un equipo refinador (Ultra Dura+ 1.25L Wet Grinder) a una temperatura de 45°C durante 4 horas o hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 14 y 25 micras, las cuales fueron medidas con un micrómetro digital (Songqi B type 0-25). El licor obtenido, se depositó en bandejas plásticas y se almacenaron a 4°C hasta la evaluación sensorial.

Para la evaluación sensorial de los licores obtenidos, se contó con la participación de un panel de expertos conformado por seis personas, a quienes se les entregó 2 g de licor de cacao a una temperatura de 30°C. Los panelistas realizaron una evaluación olfativa y

posteriormente, llevaron a la boca una pequeña porción de licor de cacao y lo esparcieron en el paladar y mucosas, con el fin de percibir los sabores básicos (acidez, amargor, astringencia) y aromas (floral, afrutado-fresco, afrutado-seco, cacao, caramelo/malta, tostado, nuez, madera, especiado, verde). La intensidad de cada uno estos descriptores de sabor y aroma estuvo definida en una escala de 0 a 10, siendo 0 ausente, 1-2 casi imperceptible, 3-4 baja intensidad, 5-7 presente, 8-10 predominante. Los resultados se registraron de manera individual y luego fueron socializados para obtener la calificación media de cada una de las muestras.

3.2.11 Análisis estadístico

Los datos de medición de cadmio, pH y temperatura se evaluaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% utilizando el programa R (https://www.r-project.org).

3.3 Resultados

3.3.1 Temperatura y pH

Durante el proceso de fermentación de cacao se registró un aumento gradual de la temperatura, alcanzando los 50°C a las 120 h (Figura 3-5), un fenómeno común durante este proceso que resulta de la actividad metabólica de microorganismos presentes en el grano de cacao. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las temperaturas de la masa entre tratamientos y el grupo control, lo cual indica que la introducción exógena de cepas de levadura y bacterias no tuvo efecto sobre este parámetro.

Por otra parte, el pH externo de los granos, en todos los tratamientos y en el grupo control, fue similar, partiendo de 3,8 ± 0,2 a las 0 h y llegando a un valor de 4,6 ± 0,2 al final del proceso. En cuanto al pH interno, tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el grupo control. A diferencia del pH externo, el pH interno tuvo una disminución, comenzando en 6,0 ± 0,3 y descendiendo a 4,6 ± 0,2 a las

144 h, momento en el cual tanto el pH interno como externo se estabilizaron en los mismos valores (Figura 3-6).

Figura 3-5. Temperatura de la masa de cacao durante la fermentación. **L**: Levadura M4HMO, **B1**: Bacteria M21HB, **B1+B2**: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **L+B1+B2**: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **FE**: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos).

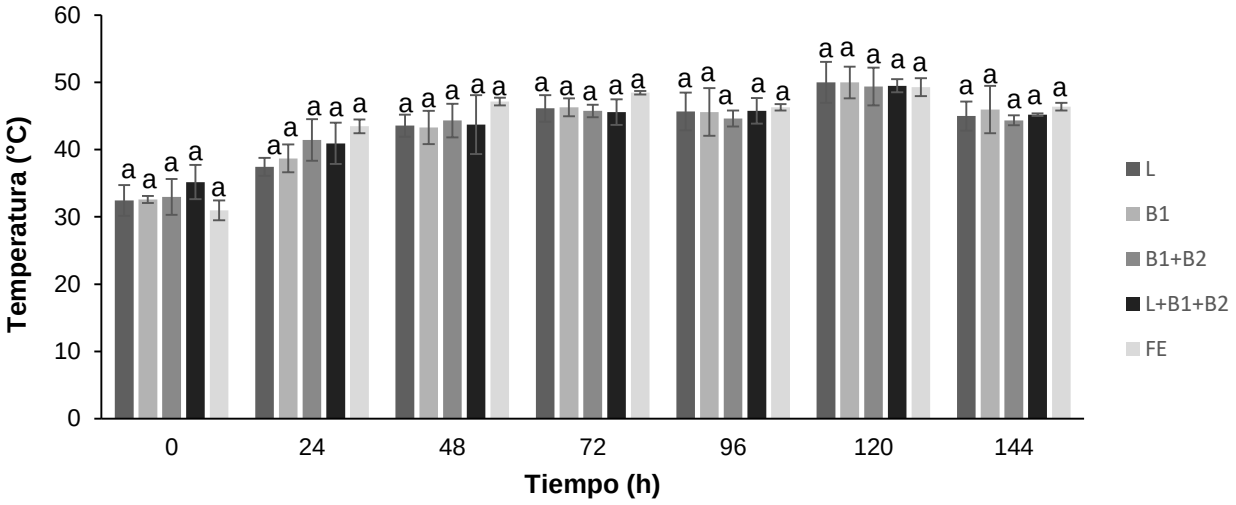
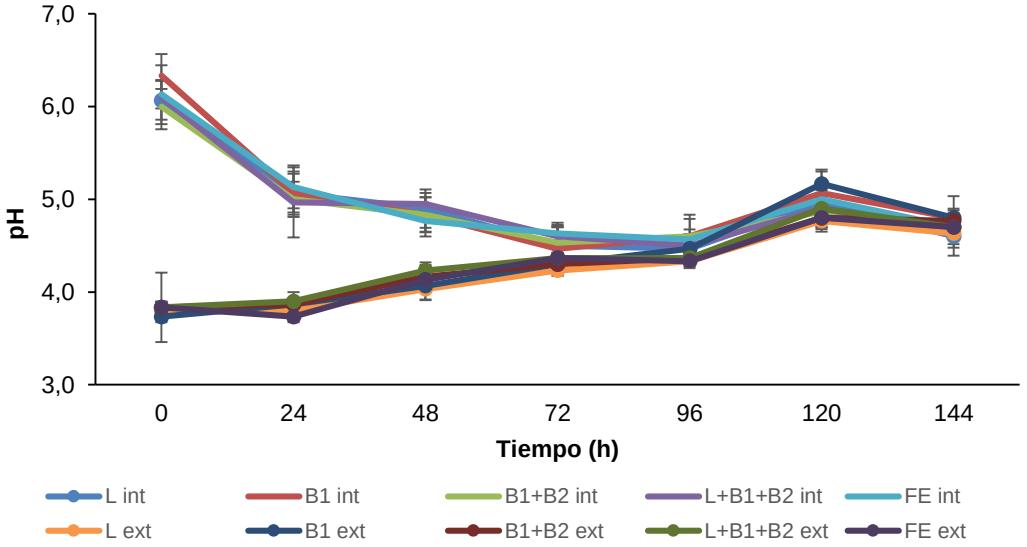


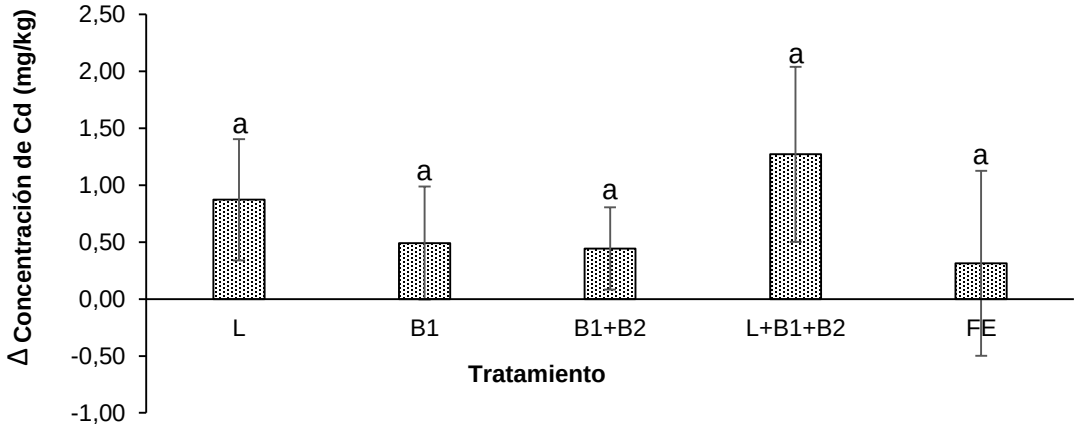
Figura 3-6. pH interno y externo de los granos de cacao durante la fermentación. **L**: Levadura M4HMO, **B1**: Bacteria M21HB, **B1+B2**: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **L+B1+B2**: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **FE**: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos).



3.3.2 Efecto de la inoculación externa de microorganismos sobre el contenido de cadmio durante la fermentación

Los inóculos microbianos aplicados tanto de manera individual como en cultivo mixto al grano de cacao en fermentación no lograron reducir la concentración de cadmio. De hecho, el contenido de este metal en los nibs fue mayor en todos los tratamientos, incluido el de fermentación espontánea (sin aplicación de microorganismos) al final del proceso de fermentación, cuyo aumento promedio fue de 0,68 mg Cd^{+2}/kg en comparación con las mediciones realizadas a las muestras del tiempo inicial, (Figura 3-7). Las muestras del tiempo inicial y las del tiempo final presentaron un coeficiente de variación del 16 y 19% respectivamente. Es importante mencionar que tanto las concentraciones de cadmio del tiempo inicial como las del tiempo final, estaban por encima del nivel crítico permisible (0,1 - 0,8 mg Cd^{+2}/kg) establecido por los organismos reguladores para la elaboración de cualquiera de los productos incluidos.

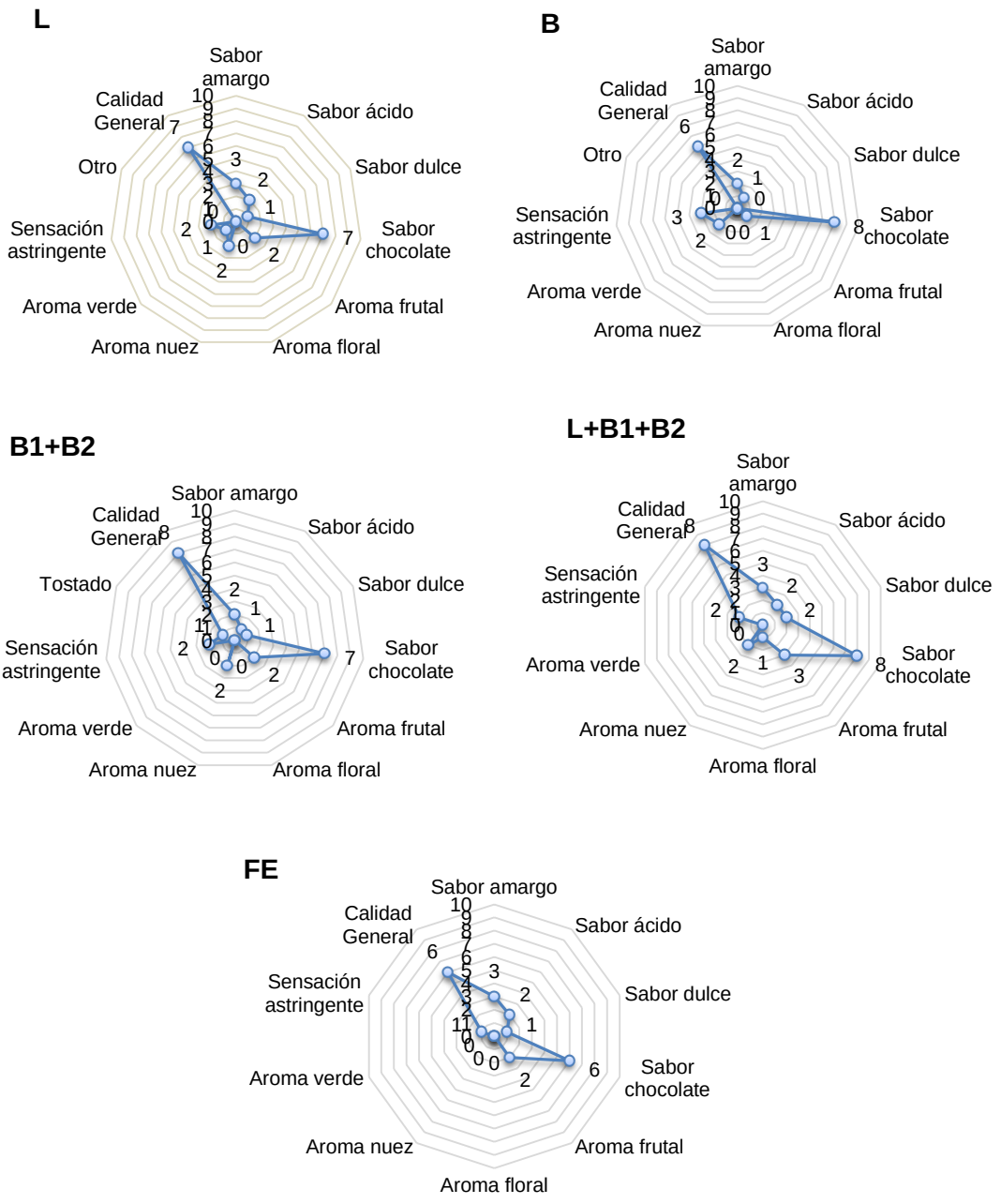
Figura 3-7. Cambio en la concentración de cadmio en el grano de cacao durante la fermentación con aplicación externa de inóculos microbianos. **L**: Levadura M4HMO, **B1**: Bacteria M21HB, **B1+B2**: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **L+B1+B2**: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **FE**: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos).



3.3.3 Evaluación Sensorial

La aplicación externa de microorganismos en la fermentación tuvo un impacto positivo sobre las características sensoriales del grano. Los tratamientos correspondientes a la levadura individual *W. anomlaus* M4 HMO (L), la bacteria *B*. *subtilis* M21HB y *B. megaterium* M17HB (B1+B2) así como la combinación de la levadura y ambas bacterias (L+B1+B2) exhibieron atributos como notas afrutadas, florales y de nuez. Además, se destacó un agradable sabor a chocolate, resultando en una calidad general de 7 (L) y 8 (B1+B2 y L+B1+B2). En contraste, los granos de cacao tratados únicamente con la bacteria *B. subtilis* M21 HB no presentaron notas aromáticas frutales ni florales. De manera similar, la fermentación espontánea (FE) no generó atributos en el grano, mostrando un nivel medio de sabor a chocolate y una ligera nota frutal. Estos resultados coincidieron con la calidad obtenida en el tratamiento con la bacteria M21HB individual, ambos alcanzando una puntuación de 6 (Figura 3-8).

Figura 3-8. Análisis sensorial del grano de cacao con y sin aplicación externa de inóculos microbianos a la fermentación. **L**: Levadura M4HMO, **B1**: Bacteria M21HB, **B1+B2**: Bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **L+B1+B2**: Levadura M4HMO y bacterias M21HB y M17HB en cultivo mixto, **FE**: fermentación espontánea (sin inoculación externa de microorganismos).



3.4 Discusión

3.4.1 Temperatura y pH

La actividad microbiana y los metabolitos producidos durante la fermentación de los granos de cacao conducen a un aumento de la temperatura y a cambios en el pH tanto en la pulpa como en el cotiledón (Nielsen et al., 2007). La presencia de oxígeno permite que las BAA reemplacen a las levaduras y conviertan el alcohol en ácido acético. Estas reacciones provocan un aumento de temperatura en la masa de los granos, llegando aproximadamente a los 48-50°C hasta alcanzar su punto máximo después de la primera mezcla, para luego descender gradualmente hasta el siguiente volteo. En el siguiente ciclo de mezclado, la temperatura vuelve a elevarse, aunque generalmente hasta un pico más bajo, alrededor de 46-48°C, decreciendo nuevamente hacia el final de la fermentación (Nair, 2010). Es importante tener en cuenta que pueden existir variaciones dependiendo del método de fermentación, la ubicación de los granos en el cajón y las condiciones ambientales. El aumento de temperatura debe considerarse un indicador clave de las reacciones bioquímicas necesarias.

En este sentido, Almeida et al. (2018), observaron un aumento en la temperatura promedio de las semillas de cacao de dos localidades después de las primeras 48 horas de fermentación, alcanzando valores superiores a los 40°C. Este incremento térmico fue considerado satisfactorio para un proceso de fermentación exitoso (Camu et al. 2007, 2008), y fue similar a lo reportado en otros estudios (Moreira et al. 2013; Papalexandratou et al. 2011), quienes encontraron una temperatura máxima media de 46,8ºC después de 144 horas de fermentación como resultado de la actividad metabólica microbiana.

El pH del cotiledón y la pulpa también varía notablemente. La pulpa fresca del grano es ácida, con un pH cercano a 3,5, mientras que el pH del cotiledón es más alto, alrededor de 6,5. A medida que el contenido de la pulpa disminuye, sus componentes se difunden a través de la testa hacia los nibs. Los ácidos sintetizados a partir de la pulpa se transfieren a los nibs, disminuyendo aún más el pH de las semillas, llegando aproximadamente a 4,8 en el tercer día de la fermentación. Según Moreira et al. (2013), con el transcurso de la fermentación, el pH de la pulpa tiende a aumentar gradualmente debido al consumo del

ácido cítrico, alcanzando valores cercanos a 5,0 al concluir el período de fermentación. También se ha reportado que, a pesar de la disminución del pH en el cotiledón, se observa un aumento en el pH de la pulpa desde el nivel inicial hasta igualar el valor final registrado en los nibs (Schwan & Wheals 2004; Thompson et al., 2013).

3.4.2 Análisis sensorial

La acidificación representa una de las propiedades más importantes en la fermentación del cacao. De hecho, los ácidos generados mediante el metabolismo microbiano, al difundirse en los granos, desencadenan la activación de diversas funciones enzimáticas que permiten la formación del aroma y sabor característico del cacao y el chocolate (Thompson et al., 2012). Durante el proceso de fermentación de los granos de cacao llevado a cabo en Abiyán (Sudeste de Costa de Marfil), se identificaron levaduras que generaron un total de 33 compuestos aromáticos. Entre estas cepas, *P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae*, *Galactomyces geotrichum* y *W. anomalus* fueron reconocidas como los principales contribuyentes a la formación de compuestos aromáticos específicos del cacao (Koné et al., 2016). Por el contrario, se ha reportado que las bacterias aeróbias formadoras de esporas, como las cepas del género Bacillus, producen una variedad de compuestos químicos, incluidos 2,3-butanodiol, pirazinas, ácido acético y ácido láctico, en condiciones de fermentación, que pueden contribuir a la acidez y quizás, en ocasiones, a los sabores desagradables de los granos de cacao fermentados (Ardhana & Fleet 2003; Sarbu y Csutak, 2019; Schwan, 1998). Contrariamente, Ouattara et al. (2008, 2011), han sugerido que *Bacillus spp* tiene una función importante como productor de enzimas pectinolíticas durante la fermentación. La descomposición de la pectina contenida en la pulpa por acción de enzimas pectinolíticas es un proceso fundamental para la penetración de compuestos en el grano, principalmente etanol y ácido acético. Así mismo, Yao et al. (2017), reportaron el aislamiento de 163 cepas pertenecientes al género *Bacillus*, destacando su actividad pectinolítica, y de acidificación y capacidad para metabolizar ácido cítrico. Estas características podrían contribuir en gran medida a la formación de sabor y aroma, generando así un efecto positivo en la calidad de los granos de cacao fermentados. Es así, como también se ha informado sobre la sinergia entre la cepa de bacteria *B. subtilis* y la levadura *P. kudriazevii* para la producción de etanol, lo cual podría desempeñar un papel crucial, dado que el etanol es un metabolito indispensable para asegurar una adecuada fermentación del cacao. (De Vuyst y Weckx, 2016).

Es importante tener en cuenta que los cambios en el pH, la temperatura, el contenido de azúcar y los productos o metabolitos de la fermentación ejercen una presión de selección sobre los microorganismos naturales existentes, favoreciendo las cepas que se adaptan mejor a este entorno (Pereira et al., 2012)

3.4.3 Cadmio

La variabilidad de las concentraciones de cadmio en los granos de cacao de diferentes sitios se ha atribuido al contenido de cadmio 'total' del suelo, así como a los factores críticos del suelo que influyen la fitodisponibilidad de cadmio, como el pH, la textura y la materia orgánica del suelo (MOS) (Alloway, 2013). A pesar de la importancia de identificar los factores que regulan la acumulación de cadmio en los granos de cacao y la necesidad de desarrollar alternativas para reducir su concentración, solo un reducido número de estudios ha investigado los efectos del suelo y otros factores ambientales en la absorción de metales pesados por las plantas de cacao, particularmente en condiciones de campo (Chávez et al., 2016; Gramlich et al., 2017). Varios estudios han concluido que, entre los distintos parámetros del suelo, el pH es el factor más influyente en la regulación del cadmio disponible para las plantas. La acidez del suelo incrementa la disponibilidad de cadmio, ya que al disminuir el pH mejora la solubilidad de los metales y la absorción por las raíces. En condiciones de pH inferiores de seis, el cadmio se adsorbe débilmente en la materia orgánica, arcillas y óxidos. En contraste en suelos con pH superior a siete o alcalinos, el cadmio tiende a no ser móvil, ya que puede precipitarse como $CaCO_3$ o $CdCO_3$. Por lo tanto, la adsorción del cadmio se incrementa rápidamente, pero depende de las características del suelo (Tantalean, 2017). Además del pH, existen otros elementos críticos del suelo, como la presencia de arcilla, contenido de materia orgánica, textura y óxido de hierro o aluminio también se han indicado como propiedades que pueden ayudar a predecir la absorción de cadmio por las plantas (Engbersen et al., 2019). Sin embargo, a nivel regional en los países del sur de América Latina también se muestra que el contenido de los granos de cacao tiene 2,1 veces más cadmio con relación al cadmio disponible en el suelo, lo que demuestra la capacidad de bioacumulación de los granos de cacao (Florida, 2021).

A pesar de la importancia de las etapas de poscosecha y procesamiento en relación con la calidad del cacao, ha habido poca investigación que evalúe cómo las prácticas

poscosecha artesanales y no tecnificadas, podrían influir en la reducción del contenido de cadmio en los granos. (Vanderschueren et al., 2019). Algunos estudios han observado disminuciones de cadmio al comparar semillas enteras frescas y cascarilla seca fermentada (Lewis et al., 2018), así como productos derivados como el cacao en polvo y el chocolate; en tales casos se ha establecido una relación entre contenido de cadmio, cacao de origen único y genotipos (Abt et al., 2018; Kruszewski et al., 2018; Lewis et al., 2018; Mrmošanin et al., 2018). Los resultados de una investigación anterior a la llevada a cabo por Lewis et al. (2018) señalaron que el contenido de cadmio fue más elevado en la testa, con un promedio de 1,83 mg Cd^{+2}/kg, en comparación con el cotiledón, que presentó un promedio de 0,88 mg Cd^{+2}/kg. Además, se observó una variación considerable en función del material genético.

Se ha investigado también el impacto de la adición de sustancias acidificantes en la reducción de la concentración de cadmio en los granos durante la fermentación. Bravo et al. (2021b), evaluaron el efecto del ácido acético y el ácido láctico, bajo condiciones controladas, variando la temperatura (30°C, 35°C y 45°C), encontrando que tanto la fermentación espontánea (sin adición de sustancias acidificantes) como los tratamientos con ácido láctico y acético, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la reducción del contenido de cadmio en los nibs. Sin embargo, se observó una disminución del pH de 6,5 a 4,5. Estos resultados indican que, ningún proceso, ya sea físico (pH, temperatura o concentración de oxígeno) o químico (reacciones enzimáticas y catalíticas) que ocurren durante la transformación poscosecha ayudan a disminuir el contenido de cadmio en los granos de cacao, lo cual se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio. De manera similar, Vanderschueren et al. (2022), realizaron experimentos a escala de laboratorio (5 kg) utilizando las mismas sustancias acidificantes, las cuales demostraron ser ineficaces en la reducción de la concentración de cadmio en los nibs. Por el contrario, la fracción de cadmio extraíble en agua de los nibs aumentó significativamente al reducir el pH. Además, la concentración de cadmio en nibs de los granos fermentados sin tratamiento (fermentación espontánea), disminuyó en un factor de 1,25 después de cuatro días de fermentación.

Contrario a los resultados obtenidos por Bravo et al. (2021b), Vanderschueren et al. (2020), informaron que la concentración de cadmio en los nibs disminuyó hasta en un factor de 1,3, pero solo con una acidificación suficiente en los nibs (pH <5), la cual fue el resultado de un mayor tiempo de fermentación. (hasta siete días). En contraste como se muestra en

la Fig. 2-6 aunque se alcanzó un valor de pH < 5,0 entre las 72 y las 96 h para los tratamientos y la fermentación espontánea, no se observó una disminución en el contenido de cadmio en los nibs. Además, entre las 120 y 144 h, el pH volvió a aumentar; por lo tanto, la hipótesis del estudio de Vanderschueren et al. (2020) que argumentaba que un pH < 5 y extender la fermentación más de siete días favorecería la migración de cadmio durante la fermentación, no es respaldada por nuestro estudio.

Además, según Vanderschueren et al. (2020), la disminución de la concentración de cadmio se atribuye a su migración desde los nibs hacia la cascarilla, lo cual es contrario a lo que se creía, ya que las concentraciones de cadmio en la cascarilla generalmente son más altas que en los nibs (Lewis et al., 2018; Ramtahal et al., 2016; Vanderschueren et al., 2020), por lo que la migración se produce en contra del gradiente de concentración total de Cd. Los autores postulan que el gradiente de concentración de cadmio móvil es opuesto al gradiente de concentración total, especialmente en granos fermentados con un pH ácido (pH <5). Este fenómeno se ha observado en estudios similares (Bravo et al., 2021b; Lewis et al., 2018; Meunier et al., 2003; Thyssen et al, 2018; Zhai et al., 2019).

A pesar de la elevada concentración de cadmio en la cascarilla, su peso relativo en el grano total representa una pequeña parte. En consecuencia, la reserva total de cadmio se constituye como una fracción mínima del contenido total de cadmio en el grano. Por ejemplo, considerando las fracciones en peso del nibs y cascarilla (fracciones en peso promedio nibs 0,93 g y testa 0,07 g) (Vanderschueren et al., 2020), un grano de cacao con un peso total de 1 g (nibs y cascarilla) tendrían una concentración total de 1,8 µg Cd^{+2} en el nibs, pero solo 0,26 µg Cd^{+2} en la cascarilla. Esto explica por qué la migración hacia afuera de cadmio desde el nibs a la cascarilla puede resultar en un aumento significativo en la concentración de cadmio en la cascarilla, pero no en una disminución detectable en la concentración de cadmio en el nibs (Vanderschueren et al., 2022). Sin embargo, esta hipótesis no se pudo verificar en este estudio ya que no se realizaron mediciones de cadmio en la cascarilla.

Dado que la cascarilla constituye aproximadamente el 10% del peso seco de un grano de cacao, su completa eliminación podría resultar en una reducción de la concentración de cadmio en un factor de 1,16 desde los granos frescos hasta el licor de cacao. Esto también

indica que la industria procesadora de cacao de la Unión Europea podría estar rechazando injustificadamente lotes de granos de cacao debido a las concentraciones elevadas de cadmio, si esta decisión se basa en el cadmio total del grano (nibs y cascarilla) en lugar de enfocarse únicamente en el cadmio presente en los nibs (Vanderschueren et al., 2021).

Resultados similares a los obtenidos por Vanderschueren et al. (2020), fueron encontrados en una investigación posterior realizada por Vanderschueren et al. (2023). En este estudio se incubaron granos de cacao a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido acético y etanol. La incubación bajo condiciones típicas de fermentación (45 °C y 20 g/L de ácido acético) demostró una reducción de la concentración de cadmio en nibs en un factor de 1,3. Este factor se incrementó a 1,6 en condiciones más extremas, es decir, 65 °C y 40 g/L de ácido acético, mientras que el etanol no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo.

Aunque la información publicada sigue siendo escasa hasta la fecha, en los últimos dos años, ha habido un aumento en la investigación sobre estrategias para reducir los altos contenidos de cadmio tanto en suelos como en las prácticas agrícolas, así como en el manejo poscosecha, sin afectar la calidad del chocolate. Se han empleado diversos enfoques con el objetivo de abordar este desafío, entre ellos, los procesos de biorremediación, que implican el bioaumento de las poblaciones bacterianas tolerantes al Cd en el suelo (CdtB) y las bacterias endófitas del grano de cacao (ECdtB), podrían disminuir las concentraciones de Cd en varias etapas del sistema de producción de cacao (Bravo et al., 2021b).

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, Falcón (2019), encontró que el contenido de cadmio en los nibs de los granos fermentados, inoculados con *S. cerevisiae* al 1%, fue significativamente menor, registrando un valor de 0,54 mg Cd^{+2}/kg respecto a los demás tratamientos. Esto podría estar relacionado con la actividad biológica de las levaduras, las cuales tienen la propiedad de absorber metales pesados (cadmio, plomo y zinc) en sus paredes celulares compuestas por quitina y polisacáridos. Estos componentes a su vez contienen nitrógeno, proteínas, iones minerales y lípidos que pueden unirse a los metales pesados. De hecho, la parte exterior de las paredes celulares de los hongos actúa como ligando para atrapar los metales pesados (Gupta et al., 2015; Selvam et al., 2013; Xie et al., 2016). Los lípidos y los polisacáridos son dos componentes

de las paredes celulares de los hongos que actúan como ligandos de metales pesados. Entre estos ligandos, los grupos amina (NH_2) son los agentes aglutinantes más fuertes.

En los estudios sobre tratamientos físicos y químicos durante la poscosecha, Cruz-Prada et al. (2021), encontraron que el pre escurrido del grano en baba, disminuye la presencia de cadmio, donde reportan 20,48 mg Cd^{+2}/kg con pre-escurrido y 23,72 mg Cd^{+2}/kg sin pre-escurrido. Sin embargo, las concentraciones del metal pesado no cumplen con los niveles máximos de cadmio permitidos establecidos en el Reglamento 488/2014 de la Unión Europea. En otro estudio, se evaluó la combinación de sustancias acidificantes (HCL) y quelantes (EDTA) junto con presecado y lavado. Se observó que la reducción de cadmio en el grano estuvo influenciada significativamente por el lavado y presecado, logrando disminuciones del 49,2 % y 28,6% respectivamente, mientras que la acidificación y el uso de quelantes no demostraron efectos significativos en la reducción de cadmio. Además, los tratamientos de presecado y lavado no tuvieron efectos sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao (Cedeño, 2020).

Los tratamientos enzimáticos y biológicos, ya sea de forma individual o en combinación, también han sido evaluados con el objetivo de reducir las concentraciones de cadmio durante la fermentación de cacao. Morales-Rodríguez et al. (2022), evaluaron la enzima pectintranseliminasa (PTE) en dos variedades de cacao (Nacional y CCN-51). Se encontró que el cacao nacional presentó un menor contenido de cadmio en el grano (1,07 mg Cd^{+2}/kg) con 0,20 mL/kg de la enzima junto con lavado completo y secado por tamiz. En el cacao CCN-51, el nivel más bajo de cadmio (1,51 mg Cd^{+2}/kg) se registró al utilizar 0,30 mL/kg de la enzima, combinado con un lavado completo y secado durante 24 horas en tamiz de cemento. En cuanto al control, el cacao comercial presentó los niveles de cadmio más bajos en comparación con los demás tratamientos, lo que podría estar relacionado con el proceso al que fue sometido durante el cultivo (tratamientos y remediación de suelos contaminados por metales pesados). Cabe señalar que el uso de la enzima PTE no solo resultó en una reducción efectiva de los niveles de cadmio, sino que también tuvo un impacto positivo en la calidad física y sensorial de los granos de cacao.

Vera-Chang et al. (2022), reportó que la levadura *S. cerevisiae* en combinación con la enzima Polifenol oxidasa (PPO), permitieron una disminución del contenido de cadmio en los nibs de cacao, sin afectar su calidad sensorial. Asimismo, para el efecto principal de

tiempos de fermentación, el menor contenido de cadmio se alcanzó a las 120 horas, Aunque en este estudio no se adicionó un tratamiento enzimático, los resultados a nivel sensorial fueron similares a los obtenidos por este autor. En una investigación más reciente, Vera-Chang et al. (2023), evaluaron la eficacia de la bacteria *Rhizobium japonicum* en la disminución de cadmio presente en semillas de cacao, logrando porcentajes de reducción del 79% durante la fermentación.

Es importante resaltar que, la mayoría de las investigaciones publicadas emplearon unidades experimentales con una cantidad reducida de granos de cacao (2-5 kg), a diferencia de la masa de cacao utilizada en el presente trabajo (100 kg). Esto podría explicar las diferencias en los resultados positivos obtenidos por otros investigadores en comparación con los resultados de este estudio. La variabilidad en las concentraciones de cadmio con cantidades más pequeñas de cacao tiende a disminuir, permitiendo la detección de efectos principalmente atribuibles a los tratamientos. Sin embargo, cuando se aplican tratamientos a grandes cantidades de grano, la alta variabilidad en las concentraciones de cadmio puede interferir en la obtención de resultados positivos. En un extenso estudio a nivel nacional en Ecuador, Argüello et al. (2019) informaron que las concentraciones de cadmio en los granos de cacao presentan una variabilidad promedio del 39 % entre las mazorcas cosechadas de diferentes árboles en un mismo campo. Sin embargo, la variación en la concentración de cadmio entre granos de una sola mazorca es baja (con un coeficiente de variación promedio del 7%), lo que destaca la utilidad de emplear mazorcas individuales como réplicas en lugar de muestras compuestas de mayor tamaño. No obstante, estas cantidades no permiten reflejar la realidad de las condiciones en las que se lleva a cabo los procesos de poscosecha, especialmente durante la fermentación.

Del mismo modo, algunos autores han informado sobre la variabilidad en las concentraciones de cadmio medidas en granos no fermentados y productos intermedios después de la fermentación. Por ejemplo, Barraza et al. (2017) midieron las concentraciones de cadmio en granos de cacao sin pelar y no fermentados (1,02–1,37 mg Cd^{+2}/kg) así como en licor de cacao (1,47–3,88 mg Cd^{+2}/kg), sugiriendo cierto enriquecimiento con cadmio después de la fermentación y el procesamiento. Yanus et al. (2014) informaron concentraciones de cadmio en semillas no fermentadas (0,072 ± 0,001 mg Cd^{+2}/kg) y en la cascarilla (0,085 ± 0,001 mg Cd^{+2}/kg), así como en cacao en polvo (0,125 ± 0,011 mg Cd^{+2}/kg), indicando nuevamente un posible enriquecimiento. Sin

embargo, a partir de estos estudios no queda claro en qué medida estas tendencias están relacionadas con la variabilidad de las muestras o si representan un efecto real de los pasos de procesamiento (Vanderschueren et al., 2021). Esta variabilidad representa una de las dificultades para demostrar cualquier efecto positivo en términos de reducción de este metal en el grano

Por otra parte, se ha informado que la biosorción de metales pesados mediante procesos de biomasa microbiana se ve influenciada por varios parámetros fisicoquímicos como el pH, la temperatura, la dosis de biomasa, la concentración inicial del metal, el tiempo de contacto, así como el tipo de metal pesado y el biosorbente empleado (Al-Qahtani, 2017; Fathollahi et al., 2021; Hasan et al., 2016).

La temperatura puede alterar la estructura de las proteínas y los grupos funcionales disponibles en la superficie del biosorbente. El pH, considerado como el factor más importante, ejerce una influencia significativa tanto en la solubilidad de los iones de metales pesados como en los sitios de unión activos de la biomasa (Fathollahi et al., 2021). La protonación y desprotonación de grupos funcionales está controlada por el pH del medio, lo que afecta la capacidad de biosorción: a pH bajo. Los grupos carboxílicos, al ser ácidos, existen en estado protonado debido a la presencia de exceso de H^+ y H_3O^+; por lo tanto, las fuerzas repulsivas de estos grupos protonados con iones de metales pesados cargados positivamente son responsables de la menor capacidad de biosorción a pH bajo (Ahmad et al., 2018; Ibrahim, 2011). Con el aumento del pH, los grupos funcionales como los grupos amina, carboxilo e hidroxilo quedan expuestos por desprotonación, lo que mejora la atracción electrostática con iones de metales pesados debido a una carga negativa (Ahmad et al., 2018; Jiang et al., 2017).

Teniendo en cuenta que la fermentación de cacao es un proceso espontáneo caracterizado por diversas reacciones biológicas secuenciales, generando cambios de pH y temperatura, es esencial identificar y optimizar microorganismos que se ajusten a un rango específico y controlado de estos parámetros de modo que se favorezca y optimice el proceso de biosorción (Farmanbordar et al., 2021; Huang et al., 2020; Ghorbani et al., 2008; Khannir et al., 2023; Zhu et al., 2019). Por otra parte, existe una variedad de microorganismos presentes en la fermentación de cacao con capacidad demostrada para mitigar cadmio en

medio acuoso (ensayos en laboratorio), pero aún se desconoce las interacciones entre estos microorganismos durante el proceso de fermentación. Es decir, los microorganismos adicionados, podrían estar presentando antagonismos con la microbiota nativa, disminuyendo así su eficacia durante la fermentación (Comitini et al., 2004; Mewa-Ngongang et al, 2021; Nally et al., 2015). Además, la presencia de ácidos y las variaciones en pH y temperatura pueden resultar en la muerte de los microorganismos más susceptibles a estas condiciones. Por lo anterior, es necesario realizar ensayos a nivel de laboratorio para identificar los parámetros más influyentes en la biosorción de cadmio y determinar los momentos adecuados para la adición de los inóculos microbianos.

Dado que la introducción de microorganismos en el proceso de fermentación de cacao con el fin de reducir los niveles de cadmio en los granos constituye una línea de investigación relativamente reciente en Colombia, existe poca información disponible en la literatura. A pesar de esto, diferentes actores del sector privado y varios centros de investigación en el país han llevado a cabo estudios de mitigación de cadmio en los granos mediante el uso de microorganismos, obteniendo una reducción en el contenido de Cd que oscila entre el 20% y el 25%, aunque hasta la fecha no hay datos publicados (Meter et al., 2019).

En situaciones en las que el contenido de cadmio excede considerablemente los límites establecidos por la regulación de la Unión Europea, además de la mitigación de este metal en el proceso fermentativo, deben establecerse otras estrategias a nivel de cultivo, entre las que se incluyen enmiendas (fertilizantes, abonos, etc.) libres o con bajo contenido de cadmio, control del pH del suelo, control de calidad del agua y de sus flujos en las fincas productoras, así como la selección de cultivares con translocación reducida de cadmio a los granos de cacao. (Vanderschueren et al., 2021). La combinación de todas estas acciones puede resultar en una mitigación significativa de cadmio en los granos, permitiendo que los cacaos que consistentemente superan los límites de cadmio de acuerdo con la reglamentación europea puedan acceder a mercados que anteriormente estaban restringidos. En algunos casos, esta implementación integral de medidas puede incluso traducirse en un mayor valor en el mercado, debido al bajo contenido de este metal pesado en los productos.

3.5 Conclusiones

Las cepas de bacterias y de levadura, aplicadas individualmente o en combinación al grano en fermentación, no demostraron reducción de la concentración de cadmio en los granos. De manera similar, el contenido de cadmio en los granos sometidos a fermentación espontánea (FE) no disminuyó durante este proceso. Sin embargo, la inoculación con estos microorganismos mejoró las características sensoriales de los granos, destacando notas afrutadas, florales y de nuez, así como un agradable sabor a chocolate.

Las concentraciones de cadmio en los granos de cacao fermentados, tanto de los tratamientos como de la fermentación espontánea (FE), superaron los niveles permisibles establecidos por la Unión Europea para la elaboración de cualquiera de los productos designados. Además, las mediciones de la concentración de cadmio en el grano fresco y fermentado presentaron un coeficiente de variación del 16 y 19% respectivamente, el cual está clasificado como un nivel medio.

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones generales

4.1 Conclusiones

A partir de la fermentación de cacao se aislaron bacterias y levaduras con capacidad de crecer y disminuir concentraciones de cadmio en soluciones acuosas a escala de laboratorio. Se identificaron bacterias como *B. subtilis*, *Bacillus*. sp, *B. megaterium*, *Dermaccocus* sp, y levaduras como *Torulaspora delbrueckii*, *W. anomalus*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia kudriavzevii*. De estos microorganismos, únicamente se seleccionaron las bacterias *B, subtilis* y *B. megaterium,* asi como la levadura *W. anomalus* para realizar los ensayos a nivel de campo, debido a que demostraron mayor capacidad para secuestrar cadmio con respecto a los demás. Además, se encontró que, durante el proceso de captura de cadmio, el pH influyó significativamente, mostrando una mayor reducción de este metal a pH 4,5. Esta reducción posiblemente esté influenciada por la presencia de grupos funcionales ubicados extra y/o intracelularmente, los cuales forman parte de moléculas como lípidos, proteínas y polisacáridos.

Aunque las cepas de bacterias y levaduras seleccionadas en esta primera etapa (laboratorio) mostraron resultados promisorios en la reducción de cadmio, no lograron disminuir los niveles de cadmio en granos de cacao durante la fermentación en condiciones de campo. Respecto al análisis sensorial, la inoculación de los granos con estos microorganismos de manera individual y en cultivo mixto, generó un perfil sensorial con notas afrutadas, florales y de nuez, así como un agradable sabor a chocolate. Por tanto,

se podría considerar la aplicación de estos microorganismos como potenciadores de sabor y aroma durante la fermentación.

Por otra parte, es necesario considerar el aumento de escala para la producción de biomasa de los microorganismos con capacidad para disminuir cadmio en ambientes acuosos, ya que los ensayos en grano de cacao durante la fermentación en condiciones de campo requieren una elevada concentración de biomasa, lo que implica el uso de altas cantidades de medios de cultivo comerciales con un costo elevado. En este sentido, se logró la formular un medio de cultivo para la levadura *W. anomalus* M4HMO mediante el uso de herramientas estadísticas y de diseño de experimentos (Plackett-Burman y Box-Behnken), compuesto por materias primas de bajo costo y con características nutricionales similares al medio de cultivo comercial YPG. Este enfoque permitió alcanzar una concentración similar a la obtenida con el medio comercial, proporcionando así una alternativa económica y eficiente.

4.2 Recomendaciones

- Realizar ensayos de optimización de condiciones para la captura de cadmio como pH, temperatura, tiempo de contacto, concentración del metal y concentración de los microorganismos, con el fin de identificar los parámetros más influyentes y determinar las condiciones que favorezcan y optimicen el proceso de secuestro de este metal en ambientes acuosos. Posteriormente validar estos resultados en granos de cacao durante la fermentación a pequeña escala, considerando que el pH y la temperatura son parámetros que no se controlan durante el proceso de fermentación de cacao.

- Identificar los mecanismos implicados en la captura de cadmio a través de estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), teniendo en cuenta las concentraciones indicadas de cadmio que permitan la visualización de este metal y su interacción con la estructura celular del microorganismo.

- Evaluar la capacidad de otros microorganismos de la fermentación de cacao para la biosorción de cadmio, empleando concentraciones más elevadas de este metal (p.ej. 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg Cd^{+2}/L).

- Evaluar el efecto del pretratamiento de la biomasa de los microorganismos con enzimas, calor, ácidos y alcalís en la biosorción de cadmio.

A. Anexo: Aislamientos de la fermentación de cacao cultivados en medio sólido suplementado con 20 mg Cd^{+2}/L

Número	Código	Medio de cultivo	Lugar de muestreo
1	Betulia B8 día 2 # 4	YPG	Hacienda Betulia
2	Betulia B8 día 2 # 1	YPG	Hacienda Betulia
3	Betulia B8 día 2 #6	YPG	Hacienda Betulia
4	Betulia B8 día 2 #4	YPG	Hacienda Betulia
5	Betulia B8 día 2 #5	YPG	Hacienda Betulia
6	Betulia B8 día 2 #4	YPG	Hacienda Betulia
7	Central mezcla día 1 super extr # 2	YPG	Hacienda Betulia
8	Central CCN día 1 fondo medio # 3	YPG	Hacienda Betulia
9	Central fear día 2 fondo centro # 1	YPG	Hacienda Betulia
10	Betulia B8 día 2 #1	YPG	Hacienda Betulia
11	Betulia B8 día 2 #1	YPG	Hacienda Betulia
12	Betulia B8 día 2 # 1	YPG	Hacienda Betulia
13	Betulia mix día 6#10	YPG	Hacienda Betulia
14	Betulia B8 día 2 super ext # 7	YPG	Hacienda Betulia
15	Betulia B8 día 2 #3	YPG	Hacienda Betulia
16	Central Fear día 7 super extr #1	YPG	Hacienda Betulia
17	Central FSV día 2 fondo ext 1er muestreo # 4	YPG	Hacienda Betulia
18	Central CCN día 1 fondo medio YPD (rugosa)	YPG	Hacienda Betulia
19	Betulia B9 cajón 3 fondo extremo día 4 #1	TSA	Hacienda Betulia
20	Central CCN día 5 fondo extremo #2	TSA	Hacienda Betulia
21	Central CCN día 5 fondo extremo #9	TSA	Hacienda Betulia
22	Betulia B9 cajón 5 super extr día 4 # 6	TSA	Hacienda Betulia
23	Betulia mix día 6 # 2	TSA	Hacienda Betulia
24	Betulia B8 día 2 fond centro # 3	TSA	Hacienda Betulia
25	Central mix día 5 super extr # 4	TSA	Hacienda Betulia
26	Central CCN día 1 fondo medio # 1	TSA	Hacienda Betulia
27	Central FSV día 7 super centro # 5	TSA	Hacienda Betulia
28	Central CCN día 5 fond extr # 4	TSA	Hacienda Betulia
29	Central CCN día 6 super extr # 4	TSA	Hacienda Betulia
30	Betulia mix día 6 # 11	TSA	Hacienda Betulia

31	Central CCN día 6 super ext # 6	TSA	Hacienda Betulia
32	Central CCN día 6 super extr# 2	TSA	Hacienda Betulia
33	Central CCN día 6 super extr # 7	TSA	Hacienda Betulia
34	Central fear día 7 super extr # 2	TSA	Hacienda Betulia
35	Betulia B8 día 2 super extr # 9	TSA	Hacienda Betulia
36	Betulia mix día 6 # 9	TSA	Hacienda Betulia
37	Betulia B8 día 2 super extr # 8	TSA	Hacienda Betulia
38	Central fear día 7 super extr # 1	TSA	Hacienda Betulia
39	Central fear día 2 superficie # 3	TSA	Hacienda Betulia
40	Betulia mix día 6 # 5	TSA	Hacienda Betulia
41	MOFC74	YPG	Haciend Monteoscuro
42	MOFC132	YPG	Haciend Monteoscuro
43	MOFE	YPG	Haciend Monteoscuro
44	MOFE23	YPG	Haciend Monteoscuro
45	MOSC101	YPG	Haciend Monteoscuro
46	MOFC21	YPG	Haciend Monteoscuro
47	MOSC11	YPG	Haciend Monteoscuro
48	MOSE133	YPG	Haciend Monteoscuro
49	MOFC44	YPG	Haciend Monteoscuro
50	MOSC22	YPG	Haciend Monteoscuro
51	MOFC75	YPG	Haciend Monteoscuro
52	MOFE82	YPG	Haciend Monteoscuro
53	MOSC52	YPG	Haciend Monteoscuro
54	MOSE63	YPG	Haciend Monteoscuro
55	MOFC43	YPG	Haciend Monteoscuro
56	MOFE73	YPG	Haciend Monteoscuro
57	MOFC76	YPG	Haciend Monteoscuro
58	MOSC14	YPG	Haciend Monteoscuro
59	MOSC12	YPG	Haciend Monteoscuro
60	MOSE54	YPG	Haciend Monteoscuro
61	MOSC31	YPG	Haciend Monteoscuro
62	MOFE111	YPG	Haciend Monteoscuro
63	MOSC222	YPG	Haciend Monteoscuro
64	MOFC132	YPG	Haciend Monteoscuro
65	MOFC37	YPG	Haciend Monteoscuro
66	MOSC173	YPG	Haciend Monteoscuro
67	MOSE42	YPG	Haciend Monteoscuro
68	MOFC24	YPG	Haciend Monteoscuro
69	MOFE112	TSA	Haciend Monteoscuro
70	MOSE241	TSA	Haciend Monteoscuro
71	MOSC381	TSA	Haciend Monteoscuro
72	MOSE451	TSA	Haciend Monteoscuro
73	MOSC511	TSA	Haciend Monteoscuro
74	MOFC614	TSA	Haciend Monteoscuro
75	MOFE731	TSA	Haciend Monteoscuro
76	MOSC822	TSA	Haciend Monteoscuro
77	MOSE913	TSA	Haciend Monteoscuro
78	MOFC1082	TSA	Haciend Monteoscuro
79	MOSE1161	TSA	Haciend Monteoscuro
80	MOFE1273	TSA	Haciend Monteoscuro
81	MOSC615	TSA	Haciend Monteoscuro

82	MOSE244	TSA	Haciend Monteoscuro
83	MOSC615	TSA	Haciend Monteoscuro

B. Anexo: Resultados de la medición de cadmio de las cepas individuales en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02
	POST-ANALÍTICO	Versión: 11
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/02/04
		Página 1 de 4

Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 0400 de 2019, en los parámetros Alcalinidad total, Cloruros, DBO_5, DQO Detergentes, Fenoles, Fosfoto reactivo total, Hierro Total, metales totales en la matriz agua (Cr, Cd, Cu, Co, Mn, Ni, Pb, Zn, Hg y Ag), Fibras, Nitritos, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, toma de muestras compuesta, simple o puntual (variables medidas en campo: pH, temperatura, sólidos sedimentables y caudal), en la matriz suelo pH y Metales Totales (Cd y Pb), TCLP en Residuos peligrosos Metales (Cd, Ag, Pb, Zn, Ba, Cr y Hg)

Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 1615 de 2015, para la realización de ensayos físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano"

Certificación ICA para el control de calidad de fertilizantes de uso agrícola, mediante Resolución N 72137 del 27 de julio de 2020; en los parámetros de: Azufre, Boro, Silicio Soluble, Cadmio, Cobre, Cromo, Hierro, Magnesio, Manganeso, Níquel, Fósforo, Sodio y Zinc por Absorción Atómica. CIC Capacidad de Retención por agua, Carbonatos por volumetría, Carbono Orgánico Oxidable total, Cenizas, conductividad, Contenido de sólidos, pH, P, K, N, As, Hg, Humedad

Informe de resultados No.	I-22-899	**Fecha de emisión:**	Noviembre 25 de 2022
Cliente:	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		
Dirección del cliente:	Carrera 72A No. 78B-141		
Solicitud de servicio No.	22-517	**No. de muestras:**	27
Fecha de recepción de las muestras:	Noviembre 15 de 2022		
Muestras recibidas por:	Natalia Galio Corzo		
Fecha de análisis:	Noviembre 24 de 2022		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	22-517-01...22-517-27	**Tipo de muestra:**	Puntual
Identificación de la muestra:	Ver tabla adjunta		
Matriz de la muestra:	Muestras Líquidas		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Medellín / Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Ambiente		
Fecha del muestreo:	Noviembre 11 de 2022		

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
22-517-01	LM1 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,695	Absorción Atómica / SM 3111B
22-517-02	LM1 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,859	

Ciudad Universitária Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratório 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular: 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimco@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 11	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/02/04	
		Página 2 de 4	

Informe de resultados No. I-22-888 Solicitud de servicio No. 22-517

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
22-517-03	LM1 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,272	Absorción Atómica / SM 3111B
22-517-04	M4 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,366	
22-517-05	M4 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,385	
22-517-06	M4 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,773	
22-517-07	M6 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,572	
22-517-08	M6 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,662	
22-517-09	M6 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,071	
22-517-10	M14 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,020	
22-517-11	M14 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,089	
22-517-12	M14 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,049	
22-517-13	B M1 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,181	
22-517-14	B M1 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,404	

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co

Informe de resultados No. I-22-889 Solicitud de servicio No. 22-517

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
22-438-15	B M1 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,499	Absorción Atómica / SM 3111B
22-438-16	M17 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	4,868	
22-438-17	M17 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	4,905	
22-438-18	M17 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	4,255	
22-438-19	M21 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,548	
22-438-20	M21 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,216	
22-438-21	M21 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,027	
22-438-22	C1 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	0,008	
22-438-23	C1 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	0,008	
22-438-24	C1 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	0,008	
22-438-25	C2 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,489	
22-438-26	C2 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,276	
22-438-27	C2 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,209	

*Los métodos utilizados en la ejecución de los ensayos para los análisis realizados en el laboratorio, han sido tomados de las normas, métodos estándar o procedimientos internos, de acuerdo a la matriz y los parámetros analizados.

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimcn@gmail.com, labquimicn@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 11	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/02/04	
		Página 4 de 4	

Informe de resultados No. I-22-899 Solicitud de servicio No. 22-517

Observaciones: *Ninguna*

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Estimado Cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Elaboró	Revisó	Aprobó
Natalia Galio Cerro.		
Natalia Galio Ingeniera Industrial Profesional de Calidad	Bibiana Herrera Química. Esp. Coordinadora de Calidad	Yolanda Vargas Química. M.Sc Directora del Laboratorio

------ Fin del informe de resultados ------

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimcn@gmail.com, labquimicn@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

C. Anexo: Resultados de la medición de cadmio de las cepas individuales y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALÍTICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 1 de 5	

IDEAM

Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 1171 de 2022, en los parámetros Alcalinidad total, Cloruros, Detergentes, Fosfóro reactivo total, Hierro Total, metales totales en la matriz agua (Cr, Cd, Cu, Co, Mn, Ni, Pb, Zn, Hg y Ag), Nitratos, Nitritos, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, toma de muestras compuesta, simple o puntual (variables medidas en campo: pH, temperatura, sólidos sedimentables y oxígeno) en la matriz suelos pH y Metales Totales (Cd y Pb), TCLP en Residuos peligrosos Metales (Cd, Ag, Pb, Zn, Ba, Cr y Hg)

Instituto Nacional de Salud

Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 1615 de 2015, para la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano"

ICA

Certificación ICA para el control de calidad de fertilizantes de uso agrícola, mediante Resolución N. 72137 del 27 de julio de 2020; en los parámetros de: Azufre, Boro, Silicio Soluble, Cadmio, Cobre, Cromo, Hierro, Magnesio, Manganeso, Níquel, Plomo, Sodio y Zinc por Absorción Atómica. CIC Capacidad de Retención por agua, Carbonatos por volumetría, Carbono Orgánico Oxidable total, Cenizas, conductividad, Contenido de sólidos, pH, P, K, N, As, Hg, Humedad

Informe de resultados No.	I-23-087	**Fecha de emisión:**	Marzo 18 de 2023
Cliente:	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		
Dirección del cliente:	Carrera 72A No. 78B-141		
Solicitud de servicio No.	23-100	**No. de muestras:**	48
Fecha de recepción de las muestras:	Marzo 15 de 2023		
Muestras recibidas por:	Natalia Galio Corzo		
Fecha de análisis:	Marzo 15 de 2023 – Marzo 17 de 2023		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	23-100-01...23-100-48	**Tipo de muestra:**	Puntual
Identificación de la muestra:	Ver tabla adjunta		
Matriz de la muestra:	Muestras Líquidas		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Medellín / Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Ambiente		
Fecha del muestreo:	Marzo 13 de 2023		

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-100-01	AR1	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,330	Absorción Atómica / SM 3111B
23-100-02	AR2	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,290	

Ciudad Universitária Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratório 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular: 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimco@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 2 de 6	

Informe de resultados No. I-23-097 Solicitud de servicio No. 23-100

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-100-03	AR3	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,270	Absorción Atómica / SM 3111B
23-100-04	BR1	Cadmio Total (mg Cd/L)	4,460	
23-100-05	BR2	Cadmio Total (mg Cd/L)	4,850	
23-100-06	BR3	Cadmio Total (mg Cd/L)	4,780	
23-100-07	CR1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,520	
23-100-08	CR2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,760	
23-100-09	CR3	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,250	
23-100-10	DR1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,070	
23-100-11	DR2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,820	
23-100-12	DR3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,530	
23-100-13	AB R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,120	
23-100-14	AB R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,400	

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 3 de 6	

Informe de resultados No. I-23-087 Solicitud de servicio No. 23-100

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-100-15	AB R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,420	Absorción Atómica / SM 3111B
23-100-16	AC R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,540	
23-100-17	AC R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,690	
23-100-18	AC R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,370	
23-100-19	AD R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,570	
23-100-20	AD R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,520	
23-100-21	AD R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,280	
23-100-22	BC R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,310	
23-100-23	BC R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	11,640	
23-100-24	BC R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	9,000	
23-100-25	BD R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,180	
23-100-26	BD R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,820	
23-100-27	BD R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,450	

*Los métodos utilizados en la ejecución de los ensayos para los análisis realizados en el laboratorio, han sido tomados de las normas, métodos estándar o procedimientos internos, de acuerdo a la matriz y los parámetros analizados.

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimcn@gmail.com, labquimico@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 4 de 6	

Informe de resultados No. I-23-087 Solicitud de servicio No. 23-100

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-100-28	DC R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,190	Absorción Atómica / SM 3111B
23-100-29	DC R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,310	
23-100-30	DC R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,140	
23-100-31	ABC R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,600	
23-100-32	ABC R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,200	
23-100-33	ABC R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,410	
23-100-34	ACD R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,560	
23-100-35	ACD R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,820	
23-100-36	ACD R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,260	
23-100-37	BCD R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,990	
23-100-38	BCD R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,150	
23-100-39	BCD R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,350	
23-100-40	ABD R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,190	
23-100-41	ABD R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,410	

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 5 de 6	

Informe de resultados No. I-23-097 Solicitud de servicio No. 23-100

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-100-42	ABD R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	5,850	Absorción Atómica / SM 3111B
23-100-43	ABCD R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,830	
23-100-44	ABCD R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,960	
23-100-45	ABCD R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,850	
23-100-46	COR1	Cadmio Total (mg Cd/L)	9,010	
23-100-47	COR2	Cadmio Total (mg Cd/L)	9,110	
23-100-48	COR3	Cadmio Total (mg Cd/L)	9,200	

*Los métodos utilizados en la ejecución de los ensayos para los análisis realizados en el laboratorio, han sido tomados de las normas, métodos estándar o procedimientos internos, de acuerdo a la matriz y los parámetros analizados.

Observaciones: *El rango lineal de calibración por Absorción Atómica de Llama es de: 0,008 mg Cd/L hasta 1,500 mg cd/L.*
El Intervalo de trabajo para la determinación de Cadmio por Absorción Atómica de Llama va de: 0,008 mg Cd/L hasta 1500 mg de Cd/L en solución, pero se tiene la posibilidad de ampliar más y ello depende del factor de dilución que se aplique.

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 6 de 6	

Informe de resultados No. I-23-097 **Solicitud de servicio No.** 23-100

Estimado Cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Elaboró	Revisó	Aprobó
Natalia Gallo Corzo.		
Natalia Gallo Ingeniera Industrial Profesional de Calidad	Bibiana Herrera Química. Esp. Coordinadora de Calidad	Yolanda Vargas Química. M.Sc Directora del Laboratorio

------ Fin del informe de resultados ------

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

D. Anexo: Resultados de la medición de cadmio de las cepas individuales y en cultivo mixto en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L con diferentes valores de pH inicial

LOCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02
	POST-ANALÍTICO	Versión: 12
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21
		Página 1 de 4

IDEAM — *Acreditación por el IDEAM según la Resolución No. 1171 de 2022, en los parámetros Alcalinidad total, Cloruros, Detergentes, Fosfoto reactivo total, Hierro Total, metales totales en la matriz agua (Cr, Cd, Cu, Co, Mn, Ni, Pb, Zn, Hg y Ag), Nitratos, Nitritos, sólidos sedimentables, sólidos suspendidos totales, toma de muestra compuesta, simple o puntual (variables medidas en campo: pH, temperatura, sólidos sedimentables y oxígeno) en la matriz suelos pH y Metales Totales (Cd y Pb), TCLP en Residuos peligrosos Metales (Cd, Ag, Pb, Zn, Ba, Cr y Hg)*

Instituto Nacional de Salud — *Autorización del Ministerio de la Protección Social, mediante la resolución 1615 de 2013, para la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano*

ICA — *Certificación ICA para el control de calidad de fertilizantes de uso agrícola, mediante Resolución N. 72137 del 27 de julio de 2020; en los parámetros de: Azufre, Boro, Silicio Soluble, Cadmio, Cobre, Cromo, Hierro, Magnesio, Manganeso, Níquel, Plomo, Sodio y Zinc por Absorción Atómica. CE: Conexidad de Retención por agua, Carbonatos por volumetría, Carbono Orgánico Oxidable total, Cenizas, conductividad, Contenido de sólidos, pH, P, K, N, As, Hg, Humedad*

Informe de resultados No.	I-23-133	Fecha de emisión:	Abril 01 de 2023
Cliente:	CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS		
Dirección del cliente:	Carrera 72A No. 78B-141		
Solicitud de servicio No.	23-141	No. de muestras:	24
Fecha de recepción de las muestras:	Marzo 31 de 2023		
Muestras recibidas por:	Natalia Gallo Corzo		
Fecha de análisis:	Marzo 31 de 2023		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	23-141-01...23-141-24	Tipo de muestra:	Puntual
Identificación de la muestra:	Ver tabla adjunta		
Matriz de la muestra:	Muestras Líquidas		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Medellín / Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Ambiente		
Fecha del muestreo:	Marzo 29 de 2023		

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-141-01	8 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,290	Absorción Atómica / SM 3111B
23-141-02	8 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,590	

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 2 de 4	

Informe de resultados No. I-23-133 Solicitud de servicio No. 23-141

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-141-03	8 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,550	Absorción Atómica / SM 3111B
23-141-04	B8 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,950	
23-141-05	B8 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,810	
23-141-06	B8 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,070	
23-141-07	AB8 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,840	
23-141-08	AB8 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,670	
23-141-09	AB8 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	7,860	
23-141-10	ABD8 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	8,980	
23-141-11	ABD8 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	9,080	
23-141-12	ABD8 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	9,050	
23-141-13	9 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,260	
23-141-14	9 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,460	

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 3 de 4	

Informe de resultados No. I-23-133 Solicitud de servicio No. 23-141

CODIFICACIÓN DE LA MUESTRA	IDENTIFICACIÓN MUESTRA	PARAMETRO	RESULTADO	MÉTODO*
23-141-15	9 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	10,680	Absorción Atómica / SM 3111B
23-141-16	B9 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,710	
23-141-17	B9 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,340	
23-141-18	B9 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,270	
23-141-19	AB9 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,320	
23-141-20	AB9 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,290	
23-141-21	AB9 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,320	
23-141-22	ABD9 R1	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,480	
23-141-23	ABD9 R2	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,410	
23-141-24	ABD9 R3	Cadmio Total (mg Cd/L)	6,560	

*Los métodos utilizados en la ejecución de los ensayos para los análisis realizados en el laboratorio, han sido tomados de las normas, métodos estándar o procedimientos internos, de acuerdo a la matriz y los parámetros analizados.

Observaciones: *El rango lineal de calibración por Absorción Atómica de Llama es de: 0,008 mg Cd/L hasta 1,500 mg cd/L.*

El Intervalo de trabajo para la determinación de Cadmio por Absorción Atómica de Llama va de: 0,008 mg Cd/L hasta 1500 mg de Cd/L en solución, pero se tiene la posibilidad de ampliar más y ello depende del factor de dilución que se aplique.

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: laboquimco@gmail.com, laboquimco@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

LQCI	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 12	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2022/11/21	
		Página 4 de 4	

Informe de resultados No. I-23-133 Solicitud de servicio No. 23-141

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Estimado Cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Elaboró	Revisó	Aprobó
Natalia Gallo Corro.		
Natalia Gallo Ingeniera Industrial Profesional de Calidad	Bibiana Herrera Química. Esp. Coordinadora de Calidad	Yolanda Vargas Química. M.Sc Directora del Laboratorio

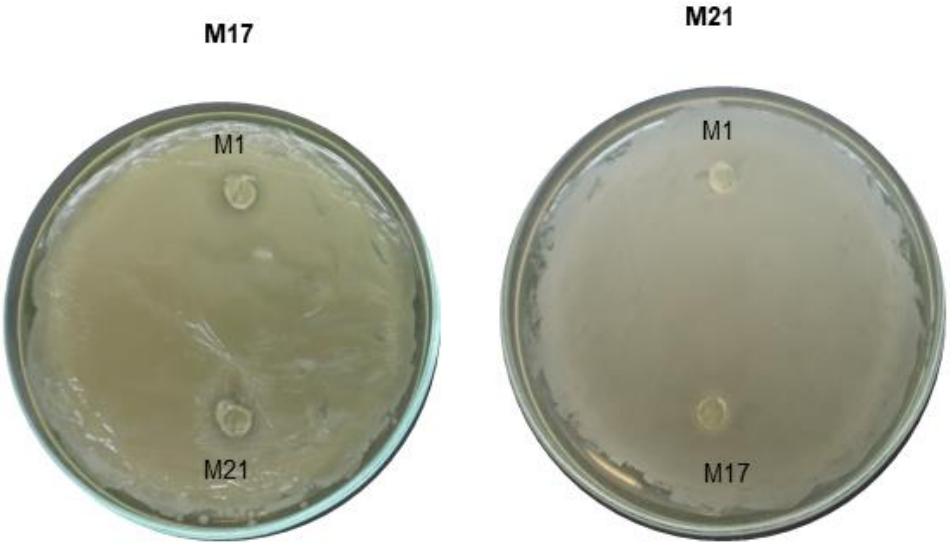
------ Fin del informe de resultados ------

LOS DATOS REPORTADOS EN ESTE INFORME DE ANÁLISIS SON VÁLIDOS ÚNICAMENTE PARA LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, LA CUAL FUE SUMINISTRADA POR EL CLIENTE BAJO SUS CONDICIONES DE MUESTREO.

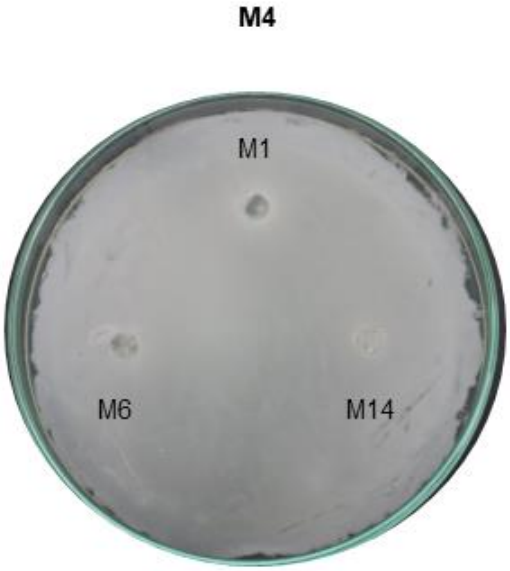
Ciudad Universitaria Carrera 27 Calle 9 – Edificio Camilo Torres/ Laboratorio 222
Conmutador: (7) 6344000 Ext. 1469-2463-2465. Celular 3182061814
E-mail: labquimco@gmail.com, labquimico@uis.edu.co
Bucaramanga - Colombia

E. Anexo: Ensayo de antagonismo entre bacterias y levaduras con capacidad para disminuir cadmio en soluciones acuosas a 10 mg Cd^{+2}/L

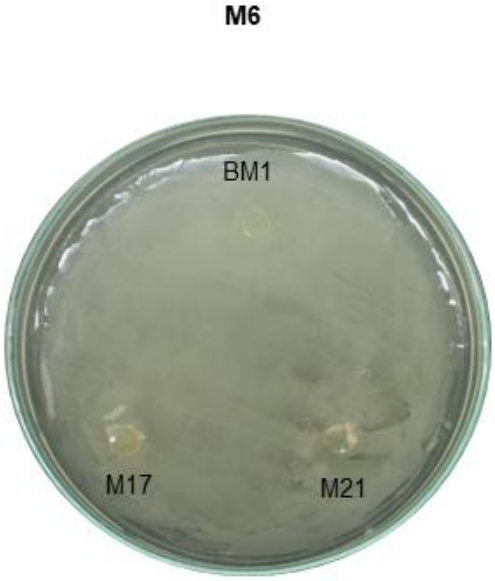
Bacteria-Bacteria



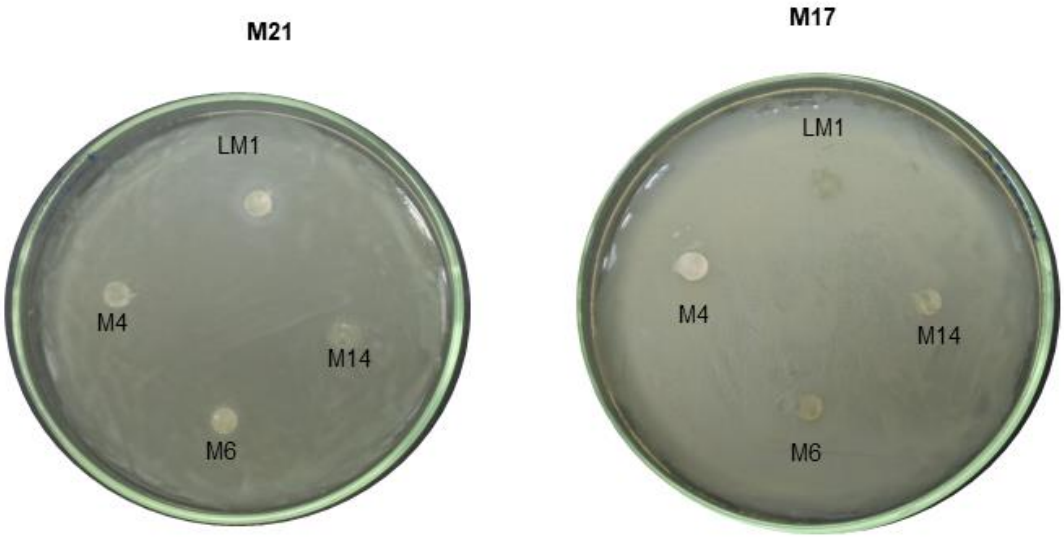
Levadura-Levadura



Levadura-Bacteria



Bacteria-Levadura



F. Resultados evaluación sensorial de los granos con y sin aplicación externa de inóculos microbianos a la fermentación

Compañía Nacional de Chocolates S.A.S.

REPORTE EVALUACIÓN SENSORIAL LICOR DE CACAO PROYECTO COLEGIO MAYOR

Nombre producto: Yariguies T1 TF

Tipo de prueba : Descriptiva
Nombre prueba: Perfil sensorial
Metodología: Concenso
Normas de referencia: NTC 3929
Número de Jueces: 4 Entrenados
Objetivo: Obtener el perfil de sabor del licor de cacao a evaluar.

Escala utilizada para calificar intensidad percibida

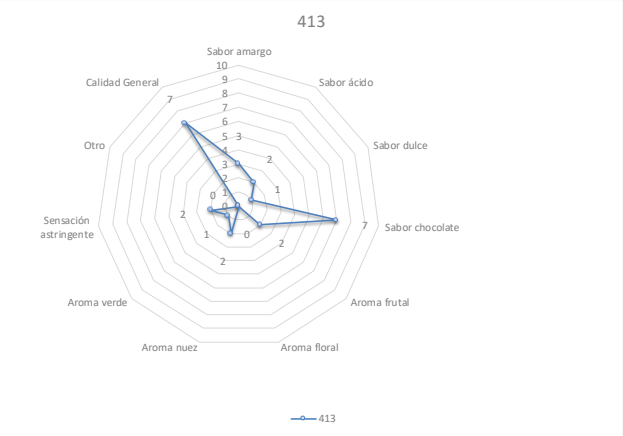
Ausente	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
0	1 a 2	3 a 5	6 a 8	9 a 10

Muestras Evaluadas :

Código muestra	Identificación
413	Muestra Yariguies T1 TF

Preparación de la muestras Tostión, descascarillado y molienda de la muestra de cacao recibida, para obtener licor de cacao.
Fecha analisis: 07.12.2023

Descriptor	413
Sabor amargo	3
Sabor ácido	2
Sabor dulce	1
Sabor chocolate	7
Aroma frutal	2
Aroma floral	0
Aroma nuez	2
Aroma verde	1
Sensación astringente	2
Otro	0
Calidad General	**7**



OBSERVACIONES:
Muestra balanceada con presencia de notas deseales como el frutal y con baja astringencia. Buen nivel de sabor chocolate.

Compañía Nacional de Chocolates S.A.S.

REPORTE EVALUACIÓN SENSORIAL LICOR DE CACAO PROYECTO COLEGIO MAYOR

Nombre producto: Yariguies T2 TF

Tipo de prueba : Descriptiva
Nombre prueba: Perfil sensorial
Metodología: Concenso
Normas de referencia: NTC 3929
Número de Jueces: 4 Entrenados
Objetivo: Obtener el perfil de sabor del licor de cacao a evaluar.

Escala utilizada para calificar intensidad percibida

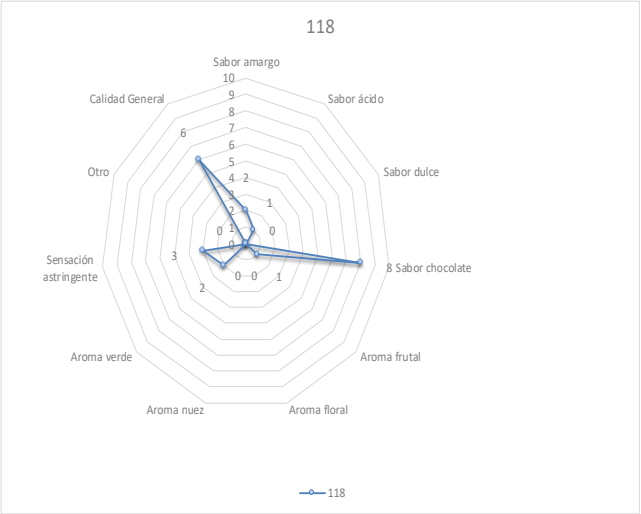
Ausente	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
0	1 a 2	3 a 5	6 a 8	9 a 10

Muestras Evaluadas :

Código muestra	Identificación
118	Muestra Yariguies T2 TF

Preparación de la muestras Tostión, descascarillado y molienda de la muestra de cacao recibida, para obtener licor de cacao.
Fecha analisis: 07.12.2023

Descriptor	118
Sabor amargo	2
Sabor ácido	1
Sabor dulce	0
Sabor chocolate	8
Aroma frutal	1
Aroma floral	0
Aroma nuez	0
Aroma verde	2
Sensación astringente	3
Otro	0
Calidad General	**6**



OBSERVACIONES:
Muestra con astringencia media y presencia de nota verde, no tiene presencia de notas aromáticas frutales, florales u otras especiales.

Compañía Nacional de Chocolates S.A.S.

REPORTE EVALUACIÓN SENSORIAL LICOR DE CACAO PROYECTO COLEGIO MAYOR

Nombre producto: Yariguies T3 TF

Tipo de prueba : Descriptiva
Nombre prueba: Perfil sensorial
Metodología: Concenso
Normas de referencia: NTC 3929
Número de Jueces: 4 Entrenados
Objetivo: Obtener el perfil de sabor del licor de cacao a evaluar.

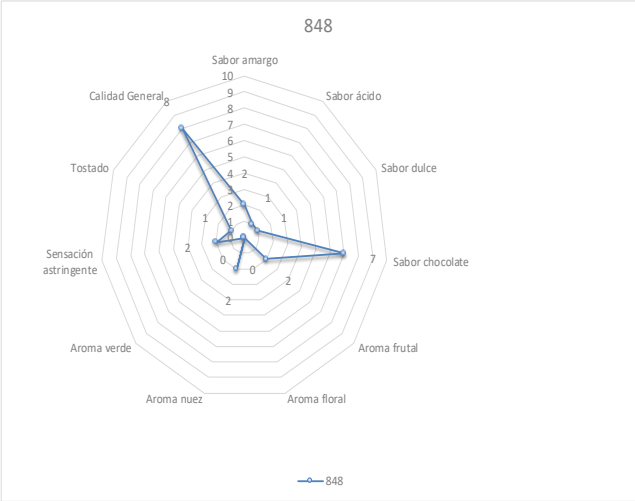
Escala utilizada para calificar intensidad percibida	Ausente	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
	0	1 a 2	3 a 5	6 a 8	9 a 10

Muestras Evaluadas :

Código muestra	Identificación
848	Muestra Yariguies T3 TF

Preparación de la muestras Tostión, descascarillado y molienda de la muestra de cacao recibida, para obtener licor de cacao.
Fecha analisis: 07.12.2023

Descriptor	848
Sabor amargo	2
Sabor ácido	1
Sabor dulce	1
Sabor chocolate	7
Aroma frutal	2
Aroma floral	0
Aroma nuez	2
Aroma verde	0
Sensación astringente	2
Tostado	1
Calidad General	**8**



OBSERVACIONES:
Muestra con buen nivel de chocolate, presenta notas frutales y anuezadas, no se percibe nota verde y astringencia es baja, buen perfil de sabor.

Compañía Nacional de Chocolates S.A.S.

REPORTE EVALUACIÓN SENSORIAL LICOR DE CACAO PROYECTO COLEGIO MAYOR

Nombre producto: Yariguies T4 TF

Tipo de prueba : Descriptiva
Nombre prueba: Perfil sensorial
Metodología: Concenso
Normas de referencia: NTC 3929
Número de Jueces: 4 Entrenados
Objetivo: Obtener el perfil de sabor del licor de cacao a evaluar.

Escala utilizada para calificar intensidad percibida

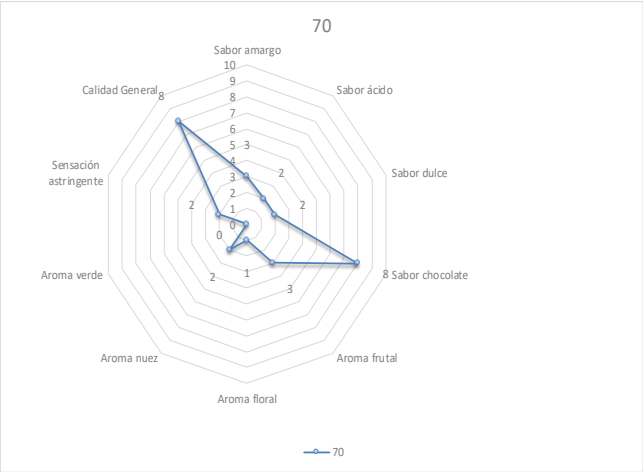
Ausente	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
0	1 a 2	3 a 5	6 a 8	9 a 10

Muestras Evaluadas :

Código muestra	Identificación
70	Muestra Yariguies T4 TF

Preparación de la muestras Tostión, descascarillado y molienda de la muestra de cacao recibida, para obtener licor de cacao.
Fecha analisis: 07.12.2023

Descriptor	70
Sabor amargo	3
Sabor ácido	2
Sabor dulce	2
Sabor chocolate	8
Aroma frutal	3
Aroma floral	1
Aroma nuez	2
Aroma verde	0
Sensación astringente	2
Calidad General	**8**



OBSERVACIONES:
Perfil de sabor balanceado, con presencia de notas deseables frutales, florales y anuezadas. El nivel de chocolate es agradable, presenta notas dulces.

Compañía Nacional de Chocolates S.A.S.

REPORTE EVALUACIÓN SENSORIAL LICOR DE CACAO PROYECTO COLEGIO MAYOR

Nombre producto: Yariguies T5 TF

Tipo de prueba : Descriptiva
Nombre prueba: Perfil sensorial
Metodología: Concenso
Normas de referencia: NTC 3929
Número de Jueces: 4 Entrenados
Objetivo: Obtener el perfil de sabor del licor de cacao a evaluar.

Escala utilizada para calificar intensidad percibida

Ausente	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
0	1 a 2	3 a 5	6 a 8	9 a 10

Muestras Evaluadas :

Código muestra	Identificación
245	Muestra Yariguies T5 TF

Preparación de la muestras Tostión, descascarillado y molienda de la muestra de cacao recibida, para obtener licor de cacao.

Fecha analisis: 07.12.2023

Descriptor	245
Sabor amargo	3
Sabor ácido	2
Sabor dulce	1
Sabor chocolate	6
Aroma frutal	2
Aroma floral	0
Aroma nuez	0
Aroma verde	0
Sensación astringente	1
Calidad General	**6**

OBSERVACIONES:
La muestra presenta notas sobrefermentadas poco deseables, nivel de chocolate medio, pocas notas aromáticas (solo presenta una leve nota frutal).

Bibliografía

Abbott, P. C., Benjamin, T., Burniske, G., Croft, M., Fenton, M. C., Kelly, C., Lundy, M. M., Rodriguez-Camayo, F., Wilcox, M. (2019). Análisis de la cadena productiva del cacao en Colombia. Informe preparado para revisión por la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Universidad Purdue y Centro Internacioal de Agricultura Tropical. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10934.14400

Abioye, O. P., Oyewole, O. A., Oyeleke, S. B., Adeyemi, M. O., Orukotan, A. A. (2018). Biosorption of lead, chromium and cadmium in tannery effluent using indigenous microorganisms. Brazilian Journal of Biological Sciences, 5(9), 25–32.

Abt, E., Fong Sam, J., Gray, P., Robin, L. P. (2018). Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. Food Addit Contam B 11, 92-102. https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700

Acosta, I., Cárdenas-González, J.F., Martínez, V.M., Rodríguez, A., Moctezuma., M., Pacheco., N.C. (2018). “Biosorption of heavy metals by Candida albicans” In: Shiomi, N, (eds) Advances in biorremediation and phytorremediation (Rijeka. InTech), 43-60. https://doi.org/10.5772/intechopen.72454

Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2008). Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 48, 840-857. https://doi.org/10.1080/10408390701719272

Aguirre-Forero, S.E., Piraneque-Gambasica, N.V., Vásquez-Polo, J.R. (2020). Heavy metals content in soils and cocoa tissues in Magdalena department Colombia: emphasis in cadmium. Entramado. Enero - Junio, 2020 vol. 16, no. 1, p.298-310 https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.6753

Ahemad, M. (2012). Implications of bacterial resistance against heavy metals in bioremediation: a review. J. Inst. Integr. Omics Appl. Biotechnol. IIOAB 3, 39–46.

Ahmad, A.; Bhat, A.H.; Buang, A. (2018) Biosorption of transition metals by freely suspended and Ca-alginate immobilised with Chlorella vulgaris: Kinetic and equilibrium modeling. J. Clean. Prod, 171, 1361–1375. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.252

Aibeche, C., Selami, N., Zitouni-Haouar, F., Oeunzar, K., · Addou, A., Kaid-Harche, M., ·

Djabeur, Abderrezak. (2022). Bioremediation potential and lead removal capacity of heavy metal-tolerant yeasts isolated from Dayet Oum Ghellaz Lake water (northwest of Algeria). Int Microbiol;25(1):61-73. doi: https://doi.org/10.1007/s10123-021-00191-z

Albarrcín, H. S. R., Contreras, A. E. D., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. Geoderma Regional, 15, e00214. https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214

Ali, G.A., Mohammad, R., Makhlouf, A.S. (2023). “Biodegradable Materials: Fundamentals, Importance, and Impacts”, In: Ali, G.A., Makhlouf, A.S (eds), Handbook of Biodegradable Materials. (Springer Nature Switzerland), 3-14. https://doi.org/10.1007/978-3-031-09710-2_74

Alloway, B. J. (2013). Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. In B. J. Alloway (Ed.), Heavy Metals in Soils (pp. 11-50). Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7

Almeida, S. D. F. O. De, Silva, L. R. C., Celso, G., Junior, A. C., Oliveira, G., Helena, S., Vasconcelos, S., Lopes, A. S. (2018). Diversity of yeasts during fermentation of cocoa from two sites in the Brazilian Amazon. Acta Amazonica, 49(1), 64–70.

Al-Qahtani, K.M. (2016). Water purification using different waste fruit cortexes for the removal of heavy metals. J. Taibah Univ. Sci. 10 (5), 700–708. https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.09.001

Al-Qahtani, K.M. (2017). Cadmium removal from aqueous solution by green synthesis zero valent silver noanoparticles with Benjamina leaves extract. Egypt. J. Aquat. Res. 43, 269–274. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.10.003

Alzahrani, O., Abo-Amer, A.E.,Mohamed, R.M. (2022). Improvement of Zn (II) and Cd (II) Biosorption by Priestia megaterium PRJNA526404 Isolated from Agricultural Waste Water. Microorganisms. 10 (12), 2510. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122510

Amezqueta, S. Gonzalez-Penas, E., Murillo, M., Lopez de Cerain, A. (2005). Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. Food Addit. Contain. 22, 590-596. https://doi.org/10.1080/02652030500130160

Ami, D., Posteri, R., Mereghetti, P., Porro, D., Doglia, S.M., Branduardi, P. (2014). Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts, Biotechnol. Biofuels. 7–12. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-12

Andersson, M., Koch, G., Lieberei, R. (2006): Structure and function of the seed coat of Theobroma cacao L. and its possible impact on flavour precursor development during fermentation. J. Appl. Bot. Food Qual. 80, 48-62.

Arce-Inga, M., González-Pérez, A.Ri., Hernandez-Diaz, E., Chuquibala-Checan, B., Chávez-Jalk, A., Llanos-Gomez K.J., Leiva-Espinoza, S.T., Oliva-Cruz, S.M., Cumpa-Velasquez, L.M. (2022). Bioremediation Potential of Native Bacillus sp. Strains as a Sustainable Strategy for Cadmium Accumulation of Theobroma cacao in Amazonas

Region. Microorganisms, 10, 2108. https://doi.org/10.3390/microorganisms10112108

Ardhana, M., Fleet, G. (2003) The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. Int J Food Microbiol 86, 87–99. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3

Arévalo-gardini, E., Arévalo-hernández, C. O., Baligar, V. C., He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (Theobroma cacao L) in major cacao growing regions in Perú. Science of the Total Environment, 605–606, 792–800. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122

Argüello, D., Chávez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., Montalvo, D. (2019). Properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans : A nationwide survey in Ecuador. Science of the Total Environment, 649, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292

Arous, F., Azabou, S., Jaouani, A., Zouari-Mechichi, H., Nasri, M., Mechichi, T. (2016). Biosynthesis of single-cell biomass from olive mill wastewater by newly isolated yeasts. Environmental Science and Pollution Research. 23:6783–6792. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5924-2

Arvelo, M. A., Delgado, T., Maroto, S., Rivera, J., Higuera, I., Navarro, A. (2016). Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América. San José, C.R.: IICA: CIATEJ.

Asria, M., Ghachtoulia, N., Elabeda, S., Koraichia, S. I., Elabeda, A., Silvac, B., Tavaresc, T. (2018). Wicherhamomyces anomalus biofilm supported on wood husk for chromium wastewater treatment. Journal of Hazardous Materials 359, 554–562. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.050

Ayubb, T.N., Cerra, G.A., Chamorro, A.L., Pérez, C.A. (2017). Resistencia a cadmio (Cd) de bacterias endófitas y bacterias rizosféricas aisladas a partir de Oriza sativa en Colombia. Rev Colombiana Cienc Anim; 9(Supl 2):281-293.

Bahafid, W., Joutey, N.T., Sayel, H., Iraqui-Houssaini, M., Ghachtouli, N. (2013). Chromium Adsorption by Three Yeast Strains Isolated from Sediments in Morocco. Geomicrobiology Journal, 30, 422–429. https://doi.org/10.1080/01490451.2012.705228

Bardhan, P., Baruah, J., Raj, G.V.S., Kalita, E., Mandal, M. (2021). Optimization of culture conditions for biomass and lipid production by oleaginous fungus Penicillium citrinum PKB20 using response surface methodology (RSM). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 37, 102169. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102169

Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: a field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. Environ. Pollut. 229, 950–963. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080

Barraza, F., Schreck, E., Uzu, G., Lévêque, T., Zouiten, C., Boidot, M., Maurice, L. (2021). Beyond cadmium accumulation: Distribution of other trace elements in soils and cacao

beans in Ecuador. Environmental Research 192, 10241. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110241

Batista, K.A., Bataus, L.A., Campos, I., Fernandes, K.F. (2013). Development of culture medium using extruded bean as a nitrogen source for yeast growth. Journal of Microbiological Methods. 92 (3): 310-315. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.002

Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. Trends in Food Science and Technology, 66, 108–116. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007

Beni, A.A, Esmaeili, A. (2020). Biosorption, an efficient method for removing heavy metals from industrial effluents: A Review. Environmental Technology & Innovation 17, 100503. https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100503

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of Theobroma cacao beans and cocoa products. Food Control, 65, 46–53. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013

Bhumibhamon, O., Jinda, J., (1997). Effect of enzymes pectinases on natural cocoa fermentation. Kasetsart J. Nat. Sci. 31, 206e212.

Billah, M., Agratiyan, T., Ayu, D., Erliyanti, N., Saputro, E., Yogaswara, R. (2020). Synthesis of Bioethanol from Cocoa Pod Husk Using Zymomonas Mobilis. IJEISE, 1:1

Boeris, P.S., Liffourrena, A.S., Lucchesi, G.I (2018). Aluminum biosorption using nonviable biomass of Pseudomonas putida immobilized in agareagar: performance in batch and in fixed-bed column. Environ. Technol. Innov. 11 https://doi.org/ 10.1016/j.eti.2018.05.003

Bonvehi, J.S. (2004). Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. J. Agric. Food Chem. 52, 6347-6352. https://doi.org/10.1021/jf040153w

Boyanov, M.I, Kelly, S.D., Kemner, K.M., Bunker, B.A., Fein J.B., Fowle D.A. (2003). Adsorption of cadmium to Bacillus subtilis bacterial cell walls: a pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. Geochimica et Cosmochimica Acta, Vol. 67, No. 18, pp. 3299–3311. https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01343-1

Bravo, D, Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., Rodríguez, E. A. G. (2021). The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. Agronomy, 11(4), 1–18. https://doi.org/10.3390/agronomy11040761

Bravo, D., Benavides-Erazo, J. (2020). The Use of a Two-Dimensional Electrical Resistivity Tomography (2D-ERT) as a Technique for Cadmium Determination in Cacao Crop Soils. Applied Sciences, 10(June), 41–49. https://doi.org/10.3390/app10124149

Bravo, D., León-Moreno, C., Quiroga, R., Zamora, A., Gutiérrez, E., Moreno, E., Duarte, D., Aristizábal, A., Arroyave, C., Cardona, L., Olarte, H., Orozco, M.L., Guerra-Sierra, B. (2021a). ¿Qué es el cadmio y por qué es importante en el cultivo de cacao? Colección de Cartillas Sobre Cadmio En Cacao. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia),

1.https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7404548

Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. Journal of Applied Microbiology, 124(5), 1175–1194. https://doi.org/10.1111/jam.13698

Bravo, D., Santander, M., Rodríguez, J., Escobar, S. (2021b). Cadmium in Cacao: "From Soil to Bar" the Journey of Cadmium at a Farm Level. Research Square. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-199662/v1

Bravo, I.D.S, Arboleda, C. A., Martín, F. J. (2014). Efecto de la calidad de la materia orgánica asociada con el uso y manejo de suelos en la retención de cadmio en sistemas altoandinos de Colombia. Acta Agron. 63(2), 164–174. https://doi.org/10.15446/acag.v63n2.39569

Broach, J.R. Nutritional control of growth and development in yeast (2012). Genetics 192(1):73–105. https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731

Cáceres, J., Torres, E. (2017). Microorganismos cultivables asociados a cadmio (Cd) presentes en suelos cacaoteros de los municipios de Yacopí y Nilo, como estrategia de biorremediación. International Symposium on Cocoa Research (ISCR) Lima, Perú, 13-17 November.

Cai, M., Zhou, J., Hao, T., Du, K. (2022). Tolerance of phyllospheric Wickerhamomyces anomalus to BDE-3 and heavy metals. Environmental Science and Pollution Research volume 29, pages56555–56561

Caligiani, A., Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G., Sforza, S. (2016). Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. Food Chem. 211:431–439. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.072

Camu, N.; De Winter, T.; Verbrugghe, K.; Cleenwerck, I.; Vandamme, P.; Takrama, J.S.; Vancanneyt, M.; De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa seeds in Ghana. Applied of Environmental Microbiology, 73: 1809–1824. https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06

Camu, N.; Gonzalez, A.; De Winter, T.; Van Schoor, A.; De Bruyne, K.; Vandamme, P.; Takrama, J.S.; Addo, S.K.; De Vuyst, L. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. Applied of Environmental Microbiology, 74: 86–98. https://doi.org/10.1128/AEM.01512-07

Canchignia, F., Auhing, J., Cedeño, Á., Carrillo, M., Bravo, D. (2021). Guía 12: Mitigación de cadmio por microorganismos. Caja de herramientas para la prevención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de cacao-Ecuador (1.ª ed., pp. 1-32). Quito, Ecuador. https://balcon.mag.gob.ec/mag01/magapaldia/Caja%20de%20Herramientas_Cadmio_Cacao/

Casteblanco, J. A. (2018). Técnicas de remediación de metales pesados con potencial aplicación en el cultivo de cacao. La Granja: Revista de Ciencias de La Vida, 27(1), 21–35. https://doi.org/10.17163/lgr.n27.2018.02

Cedeño, W., Duicela, L. A., Altamirano, A. (2020). Remoción de Cadmio en almendras de cacao en proceso poscosecha con agentes quelantes, medios ácidos, lavado y presecado.[Tesis de Maestría] Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Ecuador. http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1344/1/TTMAI02D.pdf

Cempaka, L., Aliwarga, L., Purwo, S., Kresnowati, M.T.A.P. (2014). Dynamics of cocoa bean pulp degradation during cocoa bean fermentation: effects of yeast starter culture addition. J. Math. Fund. Sci. 46, 14e25.

Chandra, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2016). Phytoextraction of heavy metals by potential native plants and their microscopic observation of root growing on stabilised distillery sludge as a prospective tool for in situ phytoremediation of industrial waste. Environmental Science and Pollution Research, 24, 2605–2619. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8022-1

Chávez, E., He, Z.L., Stoffella, P.J., Mylavarapu, R.S., Li, Y.C., Baligar, V.C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in ecuadorian soils under cacao production. Chemosphere 150, 57-62. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013

Chávez, E., He, Z.L., Stoffella, P.J., Mylavarapub, R.S., Li, Y.C., Moyanod, B., Baligar, V.C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. Science of the Total Environment 533, 205–214. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106

Cheesman, E.E. (1944) Notes on the Nomenclature, Classification and Possible Relationships of Cocoa Populations. Tropical Agriculture, 21, 144-159.

Chellaiah, E. R. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by Pseudomona aeruginosa : a minireview. Applied Water Science, 8(154). https://doi.org/10.1007/s13201-018-0796-5

Chen, D., Wang, X.B., Wang, X.L., Feng, K., Su, J.C., Dong. J. (2020). The mechanism of cadmium sorption by sulphur-modified wheat straw biochar and its application cadmium-contaminated soil. Sci. Total Environ., 714, p. 8, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136550

Chen, Z.M., Li, Q., Liu, H.M (2010). Greater enhancement of Bacillus subtilis spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. Applied Microbiology and Biotechnology. 85:1353–1360

Cheng, J.; Yin,W.; Chang, Z.; Lundholm, N.; Jiang, Z. (2017). Biosorption capacity and kinetics of cadmium (II) on live and dead Chlorella vulgaris. J. Appl. Phycol. 29, 211–221.

Chi, Y., Huang, Y., Wang, J., Chenb, X., Chu, S., Hayat, K., Xu, Z., Xu, H., Zhoub, P., Zhang, D. (2020). Two plant growth promoting bacterial Bacillus strains possess

different mechanisms in adsorption and resistance to cadmium. Science of the Total Environment 741, 140422.https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140422

Chica, D., Lopez, J. (2020). Estrategias de remediación de cadmio aplicables a sistemas de producción de cacao en Colombia. [Monografía Especialización]. Universidad de Antioquia, Medellín.

CNCH- Compañía Nacional de Chocolates. (2019). Cosecha, beneficio y calidad del grano de cacao (Theobroma cacao L.) [archivo PDF). Recuperado de https://chocolates.com.co/wp-content/uploads/2019/09/Cartilla-Cosecha-Benef-Calidad-SEP-2019.pdf

Cobaleda, L. (2022). Análisis Económico de las Exportaciones de Cacao en Colombia. Universidad Antonio Nariño [Tesis Pregrado]. Universidad Antonio Nariño, Neiva.

Comisión del Codex Alimentarius. (2018). Documento de debate sobre el desarrollo de un código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del cacao por el cadmio. 12a reunión Utrecht, Países Bajos. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-12%252FWD%252Fcf12_16s.pdf

Comitini F., Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, Maurizio. (2004). Pichia anomala and Kluyveromyces wickerhamii killer toxins as new tools against Dekkera/Brettanomyces spoilage yeasts. FEMS Microbiology Letters, 238 (1), 235–240. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x

Contreras, C. A. (2017). Análisis de la cadena de valor del cacao en Colombia: generación de estrategias tecnológicas en operaciones de cosecha y poscosecha, organizativas, de capacidad instalada y de mercado [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. http://www.bdigital.unal.edu.co/59141/1/1032373448-2017.pdf

Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., and Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. Food Microbiology, 28:1499–1504. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.005

Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Mororó, R. C., Pereira, J. L., Frisvad, J. C., Taniwaki, M. H. (2012). The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by Aspergillus species. Int J Food Microbiol, 155(3):158-64. 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.026

Copetti, M. V., Iamanaka, B.T., Pitt, J. I., Taniwaki, M. H. (2014). Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. International Journal of Food Microbiology, 178:13–20. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023

Cordoba-Novoa, H. A., Cáceres Zambrano, J., Torres Rojas, E. (2021). Assessment of native cadmium-resistant bacteria in cacao (Theobroma cacao L.) - cultivated soils. BioRxiv, 1–25. https://doi.org/10.1101/2021.08.06.455168

Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C.E., Petersen, M.A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S.

(2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. Food Res. Int. 63, 306e316.

Cravens A, Payne J, and Smolke CD (2019) Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. Nature Communications 10(1):1-12 https://doi.org/10.1038/s41467-019-09848-w

Crowley, S., Mahony, J., Van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends. Food Sci Technol. 33(2):93–109. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004

Cruz-Prada, D., Guaitero-Patiño., Correa-Rueda, L. (2021). Contenido de cadmio en el grano de cacao Theobroma cacao L. seco, obtenido en la fermentación con pre y sin pre escurrido, en san vicente de chucurí. Citecsa. ISSN: 2027-6745

Cubillos, G., Merizalde, G.J., Correa, E. (2008). Manual de beneficio del cacao. [archivo PDF]. Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12324/13260

Cui, J., Liu, T., Li, Y., & Li, F. (2018). Selenium reduces cadmium uptake into rice suspension cells by regulating the expression of lignin synthesis and cadmium-related genes. Science of the Total Environment, 644, 602–610. https://doi.10.1016/j.scitotenv.2018.07.002

D'Souza, L., Devi, P., Shridhar, D.M.P., Naik, C.G. (2008). Use of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to study cadmium-induced changes in padina tetrastromatica (Hauck). Anal. Chem. Insights 3, 135–143. https://doi.org/10.4137/117739010800300001

Da Cruz Pedrozo, M.G., De Castro Reis, L.V., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., Freitas, R., 2017. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. Food Science and Technology 77, 362-369. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076

Da Silva, E.G.; de Fátima Borges, M.; Medina, C.; Piccoli, R.H.; Schwan, R. F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. FEMS Yeast Res. 5(9): 859-865. https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.02.006

Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. FEMS Yeast Research, 9 (5), 774–783. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x

Das, S., Al-Naemi, H. (2019) Cadmium Toxicity: Oxidative Stress, Inflammation and Tissue Injury. Occupational Diseases and Environmental Medicine, 7, 144-163. https://doi.org/10.4236/odem.2019.74012

Daymond, A., Bekele, F. (2022). Cacao. In: Priyadarshan, P., Jain, S.M. (eds) Cash Crops. Springer, Cham. https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1007/978-3-030-74926-2_2

De Araujo, Q.R., Baligar, V.C., de A. Loureiro, G.A.H., de Souza Júnior, J.O., Comerford, N.B. (2017). Impact of soils and cropping systems on mineral composition of dry cacao beans. J. Soil Sci. Plant Nutr. 17, 410–428. https://doi.org/10.4067/S0718-95162017005000030

De Araujo, Q.R., De A. Loureiro, G.A.H., Ahnert, D., Escalona-Valdez, R.A., Baligar, V.C., (2020). Interactions between soil, leaves and beans nutrient status and dry biomass of beans and pod husk of Forastero cacao: an exploratory study. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 51 (5), 567–581. https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1729369

De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Camu, N. (2010). The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R, Vignolo, G.M (eds), Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. pp. 301–326. Ames: Wiley-Blackwell.

De Vuyst, L., Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. FEMS Microbiology Reviews, 44(4), 432–453. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014

De Vuyst, L., Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. Journal of Applied Microbiology 121, 5 -17. https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jam.13045

Delangiz, N., Varjovi, M. B., Lajayer, B. A., Ghorbanpour, M. (2020). Beneficial microorganisms in the remediation of heavy metals. In Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture. Edition: 1Chapter: 3 3417-423.

Díaz, A., Flórez, J., Cotes, A.M. (2005). Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura Pichia onychis (Lv027). Revista Colombiana de Biotecnología, 7:1, 51-58.

Ding, J., Chen, W., Zhang, Z., Qin, F., Jiang, J., He, A., Sheng, G.D. (2021). Enhanced removal of cadmium from wastewater with coupled biochar and Bacillus subtilis. Water Sci Technol .83(9):2075-2086. https://doi.org/10.2166/wst.2021.138

Dircks, H. D.(2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour [Tesis de Doctorado]. University of New South Wales. Sydney, Australia.https://doi.org/10.26190/unsworks/14910

Djelal, H., Amrane, A., Lahrer, F., Martin, G. (2005). Effect of medium osmolarity on the bioproduction of glycerol and ethanol by Hansenula anomala growing on glucose and ammonium. Appl Microbiol Biotechnol, 69: 341–349. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1987-1

Du, H., Huang, Q., Peacock, C.L.,Tie B., Lei, M., Liu, X.,. Wei, X. (2018). Competitive binding of Cd, Ni and Cu on goethite organo–mineral composites made with soil bacteria. Environ. Pollut., 243, pp. 444-452, https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.087

Dzelagha, B.F., Ngwa N.M., Bup, D.N. (2020). A Review of Cocoa Drying Technologies and the Effect on Bean Quality Parameters. International Journal of Food Science. 2020(6):1-11. https://doi.org/10.1155/2020/8830127

Engbersen, N., Gramlich, A., López, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutiérrez, O., Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. Sci Total Environ 678, 660-670. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001

Engeseth, N.J. y Ac Pangan, M.F. (2018). Current context on chocolate flavor development — a review. Curr. Opin. Food Sci. 21:84–91. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.07.002

Escalante, W.E.,4, Rychtera, M., Melzoch, K., Polo, E.Q., Sakoda, B.H. (2011). Estudio de la actividad fermentativa de Hansenula anomala y producción de compuestos químicos de importancia sensorial. Rev. peru. biol. 18(3): 325 – 33. ISSN 1727-9933

European Safety Authority -EFSA. (2009). Scientific opinion of the panel on contaminants in thefood chain on a request from the European Commission on cadmium in food. EFSA Journal, 7(3), 1831–4732.

Fahrurrozi, Rahayu, E.P., Nugroho, I.B., Lisdiyanti, P. (2019). Lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented cocoa beans prevent the growth of model food contaminating bacteria. AIP Conf. Proc. 020005:1-6. https://doi.org/10.1063/1.5098410

Falcón, G. (2019). Cadmio y polifenoles totales en la fermentación de los granos de cacao (Theobroma cacao l.) clon ccn-51 .[Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Agraria de la Selva, Perú.

Farmanbordar, Z., Ghazban, F., Hosseini, H.M., Amani, M.Al., Imani, A.A. (2021). Evaluation the Biosorption Properties of Three Bacillus Strains for Cu2+ Ions Uptake from Wastewater. J Appl Biotechnol Rep ;8(3):320-325. https://doi.org/10.30491/JABR.2020.209419.1140

Farooq, U.; Kozinski, J.A.; Khan, M.A.; Athar, M. (2010). Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents—A review of the recent literature. Bioresour. Technol. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.030

Fathima, S., Shanmugasundaram, R., Sifri, M., Selvaraj, R. (2023). Yeasts and yeast-based products in poultry nutrition. J. Appl. Poult. Res. 32:100345. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105661712300017X

Fathollahi, A., Khasteganan, N., Coupe, S.J., Newman A.P (2021). A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. Chemosphere 268, 129290. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129290

Fears, K.P., Creager, S.E., Latour, R.A. (2008). Determination of the surface pK of carboxylic- and amine-terminated alkanethiols using surface plasmon resonance spectroscopy. Langmuir 24. https://doi.org/10.1021/la701760s

FEDECACAO - Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia. (2022). La producción cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo récord histórico. Bogotá D.C., (Actualizado 17 de febrero de 2022).

Feria-Cáceres, P. F., Penagos-Velez, L., Moreno-Herrera, C. X. (2022). Tolerance and Cadmium (Cd) Immobilization by Native Bacteria Isolated in Cocoa Soils with Increased Metal Content. Microbiology Research, 13(3), 556–573. https://doi.org/10.3390/microbiolres13030039

Fernández -Lizarazo, J.C. (2018). Estudio del efecto de diferentes líneas monospóricas de Rhizophagus irregularis en la respuesta del cacao al cadmio bajo condiciones de

déficit hídrico en vivero [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Fernández, P.M., Cruz, E.L., Viñarta, S.C., Castellanos, L.I (2017). Optimization of Culture Conditions for Growth Associated with Cr (VI) Removal by Wickerhamomyces anomalus M10. Bull Environ Contam Toxicol. 98:400–406. https://doi.org/10.1007/s00128-016-1958-5

Figueira, A. V. de O., Janick, J. [Ed]., BeMiller, J.N. (1993). New products from theobroma cacao: seed pulp and pod gum. In New crops (p. 710). New York: Wiley.

FINAGRO-Fondo para el Financiamiento del Sector Agropecuario. (2020). Ficha de Inteligencia: Cacao. https://www.finagro.com.co/sites/default/files/ficha_de_inteligencia_-_cacao.pdf

Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. Int J Food Microbiol , 86:11-22. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00245-9

Florida, R. (2021). Cadmium in soil and cacao beans of peruvian and south american origin. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 74(2), 9499–9515. https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n2.91107

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2023, agosto 20) FAOSTAT, Countries by commodity https://www.fao.org/faostat/en/?#rankings/countries_by_commodity, 2021

Franco-Lara,E.,Link,H.,andWeuster-Botz,D.(2006).Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm. ProcessBiochem. 41,2200–2206. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.024

Gao, Y., Li, D., Liu, Y. (2012). Production of single cell protein from soy molasses using Candida tropicalis. Annals of Microbiology 62:1165–1172. https://doi.org/10.1007/s13213-011-0356-9

Garcia-Alamill, P., Salgado-Cervantes, M.A., Barel, M., Berthomia, G., Rodriguez-Jimenes, G.C., Garcia-Alvarado, M.A. (2007) Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. J. Food Fng. 79, 1159-1165. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.005

Garcia-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L., Cornelis, P. (2010). Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. Applied Microbiology and Biotechnology, 87:2281–2292. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2698-9

Gautam, R.K., Soni, S., Chattopadhyaya, M.C. (2015). Functionalized magnetic nanoparticles for environmental remediation. Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering. IGI Global, pp. 518 551. https://doi.org/10.4018/978-1-4666-6363-3.ch024

Genchi, G.; Carocci, A.; Lauria, G.; Sinicropi, M.S.; Catalano, A. (2020).Nickel: Human

health and environmental toxicology. Int. Environ. Res. Public Health, 17, 679. https://doi.org/10.3390/ijerph17030679

Gerbino, E., Carasi, P., Tymczyszyn, E., Gómez-Zavaglia, A. (2014). Removal of cadmium by Lactobacillus kefir as a protective tool against toxicity. Journal of Dairy Research 81 280–287. https://doi.org/10.1017/S0022029914000314

Ghorbani, F., Younesi, H., Ghasempouri, S.M., Zinatizadeh, A.A., Amini, M., Daneshi, A. (2008). Application of response surface methodology for optimization of cadmium biosorption in an aqueous solution by Saccharomyces cerevisiae. Chemical Engineering Journal 145, 267–275. https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.04.028

Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: a case study from Colombia. International Journal of Environmental Science and Technology, 19(4), 2455–2476. https://doi.org/10.1007/s13762-021-03299-x

Ginatta, G., Vignati, F., Del Carmen Rodríguez, M. (2020). Observatorio del cacao fino y de aroma para américa latina. Iniciativa Latinoamericana del Cacao: Boletín No. 8. Caracas:CAF. https://scioteca.caf.com/handle/123456789/1530

Gong, Y., Zhao, D., & Wang, Q. (2018). An overview of field-scale studies on remediation of soil contaminated with heavy metals and metalloids: Technical progress over the last decade. Water Research, 147, 440–460. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.024

Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Paniagua, J. C., Armengot, L., Schneider, M., Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. Science of the Total Environment, 580, 677–686. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014

Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. Science of the Total Environment, 612, 370–378. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145

Guerra, B. E., Ximena, A., Meza, S., Sebastián, L., González, M., Patricia, S., & Rangel, B. (2014). Ensayos preliminares in vitro de biosorción de cadmio cepas fúngicas nativas de suelos contaminados. Innovaciencia, 2(1), 53–58. https://doi.org/10.15649/2346075X.256

Guo, B., Liang, Y. C., Zhu, Y. G., & Zhao, F. J. (2007). Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (Oryza sativa) subjected to cadmium stress. Environmental Pollution, 147, 743–749. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.007

Guo, J., Zhang, X. (2004). Metal–ion interactions with sugars. The crystal structure and FTIR study of an SrCl2–fructose complex. Carbohydr. Res. 339, 1421–1426. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.03.004

Gupta, S., Bhathena, Z. (2020). Optimization of Culture Media and Conditions Enhances Mannan Oligosaccharides Production of Wickerhamomyces anomalus SZ1 Strain. Int. J. Curr.Microbiol.App.Sci. 9(5): 3104-3117. https://doi.org/10.1007/s12257-008-0248-4

Gupta, V.K., Nayak, A., Agarwal, S. (2015). Bioadsorbents for remediation of heavy metals: current status and their future prospects. Environ. Eng. Res. 20 (1), 1 18. https://doi.org/10.4491/eer.2015.018

Gupte, M., Kulkarni, P.(2003). A study of antifungal antibiotic production by Streptomyces chattanoogensis MTCC 3423 using full factorial design. Lett Appl Microbiol; 35 (1) :22-6. https://doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01119.x

Hadiani, M.R., Darani, K.K., Rahimifard, N., Younesi, H. (2018). Biosorption of low concentration levels of Lead (II) and Cadmium (II) from aqueous solution by Saccharomyces cerevisiae: Response surface methodology. Biocatal. Agric. Biotechnol.15, 25-34. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.001

Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 211, 111887. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887

Hamid, Y., Tang, L., Irfan, M., Cao, X., Hussain, B., Zahir, M., Usman, M., He, Z., Yang, X. (2019). An explanation of soil amendments to reduce cadmium phytoavailability and transfer to food chain. Science of the Total Environment, 660, 80–96. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.419

Hasan, H.A., Sheikh, S.R., Tan, N., Yeoh, S.J. (2016). Interaction of environmental factors on simultaneous biosorption of lead and manganese ions by locally isolated Bacillus cereus. J. Ind. Eng. Chem. 37, 295-305. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.03.038

Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Matraszek, R. (2015). Exogenous malic and acetic acids reduce cadmium phytotoxicity and enhance cadmium accumulation in roots of sunflower plants. Plant Physiology and Biochemistry, 94 (2015) 225e234. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.012

Helmke, P.A. (1999). Chemistry of Cadmium in Soil Solution. In: McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (eds) Cadmium in Soils and Plants. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 85. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_3

Hlihor, R.M., Figueiredo, H., Tavares, T., Gavrilescu, M. (2017). Biosorption potential of dead and living Arthrobacter viscosus biomass in the removal of Cr(VI): batch and column studies. Process Saf. Environ. Prot. 108, 44–56. https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.06.016

Ho, V. T. T., Zhao, J., Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. International Journal of Food Microbiology, 174, 72–87. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014

Holm, P. E., Christensen, T. H., Tjell, J. C., McGrath, S. P. (1995). Heavy metals in the environment: speciation of cadmium and zinc with application to soil solutions. Journal of Environmental Quality, 24, 183–190. https://www.researchgate.net/publication/250106584_Speciation_of_Cadmium_and_Zinc_with_Application_to_Soil_Solutions

Hoseini, S. M., Zargari, F. (2013). Cadmium in plants: a review. International Journal of Farming and Allied Science, 2, 2002–2004. http://ijfas.com/wp-content/uploads/2013/09/579-581.pdf

Huang, H., Jia, Q., Jing, W., Dahms H-U., Wang, L. (2020). Screening strains for microbial biosorption technology of cadmium. Chemosphere 251, 126428. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126428

Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., & Salminen, S. (2006). Probiotic bacteria as potential detoxification tools: Assessing their heavy metal binding isotherms. Canadian Journal of Microbiology, 52(9), 877–885. https://doi.org/10.1139/w06-043

Ibrahim, W.M. (2011). Biosorption of heavy metal ions from aqueous solution by red macroalgae. J. Hazard. Mater. 192, 1827–1835. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.019

Illeghems, K., Pelicaen, R., De Vuyst, L., Weckx, S. (2016). Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of Acetobacter ghanensis and Acetobacter senegalensis to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach. Food Microbiol. 58: 68–78

International Cocoa Organization (ICCO) (2018). As a working definition under the International Cocoa Agreement, 2010. Berlin, Germany. https://www.icco.org/wp-content/uploads/FFP-5-2-Rev.1-A-Working-Definition-of-Fine-or-Flavour-Cocoa-English.pdf

International Cocoa Organization (ICCO) (2022). Cocoa market report december 2022. https://www.icco.org/wp-content/uploads/ICCO-Monthly-Cocoa-Market-Report-December-2022.pdf

International Cocoa Organization (ICCO) (2022). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLVIII, No. 4, Cocoa year 2021/22. Published: 30-11-22. https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-XLVIII-No.-4.pdf

International Cocoa Organization (ICCO)(2020). Report of the meeting of the ad hoc panel on the review of annex c of the ica, 2010. Producing countries exporting either exclusively or partially fine or flavour cocoa. December 2020. https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/

Ishaq, S., Jafri, L. (2017). Biomedical Importance of Cocoa (Theobroma cacao): Significance and Potential for the Maintenance of Human Health. Matrix Science Pharma, 1(1), 1–5. https://doi.org/10.26480/msp.01.2017.01.05

Jacome, D., Fernandez, J., & Rrodriguez, A. (2016). Dinámica del cadmio en plantas de cacao micorrizadas en suelos del tropico. Memorias Del XXI Congreso Latinoamericano de La Ciencia Del Suelo. 24-28 de octubre 2016. Quito - Ecuador, 113–119.

Jalbani, N., Kazi, T.G., Afridi, H.I. and Arain, M.B. (2009) Determination of Toxic Metals in Different Brands of Chocolates and Candies, Marketed in Pakistan. Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry, 10, 48- 52.

Ji, Y., Zhou, Y., Ma, C., Feng, Y., Hao, Y., Rui, Y., Wu, W., Gui, X., Le, V. N., Han, Y., Wang, Y., Xing, B., & Liu, L. (2017). Jointed toxicity of TiO 2 NPs and Cd to rice seedlings: NPs alleviated Cd toxicity and Cd promoted NPs uptake. Plant Physiology and Biochemistry, 110, 82–93. https://doi.10.1016/j.plaphy.2016.05.010

Jiang, L.; Zhou, W.; Liu, D.; Liu, T.; Wang, Z. (2017). Biosorption isotherm study of Cd2+, Pb2+ and Zn2+ biosorption onto marine bacterium Pseudoalteromonas sp. SCSE709-6 in multiple systems. J. Mol. Liq, 247, 230–237. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.09.117

Jiménez-Tobón, C. S. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (Theobroma cacao): fantasía o realidad. Producción + Limpia, 10(1), 89–104.

John, W.A., Böttchera, N.L., Aßkampa, M., Bergounhou, A, Kumaria, N., Ho, P-W., D'Souzaa R.N., Nevoigt, Elke., Ullrich, M.S (2019). Forcing fermentation: Profiling proteins, peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation . Food Chemistry 278, 786–794. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.108

Joshi, J., Dhungana, P., Prajapati, B., Maharjan, R., Poudyal, P., Yadav, M., Mainali, M.,Yadav, A.P., Bhattarai, T., Sreerama, L. (2019). Enhancement of Ethanol Production in Electrochemical Cell by Saccharomyces cerevisiae (CDBT2) and Wickerhamomyces anomalus (CDBT7). Frontiers in Energy Research, 7, ISSN 2296-59. https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00070

Jürgen, H.A., Díaz, V. (2010). Growth and production of cacao. Soils, Plant Growth and Crop Production Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), 3.

Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T.S., Khaled, J.M., Alharbi, N.S., Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of Bacillus amyloliquefaciens. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 14:9. https://doi.org/10.1186/s12941-015-0069-1

Kadjo, A.C., Beugre, G.C., Sess-Tchotch, D-A., Kedjebo, K.B., Mounjouenpou, P., Durand, N., Fontana, A., Guehi, S.T. (2023). Screening of Anti-fungal Bacillus Strains and Influence of their Application on Cocoa Beans Fermentation and Final Bean Quality. J. Adv. Microbiol 23 (1), 8-17

Kaewsarn, P.; Yu, Q. (2001). Cadmium (II) removal from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga Padina sp. Environ. Pollut. 112, 209–213. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00114-7

Kang, C.H., Kwon, Y.J., So, J.S. (2016).Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. Ecological Engineering, 89, 64-69. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023

Kapahi, M., Sachdeva, S. (2019). Bioremediation Options for Heavy Metal Pollution. Journal of Health & Pollution, 9(24). https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191203

Karimpour, M., Ashraf, S. D., Taghavi, K., Mojtahedi, A., Roohbakhsh, E., & Naghipour, D. (2018). Adsorption of cadmium and lead onto live and dead cell mass of Pseudomona aeruginosa : A dataset. Data in Brief, 18, 1185–1192.

https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.014

Karthik, C., Ramkumar, V.S., Pugazhendhi, A., Gopalakrishnan, K., Arulselvi, P.I. (2017). Biosorption and biotransformation of Cr (VI) by novel Cellulosimicrobium funkei strain AR6. J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 70, 282–290. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.11.006

Kasiuliene, A., & Paulauskas, V. (2013). In-situ phytoremediation: a review of natural and chemically assisted phytoextraction. Research for Rural Development. Latvia University of Agriculture, 1, 107–113.

Kathal, R., Malhotra, P., & Chaudhary, V. (2016). Phytoremediation of Cadmium from Polluted Soil. Journal of Bioremediation & Biodegradation, 07(06), 6–8. doi: https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000376

Katz, D.L., Doughty, K., Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. Antioxid Redox Signal. 15;15(10):2779-811. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3697

Kepenek, E.S., Gozen, A.G., Severcan, F. (2018). Molecular characterization of acutely and gradually heavy metal-acclimated aquatic bacteria by FTIR spectroscopy. J. Biophot. https://doi.org/10.1002/jbio.201800301

Khanniri, E., Yousefi, M., Mortazavian, A.M., Khorshidian, N., Sohrabvandi, S., Koushki, M.R., Esmaeili, S. (2023). Biosorption of cadmium from aqueous solution by combination of microorganisms and chitosan: response surface methodology for optimization of removal conditions. Journal of Environmental Science and Health, Part A,58 (5) 433–446. https://doi.org/10.1080/10934529.2023.2188023

Kirillova, A.V., Danilushkina, A.A., Irisov, D.S., Bruslik, N.L., Fakhrullin, R.F., Zakharov, Y.A., Bukhmin, V.S., Yarullina, D.R., (2017). Assessment of resistance and bioremediation ability of Lactobacillus strains to lead and cadmium. Internet J. Microbiol. 1–7. https://doi.org/10.1155/2017/9869145

Knezevic, G. (1979). Heavy-metals in foodstuffs 1. Content of cadmium in raw cocoa sedes and cocoa based semi-finished and finished products. Dtsch Leb. 75 (10), 305–309.

Knop, M. (2011). Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. C. R. Biologies 334, 599–606. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069111001405

Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B., Niamke, S. (2017). Diversity of Yeasts Involved in Cocoa Fermentation of Six Major Cocoa-Producing Regions in Ivory Coast. European Scientific Journal 13(30). https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n30p496

Koné, M.K., Guéhi, S.T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A.F., Brou, K., Boulanger, R., Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. Food Res. Int. 89, 910-917. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010

Kongor, J.E., Hinneh, M., De Walle, D. Van, Afoakwa, E.O., Boeckx, P., Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (Theobroma cacao) bean flavour profile - A review. Food Res. Int. 82:44–52.

https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012

Kot, A.M., Błażejak, S., Kurcz, A., Bryś, J., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Maliszewska, M., Reczek, L. (2017).Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by Rhodotorula glutinis. Electronic Journal of Biotechnology. 27:25–31. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.007

Kouame, L.M., Doue, G.G., Adom, N.J., Ouattara, H.G., Niamke, S.L. (2015b). Biochemical characterization of microbial populations involved in Loh-Djiboua cocoa's fermentation in Cote d'Ivoire. Food and Environment Safety, 14, 196-205.

Kouame, L.M., Koua, G.A.Y., Adom, N.J., Goualié, B.G., Niamke, S.L. (2015a). Cocoa fermentation from Agnéby-Tiassa; Biochemical study of microflora. American Journal of BioScience, 3, 203-211. https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20150306.12

Kruszewski, B., Obiedziński, M. W., Kowalska, J. (2018). Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. J Food Compos Anal 66, 127-135. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.012

Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. (2014). Rhizoremediation a beneficial plant-microbe interaction. Mol. Plant-Microbe Interact. 17, 6–15. https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.6

Kure, J., Gana, M., Ukubuiwe, C. C. (2018). Bacteria associated with heavy metal: a review. IJABR, 9(1), 134–148.

Kurtzman, C. P., Robnett C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Leeuwenhoek 73:331-371. http://dx.doi.org/10.1023/a:1001761008817

Lajayer, B.A., Moghadam, N.K., Maghsoodi, M.R., Ghorbanpour, M., Kariman, K. (2019). Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil, water and atmosphere using ornamental plants: mechanisms and efficiency improvement strategies. Env. Sci. Pollut. Res. 26 (9), 8468 8484. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04241-y

Lamb, D.T., Ming, H., Megharaj, M., Naidu, R. (2010). Relative tolerance of a range of Australian native plant species and lettuce to copper, zinc, cadmium, and lead. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 59, 424–432. https://doi.org/10.1007/s00244-010-9481-x

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M., (Eds.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: John Wiley and Sons, p. 115-175.

Lata, S., Kaur, H.P., Mishra, T (2019). Cadmium bioremediation: a review Int. J. Pharm. Sci. Res., 10, pp. 4120-4128. http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(9).4120-28

Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during

spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. Food Microbiol. 28(3):457–464. 10.1016/j.fm.2010.10.010

Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media to compose a starter culture for cocoa bean fermentation. Appl Environ Microbiol, 76(23): 7708–7716. doi: 10.1128/AEM.01206-10

Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., Umaharan, P.(2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in Theobroma cacao L. Sci Total Environ 640-641, 696-703, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365

Li, J., , Liu, Y.R., Zhanga, L.M., He, J.Z. (2019). Sorption mechanism and distribution of cadmium by different microbial species. Journal of Environmental Management 237, 552–559. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.057

Li, L-Z., Tu, C., Peijnenburg, W.J.G.M., Luo, Y.-M. (2017). Characteristics of cadmium uptake and membrane transport in roots of intact wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. Environmental Pollution, 221, 351–358. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.085

Li, M., Cheng X, H. Guo, H. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil, Int. Biodeterior. Biodegrad. 76, 81–85. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.016

Li, W., Xu, B., Song, Q., Liu, X., Xu, J., Brookes, P.C. (2014). The identification of ´hotspots´ of heavy metal pollution in soil-rice systems at regional scale in eastern China. Sci. Total Environ. 472, 407–420. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.046

Li, X., Li, D., Yan, Z., Ao, Y., (2018b). Adsorption of cadmium by live and dead biomass of plant growth-promoting rhizobacteria. RSC Adv. 8 https://doi.org/10.1039/C8RA06758A

Li, X., Li, D., Yan, Z., Ao, Y., (2018c). Biosorption and bioaccumulation characteristics of cadmium by plant growth-promoting rhizobacteria. RSC Adv. 8, 30902–30911. https://doi.org/10.1039/C8RA06270F

Li, X., Zhang, X., Yang, Y., Li, B., Wu, Y., Sun, H., & Yang, Y. (2016). Cadmium accumulation characteristics in turnip landraces from China and assessment of their phytoremediation potential for contaminated soils. Frontiers in Plant Science, 7, 1–10. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01862

Li, Z., Wu, L., Luo, Y., & Christie, P. (2018a). Changes in metal mobility assessed by EDTA kinetic extraction in three polluted soils after repeated phytoremediation using a cadmium / zinc hyperaccumulator. Chemosphere, 194, 432–440. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.005

Lima, L.J R., Velpen, V., Wolkers-Rooijackers, Judith., Kamphuis, H.J., Zwietering, M.H, Nout, M.J. (2012). Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder. Appl Environ Microbiol 78(8):2904-13 https://doi.org/10.1128/AEM.07691-11

Liu, S. (2017). Chapter 1 - Introduction, Editor(s): Shijie Liu, Bioprocess Engineering (Second Edition), Elsevier, 1-20, ISBN 9780444637833

Lu, K., Yang, X., Gielen, G., Bolan, N., Ok, Y.S., Niazi, N.K., Xu, S., Yuan, G., Chen, X., Zhang, X., Liu D., Song, Z., Liu, X., Wang, H. (2017). Effect of bamboo and rice straw biochars on the mobility and redistribution of heavy metals (Cd, Cu, Pb and Zn) in contaminated soil. J. Environ. Manag., 186, pp. 285-292, https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.068

Lu, Y., Li, T., Xie, W., Liu, Z., Cao, J., Wang, J. (2018). Removal of Zn(II) from aqueous solutions by Burkholderia sp. TZ-1 isolated from soil of oil shale exploration area. J. Environ. Chem. Eng. 6 https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.10.049

Machuca-Guevara, J.I., Suárez-Peña, E.A., Darricau, E.M, Mialhe-Matonnier., E.L. (2019). Caracterización molecular de los microorganismos presentes durante el proceso fermentativo de los granos de cacao (Theobroma cacao). Revista peruana de biología 26(4): 535 - 542. http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i4.17220

Maddela, N. R., Kakarla, D., García, L. C., Chakraborty, S., Venkateswarlu, K., Megharaj, M. (2020). Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy : A critical view. 720, 137645. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137645

MADR. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. (2020). Informe de Gestión Institucional 2019.Bogotá. D.C.

MADR. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. (2023). Plan de ordenamiento productivo. Análisis situacional de la cadena productiva del cacao y su agroindustria en Colombia.

Martin, M. Á., Ramos, S. (2021). Impact of cocoa flavanols on human health. Food and Chemical Toxicology, 151(112121). https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112121

Martínez M, Gutierrez V, Novo R. (2010). Microbiología aplicada al manejo sustentable de suelos y cultivos p 182-235. Editorial USM. Serie: Gestión, Innovación y Tecnología. Universidad Técnica Federico Santa María. Santiago, Chile.

Martínez, G., Palacio, C. (2010) Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y granos de cacao fresco y fermentado mediante espectroscopia de absorción atómica de llama [Tesis de Pregrado]. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. http://noesis.uis.edu. co/bitstream/123456789/3703/1/136115.pdf

Martins, S.C.S., Aragão, V.O., Martins, C.M. (2014). Pichia spp. yeasts from Brazilian industrial wastewaters: Physiological characterization and potential for petroleum hydrocarbon utilization and biosurfactant production. African Journal of Microbiology Research. 8(7): 664-672. https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6037

Martos, M.A., Butiuk, A.P., Rojas, N.L., Hours, R.A. (2014). Cultivo por lote de Wickerhamomyces anomalus en un biorreactor a escala laboratorio para la producción de una poligalacturonasa. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVI No. 2, 68-73.

Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. Current

Opinion in Plant Biology, 3(2), 153–162. https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00054-0

Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G. (2016) Tuning chocolate flavour through development of thermotolerant Saccharomyces cerevisiae starter cultures with increased acetate ester production. Appl Environ Microbiol 20;82(2):732-46. https://doi.org/10.1128/AEM.02556-15

Mejía, D [Ed]. (2012). CACAO - Operaciones Poscosecha. México: GST/FAO

Mendoza, M.M., Lizarazo-Medina, P.X. (2021). Assessment of the fungal community associated with cocoa bean fermentation from two regions in Colombia. Food Research International 149, 110670. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110670

Mendoza, M.M., Martínez, O.L., Ardila, M.P., Lizarazo, P.X (2022). Bioprospecting of indigenous yeasts involved in cocoa fermentation using sensory and chemical strategies for selecting a starter inoculum. Food Microbiology 101,103896. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103896

Meng, D., Li, J., Liu, T., Liu, Y., Yan, M., Hu, J., Li, X., Liu, X., Liang, Y., Liu, H., & Yin, H. (2019). Effects of redox potential on soil cadmium solubility: Insight into microbial community. Journal of Environmental Sciences (China), 75, 224–232. https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.032

Meter, A., Atkinson, R., Laliberte B. (2019). Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe - Análisis de La Investigación y Soluciones Potenciales Para La Mitigación. Roma. Bioversity International. https://scioteca.caf.com/handle/123456789/1505

Meunier, N., Laroulandie, J., Blais J.F., Tyagi, R.D. (2003). Cocoa shells for heavy metal removal from acidic solutions. 90(3):255-263. https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00129-9

Mewa-Ngongang, Maxwell., Du Plessis, Heinrich Wilbur., Boredi, Chidi Silas., Hutchinson, Ucrecia Faith., Obed Ntwampe, Karabo Seteno., Okudoh, Vincent Ifeanyi., Jolly, Neil Paul. (2021). Physiological and Antagonistic Properties of Pichia kluyveri for Curative and Preventive Treatments Against Post-Harvest Fruit Fungi. Pol. J. Food Nutr. Sci.71(3):245–253. https://doi.org/10.31883/pjfns/139278

MIDAGRI. (2022). Observatorio de Commodities- Cacao. Boletín Trimestral No. 01-2022. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego Perú. https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3561419/Commodities Cacao%3A ene-mar 2022.pdf

Mieres, A.A. (2017). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de una poliglacturonasa microbiana y su aplicación en procesos de interés regional. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Itapúa, Paraguay.

Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., Nazamid, S. (2003). Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. Int. J. Food Sci. Tech. 38, 285-295. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00674.x

Moens, F., Lefeber, T., De Vuyst, L. (2014). Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of Acetobacter pasteurianus during Cocoa Bean Fermentation. Appl Environ Microbiol. 80(6): 1848–1857. https://doi.org/10.1128/AEM.03344-13

Monachese, M. A. (2012b). Sequesteration of lead, cadmium and arsenic by Lactobacillus species and detoxication potential. Electronic Thesis and Dissertation Repository. 729. https://ir.lib.uwo.ca/etd/729

Monachese, M., Burton, J. P., Reid, G. (2012a). Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes : a Potential Role for Probiotics ?. Applied and Environmental Microbiology, 78(18), 6397–6404. https://doi.org/10.1128/AEM.01665-12

Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., Donadio, S. (2002). New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiology Ecology 42, 419-429. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00353-7

Morales-Rodríguez, W. J., Carranza-Patiño, M. S., Morante-Carriel, J. A., Castro, A. B. (2022). Mitigation of Cadmium Concentration in Cocoa Kernels. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 13(3), 734–740. https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.03.110

Moreira, I.M., Vilela, L., Miguel, M.G., Santos, C., Lima, N., Schwan, R. (2017). Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. Molecules 22, 766. https://doi.org/10.3390/molecules22050766

Moreira, I.M.V.; Pedrozo, M.G.C.; Duarte, M.W.F.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. Food Research International, 54: 9–17. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001

Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P.R., Guiraud, J-P. (2008). Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. Int. J. Food Microbiol. 121, 234-241. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.017

Mrmošanin, J.M., Pavlović, A.N., Krstić, J.N., Mitić, S.S., Tošić, S.B., Stojković, M.B., Micić, R.J., Đorđević, M.S. (2018). Multielemental quantification in dark chocolate by ICP OES. J Food Compos Anal 67, 163-171. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.008

Nagvenkar, G. S., and Ramaiah, N. (2010). Arsenite tolerance and biotransformation potential in estuarine bacteria. Ecotoxicology 19, 604–613. https://doi.org/10.1007/s10646-009-0429-8

Naik, M.M., Pandey, A., Dubey, S.K. (2012). Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant Enterobacter cloacae strain P2B. Biodegradation 23, 775–783. https://doi.org/10.1007/s10532-012-9552-y

Nair, K.P.P (2010). Cocoa (Theobroma cacao L.), Editor(s): Nair, K.P. P. in The Agronomy

and Economy of Important Tree Crops of the Developing World, Elsevier, 131-180, ISBN 9780123846778, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384677-8.00005-9

Naja, G., Volesky, B. (2011). The Mechanism of Metal Cation and Anion Biosorption. In: Kotrba, P., Mackova, M., Macek, T. (eds) Microbial Biosorption of Metals. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5_3

Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Rodriguez, L.A., Toro, M.E., Castellanos, L.I., Vázquez, F. (2015). Antifungal modes of action of Saccharomyces and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. International Journal of Food Microbiology. 204 (2) 91-100. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.024

Naskar, A., Majumder, R., and Goswami, M. (2020). Bioaccumulation of Ni (II) on growing cells of Bacillus sp.: response surface modeling and mechanistic insight. Environ. Technol. Innov. 20:101057. https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101057

Nava-Ruiz, C., Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). Arch. Neurocienc. 16 (3), 140 147.

Nazar, R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, M. I. R., Syeed, S., Khan, N. A. (2012). Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. American Journal of Plant Sciences, 3, 1476-1489. https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310178

Nicula, N.-O.; Lungulescu, E.-M.; Rîmbu, G.A.; Marinescu, V.; Corbu, V.M.; Csutak, O. (2023). Bioremediation of Wastewater Using Yeast Strains: An Assessment of Contaminant Removal Efficiency. Int. J. Environ. Res. Public Health, 20, 4795. https://doi.org/10.3390/ijerph20064795

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

Nigam, P., Singh, A. (2014). Cocoa and Coffee Fermentations. pp. 485-492. En: Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd ed., (Ed. Batt, C.A y Tortorello, M.L.). Academic Press. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00074-4

Nighojkar, S.; Phanse, Y.; Sinha, D.; Nighojkar, A.; Kumar, A. (2006). Production of polygalacturonase by immobilized cells of Aspergillus niger using orange peel as inducer. Process Biochem. 41(5):1136-1140. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.009

Nnuro,W.A., Amankwaah, D., Awudza, J.A.M., Afful, S. (2020). Assessment of heavy metals and proximate analysis of cocoa beans from selected cocoa growing areas in Ghana. Int Res J Pure Appl Chem. 21 (14), 36–46. https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i1430245

Norvell, W. A., Hopkins, J. W., Welch, R. M. (2000). Association of cadmium in durum wheat grain with soil chloride and chelate-extractable soil cadmium. Soil Sci. Soc. Am. J., 64, 162–2168. https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6462162x

Olaniran, A. O., Balgobind, A., & Pillay, B. (2013). Bioavailability of Heavy Metals in Soil : Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. Int. J. Mol. Sci, 14, 10197–10228. https://doi.org/10.3390/ijms140510197

Ordoñez-Araque, R., Landines-Vera, E., Urresto-Villegas, J., Caicedo-Jaramillo, C. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: systematic review. Foods and Raw Materials, 8 (1). http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-155-162

Ostovar, K., Keeney, P. G. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. Journal of Food Science, 38:611–617. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02826.x

Otárola, A. (2018). Efecto de la enzima pectinolítica y levadura (Saccharomyces cerevisiae) en la fermentación y calidad del cacao Var. criollo (Theobroma cacao) [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú. https://repositorio.unfv.edu.pe/handle/20.500.13084/2412

Ouattara, H.G., Elias, R.J., Dudley, E.G. (2020). Microbial synergy between Pichia kudriazevii YS201 and Bacillus subtilis BS38 improves pulp degradation and aroma production in cocoa pulp simulation medium. Heliyon 6e03269. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03269

Ouattara, H.G., Koffi, B.L., Karou, G.T., Sangare, A., Niamke, S.L., Diopoh, J.K. (2008). Implication of Bacillus sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. World J Microbiol Biotechnol, 24:1753–60. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9683-9

Ouattara, H.G., Reverchon, S., Niamke, S.L., Nasser, W. (2011). Molecular identification and pectate lyase production by Bacillus strains involved in cocoa fermentation. Food Microbiol ;28:1–8. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.020

Pacheco-Montealegre, M. E., Davila-Mora, L. L., Botero-Rute, L. M., Reyes, A., Caro-Quintero, A. (2020). Fine Resolution Analysis of Microbial Communities Provides Insights Into the Variability of Cocoa Bean Fermentation. Frontiers in Microbiology, 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00650

Pande, V., Pandey, S.C., Sati, D., Bhatt, P., Samant, M. (2022). Microbial Interventions in Bioremediation of Heavy Metal Contaminants in Agroecosystem, 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084

Papalexandratou Z, Kaasik K, Villagra LK, Skorstengaard A, Bouillon G, Espensen JL, Hansen LH, Jakobsen RR, Krych AB, Castro-Mejia JL, Nielsen DS (2019). Linking cocoa varietals and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa quality appreciation. Int J Food Microbiol. 304:106-118. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.012

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrian, B., Lee, O. S., Daniel, H.-M., De Vuyst, L. (2013). Hanseniaspora opuntiae, Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus fermentum, and Acetobacter pasteurianus predominate during well-performed Malaysian cocoa box bean fermentation, underlining the importance of these microbial

species for a successful cocoa bean fermentation process. Food Microbiology, 35:73–85. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015

Papalexandratou, Z.; Falony, G.; Romanens, E.; Jimenez, J.C.; Amores, F.; Daniel, H. M.; De Vuyst, L. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 77: 7698–7714. https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11

Park, J.H., Chon, H.T. (2016). Characterization of cadmium biosorption by Exiguobacterium sp. isolated from farmland soil near Cu-Pb-Zn mine. Environ. Sci. Pollut. Res. 23 https://doi.org/10.1007/s11356-016-6335-8

Pereira, G.V., Magalhães, K., De Almeida, E., Coelho, I., Schwan, R.F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. Int J Food Microbiol. 1;161(2):121-33. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018

Pereira, G.V., Miguel, M., Ramos, C.L., Schwan, R.F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. Appl Environ Microbiol, 78(15): 5395–5405. doi: 10.1128/AEM.01144-12

Pérez-Moncada, U.A., Ramírez-Gómez, M., Serralde-Ordoñez, D.P., Peñaranda-Rolón, A.M., Wilches-Ortiz, W.A., Ramírez, L., Rengifo-Estrada, G.A. (2019) Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) como estrategia para reducir la absorción de cadmio en plantas de cacao (Theobroma cacao). Terra Latinoam, 37, n.2, pp.121-130. ISSN 2395-8030.https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.479

Pervaiz, I., Ahmad, S., Madni, M. A., Ahmad, H., and Khaliq, F. H. (2013). Microbial biotransformation: a tool for drug designing. Appl. Biochem. Microbiol. 49, 437–450. https://doi.org/10.7868/s0555109913050097

Perry, S. F. (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. Molecular Biotechnology, 9(1), 59-64. https://doi.org/10.1007/BF02752697

Pino, A.J., Ceballos, L., Quijano, C.E. (2011): Headspace volatiles of Theobroma cacao L. pulp from Colombia. J. Essent. Oil Res. 22, 113-115. https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700276

Plackett RL, Burman JP (1946) The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 33:305–325. https://doi.org/10.2307/2332195

Podstawczyk, D., Witek-Krowiak, A., Dawiec, A., Bhatnagar, A. (2015). Biosorption of copper (II) ions by flax meal: empirical modeling and process optimization by response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) simulation. Ecol. Eng. 83, 364–379. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.004

Prabhakaran N. (2010). Cocoa (Theobroma cacao L.). Prabhakaran N. (Eds). In The agronomy and economy of important tree crops of the developing world, pp. 131-180. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384677-8.00005-9

Predan, G.M.I., Lazăr, D.A., Lungu, I.I. (2019). Cocoa industry—from plant cultivation to cocoa drinks production. pp. 489-507. En: Caffeinated and Cocoa Based Beverages, Vol 8., (Ed. Grumezescu, A.M., Holban, A.M.) Woodhrad Publising, Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00015-5

Qiao, J., Liu, T., Wang, X., Li, F., Lv, Y., Cui, J., Zeng, X., Yuan, Y., & Liu, C. (2018). Simultaneous alleviation of cadmium and arsenic accumulation in rice by applying zero-valent iron and biochar to contaminated paddy soils. Chemosphere, 195(808), 260–271. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.081

Quiroga-Mateus, R., López-Zuleta, S., Chávez, E., Bravo, D. (2022). Cadmium-Tolerant Bacteria in Cacao Farms from Antioquia, Colombia: Isolation, Characterization and Potential Use to Mitigate Cadmium Contamination. Processes, 10, 1457, https://doi.org/10.3390/pr10081457

Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Allah, E. F. A. (2017). Bacillus : A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. Frontiers in Physiology, 8, 667. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667

Radziemska, M. (2017). Management Strategy for Stabilizing Trace Elements in Contaminated Soils. Int. J. Environ. Res. Public Health, 14(958). https://doi.org/10.3390/ijerph14090958

Raimondi, S., Foca, G., Ulrici, A., Destro, L., Leonardi, A., Buzzi, R., Candeliere, F., Rossi, M., Amaretti, A. (2022). Improved fed-batch processes with Wickerhamomyces anomalus WC 1501 for the production of d-arabitol from pure glycerol. Microbial Cell Factories, 21:179. https://doi.org/10.1186/s12934-022-01898-y

Ramos, C., Dias, D., Da Cruz Pedrozo, M.G., Schwan, R.F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (Theobroma cacao L.) and S. cerevisiae UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. Food Research International 64, 908–918. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033

Ramrakhiani, L., Ghosh, S., Majumdar, S. (2016). Surface modification of naturally available biomass for enhancement of heavy metal removal efficiency, upscaling prospects, and management aspects of spent biosorbents: a review. Appl. Biochem. Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s12010-016-2083-y

Ramstedt, M., Leone, L., Persson, P., Shchukarev, A., 2014. Cell wall composition of Bacillus subtilis changes as a function of pH and Zn2þ exposure: insights from cryo-XPS measurements. Langmuir 30. https://doi.org/10.1021/la5002573

Ramtahal, G., Chang-yen, I., Bekele, I., Harrynanan, L. (2012). Investigation of the effects of mycorrhizal fungi on cadmium. Proceedings of the Caribbean Food Crops Society, 48, 147–152. . https://doi.org/10.22004/ag.econ.253720

Ramtahal, G., Umaharan, P., Hanuman, A., Davis, C., Ali, L. (2019). The effectiveness of soil amendments, biochar and lime, in mitigating cadmium bioaccumulation in Theobroma cacao L. Science of the Total Environment, 693, 133563

Ramtahal, G., Yen, I. C., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L. (2016). Relationships between

Cadmium in Tissues of Cacao Trees and Soils in Plantations of Trinidad and Tobago. Food and Nutrition Sciences, 7(January), 37–43. https://doi.org/10.4236/fns.2016.71005

Rani, A., and Goel, R. (2009). “Strategies for crop improvement in contaminated soils using metal-tolerant bioinoculants,” In: Khan, M., Zaidi, A., Musarrat, J. (eds) Microbial Strategies for Crop Improvement (Berlin: Springer), 85–104. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-01979-1_5

Raza, A., Habib, M., Kakavand, S. N., Zahid, Z., Zahra, N., Sharif, R., & Hasanuzzaman, M. (2020). Phytoremediation of cadmium: Physiological, biochemical, and molecular mechanisms. Biology, 9(7), 1–46. https://doi.org/10.3390/biology9070177

Revoredo, A. G., Hurtado, J. (2017). Efecto del tratamiento con 3 cepas de Streptomicetos en la acumulación de cadmio en plantas de Theobroma Cacao L. 2017 International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Peru, 13-17 November.

Ríos, F., Ruiz, A., Lecaro, J., Rehpani C. (2017). Estrategias país para la oferta de cacaos especiales -Políticas e iniciativas privadas exitosas en el Perú, Ecuador, Colombia y República Dominicana. Fundación Swisscontact Colombia. Bogotá D. C. 140 p.

Roberts, T. L. (2014). Cadmium and phosphorous fertilizers: The issues and the science. Procedia Engineering, 83, 52–59. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.09.012

Rodriguez, H. (2017). Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/62944

Rodríguez-Albarracín, H. S. R., Contreras, A. E. D., Henao, M.C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. Geoderma Regional, 15, e00214. https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214

Rodríguez-López, C., Guzmán-Beltrán, A., Lara-Morales,M., Castillo., E., Brandão, P. (2021). Aislamiento e identificación de lactobacillus spp. (lactobacillaceae) resistentes a cd(ii) y as(iii) recuperados de fermento de cacao. Acta Biol Colomb, 26(1):19-29. http://dx.doi.org/10.15446/abc.v26n1.83677

Roşca, M., Hlihor, R.M., Cozma, P., Drăgoi, E.N., Diaconu, M., Silva, B., Tavares, T., Gavrilescu, M. (2018). Comparison of Rhodotorula sp. and Bacillus megaterium in the removal of cadmium ions from liquid effluents. Green Process Synth; 7: 74–88. https://doi.org/10.1515/gps-2016-0218

Sabae, S. Z., Hazaa, M., Hallim, S. A., Awny, N. M., & Daboor, S. M. (2006). Bioremediation of Zn+2, Cu+2 and Fe+2 using Bacillus subtilis D215 and Pseudomonas putida biovar A D225. Bioscience Research, 3(1), 189–204.

Sadiq, F.A. Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. Emir. J Food Agric., 18(5):1403–1436. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481

Salinas E, De Orellano ME, Rezza I, Martinez L, Marchesvky E, De Tosetti MS. (2000) Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by Rhodotorula rubra. Bioresour Technol 72:107–112. https:// doi. org/ 10. 1016/ S0960- 8524(99) 00111-X

Sánchez, V., Zambrano, J., Iglesias, C. (2019). La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe. https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5382

Sarbu, I. y Csutak, O. (2019). The microbiology of cocoa fermentation. pp. 463-446. In: Caffeinated and Cocoa Based Beverages, Vol 8., (Ed. Grumezescu, A.M., Holban, A.M.) Woodhrad Publising, Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1

Satarug, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., & Sens, D. A. (2010). Cadmium , Environmental Exposure , and Health Outcomes. Environmental Health Perspectives, 182(2), 182–190. https://doi.org/10.1289/ehp.0901234

Schwan, R. F., Pereira, G. V. D. M., Fleet, G. H. (2014). Microbial activities during cocoa fermentation. Cocoa and Coffee Fermentations, CRC Press Taylor and Francis, London, 125–135. https://www.researchgate.net/publication/285267847_Microbial_activities_during_cocoa_fermentation/link/5bab7e35299bf13e604cdd1c/download

Schwan, R. F., Rose, A.H.,Board, R.G. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 79, 96S-107S.

Schwan, R.F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. Applied and Environmental Microbiology, 64:1477–1483. https://doi.org/ 10.1128/AEM.64.4.1477-1483.1998

Schwan, R.F., Wheals, A.E. (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Crit Rev Food Sci Nutr 44, 205–221. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15462126/

Selvam, K., Arungandhi, B., Vishnupriya, B., Shanmugapriya, T., Yamuna, M. (2013). Biosorption of chromium (vi) from industrial effluent by wild and mutant type strain of saccharomy cescerevisiae and its immobilized form. Biosci. Discov. 4 (1), 72 77.

Shahpiri, A., Mohammadzadeh, A. (2018). Mercury removal by engineered Escherichia coli cells expressing different rice metallothionein isoforms. Ann. Microbiol. 68, 145–152. https://doi.org/10.1007/s13213-018-1326-2

Sharif, M., Zafar, M. H., Aqib, A. I., Saeed, M., Farag, M. R., Alagawany, M. (2021). Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. Aquaculture. 531. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885

Shi, L., Guo, Z., Peng, C., Xiao, X., Feng, W., Huang, B., & Ran, H. (2019). Immobilization of cadmium and improvement of bacterial community in contaminated soil following a continuous amendment with lime mixed with fertilizers: A four-season field experiment. Ecotoxicology and Environmental Safety, 171, 425–434.

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.006

Siddique, S., Shakir, H. A., Qazi, J.I., Tabinda, A.B., Irfan, M. (2016). Screening of some agri-wastes for economical cultivation of Candida tropicalis SS1. Punjab University Journal of Zoology. 31:31–37. 53-PUJZ-61028140/16/0031-0037

Singh, S., Gupta, V. K. (2016). Biodegradation and bioremediation of pollutants: perspectives strategies and applications. Int. J. Pharmacol. Bio. Sci, 10(1), 53–65.

Smolders, E., Brans, K., Foldi, A., & Merckx, R. (1999). Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. Soil Science Society of American Journal, 63(1), 78–85. https://doi.org/10.2136/sssaj1999.03615995006300010013x

Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. International Journal of Phytoremediation, 19(2), 133–141. https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598

Souza, J.V.B.; Silva, E.S.; Maia, M.L.S.; Teixeira, M.F. (2003). Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by Paecilomyces clavisporus 2A.UMIDA.1. Process Biochem. 39:455-458. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00092-X

Souza, K.S.,. Gudiña, E.J.,. Schwan, R.F., Rodrigues, L.R., Dias, D.R.,. Teixeira, J.A. (2018). Improvement of biosurfactant production by Wickerhamomyces anomalus CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. Journal of Hazardous Materials 346: 152–158. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.021

Spalvins, K., Geiba, Z., Kusnere, Z., Blumberga, D. (2020). Waste Cooking Oil as Substrate for Single Cell Protein Production by Yeast Yarrowia lipolytica. Environmental and Climate Technologies. 24(3):457–469. https://doi.org/10.2478/rtuect-2020-0116

Sreekumar, G., Krishnan, S.(2010). Enhanced biomass production study on probiotic Bacillus subtilis SK09 by medium optimization using response surface methodology. African Journal of Biotechnology. 9:8078–8084. https://doi: 10.5897/AJB10.1283

Srivastava, S., Agrawal, S., Mondal, M. (2015). Biosorption isotherms and kinetics on removal of Cr(VI) using native and chemically modified Lagerstroemia speciosa bark. Ecol. Eng. 85, 56–66. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.10.011

Stafussa, A.P., Maciel, G.M., da Silva, A.G., Vieira, M., Ferreira, A.A., Isidoro, C.W. (2016). Biosorption of anthocyanins from grape pomace extracts by waste yeast: kinetic and isotherm studies. J. Food Eng. 169, 53–60. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.08.016

Tantalean, E.(2017). Distribución del contenido de cadmio en los diferentes órganos del cacao ccn-51 en suelo aluvial y residual [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional Agraria de la Selva.Tingo María, Perú. https://doi.org/10.25127/aps.20172.365

Tao, N., Gao, Y. and Liu, Y. (2011). Isolation and characterization of a Pichiaanomala strain: a promising candidate for bioethanol production. Braz. J. Microbiol. 42: 668–675. https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000031

Tarbaoui, M., Oumam, M.M., Benzina, M. (2016). Study of competitive biosorption of Cu (II), Cd (II) and Pb (II) in aqueous solution onto a new biosorbent prepared from the marine sponge Cinachyrella tarentina. Proceed. RSE 1, 32e38.

Teneda, W. (2016). Mejoramiento del Proceso de Fermentación del Cacao (Theobroma cacao L.) Variedad Nacional y Variedad CCN51. Ecuador. Universidad Internacional de Andalucía. https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=664426

Thanh PB, Tru NV, Thi Thuy D, Thi Thoa N, Thao PV, Tham TT, Van Vo T (2017). Bacteria in Wooden Box Fermentation of Cocoa in Daklak. Vietnam. J. Microbiol Exp.; 5: 1-5. https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00176

Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., and Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. J. Environ. Manag. 146, 383–399. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014

Thompson, S.S., Miller, K.B., Lopez, A., Camu, N. (2013). Cocoa and coffee. In: Doyle, M. P., Buchanan, R. L. (eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 4th edition. ASM Press, Washington, DC, 881–889. https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch35

Thyssen, G.M., Keil, C., Wolff, M., Sperling, M., Kadow, D., Haase, H., Karst, U. (2018). Bioimaging of the elemental distribution in cocoa beans by means of LA-ICP-TQMS. J. Anal. At. Spectrom. 33 (2), 187–194. https://doi.org/10.1039/c7ja00354d

Ullah, I., Wang, Y., Eide, D. J., & Dunwell, J. M. (2018). Evolution , and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from Theobroma cacao and their role in cadmium accumulation. Sci Rep, 8(1), 14412. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32819-y

Umesh, M., Priyanka, K., Thazeem, B., Preethi, K. (2017) Production of Single Cell Protein and Polyhydroxyalkanoate from Carica papaya Waste. Arabian Journal for Science and Engineering:42:2361–2369. https://doi.org/10.1007/s13369-017-2519-x

Unión Europea. Diario Oficial de la UE (2014). Reglamento (UE) No 488/2014 de la comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32014R0488&qid=1675993822763

Vanderschueren, R., Doevenspeck, J., Helsen, F., Mounicou, S., Santner, J., Delcour, J. A., Chávez, E., Smolders, E. (2022). Cadmium migration from nib to testa during cacao fermentation is driven by nib acidification. LWT 157, 113077. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113077

Vanderschueren, R., Helsen, F., Doevenspeck, J., Delcour, J.A., Smolders, E. (2023). Incubation tests mimicking fermentation reveal that phytate breakdown is key to lower the cadmium concentrations in cacao nibs. Food Chemistry 398, 133899. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133899

Vanderschueren, R., Montalvo, D., De Ketelaere, B., Delcour, J.A., Smolders, E. (2019).

The elemental composition of chocolates is related to cacao content and origin: A multi-element fingerprinting analysis of single origin chocolates. J Food Compos Anal 83, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103277

Vanderschueren, R., Pulleman, M. (2021). Cadmio en cacao: lo que sabemos sobre prácticas de mitigación. Resumen Informativo de Clima-LoCa No. 2. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 10p. https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/121926

Vanderschueren, Ruth, Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chávez, E., Sarret, G., Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. Science of the Total Environment, 781, 146779. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779

Vásquez, Z.C., Neto, D.P., Pereira, G., Vandenberghe, L., De Oliveira, P., Tiburcio, P., Rogez, H., Goes, A., Soccol, C. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. Waste Management. 90: 72-83. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030

Vedyaykina, A.D., Ponomareva, E.V., Khodorkovskii, M.A., Borchsenius, S.N Vishnyakov, I.E. (2019). Mechanisms of Bacterial Cell Division. Microbiology, 88, 3, pp. 245–260. https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261719030159

Vehapi, M., İnan, B., Kayacan-Cakmakoglu, S., Sagdic, O., Özçimen, D. (2022). Optimization of Growth Conditions for the Production of Bacillus subtilis Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi. Probiotics Antimicrob Proteins. 15, 682–693. https://doi.org/10.1007/s12602-021-09904-2

Vera-Chan, J.F., Morejon, R., Salgado, I.P., Flores, C.I., Morejón, M.R. (2022). Use of enzymes and leavening agents as a strategy to Treduce the presence of cadmium in the fermentation process of heobroma cacao L. almonds. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 13 (3). https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.03.089

Vera-Chang, J.F., Benavides-Vera, J.I., Vásquez-Cortez, L.H., Alvarado-Vásquez, K.E., Reyes-Pérez, J.J., Intriago-Flor, F.G., Naga-Raju, M., Castro-Triana, V.L. (2023). Efectos de dos métodos fermentativos en cacao (Theobroma cacao L.) trinitario, inducido con Rhizobium japonicum para disminuir cadmio. Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales, 10 (1). 95-106. https://doi.org/10.23850/24220582.5460

Vijayalakshmi, V., Senthilkumar, P., Mophin-kani, K., Sivamani, S., & Sivarajasekar, N. (2018). Bio-degradation of Bisphenol A by Pseudomonas aeruginosa PAb1 isolated from ef fl uent of thermal paper industry : Kinetic modeling and process optimization. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 11(1), 56–65. https://doi.org/10.1016/j.jrras.2017.08.003

Vijayaraghavan, K.; Balasubramanian, R. (2015) Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. J. Environ. Manag, 160, 283–296. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.030

Villanueva, P. (2019). Relación entre las características del suelo y la concentración de cadmio en los tejidos de la planta de cacao (Theobroma cacao L.) en Pumahuasi, Huánuco [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional Hermilio Valdizán, Perú.

Vishan, I., Saha, B., Sivaprakasam, S., Kalamdhad, A., 2019. Evaluation of Cd(II) biosorption in aqueous solution by using lyophilized biomass of novel bacterial strain Bacillus badius AK: biosorption kinetics, thermodynamics and mechanism. Environ. Technol. Innov. 14, 100323. https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100323

Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., & Cocolin, L. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. International Journal of Food Microbiology, 216, 69–78. https://doi.org/ 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004

Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., Cocolin, L. (2017). Impact of Saccharomyces cerevisiae and Torulaspora delbrueckii starter cultures on cocoa beans fermentation. International Journal of Food Microbiology 257, 31–40. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004

Vītola, V., Ciproviča, I. (2016). The effect of cocoa beans heavy and trace elements on safety and stability of confectionery products. Rural Sustain Res. 35 (330), 19–23. https://doi.org/10.1515/plua-2016-0003

Wang, J., Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnology Advances, 27(2), 195–226. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002

Wang, J., Wang, P.M., Gu, Y., Kopittke, P., Zhao, F., Wang, P. (2019). Iron−Manganese (Oxyhydro)oxides, rather than oxidation of sulfides, determine mobilization of Cd during soil drainage in paddy soil systems. Environ. Sci. Technol., 53 (2019), pp. 2500-2508, https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06863

Wang, T., Lu, Y., Yan, H., Li, X., Wang, X., Shan, Y., Yi, Y., Liu, B., Zhou, Y., Lü, X. (2020). Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: Lactobacillus rhamnosus LS-8. Bioprocess Biosyst Eng 43(3):515-528. https://doi.org/10.1007/s00449-019-02246-y

Wang, Y.,Fang, X., An, F., Wang, G., Zhang, X. (2011).Improvement of antibiotic activity of Xenorhabdus Bovienii by medium optimization using response surface methodology. Microb.Cell Fact. 10,1–15. https://doi: 10.1186/1475-2859-10-98

Wang, Y.X., Lu Z.X. (2004).Statistical optimization of media for extracellular polysaccharide by Pholiotasquarrosa (Pers. ex Fr.) Quel. AS 5.245 under submerged cultivation. Biochemical Engineering Journal. 20: 39-47. https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.04.004

Wang, Y., Yu, K.F., Poysa, V., Shi, C., Zhou, Y.H. (2012). A single point mutation in GmHMA3 affects cadmium (Cd) translocation and accumulation in soybean seeds. Mol. Plant 5 (5), 1154–1156. https://doi.org/10.1093/mp/sss069

Wei, X., Fang, L., Cai, P., Huang, Q., Chen, H., Liang, W., Rong, X. (2011). Influence of

extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. Environ. Pollut. 159, 1369–1374. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.006

World Health Organization-WHO. (2011). Cadmium. Safety evaluation of certain contaminants in food. WHO Food Additives Series, No. 64/FAO JECFA Monographs 8. WHO: Geneva, Switzerland.

Wu, Y., Bin, H., Zhou, J., Ji, L., Dong, Y., Sun, S., Wei, L. (2011). Atmospheric deposition of Cd accumulated in the montane soil, Gongga Mt., China. J. Soils Sediments 11, 940–946. https://doi.org/10.1007/s11368-011-0387-7

Xiao, R., Huang, Z., Li, X., Chen, W., Deng, Y., & Han, C. (2017). Lime and phosphate amendment can significantly reduce uptake of Cd and Pb by field-grown rice. Sustainability MDPI, 9, 1–10. https://doi.org/10.3390/su9030430

Xie, Y., Fan, J., Zhu, W., Amombo, E., Lou, Y., Chen, L., Fu, J. (2016). Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and bermudagrass genetic variation. Front. Plant Sci. 7, 755. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00755

Xie, Y., He, N., Wei, M., Wen, T., Wang, X., Liu, H., Zhong, S., Xu, H. (2021). Cadmium biosorption and mechanism investigation using a novel Bacillus subtilis KC6 isolated from pyrite mine. Journal of Cleaner Production 312, 127749 https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127749

Yanus, R.L., Sela, H., Borojovich, E.J.C., Zakon, Y., Saphier, M., Nikolski, A., Gutflais, E., Lorber, A., Karpas, Z. (2014). Trace elements in cocoa solids and chocolate: an ICPMS study. Talanta 119, 1–4. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.048

Yao, W., Doue, G., Ouattara, H., Goualie, B.,Koua, G., Niamke, S. (2017). Selection of potential bacillus starters for cocoa beans fermentation improvement. AUDJG – Food Technology 41(1), 131-146

Yao, W., Goualié, B., Ouattara, H., Niamké, S. (2017). Growth capacity of bacillus potential starter strains isolated from cocoa beans fermentation under culture stress conditions. Scientific Study & Research. 18 (2), pp. 201 – 211.

Yapo, K.D., Ouffoue, S.K., N'guessan, B.R., Okpekon, T.A., Dade, J., Say, M., Kouakou, T.H. (2014). Quality control by the determination of heavy metals in new variety of cocoa (cocoa mercedes) in Côte d' Ivoire. J la Société Ouest-Africaine Chim. 37, 56–64.

Yee, N., Benning, L.G., Phoenix, V.R., Ferris, F.G. (2004). Characterization of Metal−Cyanobacteria Sorption Reactions: A Combined Macroscopic and Infrared Spectroscopic Investigation. Environ. Sci. Technol. 38, 775–782. https://doi.org/10.1021/es0346680

Zamudio-Palacios B. B., Ayora-Talavera T. del R., Cervantes-Lugo E. del C., Taillandier, P., Gastélum-Martínez, E. (2021). Estudio de un consorcio de levaduras durante la fermentación de cacao y su efecto en la 1 generación de compuestos aromáticos. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Vol. 6, 62-74

Zhai, Qixiao., Guo, Y., Tang, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2019). Removal

of cadmium from rice by Lactobacillus plantarum fermentation Food Control, 96 (1): 357-364. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.029

Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., & Jiang, L. (2020). Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. Chemical Engineering Journal, 398, 125657. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125657

Zhang, L.,Wu, J., Tang, Z., Huang, X.,Wang, X., Salt, D.E., Zhao, F.J. (2019). Variation in the BrHMA3 Coding Region Controls Natural Variation in Cadmium Accumulation in Brassica rapa Vegetables. 70(20), pp. 5865–5878. https://doi.org/10.1093/jxb/erz310

Zhang, Y., Liu, W., Xu, M., Zheng, F., Zhao, M. (2010). Study of the mechanisms of Cu2 + biosorption by ethanol / caustic-pretreated baker's yeast biomass. J. Hazard. Mater. 178, 1085–1093. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.051

Zheng, S., Yang, M., Yang, Z. (2005) Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. Bioresource Technology. 96(10):1183–1187. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.022

Zhong, J., Zhang, X., Ren, Y., Yang, J., Tan, H., Zhou, J.(2014) Optimization of Bacillus subtilis cell growth effecting jiean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. Electronic Journal of Biotechnology. 17:132-136. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.04.010

Zhu, H., Chen, C., Xu, C., Zhu, Q., & Huang, D. (2016). Effects of soil acidification and liming on the phytoavailability of cadmium in paddy soils of central subtropical China. Environmental Pollution, 219, 99–106. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.043

Zhu, J.; Chen, Y.; Lv, C.; Wu, W.; Qin, S. (2019). Study on optimization of removing cadmium by lactobacillus fermentation and its effect on physicochemical and quality properties of rice noodles. Food Control, 106, 106740. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106740

Zug, K.L., Humaní, H.A., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (Theobroma cacao L.) and Opportunities for Mitigation. Water Air Soil Pollut, 230, 72. https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x