



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**SELECCIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS AUTÓCTONAS
DE LA FERMENTACIÓN DE CACAO MEXICANO PARA
LA FORMULACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES**

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.Q. Natali Hernández Parada

Directores:

Dra. Claudia Yuritzí Figueroa Hernández

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz

H. VERACRUZ, VER.

Junio de 2021



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

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

H. Veracruz, Veracruz, **28/Mayo/2021**
OFICIO: ITV/D/No.128/2021
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C.NATALÍ HERNÁNDEZ PARADA
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de hago **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERIA
BIOQUÍMICA** titulada:

**“SELECCIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS AUTÓCTONAS DE LA FERMENTACIÓN DE CACAO
MEXICANO PARA LA FORMULACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES”**

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente*

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

EL H. JURADO

**CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ
PRESIDENTE**

**MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ
SECRETARIO**

**PATRICIA GUILLERMINA MENDOZA GARCÍA
REVISOR-1**

**SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA
REVISOR-2**



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

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



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





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

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

El presente trabajo de tesis titulado "selección de levaduras y bacterias autóctonas de la fermentación de cacao mexicano para la formulación de cultivos iniciadores" presentado por el (la) C. Natalí Hernández Parada, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTOR

DRA. CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR

DRA. MIRNA LEONOR SUÁREZ QUIROZ

REVISORA

DRA. PATRICIA GUILLERMINA MENDOZA GARCÍA

REVISORA

DRA. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA



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



DEDICATORIA

En primer lugar, quiero dedicar este logro a Dios porque ha guiado mi camino dándome día a día me da fortaleza para seguir adelante, porque me bendice en cada momento, y porque sin Él nada de esto sería posible.

A mi madre Olga Parada, porque es el motor de mi vida, es una gran mujer, que con sus consejos, esfuerzos y apoyo incondicional me ha impulsado siempre a ser una mejor persona y me ha llenado la vida de alegría con su gran amor.

A mis hermanos Jackeline Hernández y William Hernández, porque siempre me han dado su cariño, me han acompañado en los momentos en que los necesito, y porque son un ejemplo claro en mi vida de fortaleza, esfuerzo, nobleza y sinceridad.

A mi sobrina Katherine Ramírez, que es mi hermanita menor, quien me escucha y aconseja siempre, gracias por contagiar de tu alegría mis momentos difíciles. Love u.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y directora, la **Dra., Claudia Yuritzi Figueroa Hernández** por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Porque durante esta etapa con su cariño, paciencia, compromiso, conocimientos y dedicación me apoyo e impulso, siempre dando lo mejor para lograr buenos resultados.

A mi asesora, la **Dra., Mirna Leonor Suárez Quiroz** que me permitió pertenecer a su excelente grupo de trabajo, por su apoyo y por brindarme sus conocimientos que fueron acertados y contribuyeron a la culminación de este proyecto.

Al **Dr. Oscar González Ríos** por sus conocimientos y apoyo durante esta etapa, por siempre ver lo mejor de las personas y porque con sus aportes siempre se tiene una perspectiva diferente.

Al **Dr. Zorba Josúe Hernández Estrada** por su apoyo, conocimientos, consejos y por ser una guía durante este tiempo.

A mi comité revisor, **Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura** y **Dra. Patricia Mendoza García**, gracias por sus aportes y tiempo invertido en la revisión de este trabajo que se enriqueció de sus conocimientos.

Para mí, es de gran gozo haber transcurrido esta etapa profesional en compañía de ustedes, gracias Doctores.

A mis compañeros de la maestría, que me hicieron sentir parte de ellos, gracias por hacer que el tiempo que compartimos fuera ameno. A mis compañeros del laboratorio de

Bromatología y el laboratorio de café, sus aportaciones y conocimiento también hicieron posible la realización de este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el financiamiento beca 731215 otorgado para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Hernández-Parada Natali. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio 2021. **SELECCIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS AUTÓCTONAS DE LA FERMENTACIÓN DE CACAO MEXICANO PARA LA FORMULACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES.** Directoras: Dra. Claudia Yuritzí Hernández Figueroa y Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz.

La fermentación de los granos de cacao es una etapa postcosecha importante en la cadena del cacao, donde interviene una sucesión levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido acéticas (BAA), que impactan su calidad e inocuidad. En los últimos años se han utilizado microorganismos autóctonos del proceso como cultivos iniciadores, estos se deben seleccionar considerando criterios fisiológicos, metabólicos y funcionales. El objetivo del presente estudio fue seleccionar levaduras y bacterias autóctonas de la fermentación de cacao considerando criterios fisiológicos (pruebas de tolerancia), funcionales y metabólicos para formular cultivos iniciadores que permitan obtener granos de cacao con calidad homogénea. Para las levaduras, se realizaron pruebas para la caracterización fisiológica (a diferentes condiciones de estrés, etanol: 4, 8, y 12 % v/v, ácido láctico: 0.5, 1, y 2 % v/v, pH 3.0-5.0), metabólica (actividad pectinolítica) y funcional (actividad antifúngica). En el caso de las BAL, se probaron diferentes niveles de estrés (etanol: 6, 8, y 12 % v/v, fructosa/glucosa: 5, 15 y 30 % p/v, y pH 3.0-5.0), así como la prueba del metabolismo del citrato. Para las BAA se realizaron pruebas de estrés (40-50 °C, pH 4.0-6.0, ácido láctico a 1, 2 y 4 % v/v). Las condiciones de estrés analizadas fueron seleccionadas tomando en consideración las condiciones que se encuentran en fermentación del cacao. Se encontró que solo *Saccharomyces cerevisiae* Y-CTA-18-14 mostró actividad pectinolítica, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12 toleró etanol al 8 % v/v; *Pichia kudriavzevii* Y-CTA-18-9 tuvo mayor tolerancia al ácido láctico y condiciones de pH evaluados, y *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16 mostró tolerancia al ácido láctico y presentó efecto

fungistático sobre la germinación de hongos toxigénicos del género *Aspergillus*. Las cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* LAB-CTA-18-3, LAB-CTA-18-6 LAB-CTA-18-8, presentaron mayor tolerancia a las condiciones de estrés evaluadas, actividad antifúngica y capacidad de metabolizar el ácido cítrico. Se seleccionó a *Acetobacter pastorianus* AAB-CTA-18-3 por resistir condiciones de pH 4.0-5.0 y 50 °C. Finalmente, se propone el uso de tres cultivos iniciadores mixtos conformados por las levaduras *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12 y Y-CTA-18-14, *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 y *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16, BAL *L. plantarum* LAB-CTA-18-3, LAB-CTA-18-8 y LAB-CTA-6, y la cepa de *A. pastorianus* AAB-CTA-18-3.

ABSTRACT

Hernández-Parada Natali. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. June 2021. **SELECCIÓN DE LEVADURAS Y BACTERIAS AUTOCTONAS DE LA FERMENTACIÓN DE CACAO MEXICANO PARA LA FORMULACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES.** Advisors: Dra. Claudia Yuritzí Hernández Figueroa and Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz.

Fermentation of cocoa beans is an important postharvest stage in the cocoa chain, involving a succession of yeasts, lactic acid bacteria (LAB), and acetic acid bacteria (AAB), which impact their quality and safety. In recent years, indigenous microorganisms from the process have been used as starter cultures, which must be selected considering physiological, metabolic, and functional criteria. This study aimed to select indigenous yeasts and bacteria for cocoa fermentation, considering physiological (tolerance tests), functional and metabolic criteria to formulate starter cultures that allow obtaining cocoa beans with homogeneous quality. For yeasts, tests were carried out for physiological characterization (at different stress conditions, ethanol: 4, 8, and 12 % v/v, lactic acid: 0.5, 1, and 2 % v/v, pH 3.0-5.0), metabolic (pectinolytic activity) and functional (antifungal activity). For LAB, different stresses were tested (ethanol: 6, 8, and 12 % v/v, fructose/glucose: 5, 15, and 30 % p/v, and pH 3.0-5.0), as well as the citrate metabolism. For AAB, stress tests (40-50 °C, pH 4.0-6.0, 1, 2 and 4 % v/v lactic acid) were performed. The stress test conditions were determined according to the same conditions as those found in cocoa fermentation. It was found that only *Saccharomyces cerevisiae* Y-CTA-18-14 showed pectinolytic activity, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12 tolerated 8 % v/v ethanol; *Pichia kudriavzevii* Y-CTA-18-9 had higher tolerance to lactic acid and pH conditions evaluated, and *Hanseniaspora* spp Y-CTA-18-16 showed tolerance to lactic acid and presented fungistatic effect on the germination of toxigenic fungi of the genus *Aspergillus*. The *Lactiplantibacillus plantarum* strains LAB-CTA-18-3, LAB-CTA-18-6 LAB-CTA-18-8, showed greater tolerance to the stress conditions evaluated,

antifungal activity, and ability to metabolize citric acid. The *Acetobacter pasteurianus* strain AAB-CTA-18-3 was selected to resist conditions of pH 4.0-5.0 and 50 °C. Finally, we propose the use of three mixed starter cultures consisting of the yeasts *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12 and Y-CTA-18-14, *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 and *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16, LAB *L. plantarum* LAB-CTA-18-3, LAB-CTA-18-8, and LAB-CTA-6, and the *A. pasteurianus* strain AAB-CTA-18-3.

CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Generalidades del cacao	3
1.2. Producción de cacao a nivel mundial y en Latinoamérica	6
1.2.1. Producción de cacao en México.....	7
1.3. Tratamientos postcosecha del cacao.....	9
1.3.1. Cosecha	9
1.3.2. Quiebre de la mazorca	9
1.3.3. Fermentación del grano de cacao	9
1.3.3.1. Métodos de fermentación	10
1.3.3.1.1. Fermentación en pilas	10
1.3.3.1.2. Fermentación en cajas	11
1.3.3.1.3. Fermentación en bandejas.....	12
1.3.3.1.4. Fermentación en cestas.....	13
1.3.4. Secado del grano de cacao.....	14
1.3.5. Almacenamiento del grano de cacao	15
1.4. Microbiología del proceso fermentativo	15
1.4.1. Levaduras.....	17
1.4.1.1. Diversidad de levaduras durante la fermentación de cacao	18
1.4.2. Bacterias ácido lácticas	18

1.4.2.1.	Diversidad de bacterias ácido lácticas durante la fermentación de cacao.....	20
1.4.3.	Bacterias ácido acéticas.....	20
1.4.3.1.	Diversidad de bacterias ácido acéticas durante la fermentación de cacao.....	21
1.4.4.	Presencia de bacterias del género <i>Bacillus</i>	21
1.4.5.	Presencia de hongos filamentosos.....	21
1.5.	Transformación fisicoquímica y bioquímica del grano de cacao.....	22
1.5.1.	Cambios físicos del grano de cacao.....	22
1.5.2.	Cambios químicos y bioquímicos del grano de cacao	23
1.6.	Cultivo iniciador	26
1.6.1.	Cultivos iniciadores para la fermentación del cacao	27
1.6.2.	Selección de microorganismos para formular un cultivo iniciador para la fermentación de cacao.....	28
1.6.3.	Criterios de los microorganismos para formar un cultivo iniciador para la fermentación del cacao	29
1.6.3.1.	Actividad pectinolítica	31
1.6.3.2.	Metabolismo de ácido cítrico	32
1.6.4.	Uso de los cultivos iniciadores en la fermentación de cacao	33
1.7.	Calidad del grano de cacao beneficiado.....	34
1.7.1.	Indicadores de calidad del cacao.....	34
1.7.2.	Indicadores de inocuidad	35
1.8.	Antecedentes de investigación del grupo de Tecnología de Alimentos	36
2.	JUSTIFICACIÓN	39
3.	HIPOTESIS	40
4.	OBJETIVOS	41

4.1. Objetivo general.....	41
4.2. Objetivos específicos.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
5.1. MATERIALES	42
5.1.1. Microorganismos	42
5.1.2. Medios de cultivo.....	42
5.2. METODOLOGÍA	42
5.2.1. Etapa 1: Caracterización bioquímica de las levaduras.....	43
5.2.1.1. Caracterización morfológica macroscópica de las levaduras	43
5.2.1.2. Caracterización morfológica microscópica de las levaduras	43
5.2.1.3. Identificación presuntiva de las levaduras	43
5.2.2. Etapa 2: Pruebas de selección de levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas	44
5.2.2.1. Activación y propagación de las cepas.....	44
5.2.2.2. Pruebas de tolerancia	45
5.2.2.2.1. Pruebas de tolerancia a compuestos	48
5.2.2.2.2. Pruebas de tolerancia al estrés con pH modificado	49
5.2.2.2.3. Pruebas de tolerancia al estrés térmico	50
5.2.2.3. Prueba de actividad pectinolítica de las levaduras	50
5.2.2.4. Prueba de metabolismo de ácido cítrico para las BAL	51
5.2.2.5. Prueba de actividad antifúngica.....	53
5.2.2.5.1. Preparación de inóculos de hongos y levaduras.....	53
5.2.2.5.2. Pruebas de confrontación de levaduras sobre los hongos	54
5.2.2.6. Selección de los microorganismos de los cultivos iniciadores.....	55
5.2.3. Análisis estadístico	55

6. RESULTADOS.....	56
6.1. Caracterización morfológica de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao	56
6.1.1. Caracterización morfológica macroscópica.....	56
6.1.2. Caracterización morfológica microscópica	61
6.2. Caracterización bioquímica de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao	66
6.3. Caracterización fisiológica de las cepas de levadura aisladas del proceso de fermentación del cacao.....	68
6.3.1. Pruebas de tolerancia a compuestos	69
6.3.1.1. Levaduras: Testigo	69
6.3.1.2. Tolerancia a etanol	70
6.3.1.3. Tolerancia al ácido láctico.....	75
6.3.1.4. Tolerancia a pH.....	78
6.4. Caracterización metabólica de las cepas de levadura aisladas de la fermentación del cacao.....	83
6.4.1. Prueba de actividad pectinolítica.....	83
6.5. Caracterización funcional de las cepas de levaduras	84
6.5.1. Prueba de actividad antifúngica de las levaduras sobre <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus carbonarius</i>	84
6.6. Caracterización fisiológica y metabólica de las bacterias ácido lácticas ..	87
6.6.1. Pruebas de tolerancia a compuestos	87
6.6.2. Prueba de metabolismo de ácido cítrico	90
6.7. Caracterización fisiológica de las bacterias ácido acéticas aisladas de la fermentación de cacao	93
6.7.1. Pruebas de tolerancia a compuestos	93

6.7.2. Prueba de termoresistencia.....	95
6.8. Selección de consorcios microbianos para la fermentación de cacao.....	97
7. CONCLUSIONES	100
8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	102
9. BIBLIOGRAFÍA	103
10. APENDICE	124

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1. Condiciones requeridas para el cultivo de árboles de cacao.....	3
TABLA 1.2. Composición aproximada de los granos de cacao frescos.....	23
TABLA 5.1. Condiciones de estrés establecidas para evaluar fisiológicamente los microorganismos	49
TABLA 6.1. Características morfológicas macroscópicas de las colonias de levadura (Agar YPD, 30 °C, 36 h)	57
TABLA 6.2. Confrontación de las células de levadura contra los hongos toxigénicos (30 °C durante 96 h).....	85
TABLA 6.3. Resultados de la producción de CO ₂ a partir del citrato (48 h a 30 °C)	91
TABLA 6.4. Crecimiento de las BAA a diferentes temperaturas (24 h de incubación en medio GEA).....	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Aspecto del árbol de <i>Theobroma cacao</i> L.	4
FIGURA 1.2. Aspecto del fruto del árbol de cacao	5
FIGURA 1.3. Países productores de cacao.	7
FIGURA 1.4. Principales estados productores de cacao en México.....	8
FIGURA 1.5. Fermentación en pilas	11
FIGURA 1.6. Fermentación en cajas de madera	12
FIGURA 1.7. Fermentación en bandejas	13
FIGURA 1.8. Fermentación en cestas	14
FIGURA 1.9. Comportamiento de los microorganismos durante la fermentación .	16
FIGURA 1.10. Cambios bioquímicos en los granos de cacao	24
FIGURA 1.11. Esquema de etapas de la formulación de un cultivo iniciador	27
FIGURA 1.12. Acción de las pectinasas	31
FIGURA 1.13. Rutas de metabolismo de citrato por las BAL de la fermentación de cacao.....	32
FIGURA 5.1. Metodología general	43
FIGURA 5.2. Activación y propagación de las cepas.....	45
FIGURA 5.3. Metodología de las cinéticas de crecimiento de las levaduras.....	46
FIGURA 5.4. Diseño de prueba para la determinación del crecimiento de BAL en ambientes con etanol y pH modificado	47
FIGURA 5.5. Diseño de prueba para la determinación del crecimiento de BAL en ambientes con glucosa y fructosa.....	47
FIGURA 5.6. Diseño de prueba para la determinación del crecimiento de BAA en ambientes con ácido láctico y pH modificado.	48
FIGURA 5.7. Metodología de la prueba de actividad pectinolítica.....	51
FIGURA 5.8. Pruebas de consumo de ácido cítrico.....	52
FIGURA 5.9. Esquema de la preparación de las esporas de hongos.....	53
FIGURA 5.10. Prueba de confrontación de hongos y levaduras	54
FIGURA 6.1. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD durante 24 h a 30 °C y 150 rpm.....	69

FIGURA 6.2. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 4 % v/v de etanol durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	71
FIGURA 6.3. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 8 % v/v de etanol durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	72
FIGURA 6.4. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 12 % v/v de etanol durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	73
FIGURA 6.5. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 0.5 % v/v de ácido láctico durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	75
FIGURA 6.6. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 1 % v/v de ácido láctico durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	76
FIGURA 6.7. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 2 % v/v de ácido láctico durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	77
FIGURA 6.8. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD con pH modificado a 3.0 durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	79
FIGURA 6.9. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD con pH modificado a 4.0 durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	80
FIGURA 6.10. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD con pH modificado a 5.0 durante 24 h a 30 °C y 150 rpm	81
FIGURA 6.11. Levaduras autóctonas del cacao sembradas en medio enriquecido con pectina incubadas durante seis días a 30 °C	83
FIGURA 6.12. Proliferación completa e incompleta de los hongos a causa de la acción de las levaduras	86

FIGURA 6.13. Crecimiento de las bacterias ácido lácticas autóctonas del cacao sometidas a diferentes condiciones de estrés incubadas 24 h a 30 °C	88
FIGURA 6.14. Resultado de la prueba de metabolismo de ácido cítrico de las bacterias ácido lácticas autóctonas del cacao	91
FIGURA 6.15. Resultados de la prueba de producción de acetoina; A: <i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-1; B: <i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-3; C: <i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-6; D: <i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-8.....	91
FIGURA 6.16. Crecimiento de las bacterias ácido acéticas autóctonas del cacao sometidas a diferentes condiciones de estrés (AL: Ácido láctico; incubadas 24 h a 30 °C)	94

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
CEDRSSA	Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria
ICCO	Organización Internacional de Cacao
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ABS	Absorbancia
PDI	Índice de degradación de pectina
pH	Concentración de iones hidrógeno o Potencial de hidrogeno
pKa	Constante de disociación ácida
BAA	Bacteria ácido acética
BAL	Bacteria ácido láctica
μ	Velocidad específica de crecimiento
μ_{\max}	Velocidad específica de crecimiento máxima
td	Tiempo de duplicación de los microorganismos

INTRODUCCIÓN

La materia prima principal para la producción de chocolate es el grano de cacao, fruto del árbol *Theobroma cacao L.* (Beg *et al.*, 2017). Entre las principales regiones productoras de cacao se encuentran África del Oeste, América Central, Sudamérica y Asia. Actualmente, México está posicionado como el décimo tercero productor mundial de cacao, Tabasco, Chiapas y Guerrero son los principales estados productores de cacao (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018).

Comúnmente, hay tres variedades genéticas de cacao: Forastero, Criollo y Trinitario, aunque existe una cuarta variedad que crece en Ecuador, denominada Nacional. Esta clasificación se basa en el aspecto de la fruta, sin embargo, también se pueden clasificar con respecto a sus atributos aromáticos, así, la variedad Forastero se conoce como cacao ordinario y las variedades Trinitario y Criollo como cacao fino. La calidad de los granos de cacao varía por factores como su genotipo, las condiciones agroclimáticas, y los cambios bioquímicos presentados durante las etapas de postcosecha (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018).

Antes de ser procesados, los granos de cacao deben pasar por una serie de etapas postcosecha, las cuales comprenden la separación del grano y la mazorca, fermentación, secado y almacenamiento (Beg *et al.*, 2017). La fermentación es una de las etapas más relevantes, en la cual se forman los precursores de sabor, color y aroma característicos de los granos de cacao. Esto depende de la actividad de diferentes grupos microbianos en la pulpa mucilaginosa del grano. Durante este proceso, la temperatura del grano incrementa y los productos de fermentación disminuyen la viabilidad microbiana, generando precursores de aroma y sabor, así como pardeamiento y reducción del amargor y astringencia de los granos. Además, también se genera acidez fija y volátil, que corresponden a los residuos de ácido láctico y ácido acético, respectivamente, los cuales son indicadores del éxito de la fermentación y de la calidad del grano de cacao (Leal *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011).

La fermentación de cacao es un proceso espontáneo y sucesivo en el cual se involucran una gran cantidad de microorganismos, inicialmente, el proceso es dominado por levaduras, seguido por bacterias ácido lácticas y ácido acéticas (Batista *et al.*, 2015). Los géneros de levadura que forman parte de la microbiota representativa de la fermentación de cacao son *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* y *Pichia*. *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más reportada. Similarmente, se han reportado dos especies de bacterias ácido lácticas dominantes, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Limosibacillus fermentum*. Las bacterias ácido acéticas comúnmente presentes son de la especie *Acetobacter pasteurianus*, también se han reportado especies como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter fabarum*, *Gluconobacter oxydans* y *Gluconobacter xylinus*. Al final de la fermentación puede haber crecimiento de bacterias del género *Bacillus* y hongos filamentosos, los cuales pueden afectar la calidad y sabor del cacao (Magalhães da Veiga Moreira *et al.*, 2017).

Los metabolitos producidos por los microorganismos durante la fermentación son los que permiten que se lleven a cabo las reacciones bioquímicas de formación de precursores de sabor y aroma, razón por la cual el uso de cultivos iniciadores compuestos de levaduras y bacterias pertenecientes a la microbiota representativa de la fermentación de cacao ayudará a obtener perfiles de aroma y sabor deseados en los granos de cacao. Al formular correctamente un cultivo iniciador, se puede controlar y mejorar los resultados de la fermentación y, por ende, la calidad del grano de cacao (Engeseth y Pangan, 2018). El objetivo de este trabajo es seleccionar cultivos iniciadores a partir de cepas autóctonas de la microbiota representativa de la fermentación de cacao con el fin de obtener mejores parámetros sensoriales y de inocuidad.

1. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del cacao

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es nativo de bosques húmedos tropicales en América, inicialmente fue domesticado y consumido por las civilizaciones Maya y Azteca, quienes consideraban el cacao como alimento de dioses; a raíz de esto, el científico sueco Linneo nombro al árbol *Theobroma*, cuyo significado es alimento de los dioses. Cuando los europeos conquistaron América se encargaron de distribuir la planta en diferentes regiones del mundo (Nair, 2010). Las condiciones requeridas para el cultivo del árbol de cacao se presentan en la Tabla 1.1. El cacao debe crecer en un clima cálido y húmedo, por lo general se interplanta con otros árboles debido a su sensibilidad a la luz y al viento. Estos árboles de sombra comúnmente son de plátano, caucho, palmas de aceite, y coco (Dircks, 2009; Ho *et al.*, 2015).

TABLA 1.1. Condiciones requeridas para el cultivo de árboles de cacao

Temperatura	Rango mínimo: 18-21 °C Rango máximo promedio: 30-35 °C
Lluvia	1500-2500 mm anualmente. La irrigación puede ser necesaria en caso de que durante dos meses consecutivos la lluvia sea menos a 50 mm.
Humedad	100 % durante la noche. 70-80 % durante el día.
Altitud	Generalmente menor a 300 m. Puede ser mayor a 1300 m en regiones ecuatoriales.
Sombra	Las plántulas jóvenes requieren 50 % de sombra. En condiciones de sobre sombreado se reduce el rendimiento en plantas maduras.
Viento	El cacao es sensible a vientos fuertes. Cortavientos e interplantar con otros árboles previene la defoliación.
Suelo	El cacao puede crecer en un rango diverso de suelos, sin embargo, las características deseadas son: suelo bien drenado; profundidad \geq 1.5m; relación carbono/nitrógeno \geq 9; no más de 50 % de arena, 20 % de lodo, o 40 % arcilla. Puede crecer en suelos más pobres con adición de abono. pH neutral o ligeramente ácido 5-7.5.

Elaboración a partir de datos obtenidos de (Dircks, 2009; Fowler, 2009)

El árbol *Theobroma cacao L.* puede tener una altura de 5 a 8 metros y un diámetro de corona de 4 a 6 metros. La raíz es pivotante, su longitud y forma varían según la estructura, textura y consistencia del suelo. El tallo es erecto, y con 2 años, el crecimiento de la yema terminal se detiene con 1-1.5 metros de altura. Posteriormente, aparecen las primeras coronas, compuestas por 3-5 ramas, que se multiplican en otras ramas laterales (Souza *et al.*, 2017).

Por lo general, los árboles de cacao tardan mínimo tres años en producir su primer cultivo, y los rendimientos máximos de los cultivos se alcanzan de tres a cinco años después. Además, la mayoría de árboles de cacao producen rendimientos comercialmente aceptables hasta un rango de edad entre 25 y 30 años (Dircks, 2009).



FIGURA 1.1. Aspecto del árbol de *Theobroma cacao L.*

Las hojas del árbol de cacao son color verde oscuro y tienen una textura fina; las flores aparecen en el tronco o en las ramas a partir de brotes que se desarrollan en la yema axilar de las hojas y producen entre 20-50 frutas maduras por árbol, tal como se muestra en la Figura 1.1. El árbol de cacao florece cada temporada, sin

embargo, en la región amazónica, tiene dos picos florales: uno menor que coincide con el comienzo del período menos lluvioso y uno principal que se produce al final de la estación seca y al comienzo de la estación lluviosa (Souza *et al.*, 2017; Predan *et al.*, 2019). Las frutas maduras o vainas de cacao se desarrollan totalmente después de cinco o seis meses, suelen tener entre 15-25 cm de largo y 7-10 cm de ancho, además, dependiendo de la variedad de cacao tienen color verde, amarillo, rojo y marrón. Por lo tanto, existe una variación considerable en la forma, textura superficial y color de las vainas dependiendo de la variedad de cacao (Fowler, 2009). Como se puede ver en la Figura 1.2, el fruto presenta un pericarpio carnoso y grueso, un mesocarpio delgado y duro no muy lignificado, y un endocarpio carnoso no muy grueso. Contiene de 30 a 45 semillas, cubiertas con una capa mucilaginosa azucarada denominada pulpa. Generalmente, las vainas verdes cambian a amarillas y de rojizas a naranja o amarillo en el periodo de maduración (Nair, 2010).



FIGURA 1.2. Aspecto del fruto del árbol de cacao

La forma de los granos es aplanada, con variaciones de elipsoide a ovoide, y el embrión de la pulpa mucilaginosa que rodea la semilla tiene dos cotiledones, un embrión pequeño, una membrana delgada, los restos del endospermo y cáscara (Nair, 2010; Souza *et al.*, 2017; Predan *et al.*, 2019).

Existen cuatro variedades comunes de cacao, denominados Forastero, Criollo, Trinitario y Nacional, cuyas propiedades varían dependiendo de su origen

geográfico y composición química. La variedad Forastero presenta granos pequeños y planos, comúnmente amelonados con cotiledones violetas; esta variedad muestra un sabor fuerte a chocolate básico y se clasifica como ordinario. Las mazorcas de la variedad Criollo son de color amarillo o rojo, mientras sus granos son alargados y redondos con cotiledones blanquecinos; esta variedad presenta baja resistencia a los daños por pestes y cambios climáticos, y tiene bajo rendimiento. El cacao Criollo es altamente aromático y desarrolla sabores suaves, almendrados, terrosos, florales y sabor a té. La variedad Trinitario es un híbrido entre las variedades Criollo y Forastero, tiene más rendimiento y es menos susceptible a enfermedades; esta variedad presenta caracteres fuertes de chocolate básico y un sabor suave a vino. La variedad Nacional solamente se cultiva en Ecuador, sus granos son morados y producen el sabor “Arriba” con notas aromáticas, florales, picosas y verdes. Las variedades Criollo, Trinitario y Nacional están catalogadas como finas por las notas aromáticas y sabor que producen sus granos (Vega y Kwik-Urbe, 2012; Aprotosoie *et al.*, 2016).

Los pasos para transformar las semillas en los productos finales consisten en la cosecha del fruto maduro, seguido por el quiebre de mazorca, fermentación, secado, tostado y molienda. Estas etapas son importantes para asegurar la calidad de los granos (Vásquez *et al.*, 2019).

1.2. Producción de cacao a nivel mundial y en Latinoamérica

La producción mundial de cacao fue de 4,824 millones de toneladas en promedio entre el 2019 y 2020. De este total, aproximadamente el 76 % lo produce África, el 16 % América Latina y el 8 % restante corresponde a Asia (ICCO, 2020). En la Figura 1.3. se muestran los países con mayor producción de cacao del mundo, que son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Malasia (Gardea *et al.*, 2017; Campos-Vega *et al.*, 2018).



FIGURA 1.3. Países productores de cacao.

En América Latina se produce en promedio 752,000 toneladas, de las cuales Ecuador produce el 38 %, siendo el mayor productor latinoamericano, seguido de Brasil (23 %), Perú (15 %), República Dominicana (10 %), Colombia (8 %) y México (4 %), el 6 % restante lo producen Bolivia, Panamá y Costa Rica (ICCO, 2017).

El 80 % de la producción mundial de cacao se concentra en el cacao variedad Forastero, que se utiliza en la industria para elaborar pasta y derivados de chocolate ordinario debido a su bajo aroma y sabor. El cacao Trinitario, que es clasificado como aromático, abarca el 19 % de la producción global. Por su parte, el cacao Criollo representa entre el 1 % de la producción internacional y también se caracteriza ser aromático, razón por la cual es utilizado en la elaboración de chocolate de alta gama (Afoakwa *et al.*, 2008; Aprotosoai *et al.*, 2016; Kongor *et al.*, 2016).

1.2.1. Producción de cacao en México

La semilla de cacao es uno de los cultivos principales en el sureste de México, y ha sido cultivado desde tiempos prehispánicos. En 2019, de acuerdo a

datos recopilados por la SIAP y la CEDRSSA, se produjeron en total aproximadamente 28,213 mil toneladas de granos de cacao, situando a México como el onceavo productor mundial. La producción nacional es dominada por la variedad Forastero con aproximadamente el 80 %. En la Figura 1.4 se presentan los principales estados productores de cacao, Tabasco, Chiapas y Guerrero, zonas en las que se encuentra una superficie con potencial para el cultivo, sin embargo, en Veracruz y Nayarit existe un entorno idóneo que podría aprovecharse para su cultivo. Tabasco es el mayor productor de cacao del país, representa el 66.4 % de la producción nacional, su principal región productora es Chontalpa (SIAP, 2018).

México cuenta con tres variedades de cacao, Forastero, Trinitario y Criollo, de este último es deseable incrementar la producción, dado que se cuenta con las superficies agroforestales requeridas para su cultivo, además, según el Comité Sistema Producto Cacao Nacional A.C., el valor comercial del cacao Criollo alcanza cifras 50 % más altas con relación al cacao de tipo Forastero. Esto, representa una oportunidad para el crecimiento de la producción de este tipo de cacao, que marca tendencia en los mercados internacionales.



FIGURA 1.4. Principales estados productores de cacao en México (SIAP,2018)

1.3. Tratamientos postcosecha del cacao

Después ser cosechado, el cacao debe procesarse, debido a que los granos frescos son amargos e inadecuados para la manufactura de productos derivados del cacao dado que no tienen el sabor, aroma y gusto que los caracteriza (Caligiani *et al.*, 2015). Las etapas involucradas en este procesamiento son conocidas como beneficiado o tratamientos postcosecha estas consisten en la cosecha, fermentación, secado, limpieza, selección y almacenamiento.

1.3.1. Cosecha

El árbol de *Theobroma cacao* tiene frutos después de tres años y alcanza su máxima producción después de ocho a nueve años. Los frutos maduros se pueden encontrar en los árboles de cacao durante todo el año debido a que maduran aproximadamente entre 5-6 meses después de la polinización, sin embargo, algunos países tienen dos temporadas de producción altas por año (Beg *et al.*, 2017). La cosecha, productividad y cultivo pueden afectarse por cambios en las condiciones ambientales; la cosecha se realiza manualmente usando una herramienta de acero de mango largo para obtener el fruto de los árboles (Beg *et al.*, 2017).

1.3.2. Quiebre de la mazorca

Una vez cosechados y recolectados, el fruto del árbol se abre para sacar los granos de cacao, esto se realiza el día que se dispondrán los granos a la fermentación. La mazorca comúnmente se abre golpeándola con un machete para sacar los granos de cacao y ponerlos a fermentar.

1.3.3. Fermentación del grano de cacao

Después de extraer las semillas con pulpa empieza la etapa de fermentación. El cacao de variedad Forastero tarda de cinco a siete días en fermentarse, la variedad Trinitario de cuatro a seis días y la variedad Criollo requiere de un periodo entre tres y cuatro días (Lefeber *et al.*, 2014) La composición de la pulpa es un buen sustrato para el desarrollo de microorganismos; sin embargo, su cantidad y

componentes varían dependiendo de la especie de cacao, algunas especies tienen pulpa con sabor dulce y agradable, mientras otras especies como el cacao Criollo tienen la pulpa ácida (Nigam y Singh, 2014; Sarbu y Csutak, 2019).

El objetivo principal de la fermentación es causar la muerte del embrión del grano y desarrollar precursores de sabor (Nigam y Singh, 2014; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Durante la fermentación, el grano de cacao presenta una serie de transformaciones que incluyen la degradación de la pulpa por acción de las cepas microbianas, la muerte del cotiledón como resultado de cambios en el pH y en la temperatura, reducción en la astringencia y la amargura debido a la pérdida de flavonoides, y se presenta una transformación de color debido a la formación de taninos y polifenoles oxidados. Estas transformaciones ocurren dentro y fuera del grano de cacao, y conducen a la formación de precursores de sabor (Sarbu y Csutak, 2019).

En relación con lo anterior, la fermentación del cacao puede ser considerada como 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 debidas a actividad bioquímica de microorganismos presentes en el proceso (Dircks, 2009; Caligiani *et al.*, 2015).

1.3.3.1. Métodos de fermentación

Los métodos de fermentación considerados como estándar son el método de pila y en caja, y su duración depende de la variedad de cacao. Los otros métodos de fermentación incluyen la fermentación en cestas, bandejas, barriles, fermentación en depresiones o huecos realizados en el suelo o en plataformas, según la región productora (Schwan y Wheals, 2004; Nigam y Singh, 2014).

1.3.3.1.1. Fermentación en pilas

Este método consiste en disponer los granos de cacao en montones sobre hojas de plátano y cubrirlos con hojas iguales, al realizar correctamente este método es posible obtener cacao con buena calidad, por lo cual la cantidad de granos

dispuestos es un factor importante, según la Organización Internacional de Cacao (ICCO) una buena cantidad de granos para la fermentación en pilas está comprendida entre 25 y 2500 kg. Las hojas de plátano se extienden sobre palos para mantenerlas elevadas y facilitar el drenaje de los fluidos de fermentación, que finaliza dos días después de disponer los granos en pilas (Figura 1.5). Por otro lado, los granos de cacao son cubiertos con hojas de plátano con el fin de conservar el calor producido durante la fermentación. El color de la pulpa cambia en la superficie de la masa de granos, mientras que los granos más internos mantienen su color blanquecino, este cambio de color indica la producción de ácido acético a causa de la aireación, por esto es necesario que los granos sean mezclados durante la fermentación, mejorando la difusión de aire y causando la fermentación ácida en los granos más profundos de la pila (Nair, 2010; Nigam y Singh, 2014).



FIGURA 1.5. Fermentación en pilas

Fuente: Anónimo. (2021). Beneficio del cacao. Métodos de fermentación.
<https://poscosechacacao.blogspot.com/2017/08/metodos-de-fermentacion.html>

1.3.3.1.2. Fermentación en cajas

Las cajas son fabricadas comúnmente de madera (Figura 1.6), sin embargo, también pueden estar hechas de concreto o de fibra de vidrio. La dimensión estándar de las cajas es de un metro de ancho, largo y alto, además, con ese

tamaño pueden almacenar aproximadamente una tonelada de granos de cacao. De manera ideal y para improvisar aislamiento, las cajas deberían ser construidas con pared doble, con un espacio entre la pared interna y externa relleno de aserrín o bagazo de caña de azúcar. Las cajas tienen perforaciones en el fondo y en los lados para permitir el drenaje de los fluidos de fermentación y facilitar la aireación. Es importante que los granos sean mezclados en días alternos transfiriendo los granos de una caja a otra. Con el fin de hacer más fácil esta transferencia, la fermentación se puede llevar a cabo en unidades individuales o en filas de cajas dispuestas en niveles, es decir, una caja más elevada que la otra con una compuerta deslizante para trasladar los granos del nivel superior al inferior. Los granos se aíslan y protegen con hojas de plátano o un saco de yute en la parte superior de las cajas. En la fermentación en cajas, hay factores que generan grano sin calidad relacionados con la distribución desigual de la temperatura y del oxígeno a través de la masa de fermentación, esto puede causar la inducción de acidez en los granos o el crecimiento de mohos (Nair, 2010; Nigam y Singh, 2014).



FIGURA 1.6. Fermentación en cajas de madera

Fuente: Anónimo. (2021). Beneficio del cacao. Métodos de fermentación.
<https://poscosechacacao.blogspot.com/2017/08/metodos-de-fermentacion.html>

1.3.3.1.3. Fermentación en bandejas

Este método contrario al método de pilas y cajas produce una fermentación uniforme porque la aireación se realiza sin necesidad de remover los granos de cacao (Figura 1.7). Las bandejas son de madera y pueden contener alrededor de 45 kg de granos de cacao, además se disponen una encima de la otra en pilas que

contienen de ocho a doce bandejas, esta acomodación no causa la acumulación de fluidos dado que la bandeja del fondo se deja vacía para permitir el drenaje de los mismos y para que el aire pueda circular de manera más fácil. Después del primer día, la pila de bandejas se cubre con hojas de plátano o con sacos de yute para conservar el calor producido durante la fermentación. Con este método los granos no son removidos y se requiere menos espacio para realizar la fermentación (Nair, 2010; Nigam y Singh, 2014).



FIGURA 1.7. Fermentación en bandejas

Fuente: Anónimo. (2021). Beneficio del cacao. Métodos de fermentación. <https://poscosechacacao.blogspot.com/2017/08/metodos-de-fermentacion.html>

1.3.3.1.4. Fermentación en cestas

En este método, se requieren entre 30-40 kg de granos de cacao, aunque algunas veces se pueden fermentar hasta 90 kg. Las cestas son tejidas con material vegetal, no son herméticas, pero se forran con hojas de plátano antes de disponer los granos de cacao dentro de ellas con el fin de retener el calor durante el proceso. La base de la canasta no se cubre con hojas para permitir el drenaje de los fluidos producidos durante la fermentación (Figura 1.8). La mezcla de los granos contenidos en la canasta se realiza el segundo y cuarto día de la fermentación, y puede realizarse pasando los granos de una canasta a otra o removiéndolos con un utensilio de madera (Nigam y Singh, 2014).



FIGURA 1.8. Fermentación en cestas

Fuente: Anónimo. (2021). Beneficio del cacao. Métodos de fermentación. <https://poscosechacacao.blogspot.com/2017/08/metodos-de-fermentacion.html>

1.3.4. Secado del grano de cacao

Después de la fermentación, los granos de cacao se secan para reducir el contenido de humedad hasta 6 u 8 %, objetivo principal del secado, esto evita la presencia de moho durante el almacenamiento y transporte del grano de cacao (Nair, 2010; Kongor *et al.*, 2016). Durante este proceso, la oxidación bioquímica del ácido acético de los granos continua, mejorando el desarrollo de sabor (Engeseth y Pangan, 2018). Además, las reacciones presentadas durante el secado disminuyen las azúcares en el grano debido a la participación de reacciones de pardeamiento no enzimático para formar compuestos volátiles, dichas reacciones también causan la disminución de la concentración de proteínas debido a su continua hidrólisis y el incremento de los ácidos grasos libres causado por la acción 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 de cacao (Engeseth y Pangan, 2018; Predan *et al.*, 2019).

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 de manera general en dos tipos, el secado solar y el secado artificial (Kongor *et al.*, 2016). Sin embargo, la técnica más utilizada es el secado solar debido a su capacidad para inducir un sabor a chocolate más pronunciado, a su practicidad y economía. Además, esta técnica no otorga ningún sabor extraño como notas de humo a los granos de cacao secos, que es una de las condiciones principales para los granos de buena calidad (Predan *et al.*, 2019).

1.3.5. Almacenamiento del grano de cacao

Después de procesados los granos de cacao, todas las impurezas deben ser eliminadas, dejando solamente granos secos y sanos cuyas características deben ser color café oscuro o canela, quebradizos, con cáscara fácilmente desprendible, forma de frijol y olor agradable a chocolate. Para la clasificación del cacao se realiza una prueba de corte que consiste en tomar una muestra de granos representativa y partirlos de forma longitudinal con una guillotina de manera que se puedan observar las características de clasificación. Los granos clasificados se empacan en sacos de fique nuevos que deben estar secos y limpios (Nair, 2010; Sánchez Mafla, 2017).

Para su almacenamiento se debe cumplir la norma CAC/RCP 72-2013 del Codex Alimentarius. Los costales de cacao se deben almacenar en estibas en un lugar con techo, no deben tener contacto con el piso ni paredes, y el lugar de almacenamiento debe tener buena ventilación para mantener la humedad debajo del 80 %, además el producto no se debe almacenar por mucho tiempo para evitar el crecimiento de moho o la presencia de plagas. Una gran variedad de especies animales, como ratas, aves, escarabajos y otros, pueden causar pérdidas de cacao almacenado. Por otro lado, la pérdida de la calidad durante el transporte puede ser minimizada mediante el uso de recipientes ventilados que estén limpios y libres de contaminantes químicos (Beg *et al.*, 2017; Sánchez Mafla, 2017; Souza *et al.*, 2017).

1.4. Microbiología del proceso fermentativo

La fermentación del cacao es llevada a cabo por una sucesión microbiana y consiste de tres etapas principales. Los microorganismos son los responsables de

metabolizar la pulpa que rodea los granos de cacao, su actividad causa la muerte del grano y crea un ambiente que permite la formación de los precursores de sabor del cacao. El proceso fermentativo es dirigido por levaduras, las cuales dominan la población microbiana durante las primeras horas de la fermentación, después de las cuales la población de levaduras es superada por las bacterias ácido lácticas, al cabo de 48 horas, éstas disminuyen su población y empiezan a crecer bacterias ácido acéticas. Finalizando la fermentación es posible que predominen bacterias aerobias formadoras de esporas del género *Bacillus* y que crezcan hongos filamentosos en la superficie del grano (Lima *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2019).

La fermentación de los granos de cacao ocurre en dos etapas, la primera etapa es anaeróbica e involucra las levaduras y bacterias ácido lácticas. La segunda es realizada en condiciones aeróbicas, y está dominada por las bacterias ácido acéticas (Moreira *et al.*, 2013; De Vuyst y Weckx, 2016).

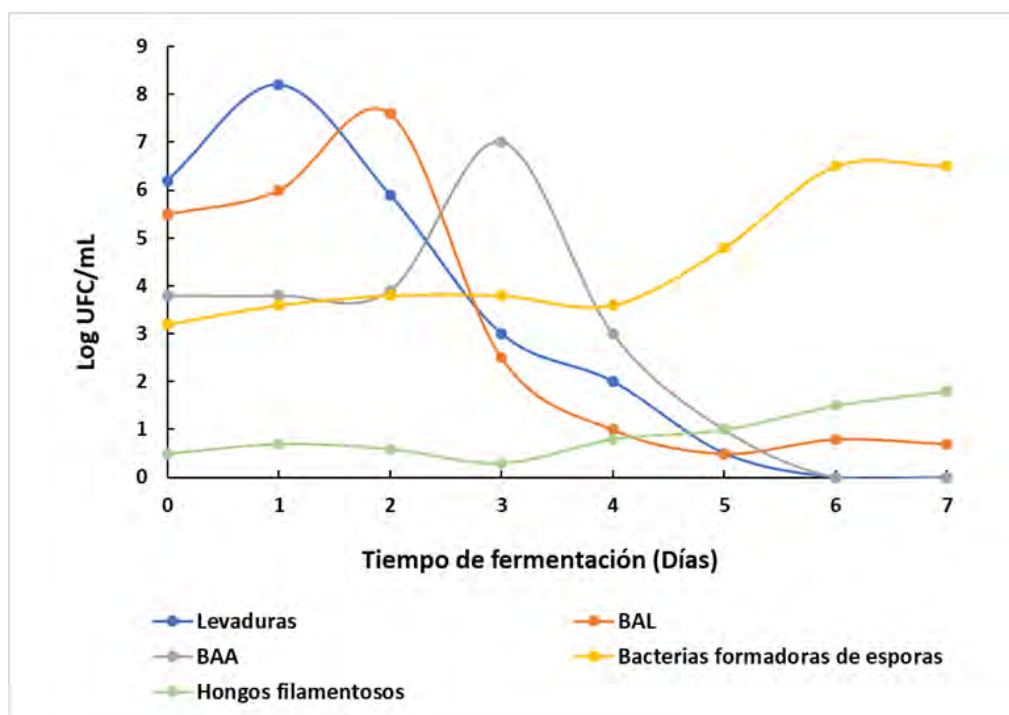


FIGURA 1.9. Comportamiento de los microorganismos durante la fermentación (Nigam y Singh, 2014)

En la Figura 1.9 se puede ver la dinámica poblacional de los microorganismos durante la fermentación de los granos de cacao. La primera etapa de la

fermentación se presenta durante el periodo de tiempo comprendido en 24 y 72 horas del proceso, esto depende de la variedad del cacao utilizado, dado que para el cacao de tipo Criollo el tiempo de fermentación es menor (Ardhana y Fleet, 2003; Nigam, 2014). En las primeras horas, las levaduras convierten el azúcar en alcohol mediante la acción de pectinasas que degradan la pulpa del grano, incrementando levemente la aireación en los granos. Después, las bacterias ácido lácticas se vuelven dominantes entre las 48 y 72 horas, convirtiendo azúcares y algunos ácidos orgánicos en ácido láctico. Finalmente, en la fase aeróbica, las bacterias ácido acéticas son las responsables de convertir alcohol en ácido acético mediante su oxidación. En esta fase, ocurre una reacción fuertemente exotérmica que es la principal responsable del aumento en temperatura que puede alcanzar 50 °C (Fowler, 2009; Kadow *et al.*, 2015; Gardea *et al.*, 2017).

1.4.1. Levaduras

Las levaduras son los microorganismos dominantes en la fermentación de cacao, especialmente durante las primeras etapas del proceso, además, son consideradas esenciales durante este proceso y en el desarrollo del sabor del chocolate (Nigam y Singh, 2014).

La actividad más importante de las levaduras es la producción de etanol a partir de carbohidratos, principalmente glucosa, produciendo dióxido de carbono y una amplia gama de metabolitos secundarios, como alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, cetonas, compuestos azufrados y nitrogenados, estos metabolitos pueden variar dependiendo de las especies de levaduras que predominen el proceso. Los azúcares son metabolizados por las células de las levaduras mediante glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato, y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La producción de etanol se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas, ácidas y ricas en carbohidratos, además, también causa un aumento en la temperatura que a valores entre 35 y 40 °C durante las 48 horas posteriores al inicio de la fermentación. Algunas levaduras pueden metabolizar ácido cítrico causando una disminución en la acidez de los granos (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2011; Nigam y Singh, 2014; Illegghems *et al.*, 2015; Sarbu y Csutak, 2019)

Por otro lado, las levaduras pueden producir enzimas pectinolíticas, deseables en la fermentación de cacao, porque su secreción reduce la viscosidad de la pulpa, incrementando la disponibilidad de oxígeno al mezclar los granos y proporcionando una fuente suplementaria de carbohidratos (Lima *et al.*, 2011; Illegghems *et al.*, 2015; Sarbu y Csutak, 2019). Las enzimas producidas por las levaduras son hidrolasas como las endo- y exo-poligalacturonosidasas, sin embargo, las últimas son las que se producen generalmente por las cepas de levadura presentes en la fermentación de cacao (Sarbu y Csutak, 2019).

1.4.1.1. Diversidad de levaduras durante la fermentación de cacao

Existe una diversidad de levaduras presentes durante la fermentación, sin embargo, los géneros que predominan el proceso son *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida* y *Torolospura*. La especie *Hanseniaspora* generalmente inicia la fermentación debido a su baja tolerancia al etanol y al calor, buena tolerancia a ambientes ácidos y no competitividad con las bacterias ácido lácticas creando condiciones necesarias para el crecimiento de la especies *Saccharomyces* y *Pichia*, que pueden crecer en ambientes ácidos, con etanol y algunas son termoresistentes (Ho, Zhao, y Fleet, 2014; Nigam y Singh, 2014; Sarbu y Csutak, 2019). Por otro lado, 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 (Nigam y Singh, 2014).

1.4.2. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas están presentes desde el inicio de la fermentación, sin embargo, las levaduras son dominantes. La actividad de las levaduras se inhibe por la concentración del alcohol, el incremento de pH y aumento de la aireación. Después de 48-96 horas, las condiciones se vuelven favorables para las bacterias ácido lácticas, las cuales dominan la población microbiana en este tiempo. Las bacterias ácido lácticas convierten un amplio rango de azúcares y algunos ácidos orgánicos en ácido láctico, por lo cual contribuyen a la degradación de la pulpa, la acumulación de sabores, y la inhibición de microorganismos de

deterioro (Nigam y Singh, 2014; Illegghems *et al.*, 2016; Sarbu y Csutak, 2019). Los productos del metabolismo de las bacterias ácido lácticas son el ácido láctico, etanol, ácido acético y otros ácidos orgánicos como el glicerol, manitol, dióxido de carbono y volátiles (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2011; Nigam y Singh, 2014; Illegghems *et al.*, 2015; Romanens *et al.*, 2019; Sarbu y Csutak, 2019)

Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas dominan la fermentación, utilizan glucosa mediante la ruta de las pentosas fosfato, sin embargo, este metabolismo produce ácido láctico con un rendimiento de 50 %. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas usan glucosa mediante la glucólisis para producir ácido láctico con un rendimiento mayor a 85 %. Las cepas heterofermentativas y homofermentativas están involucradas en la fermentación de los granos de cacao, pero la pulpa de cacao representa un sustrato ideal para las bacterias heterofermentativas debido a la alta concentración de fructosa y ácido cítrico. La producción de ácidos disminuye el pH de la pulpa, sin embargo, esta disminución no es tan drástica durante los primeros días de la fermentación debido a que las levaduras pueden asimilar el ácido láctico y al consumo del ácido cítrico por las bacterias ácido lácticas mediante la ruta del oxalacetato. La actividad de las levaduras y las bacterias ácido lácticas reducen los azúcares a niveles residuales (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2011; Bortolini *et al.*, 2016; Sarbu y Csutak, 2019).

Por otro lado, las bacterias ácido lácticas también producen compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica, como ácidos orgánicos (ácido fenil láctico, ácido láctico, ácido benzoico), peróxido de hidrógeno, derivados de ácidos grasos (ácidos grasos hidroxilados), antioxidantes fenólicos y compuestos de origen proteicos como la bacteriocina y péptidos antifúngicos (Dalie *et al.*, 2010; Crowley *et al.*, 2010; 2013a; Sadiq *et al.*, 2019). Estas sustancias impactan en la actividad de levaduras y otras bacterias, así como la prevención del crecimiento de hongos toxigénicos en los granos durante el secado y almacenamiento (Fahrurrozi *et al.*, 2019; Ruggirello *et al.*, 2019; Sarbu y Csutak, 2019).

1.4.2.1. Diversidad de bacterias ácido lácticas durante la fermentación de cacao

Las bacterias ácido lácticas comúnmente involucradas en la fermentación de cacao incluyen especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella*. Al comienzo de la fermentación, se pueden encontrar especies como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Fructobacillus tropeoli*, *Liquorilactobacillus cacaonum*, *Limosibacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Sin embargo, las bacterias ácido lácticas de la especie *Limosibacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum* son las predominantes durante la fermentación de cacao (De Vuyst y Weckx, 2016; Sarbu y Csutak, 2019).

1.4.3. Bacterias ácido acéticas

El consumo de la pulpa de los granos causa un incremento en la temperatura y aireación en la masa fermentativa, esto, permite el crecimiento de las bacterias ácido acéticas que metabolizan el etanol y el ácido láctico produciendo ácido acético mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La disminución del lactato presente en los granos es importante dado que el ácido láctico en altas concentraciones disminuye la calidad sensorial de los granos de cacao beneficiados (Lefeber *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Bortolini *et al.*, 2016; Sarbu y Csutak, 2019). Las bacterias ácido acéticas pueden estar en ambientes tanto neutrófilos como acidófilos y su metabolismo de producción de ácido acético es un proceso exotérmico que eleva la temperatura de los granos de cacao por encima de 50 °C (Lefeber, *et al.*, 2011; Ho, 2014).

El ácido acético incrementa la acidez en los granos y al difundirse causa la muerte de los cotiledones, lo que conlleva a 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 (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Dircks, 2009; Ho, 2014; Sarbu y Csutak, 2019).

1.4.3.1. Diversidad de bacterias ácido acéticas durante la fermentación de cacao

La especie *Acetobacter pasteurianus* es la más prevalente de las bacterias ácido acéticas presentes durante la fermentación de granos de cacao, posiblemente por su capacidad de metabolizar etanol, manitol y ácido láctico, además de presentar termoresistencia. Por otro lado, los géneros *Acetobacter* y *Gluconoacetobacter* pueden estar presentes en el inicio de la fermentación. Las especies de *Gluconoacetobacter* son menos comunes y son indicativas de una fermentación inadecuada porque 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 producir sabores desagradables (De Vuyst y Weckx, 2016).

1.4.4. Presencia de bacterias del género *Bacillus*

En el proceso de fermentación de cacao las bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* pueden proliferar, son microorganismos ubicuos en el ambiente, aerobios y anaerobios facultativos, con diversidad metabólica dado que pueden utilizar una gran cantidad de fuentes de carbono y además proliferarse bajo condiciones extremas. En las últimas horas de la fermentación, las mayores fuentes de carbono para estas bacterias son los ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido láctico y el manitol. Sin embargo, la presencia de estas bacterias no es deseada dado que producen un rango de compuestos volátiles durante la fermentación que causan notas y sabores indeseables (Lima *et al.*, 2011; Sarbu y Csutak, 2019). Su crecimiento puede ser afectado por el etanol y por las bacteriocinas producidas durante la fermentación (Dircks, 2009).

1.4.5. Presencia de hongos filamentosos

Se ha reportado que los hongos filamentosos no tienen una función importante durante la fermentación del cacao, sin embargo, su presencia durante el proceso se evidencia en la superficie, en las áreas aireadas y frías de la masa

fermentativa. Las especies fúngicas asociadas al deterioro y contaminación con micotoxinas no están presentes en la etapa de fermentación, sino en el proceso de secado. Las especies ocratoxigénicas comúnmente aisladas son *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum*, y *Penicillium nordicum* (Dircks, 2009; Nigam y Singh, 2014; Sarbu y Csutak, 2019).

1.5. Transformación fisicoquímica y bioquímica del grano de cacao

Los granos de cacao contienen un amplio rango de componentes, durante la fermentación varios de estos componentes se someten a cambios causados por la actividad de microorganismos, además de reacciones enzimáticas y no enzimáticas en los granos. La calidad y sabor de los granos de cacao dependen de los cambios químicos y bioquímicos que ocurren durante la fermentación (Dircks, 2009). La fermentación se puede dividir en externa e interna; la fermentación externa hace referencia a la acción microbiana en la pulpa y a los metabolitos formados a partir de esta, mientras que la fermentación interna se refiere a las reacciones enzimáticas y químicas dentro de los cotiledones (Lima *et al.*, 2011).

1.5.1. Cambios físicos del grano de cacao

La pulpa de cacao está físicamente separada de la semilla por la testa, que actúa como barrera semipermeable al flujo de sustancias entre la semilla y la pulpa. La testa es permeable a agua, etanol, ácido acético y láctico, y a algunos compuestos orgánicos volátiles, permitiendo que las sustancias producidas en la pulpa por el crecimiento microbiano se difundan a la semilla. Esta barrera incrementa su permeabilidad a medida que se produce la fermentación, permitiendo la difusión de polifenoles, péptidos, alcaloides, azúcares y algunas proteínas a la pulpa. Por otro lado, la testa actúa para contener las sustancias que son liberadas de las células de la semilla de cacao durante la fermentación. Dentro de la semilla hay separación vacuolar de lípidos, polifenoles y proteínas, cuando el grano está fresco, las vacuolas tienen la función de conservar su contenido hasta la germinación de la semilla, mientras que, durante la fermentación, estas estructuras vacuolares sufren daños permitiendo que sus componentes se difundan adentro del grano e interaccionen (Dircks, 2009).

1.5.2. Cambios químicos y bioquímicos del grano de cacao

La pulpa del cacao es aproximadamente el 40 % del peso de los granos de cacao frescos, contiene azúcares, principalmente fructosa, glucosa y sacarosa; la pulpa también contiene pequeñas cantidades de aminoácidos, minerales, vitamina C y ácido cítrico. Adicionalmente, la pulpa contiene pectina y otros polisacáridos que generan su textura viscosa. Por otro lado, la semilla de cacao contiene agua, grasa, proteínas, celulosa, almidón, pentosanos, sacarosa, polifenoles y ácidos orgánicos como el ácido cítrico, oxálico y málico, entre otros (Nielsen *et al.*, 2007; Nigam y Singh, 2014; Caligiani *et al.*, 2016). En la Tabla 1.2 se muestra la concentración aproximada de la pulpa y de la semilla (Dircks, 2009).

TABLA 1.2. Composición aproximada de los granos de cacao frescos (Dircks,2009)

Componente	Concentración promedio (% p/p)	
	Pulpa	Semilla
Agua	80-85	35-45
Lípidos	< 0.5	45-55
Azúcares	10-16	0.5-2
Polisacáridos	1.5-3	14-20
Pectina	4-7	2
Proteínas	0.6	1.5-1.7
Ácidos orgánicos	1-3	0.3-0.9
Sales inorgánicas	0.5-1	0.5-1
Polifenoles	< 0.1	7-10
Alcaloides	< 0.1	3-3.5

En los cotiledones, hay dos tipos importantes de células, en primer lugar, las células de almacenamiento que contienen grasas y proteínas y, en segundo lugar, las células de pigmento que contienen compuestos polifenólicos y metilxantinas (Dircks, 2009; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Nigam y Singh, 2014).

Durante la fermentación se llevan a cabo cambios químicos y bioquímicos que aumentan la temperatura de los granos, la permeabilidad celular y la difusión de ácidos y alcohol desde la pulpa a la semilla del grano causando la muerte del embrión, lo cual desencadena la ruptura de las células de almacenamiento y de pigmento en los cotiledones; esto permite que los componentes celulares de la

semilla se mezclen resultando en reacciones bioquímicas y enzimáticas que conllevan a la formación de los precursores de sabor y del color marrón típico de los granos de cacao bien fermentados (Fowler, 2009; Vega y Kwik-Urbe, 2012; Nigam y Singh, 2014). En Figura 1.10 se esquematizan los cambios más significativos durante la fermentación de cacao y la forma en que se relacionan entre ellos.

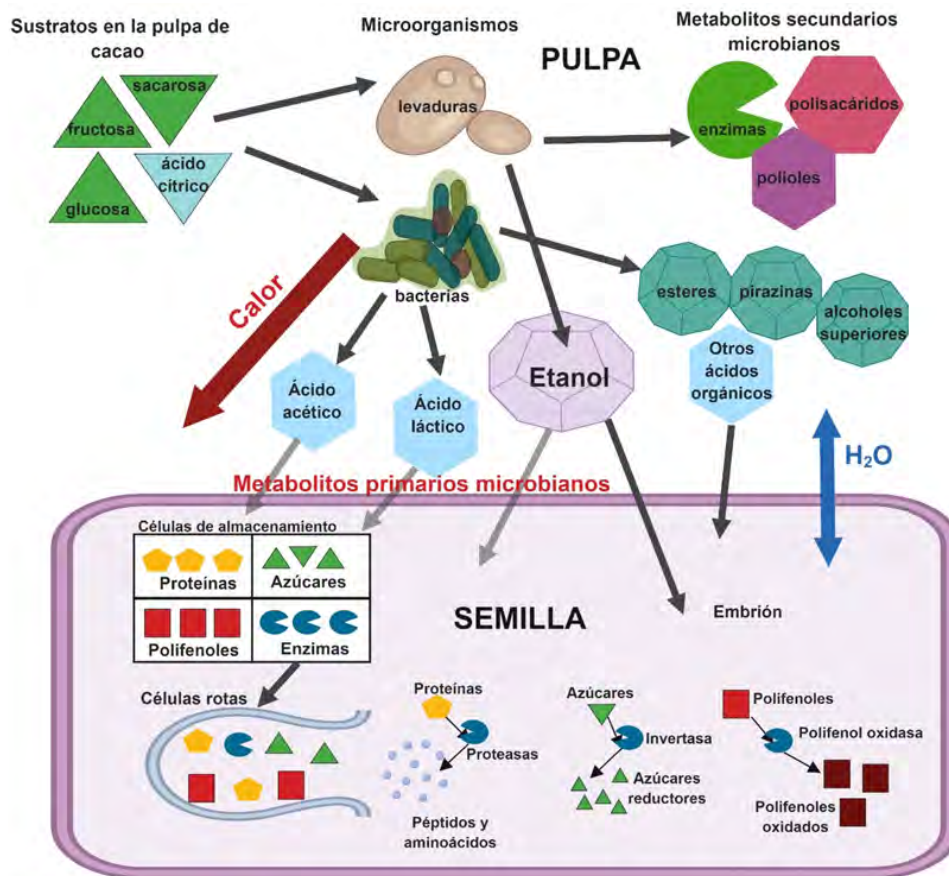


FIGURA 1.10. Cambios bioquímicos en los granos de cacao (Dircks, 2009)

De manera más detallada, el proceso de fermentación ocasiona la proteólisis inducida por acidificación de las células que almacenan las proteínas en la semilla del grano de cacao. Las proteínas son aproximadamente el 10-15 % de las semillas de cacao secas, los compuestos más abundantes después de los lípidos. El contenido total de proteínas en los granos de cacao consiste en 52 % de albúmina y 43 % de globulinas como la vicilina. Los péptidos derivados de la vicilina son los componentes principales a los precursores de aroma y sabor determinantes de la calidad (Kumari *et al.*, 2016; John *et al.*, 2018). Las enzimas endógenas,

endopeptidasa (Serino endopeptidasa; EC 3.4.21, Endopeptidasa aspártica; EC 3.4.23) y carboxipeptidasa (Serina carboxipeptidasa; EC 3.4.16), están presentes naturalmente en los granos de cacao durante la fermentación y producen péptidos y aminoácidos, que durante el secado y tostado en conjunto con los azúcares reductores mediante las reacciones de Maillard forman compuestos de aroma y sabor en el grano de cacao, entre los cuales se encuentra la metilpirazina, componente que brinda buen sabor al cacao y representa el 40 % de los componentes aromáticos (Afoakwa *et al.*, 2008; Jinap *et al.*, 2008; Navia-Orcés y Pazmiño-Piedra, 2012; Nigam y Singh, 2014; Rawel *et al.*, 2019).

Los polifenoles y taninos, principalmente flavonoides, leucocianinas, catequinas y antocianinas son responsables del color, la astringencia y propiedades antioxidantes del cacao. En la fermentación, los niveles de algunos de los polifenoles amargos y astringentes son reducidos debido a que se difunden en el grano y son oxidados por la enzima polifenoloxidasas (1,2-benzenediol:oxígeno oxirreductasa; EC 1.10.3.1) para producir taninos insolubles (Afoakwa *et al.*, 2008; Jinap *et al.*, 2008; Dircks, 2009; Navia-Orcés y Pazmiño-Piedra, 2012; Nigam y Singh, 2014; John *et al.*, 2018; Racine *et al.*, 2019). Las antocianinas principales son la 3- β -D-galactosidil y 3- α -L-arabinosil cianidinas, estas dan el color púrpura al cacao de tipo Forastero, mientras que su ausencia en los granos de cacao criollo causa el color blanco en ellos. Adicionalmente, las antocianinas son inestables y su color es afectado por el pH, presentan color rojo a valores de pH bajos, a un pH 5 este color se desvanece, y se vuelve púrpura a valores de pH entre 6-7. Este cambio en la coloración también puede ser causado por la formación de un complejo débil con otra molécula de antocianina o por hidrólisis de las cianidinas y azúcares mediante la acción de glucosidasas, como consecuencia el color de los cotiledones puede volverse más claro (Dircks, 2009; Nigam y Singh, 2014; Aprotosoai *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2019). Por otro lado, las metilxantinas (teobromina y cafeína) constituyen aproximadamente el total de alcaloides en los granos de cacao. La teobromina es la más abundante y la cafeína es encontrada en pequeñas cantidades. La presencia de estos compuestos causa el sabor amargo de los granos y su nivel disminuye durante la fermentación aproximadamente en un 30 % debido

a la difusión entre los cotiledones (Tarka y Cornish, 1982; Rodríguez-Campos *et al.*, 2012; Bartella *et al.*, 2019).

1.6. Cultivo iniciador

Un cultivo iniciador está definido como una preparación de microorganismos que son utilizados para contribuir con el comienzo de la fermentación, produciendo cambios específicos en la composición química y las propiedades sensoriales del sustrato para obtener un producto más homogéneo (Medina-Pradas, Pe, y Noe, 2017). La adición selectiva del cultivo iniciador a un proceso fermentativo permite un mejor control y reduce el riesgo de fallas durante el mismo, además de que aumenta la estabilidad, el perfil sensorial y la inocuidad del producto final (Viesser *et al.*, 2020). El mercado de los alimentos fermentados se encuentra en continuo crecimiento y por ello requiere tener una mayor diversificación de productos. Por esta razón, en los últimos años se ha incrementado el número de publicaciones científicas relacionadas con el estudio de la selección de nuevas cepas microbianas con varias propiedades funcionales específicas. Además, en estudios más recientes se ha estudiado la complejidad del metabolismo microbiano en la producción de moléculas específicas, como enzimas, compuestos aromáticos, compuestos antimicrobianos o antifúngicos y polisacáridos, los cuales pueden tener un impacto positivo en la calidad nutricional y sensorial del alimento fermentado (Viesser *et al.*, 2020).

La selección de microorganismos para la formulación de cultivos iniciadores para la producción de alimentos y bebidas fermentadas involucra una serie de etapas sistemáticas, como las que se observan en la Figura 1.11. Por lo general, el gran número de cepas microbianas hace que se requiera aplicar pruebas secuenciales para reducir de forma progresiva el número posible de candidatos, entre las cuales destacan: i) la determinación de la tolerancia al estrés, ii) producción de metabolitos de interés (enzimas, compuestos aromáticos, etc) y iii) la evaluación de los parámetros tecnológicos. Al final de este procedimiento, se seleccionan las cepas que presentan el mayor número de propiedades funcionales y, que, al mismo tiempo, no presentan algún tipo de características no deseables (Pereira *et al.*,

2019). En la elaboración de alimentos fermentados están involucrados tres tipos de fermentaciones: alcohólica, láctica, y acética (Steinkraus, 2002). Estas fermentaciones pueden llevarse a cabo simultáneamente en algunas matrices alimentarias, como los granos de cacao para la elaboración del chocolate (Schwan y Wheals, 2004; Lima *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015; De Vuyst y Weckx, 2016; Pereira *et al.*, 2016;).

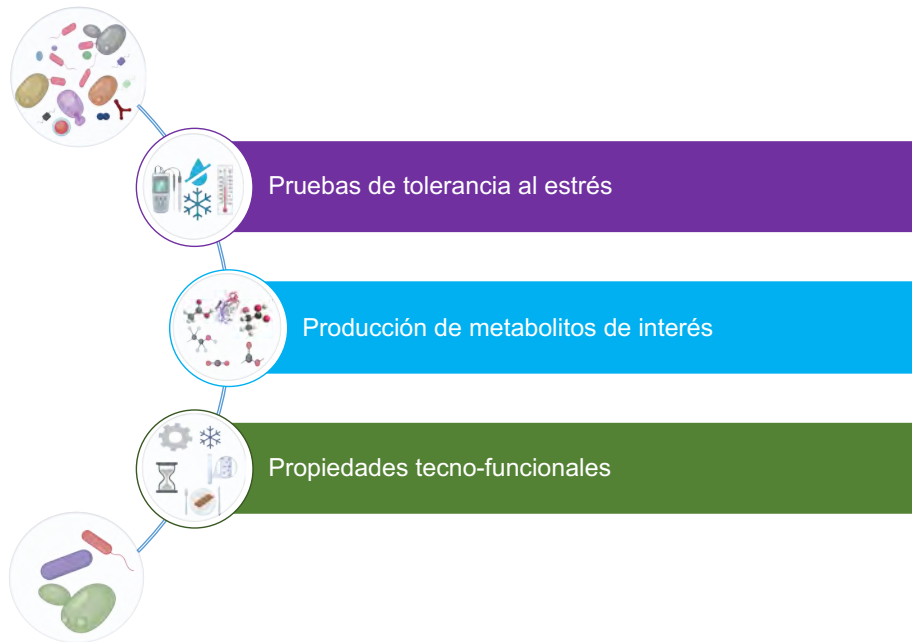


FIGURA 1.11. Esquema de etapas de la formulación de un cultivo iniciador (Pereira *et al.*, 2019)

Cultivos iniciadores para la fermentación del cacao

El proceso de fermentación de cacao es un proceso espontáneo llevado a cabo por una gran cantidad de microorganismos autóctonos, sin embargo, el uso de bacterias y levaduras como cultivo iniciador tiene un papel importante para el control en la producción de alimentos fermentados, por lo cual se ha establecido como una estrategia viable para dirigir la fermentación de cacao. Al usar un cultivo iniciador apropiado, la fermentación se puede dirigir y controlar, lo cual influye en la rapidez del proceso y en la calidad del cacao obtenido. Por esta razón la inoculación de la fermentación con distintos consorcios microbianos puede conducir al perfil de aroma

y sabor que se desea en los granos de cacao siempre y cuando el consorcio sea formulado a partir de microorganismos de la microbiota central de la fermentación de cacao (Engeseth y Pangan, 2018).

Entre los microorganismos con más presencia en las fermentaciones de cacao en diversas partes del mundo se tienen las levaduras de las especies, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Torulaspora delbrueckii*, Estas levaduras han sido utilizadas como cultivos iniciadores para el proceso de fermentación del grano de cacao. De forma similar, las bacterias ácido lácticas (BAL) con más prevalencia en la fermentación de cacao son *Limosilactobacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum* y en el caso de las bacterias ácido acéticas (BAA) se encuentra mayoritariamente *Acetobacter pastorianus*, las cuales también han sido empleadas para la formulación del cultivos iniciadores (Schwan y Wheals, 2004; Crafacck *et al.*, 2013, 2014).

1.6.1. Selección de microorganismos para formular un cultivo iniciador para la fermentación de cacao

El uso de cultivos iniciadores ha mostrado que se pueden obtener granos de cacao con calidad aromática, sin embargo, los parámetros cinéticos y la tolerancia a estrés de las cepas microbianas son factores importantes para que un cultivo pueda llevar a cabo el proceso fermentativo del cacao. La selección de cepas se realiza respecto a las condiciones presentadas durante la fermentación de cacao, por lo cual las cepas se deben adaptar al ambiente. Para conocer las cepas que se adaptan es necesario realizar una evaluación de los parámetros de crecimiento, y de la capacidad que tienen las cepas para soportar diferentes variaciones en el pH, la temperatura y las concentraciones de etanol, ácido láctico, ácido acético, glucosa y fructosa (Pereira *et al.*, 2012). Se han realizado estudios en los que se identifican las cepas que pueden ser seleccionadas para un cultivo iniciador potenciales por su habilidad de resistir a las condiciones fisicoquímicas además producir las enzimas necesarias para la fermentación de cacao (Vinícius *et al.*, 2012; Visintin *et al.*, 2016; Koffi *et al.*, 2018). Además, las cepas también pueden seleccionarse por su

actividad antifúngica, tal como lo reporta Romanens *et al.* (2019) quienes seleccionaron cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas para un co-cultivo antifúngico para la fermentación de cacao; en su estudio seleccionaron las cepas que permitieron la inhibición de crecimiento de hongos filamentosos y crecieron a las condiciones de estrés a las que están expuestas durante la fermentación de cacao.

1.6.2. Criterios de los microorganismos para formar un cultivo iniciador para la fermentación del cacao

Para lograr una correcta selección de los microorganismos autóctonos del proceso de fermentación de cacao que formarán parte del cultivo iniciador es necesario tomar en cuenta las características fisiológicas y metabólicas de los microorganismos.

En el caso de las levaduras, existe una gran diversidad, sin embargo, se ha visto que el uso de cultivos iniciadores conformados por las cepas de levaduras autóctonas del proceso como *Saccharomyces*, *Pichia* y *Hanseniaspora* tienen un marcado efecto en la eficiencia de la fermentación y la calidad del grano fermentado, debido a entre otras cosas a la producción de compuestos aromáticos, la alta tasa de crecimiento y su actividad pectinolítica (Meersman *et al.*, 2013; Ho, 2014; De Vuyst y Weckx, 2016; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Las cepas de *S. cerevisiae*, además de ser predominantes, han presentado características como la producción y tolerancia al etanol, a ambientes ácidos, así como termoresistencia. Por su parte, algunas cepas de *P. kudriavzevii* producen compuestos volátiles aromáticos como etanol, acetaldehído, acetato de etilo, butanodiona, acetato de butilo, y acetato de hexilo, compuestos que contribuyen como precursores de sabor del chocolate. También, se ha encontrado que estas cepas tienen la habilidad de soportar condiciones de estrés a altas temperaturas y concentraciones de etanol, y tienen la habilidad de metabolizar el ácido cítrico presente en la pulpa (Pereira *et al.*, 2017; Delgado-Ospina *et al.*, 2020).

Tomando en cuenta algunos de estos criterios (producción de ácidos orgánicos, tolerancia al calor y al etanol, así como consumo de citrato), se ha

demostrado que las bacterias ácido-lácticas *L. fermentum* y *L. plantarum* son candidatos idóneos para formar parte de consorcios microbianos para el proceso de cacao (Camu *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2010; Lefeber *et al.*, 2011; Adler *et al.*, 2013; Moens, Lefeber, Vuyst, *et al.*, 2014; Cempaka *et al.*, 2014; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019; Viesser *et al.*, 2020). Las características que hacen a *L. fermentum* un buen candidato para formar parte de los consorcios es la capacidad de utilizar la fructosa como fuente de carbono, de metabolizar el citrato, la producción de manitol, además de presentar una alta tolerancia a estrés térmico y de pH (Camu *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2010; Lefeber *et al.*, 2011; Adler *et al.*, 2013; De Vuyst y Weckx, 2016; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Respecto a *L. plantarum*, se ha reportado que cepas aisladas de la fermentación de cacao en Brasil tienen la capacidad de crecer más rápidamente en presencia de fructosa que en presencia de glucosa, sin ningún aceptor de electrones externo, por esta razón, estas cepas fueron clasificadas como bacterias fructofílicas facultativas, cuyo crecimiento es limitado por la glucosa y favorecido por la fructosa. Además, de que una de las cepas identificada como *L. plantarum* LPBF 35 produce algunos compuestos aromáticos como acetaldehído, acetato de etilo, nonanal y ácido octanoico, los cuales producen una mayor diversidad aromática en el cacao fermentado cuando es utilizado como cultivo iniciador. Por otro lado, esta cepa de *L. plantarum* también mostró tener una buena capacidad de metabolizar el ácido cítrico con la consecuente producción de ácido láctico lo cual genera nuevas perspectivas para su uso como cultivo iniciador (Viesser *et al.*, 2020). En el caso de las bacterias ácido acéticas, *A. pasteurianus*, es autóctona del proceso y tiene la capacidad de oxidar etanol, manitol y ácido láctico además de mostrar una alta tolerancia al estrés térmico. Otra cepa de bacteria ácido acética es *Acetobacter tropicalis*, estas tienen la capacidad de oxidar etanol y ácido láctico, producir ácido acético y tolerar ambientes ácidos, el etanol, el ácido acético y ser termoresistentes (Pereira *et al.*, 2016).

Por estas razones, se considera que un consorcio microbiano adecuado para dirigir el proceso de fermentación del cacao debe de estar compuesto por al menos una cepa de levadura, una bacteria ácido láctica y una bacteria ácido acética,

teniendo en consideración que se debe seleccionar una bacteria ácido láctica que no tenga una alta tasa de producción de ácido láctico, para que la acumulación de este metabolito no impacte negativamente la calidad del grano de cacao.

1.6.2.1. Actividad pectinolítica

Entre los criterios para seleccionar los microorganismos que forman parte de un cultivo iniciador en la fermentación de cacao se tiene la actividad pectinolítica. Las levaduras son las responsables de degradar la pulpa mucilaginososa del cacao durante la fermentación y de reducir su viscosidad, esto facilita la aireación de la masa fermentativa y permite el crecimiento de las bacterias (Crafack *et al.*, 2013; Koffi *et al.*, 2018). Las enzimas pectinolíticas de las levaduras son las encargadas de la degradación de la pectina en la pulpa de cacao (4-7 %), que es una cadena lineal de ácido poligalacturónico unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 (Haile y Kang, 2019; Samagaci *et al.*, 2014). Las pectinasas tienen tres actividades enzimáticas que actúan sinérgicamente: la principal es la poligalacturonasa (Endopoligalacturonasa; EC 3.2.1.15), que se encarga de cortar la cadena de ácido galacturónico de la pectina, solubilizando completamente la pectina. Debido a que la poligalacturonasa solamente puede actuar sobre las funciones carboxílicas libres de las unidades de galacturónico, cuando las moléculas están esterificadas, es necesaria la acción de la pectin metil esterasa (Pectinesterasa; EC 3.1.1.11). Por último, la pectin liasa (Pectin liasa; EC 4.2.2.10) escinde la pectina en trozos más pequeños, acelerando el proceso de degradación (Rodríguez Gàmez y Serrat Díaz, 2008). En la Figura 1.12, se observa el esquema de la acción de estas tres enzimas.

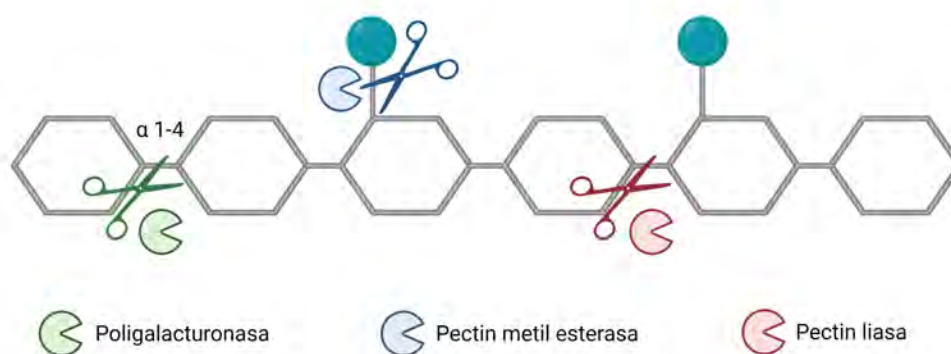


FIGURA 1.12. Acción de las pectinasas

1.6.2.2. Metabolismo de ácido cítrico

Para las bacterias ácido lácticas, el consumo de ácido cítrico es un factor clave en su adaptación al ambiente de crecimiento presentado en la fermentación de cacao. El pH afecta el comportamiento y el metabolismo de los microorganismos que fermentan el cacao. El ácido cítrico impacta con un pH inicial en la pulpa del cacao, con valores entre 3-3.5, que favorece el crecimiento de las levaduras en condiciones anaeróbicas. La difusión del ácido dentro y fuera de los granos modula el pH, el cual afecta las enzimas proteasas e invertasas que influyen en la producción de aminoácidos, péptidos y azúcares reductores (Koffi *et al.*, 2018). Es necesario un incremento en el pH de la masa fermentativa para el crecimiento de las bacterias ácido acéticas, y para que se desencadenen las reacciones bioquímicas; dicho incremento es fomentado por las bacterias ácido lácticas que degradan y consumen el ácido cítrico mediante la ruta del oxalacetato.

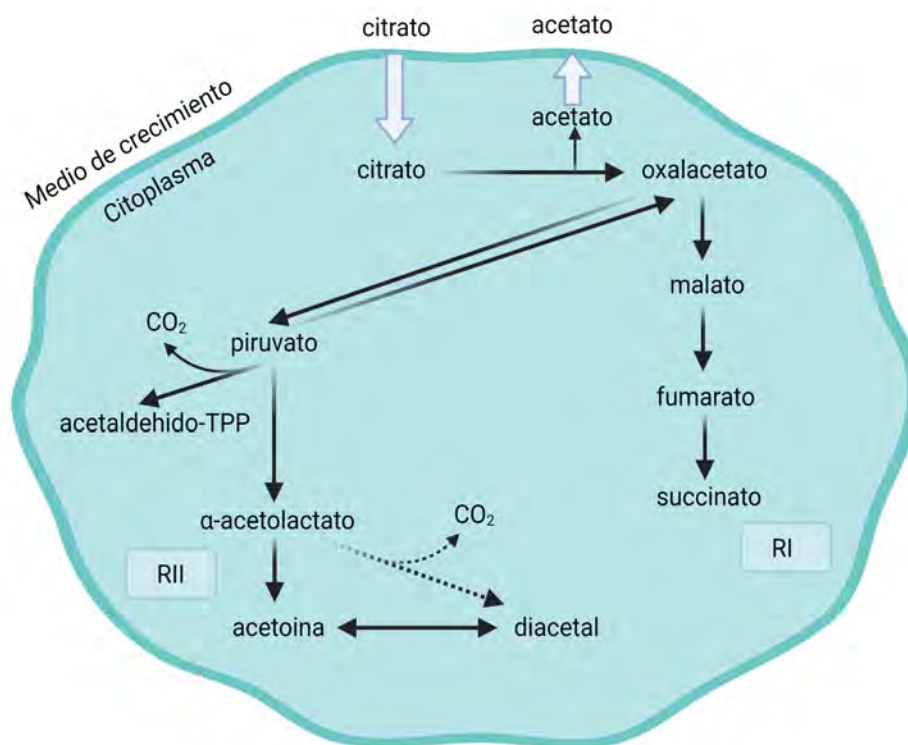


FIGURA 1.13. Rutas de metabolismo de citrato por las BAL de la fermentación de cacao (Ouattara *et al.*, 2016)

Para que el citrato sea metabolizado es necesaria la acción de la enzima citrato liasa (Citrato-liasa; EC 4.1.3.6), que cataliza el ácido en oxalato y acetato; la secreción de esta enzima es inducida por la presencia del sustrato y su acción desaparece después del consumo del ácido en el medio. Las BAL que producen esta enzima son de interés para la fermentación de cacao, además dependiendo de la cepa bacteriana pueden metabolizar el ácido cítrico para producir ácido succínico, acetoina, acetaldehído o ácido láctico (Figura 1.13). El ácido succínico es débilmente volátil, por ende, afecta la calidad del grano y es de poco interés en la fermentación de cacao. Por otro lado, la acetoina indica que el consumo de citrato es óptimo para la fermentación de cacao, dado que este compuesto da sabor a mantequilla.

1.6.3. Uso de los cultivos iniciadores en la fermentación de cacao

En 1998, Schwan realizó el primer estudio del comportamiento de un cultivo iniciador mixto compuesto por levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, en este estudio se demostró que los perfiles de fermentación utilizando cultivos iniciadores fueron similares a la fermentación natural respecto a la velocidad, sucesión microbiana y el rendimiento de metabolitos, además de que la calidad de los productos finales obtenidos fue similar, indicando que las especies utilizadas fueron suficientes para imitar la fermentación natural. Además, se observó mayor estabilidad microbiológica respecto a la fermentación espontánea, dado que no hay contaminación natural con otros microorganismos. A partir de este trabajo, sobre todo en la última década, se han estudiado y utilizado varias cepas microbianas autóctonas como cultivos iniciadores para este proceso de fermentación. Los microorganismos utilizados para la inoculación de este proceso pueden estar conformados por una sola levadura o bacteria, pero pueden ser consorcios de microorganismos.

Por otro lado, Leal *et al.* (2008) evaluaron la capacidad de una cepa híbrida de *K. marxianus* como cultivo iniciador, y en sus resultados encontraron que el chocolate producido con esta cepa fue más aceptado por los jueces sensoriales en comparación con los chocolates obtenidos de un proceso de fermentación

espontánea. Un estudio similar mostró que un cultivo iniciador mixto compuesto por las especies *P. kluyveri* (aromática), *K. marxianus* (pectinolítica), *L. fermentum* L18 y *A. pasteurianus* A149, aparentemente tiene un efecto positivo en el perfil de sabor en comparación con los cultivos espontáneos, dado que presentan notas más altas de descriptores sensoriales como dulzura, frutal y aroma de cacao (Crafack *et al.*, 2013; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Sandhya *et al.* (2016) inocularon con diferentes porcentajes (10-60 %) un consorcio definido por *S. cerevisiae*, *L. plantarum* y *A. aceti*, y compararon los resultados obtenidos respecto a una fermentación natural, sus resultados mostraron que el perfil sensorial con inóculo del 10 % tuvo notas de 8.5 en la escala hedónica además de reducir el tiempo de fermentación a tres días, mientras que con las porcentajes de inóculo de 30 a 60 % la fermentación fue indeseable resultado en una disminución de la calidad de los granos de cacao. Magalhães da Veiga Moreira *et al.* (2017), estudiaron el efecto de un cultivo iniciador de la fermentación de cacao en las características del sabor del chocolate, encontrando que además, de que se aceleró el proceso de fermentación, los compuestos volátiles producidos fueron diferentes a las obtenidas con la fermentación espontánea, encontrándose descriptores relacionados con amargura, dulzura y de cacao más marcadas en los chocolates producidos con la fermentación inoculada con el cultivo iniciador.

1.7. Calidad del grano de cacao beneficiado

1.7.1. Indicadores de calidad del cacao

El grano de cacao es aceptado comercialmente debido a su aroma, el cual también determina su calidad. La calidad de aroma del cacao no solamente es resultado del genotipo y origen geográfico de la planta, sino también depende de los tratamientos postcosecha, especialmente de la fermentación y el tostado, los granos bien fermentados tienen alta concentración de aminoácidos libres y ausencia de sacarosa. El aroma es formado por los compuestos volátiles que son percibidos por los receptores de olor del tejido olfatorio de la cavidad nasal, estos compuestos se forman durante el tostado del grano a partir de las moléculas precursoras de aroma generadas durante la fermentación. Los precursores formados en cantidades

y proporciones adecuadas son esenciales para la producción óptima de compuestos volátiles en el tostado (Voigt *et al.*, 2016; Alvarez Robledo, 2018; Castro-Alayo *et al.*, 2019).

Por otro lado, los aromas básicos de los granos de cacao incluyen notas de chocolate agradables y equilibradas, estas notas básicas son atribuidas a la 2,3,5,6-tetrametilpirazina y a la 2,3,5-trimetilpirazina. Además de las pirazinas, los aldehídos también contribuyen en el aroma del cacao. Los compuestos aromáticos típicos se desarrollan durante el tostado a partir de los precursores de aroma mediante la reacción de Maillard entre azúcares reductores y péptidos, además también se producen compuestos intermedios como furanos, aldehídos, cetonas y otros compuestos volátiles influenciando el perfil de aroma del cacao. Los péptidos y aminoácidos hidrofóbicos libres como leucina, alanina, fenilalanina y tirosina son precursores que se desarrollan durante la fermentación mediante la proteólisis de vicilina y contribuyen a la formación de aromas del cacao por su reacción con fructosa y glucosa durante el tostado. Sin embargo, no existe una correlación cuantitativa entre la cantidad de precursores y los compuestos aromáticos formados. En cuanto a los aldehídos de degradación de Strecker como el 3-metilbutanal y fenilacetaldehído, son derivados de la valina, leucina, isoleucina y fenilalanina (Tran *et al.*, 2015; Castro-Alayo *et al.*, 2019).

1.7.2. Indicadores de inocuidad

El crecimiento de hongos filamentosos puede provocar el deterioro del grano de cacao al producir sabores desagradables que afectan la calidad del grano, por lo cual su presencia en el cacao es indeseable, y se asocia a la formación de sabores desagradables, deterioro y acumulación de micotoxinas. Varios hongos, especialmente las especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* producen micotoxinas que pueden causar intoxicación aguda o crónica, y daños a los humanos después de la ingesta de alimentos contaminados. Entre las micotoxinas, las aflatoxinas y ocratoxinas son de especial interés dada su alta incidencia y toxicidad (Sánchez-Hervás *et al.*, 2008; Copetti *et al.*, 2014).

Las aflatoxinas representan el grupo más estudiado de las micotoxinas, las especies aflatoxigénicas es alta en países tropicales, por lo cual su ocurrencia en los granos de cacao es amplia. Debido a sus propiedades hepatotóxicas, teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas, varios países han impartido regulaciones con el objetivo de minimizar la exposición de los humanos a las aflatoxinas (Iamanaka *et al.*, 2011; Copetti *et al.*, 2014). Por otro lado, las ocratoxinas tienen propiedades nefrotóxicas, inmunotóxicas, teratogénicas y carcinogénicas, han sido asociadas con la nefropatía endémica balcánica y el desarrollo de tumores en el tracto urinario, además está clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer (IARC) como carcinogénico para humanos, con categoría 2B. La ocratoxina, es un metabolito producido principalmente por hongos filamentosos de las especies *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii* y *Aspergillus ochraceus*, que crecen cuando la actividad de agua es mayor a 0.85 (Bonvehí, 2004; Mounjouenpou *et al.*, 2008; Sánchez-Hervás *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2019).

1.8. Antecedentes de investigación del grupo de Tecnología de Alimentos

En el grupo de investigación de Tecnología de Alimentos de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) se han realizado diversos estudios en las diferentes etapas de beneficio del cacao, entre los cuales destacan los estudios sobre la incidencia de hongos toxigénicos durante las etapas de fermentación, secado y almacenamiento; estudios sobre la capacidad antifúngica de las bacterias ácido lácticas autóctonas de la fermentación de cacao y finalmente estudios acerca la formulación de cultivos iniciadores con microorganismos autóctonos de la fermentación del cacao.

Hernández-Medina, (2018), estudió la diversidad de hongos toxigénicos en las diferentes vías de procesamiento de cacao y correlacionó su impacto sobre la calidad sanitaria del mismo. Se aislaron hongos toxigénicos de las diferentes etapas del beneficiamiento del cacao y se probó su capacidad de producir micotoxinas. A partir de muestras contaminadas con micotoxinas se estudió la diversidad de hongos toxigénicos, mediante PCR – DGGE y se identificaron las etapas del

proceso que favorecen la pérdida de inocuidad del grano. Se demostró que durante la fermentación del grano de cacao no existe incidencia de hongos toxigénicos. Sin embargo, el secado por zarandas protegidas y por samoas favorecen el desarrollo de cepas toxigénicas y la producción de OTA y AFLA. Además, se encontró que los granos almacenados en sacos de yute presentaron contaminación por hongos toxigénicos. Este estudio permitió identificar las etapas de proceso en las cuales se favorece el desarrollo de hongos toxigénicos y contaminación del grano de cacao con Aflatoxinas y OTA, permitiendo establecer medidas de control para evitar su formación.

Cervantes-Ilizaliturri, (2020), aisló y caracterizó bacterias ácido lácticas aisladas del cacao con capacidad antifúngica, y obtuvo cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum*; una de *Lactobacillus fermentum*; dos de *Lactobacillus brevis* y una de *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* del proceso de fermentación del grano de cacao. Se encontró que los extractos libres de células de las BAL mostraron tener un efecto inhibitorio y que *A. ochraceus* mostró una mayor susceptibilidad a los extractos libres de células de las BAL, con un efecto inhibitorio cercano al 90%. También, se tuvo que la cepa de *Lb. plantarum* LAB-CTA-18-3 mostró un mayor potencial antifúngico sobre el crecimiento de los hongos evaluados. Concluyéndose que la cepa *Lb. plantarum* LAB-CTA-18-3 tiene potencial para ser utilizada como biocontrol en la cadena productiva del cacao.

En 2021, Huerta-Conde *et al.*, aislaron microorganismos autóctonos para formular un inóculo definido para la fermentación de cacao en pequeña escala. Se aislaron cepas de levaduras, entre las cuales se encontraron levaduras del género *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*), BAL, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* y BAA de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Las fermentaciones del cacao fueron inoculadas con un inóculo conformado por *Yarrowia lipolytica*, *Lactococcus lactis* y *Acetobacter aceti*, variando solamente la forma de inoculación (mixta o sucesión microbiana), y fueron comparadas con una fermentación espontánea. Se observó que la fermentación conducida por un inóculo agregado en forma sucesiva presentó un comportamiento

similar al proceso espontáneo, obteniéndose granos de cacao bien fermentados con calidad homogénea e inocuos.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante la fermentación de cacao ocurren cambios físicos, químicos y bioquímicos en el grano de cacao que conducen a la formación de precursores de aroma y sabor. Los microorganismos comúnmente presentes durante la fermentación son las levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, y sus metabolitos pueden afectar positiva o negativamente el producto final y su calidad. Además, la presencia de las bacterias ácido acéticas y lácticas ejerce un efecto de biocontrol.

Los cultivos iniciadores mixtos han sido estudiados durante las últimas décadas, dado que son potenciales candidatos para mejorar los resultados de la fermentación respecto a los indicadores de calidad, inocuidad y los análisis sensoriales. Sin embargo, aún no se reportan estudios de selección de microorganismos autóctonos de la fermentación de cacao en la región de Tabasco para formular cultivos iniciadores, por esta razón, en este estudio se pretende seleccionar las cepas de acuerdo con su tolerancia al estrés y su caracterización metabólica.

3. HIPOTESIS

Es posible generar una propuesta de cultivo iniciador adecuado para la fermentación del cacao mediante pruebas de selección fisiológica (pruebas a diferentes condiciones de estrés y actividad pectinolítica) y funcional (actividad antifúngica y consumo de ácido cítrico) del cepario de microorganismos aislados de la fermentación de cacao por el grupo de Tecnología de Alimentos de la UNIDA.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Seleccionar levaduras y bacterias autóctonas de la fermentación de cacao considerando criterios fisiológicos, funcionales y metabólicos con el objetivo de formular un cultivo iniciador que permita obtener *a posteriori* granos de cacao con calidad homogénea.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar bioquímica, fisiológica y metabólicamente las levaduras aisladas del proceso de fermentación del cacao para analizar su potencial para formar parte de un cultivo iniciador.
- Seleccionar las bacterias ácido lácticas aisladas previamente con respecto a su caracterización fisiológica, metabólica y funcional para ser incluidas en un cultivo iniciador.
- Caracterizar fisiológicamente las bacterias ácido acéticas aisladas previamente para ser seleccionadas en la formulación de un cultivo iniciador.
- Plantear cultivos iniciadores mixtos para la fermentación de cacao compuestos por levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas considerando su caracterización.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Microorganismos

Se utilizaron cepas microbianas autóctonas aisladas del proceso de fermentación de cacao criollo. El proceso fermentativo del cual se aislaron y caracterizaron bioquímicamente las cepas de levaduras fue realizado en las instalaciones de la empresa “Agroindustriales Serranas S.A de C.V” ubicado en Comalcalco, Tabasco. Las cepas de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas fueron previamente aisladas e identificadas fenotípicamente por el grupo de investigación de Tecnología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz.

5.1.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las levaduras fue medio YPD (Dextrosa 2 % (p/v), Peptona de caseína 2 % (p/v) y Extracto de levadura 1% (p/v). Para las bacterias ácido lácticas se utilizó medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y para las bacterias ácido acéticas se utilizó medio GEA (Glucosa 1 % (p/v), Etanol 0.5 % (p/v), Ácido acético 0.3 % (p/v), Peptona 0.5 % (p/v), Agar 1.5 % (p/v), Extracto de levadura 0.8 % (p/v)).

5.2. METODOLOGÍA

En la Figura 5.1 se muestra un esquema de la metodología general que se siguió para realizar el proyecto de investigación. El procedimiento experimental que se llevó a cabo consistió en tres etapas, en la primera se realizó la caracterización bioquímica de las levaduras. En la segunda etapa, se realizaron pruebas fisiológicas y funcionales a las cepas previamente aisladas, para su selección. Finalmente, se

realizará un análisis de los criterios de selección de cepas para proponer cultivos iniciadores para el proceso de fermentación de Tabasco.

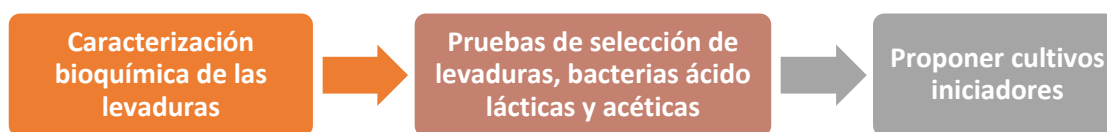


FIGURA 5.1. Metodología general

5.2.1. Etapa 1: Caracterización bioquímica de las levaduras

Para caracterizar bioquímicamente las levaduras se realizó la caracterización morfológica macroscópica y microscópica, así como la identificación presuntiva mediante asimilación de sustratos mediante la prueba API®20C AUX.

5.2.1.1. Caracterización morfológica macroscópica de las levaduras

La caracterización morfológica a nivel macroscópico se realizó después de incubar las levaduras a 30 °C en agar YPD durante 48 horas, el sembrado se realizó utilizando la técnica de estrías cruzadas.

5.2.1.2. Caracterización morfológica microscópica de las levaduras

Para la caracterización morfológica de las levaduras se colocó en un portaobjetos una gota de agua destilada estéril y asadas con fracciones de colonia de levadura, se dejó secar para fijar el frotis y posteriormente se realizó tinción simple con azul de metileno y se cubrió con un cubreobjetos. Esto se realizó utilizando un microscopio de campo claro (Motic BA200. U.S.A.) utilizando el objetivo de inmersión (100X). Esta caracterización microscópica se realizó describiendo la morfología celular, teniendo en cuenta características como forma de las células y agrupación.

5.2.1.3. Identificación presuntiva de las levaduras

Se realizó la prueba de identificación de levaduras para la su caracterización bioquímica utilizando la galería API®20C AUX, que se compone de 20 cápsulas con sustratos deshidratados para probar la asimilación por parte de las levaduras, dado que solo se reproducen si son capaces de utilizar cada sustrato.

Para realizar la prueba se precultivaron las levaduras durante 24 horas a 30 °C, se ajustó un patrón de turbidez de McFarland N°2, y se inocularon 10 µL en microtubos con 2 mL de NaCl (0.85%), de esta disolución se tomaron 100 µL y se transfirieron en el API C Medium. Posteriormente, se inocularon las cepas en las galerías tomando 110 µL del API C Medium preparado en cada una de las cápsulas y se incubó a 30 °C. Al cabo de 48 y 72 horas se observó la turbidez de las cápsulas para reportar el crecimiento celular. Para la identificación de las cepas los datos se introdujeron en el software de la galería de APIWEB™.

5.2.2. Etapa 2: Pruebas de selección de levaduras, bacterias ácido lácticas y acéticas

Se realizaron pruebas para determinar el grado de tolerancia a diferentes condiciones de estrés a compuestos presentes en la pulpa del grano de cacao durante la fermentación, pH y temperatura. Además, se realizaron pruebas de actividad antifúngica y pectinolítica a las levaduras y pruebas de utilización de ácido cítrico para las BAL. Esto para seleccionar las cepas de levaduras, BAL y BAA adecuadas para formular los cultivos iniciadores.

5.2.2.1. Activación y propagación de las cepas

Las cepas de levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas fueron sembradas en cajas Petri en medio YPD, MRS y GEA respectivamente. Las cajas fueron incubadas (Felisa Fe-293, México) a 30 °C ± 1 °C durante 24 horas o hasta observar un crecimiento microbiano abundante.

Las cepas activadas fueron inoculadas en 15 mL de medio líquido utilizando tubos de rosca hasta alcanzar una concentración de 10⁶ UFC/mL. Posteriormente, a partir de estos cultivos se inoculó 1 mL de microorganismos con condiciones estériles en un tubo con 15 mL de medio líquido durante 24 horas a 30 °C ± 1 °C (Figura 5.2).



FIGURA 5.2. Activación y propagación de las cepas

5.2.2.2. Pruebas de tolerancia

Las pruebas de tolerancia para las levaduras se realizaron mediante cinéticas de crecimiento. Se realizó un pre-cultivo inoculando 5 mL de levaduras propagadas durante 24 horas a 30 °C en un matraz con 50 mL de medio líquido YPD (Felisa Fe-293, México). Posteriormente, se inoculó 1 mL del precultivo a una concentración de 10^6 UFC/mL en un matraz con 50 mL de medio YPD modificado según la prueba de tolerancia a realizar. El cultivo fue incubado a 30 °C durante 24 horas con agitación a 150 rpm (Marca Sheldon Manufacturing Modelo S16R). Cada dos horas se tomaron muestras del cultivo y se realizó conteo de células viables utilizando la cámara de Neubauer (Figura 5.3).

Para calcular el parámetro cinético de velocidad específica de crecimiento (μ) a partir de las curvas de cinética se utilizó la Ecuación 1, los cálculos se realizaron en la fase exponencial de crecimiento (Dorán, 1995).

$$\mu = \frac{x_1 - x_0}{t_1 - t_0} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde, x_0 y t_0 son respectivamente la concentración celular y el tiempo al iniciar la fase exponencial y x_1 y t_1 corresponden respectivamente a la concentración celular y tiempo al finalizar la fase exponencial.

Para el cálculo del tiempo de duplicación (td) de las levaduras se utilizó la expresión matemática de la Ecuación 2.

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \text{Ecuación (2)}$$

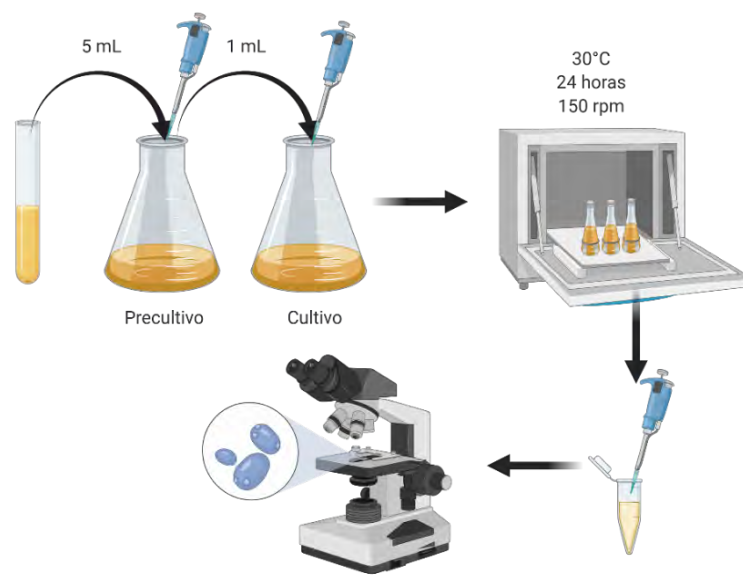


FIGURA 5.3. Metodología de las cinéticas de crecimiento de las levaduras

La tolerancia al estrés de las bacterias fue determinada empleando microplacas con 96 pocillos con el fin de evaluar diferentes condiciones de crecimiento de los microorganismos. En las Figuras 5.4, 5.5, 5.6, se presenta el diseño de la prueba para la determinación del crecimiento microbiano en medio líquido de las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas.

Se agregaron 150 μ L de medio líquido estéril como control en cada uno de los pocillos de la primera columna de la microplaca. A partir de la segunda columna hasta la penúltima se inoculó cada pocillo con 10 μ L de las cepas bacterianas con una concentración ajustada con escala de 0.5 de Mc Farland, para las BAL y BAA la relación usada fue 1:10 y 1:40 respectivamente; posteriormente se ajustó el volumen a 150 μ L con medio líquido modificado de acuerdo a la prueba de tolerancia a realizar. En la última columna se adicionó en cada pocillo 10 μ L del inóculo bacteriano y 140 μ L de medio líquido sin modificar como testigo de crecimiento de las bacterias. Las microplacas fueron incubadas (Felisa Fe-293, México) a 30 °C por 48 horas. Al término de la incubación se leyó la absorbancia de las microplacas a 640 nm utilizando un fotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ FC.

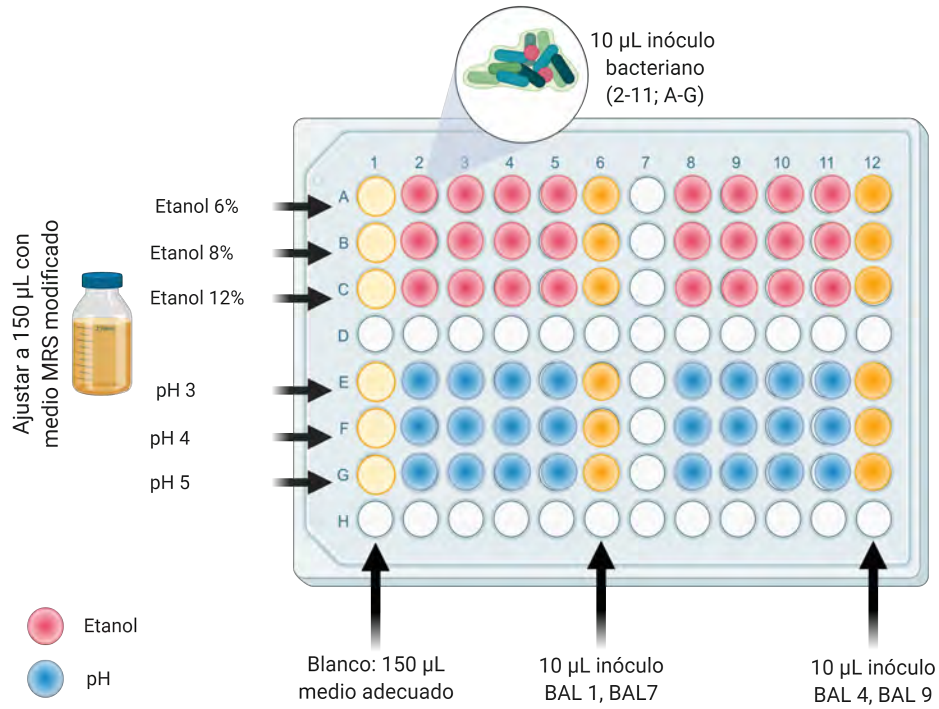


FIGURA 5.4. Diseño de prueba para la determinación del crecimiento de BAL en ambientes con etanol y pH modificado

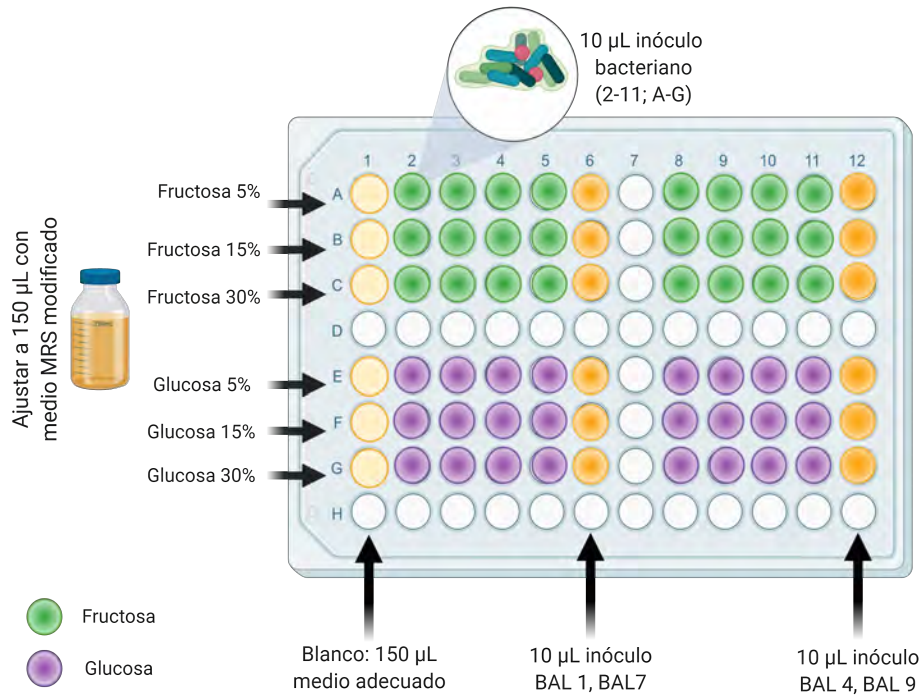


FIGURA 5.5. Diseño de prueba para la determinación del crecimiento de BAL en ambientes con glucosa y fructosa.

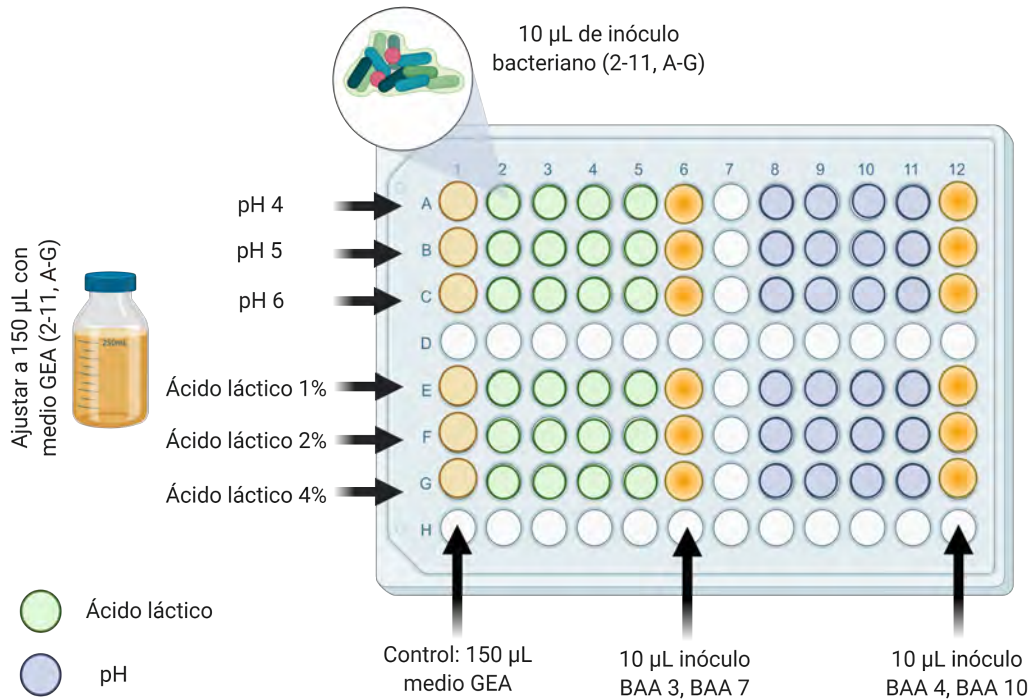


FIGURA 5.6. Diseño de prueba para la determinación del crecimiento de BAA en ambientes con ácido láctico y pH modificado.

El cálculo del crecimiento de las bacterias en porcentaje fue calculado mediante la Ecuación 3.

$$Crecimiento (\%) = \frac{ABS_{estrés} - ABS_{blanco}}{ABS_{testigo} - ABS_{blanco}} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde,

$ABS_{estrés}$ es la absorbancia de los pocillos con los medios modificados con las condiciones de estrés e inoculados.

$ABS_{testigo}$ es la absorbancia de los pocillos con medio MRA o GEA inoculados.

ABS_{blanco} es la absorbancia de los pocillos con el medio MRS o GEA estéril.

5.2.2.2.1. Pruebas de tolerancia a compuestos

Los medios utilizados para cada uno de los microorganismos fueron enriquecidos con diferentes concentraciones de etanol, ácido láctico, glucosa y fructosa (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Lefeber, *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012;

Coulibaly *et al.*, 2018; Koffi *et al.*, 2018). En la Tabla 5.1 se presentan las diferentes condiciones de estrés. Se utilizó como control el medio YPD para levaduras, MRS para BAL y GEA para BAA.

TABLA 5.1. Condiciones de estrés establecidas para evaluar fisiológicamente los microorganismos

	Etanol (% v/v)	Ácido láctico (% v/v)	Fructosa (% p/v)	Glucosa (% p/v)
Levaduras	4, 8, 12	0.5, 1, 2	-	-
BAL	6, 8, 12	-	5, 15, 30	5, 15, 30
BAA	-	6, 8, 10	-	-

Para las levaduras, solamente se utilizó etanol y ácido láctico, debido a que estos compuestos pueden inhibir su crecimiento, la fructosa y glucosa no se evaluaron porque las cepas pueden crecer en ambientes con estas condiciones (Lefeber, *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Koffi *et al.*, 2018).

Respecto a las BAL, se evaluó su tolerancia a ambientes con glucosa y fructosa, dado que las BAL contribuyen a metabolizar las azúcares durante la fermentación de cacao. También, se evaluó la tolerancia al etanol, metabolito de las levaduras que está presente en el ambiente de crecimiento de las BAL (Lagunes Gálvez *et al.*, 2007; Lefeber, *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012).

Finalmente, se evaluó la tolerancia al ácido láctico a las BAA porque es el compuesto con mayor presencia en la etapa de la fermentación que las BAA crecen (Coulibaly *et al.*, 2018).

5.2.2.2.2. Pruebas de tolerancia al estrés con pH modificado

La evaluación de la tolerancia al pH se evaluó cuantificando el crecimiento de cada uno de los microorganismos en medios adecuados con valores de pH ajustados a 3, 4 y 5 para las levaduras y BAL, y pH ajustado a 4, 5, 6 para las BAA. El pH se modificó adicionando solución de HCl y NaOH 2N; se cuantificó la acidez del medio con un potenciómetro (HANNA Instrument HI 2210) tomando una muestra del medio estéril para comprobar la acidez final del medio.

5.2.2.2.3. Pruebas de tolerancia al estrés térmico

La prueba de tolerancia a estrés térmico se realizó a las bacterias ácido acéticas debido a que su metabolismo es el causante del incremento de temperatura en la masa de fermentación. Para esto, las cepas se inocularon 40 °C, 45 °C y 50 °C.

5.2.2.3. Prueba de actividad pectinolítica de las levaduras

Se evaluó la actividad enzimática de cada cepa siguiendo la metodología propuesta por Haile y Kang en 2019, el esquema de la metodología se presenta en la Figura 5.7.

Las cepas de levadura se sembraron en un medio rico en pectina, compuesto por pectina cítrica (4 g/L), extracto de levadura (2 g/L), agar bacteriológico (16 g/L), extracto de levadura (2 g/L), KH_2PO_4 (0.2 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), CaCl_2 (0.05 g/L), MgSO_4 (0.8 g/L); además, se ajustó el pH a 4.5 utilizando HCl 2N. Las placas se incubaron a 30 °C durante seis días (Felisa Fe-293, México). La actividad enzimática se pudo observar debido a un cambio de color amarillo claro alrededor de las colonias después de revelar las placas adicionando 10 mL de Lugol durante 15 minutos; transcurrido este tiempo se retiró el exceso de Lugol con agua destilada.

Posteriormente se midió el índice de degradación de pectina, el diámetro de las colonias de levaduras y las zonas de degradación, que se diferencian por ser más claras. A partir de los datos obtenidos del diámetro de la zona clara y de las colonias se determina el índice de degradación de pectina, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Índice de degradación de pectina \%} = \frac{DZ - DC}{DZ} * 100$$

Donde, DC es el diámetro de la colonia y DZ es el diámetro de la zona degradada.

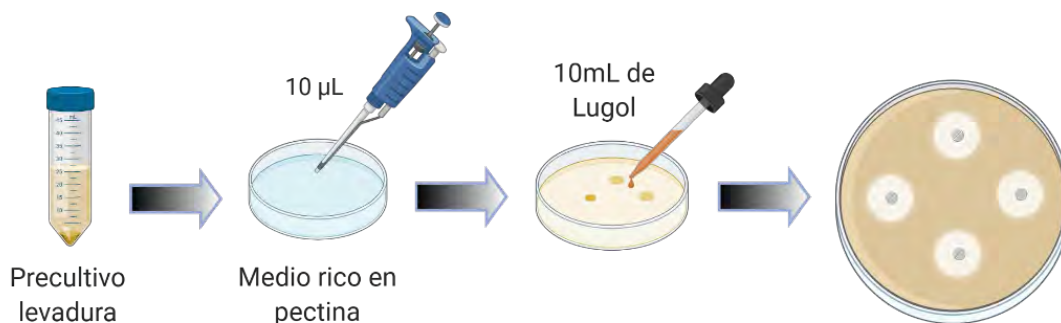


FIGURA 5.7. Metodología de la prueba de actividad pectinolítica

5.2.2.4. Prueba de metabolismo de ácido cítrico para las BAL

La habilidad de las bacterias ácido lácticas para metabolizar citrato se realizará siguiendo la metodología desarrollada por Ouattara *et al.* (2016) que se muestra en la Figura 5.8. Se preparó un medio basal formulado con 1 % p/v leche en polvo, 0.25 % p/v peptona de caseína, 0.5 % p/v glucosa y 1.5 % p/v agar, después de que el medio se esterilizó y su temperatura alcanzó 45 °C se añadieron 10 mL/L de una solución de ferrocianuro de potasio al 10 % p/v y 10 mL/L de una solución mezclada de citrato de hierro (2.5 % p/v) y citrato de sodio (2.5 % p/v), previamente esterilizadas. El medio fue inoculado con un precultivo de 24 horas de las BAL, y se incubó a 30 °C durante 48-72 horas (Felisa Fe-293, México). El metabolismo de citrato fue evaluado por la formación de un complejo azul en la colonia resultante del consumo de citrato.

Además, como confirmación de la prueba fue realizado el monitoreo de la producción de gas (CO₂) y acetoina como productos secundarios del metabolismo de citrato. Para estas pruebas, la concentración celular se ajustó utilizando la escala de MC Farland 2. Además, también se añadieron las soluciones de ferrocianuro de potasio y de citratos.

Para la prueba de producción de gas se utilizó el medio basal con citrato de sodio como única fuente de carbono, y se evaluó realizando la prueba de Durham. Se acondicionaron las BAL en caldo MRS durante 24 horas a 30 °C. Una vez ajustada la concentración celular, se inocularon tubos de ensayo (20 mL) con 9 mL

de medio, 1 mL de inóculo y una campana de Durham, lo cual permite observar la capacidad de producción de CO₂ de la bacteria.

La producción de acetoina a partir del citrato se evaluó en medio líquido basal. Después de 48 horas de incubación, se tomaron 2 mL de muestra y se centrifugaron a 13000 x g durante 15 minutos (Labnet International, Inc., Modelo C2400). La producción de acetoina se reveló añadiendo a 1 mL de sobrenadante libre de células dos gotas de una solución alcohólica de alfa-naftol al 6% p/v y dos gotas de hidróxido de sodio al 16% v/v. Los tubos de prueba se agitaron y calentaron. Después de 30 segundos de agitación la aparición de un color rosado constituye una reacción positiva indicadora de la presencia de acetoina.

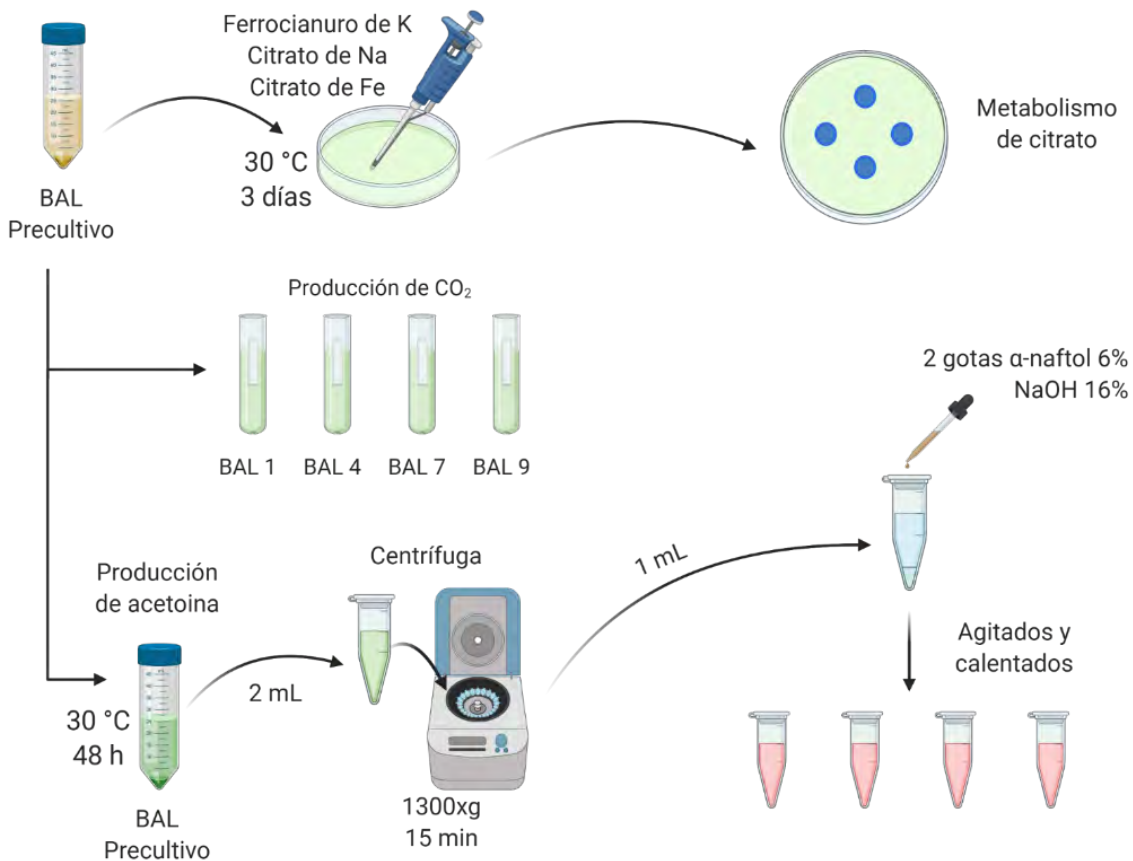


FIGURA 5.8. Pruebas de consumo de ácido cítrico

5.2.2.5. Prueba de actividad antifúngica

Las cepas de levadura previamente acondicionadas fueron inoculadas en caldo YPD e incubadas a 30 °C para realizar pruebas de confrontación contra dos cepas de hongos toxigénicos *A. flavus* y *A. carbonarius*. Estas pruebas fueron realizadas con el cultivo celular para observar el efecto de estos sobre la germinación de las esporas de los hongos toxigénicos.

5.2.2.5.1. Preparación de inóculos de hongos y levaduras

La preparación de los inóculos de esporas de los hongos se realizó a partir una suspensión de conidios obtenida de un cultivo de siete días del hongo cultivado en PDA acidificado a 35 °C (Felisa Fe-293, México) de acuerdo con la técnica de Suárez-Quiroz *et al.* 2013 con algunas modificaciones.

Se realizó un raspado con el asa bacteriológica sobre las esporas y se añadieron 10 mL de Tween 80 al 0.05 %. Se tomó 1 mL de dicha suspensión y se añadió a un tubo con 9 mL de la misma solución de Tween 80. Después de esto se hicieron diluciones seriadas hasta que se obtuvo una concentración celular de 10^6 esporas/mL, esto se ajustó utilizando la cámara de Neubauer (Figura 5.9).

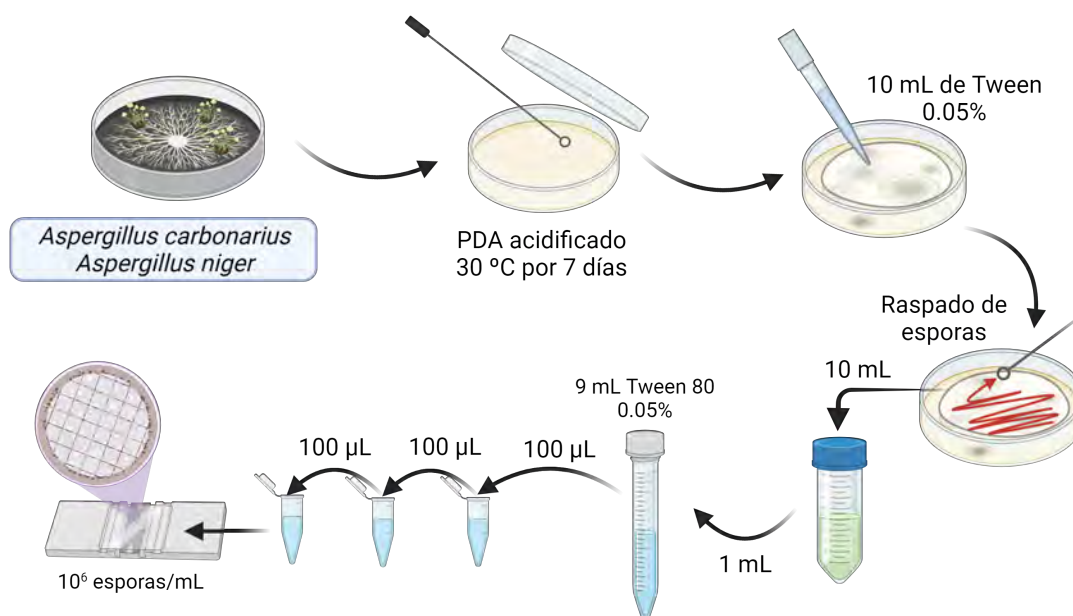


FIGURA 5.9. Esquema de la preparación de las esporas de hongos

Las cepas de levadura fueron propagadas en caldo YPD y se incubaron a 30°C durante 24 horas (Felisa Fe-293, México) y se ajustó su concentración a 10^6 células/mL realizando diluciones seriadas y utilizando la cámara de Neubauer.

5.2.2.5.2. Pruebas de confrontación de levaduras sobre los hongos

Se confirmó que la concentración celular estuviera entre 10^6 - 10^7 UFC/mL utilizando la cámara de Neubauer. Se adicionaron 100 μ L de la suspensión de esporas del hongo y 100 μ L del cultivo celular en microtubos de tapón de rosca de 2 mL, después se añadieron 800 μ L de caldo YPD a cada tubo y se incubaron los tubos a 30 °C durante 96 horas (Felisa Fe-293, México) cuidando de no cerrar completamente los tubos. Como pruebas testigo se prepararon tubos con 900 μ L de caldo YPD a los cuales se añadieron por separado 100 μ L de cultivo celular y 100 μ L de la suspensión de esporas, como se observa en la Figura 5.10. Estas pruebas se realizaron de acuerdo con la técnica de Suárez-Quiroz *et al.* 2013.

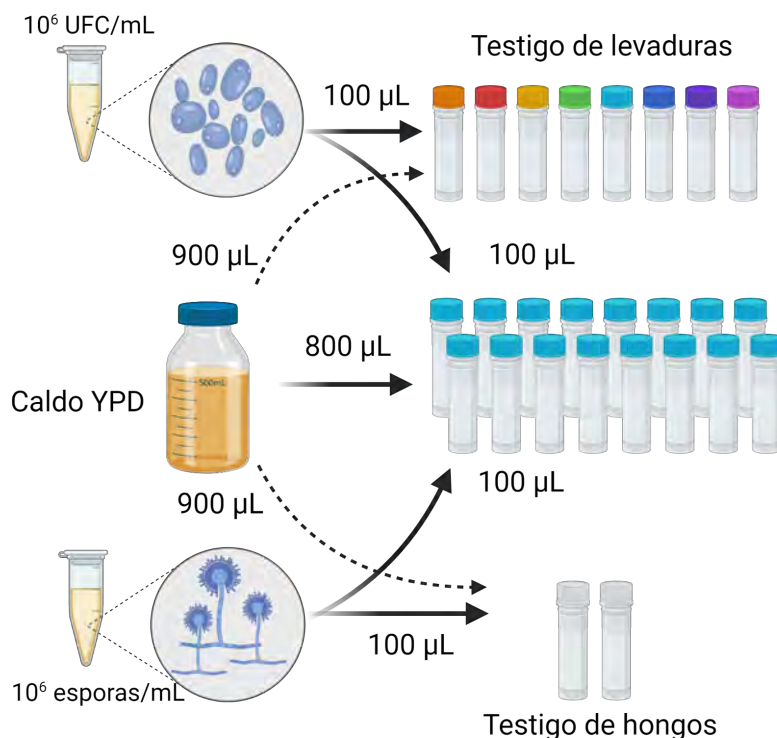


FIGURA 5.10. Prueba de confrontación de hongos y levaduras

5.2.2.6. Selección de los microorganismos de los cultivos iniciadores

Los microorganismos para formular el cultivo iniciador fueron seleccionados considerando los criterios funcionales (producción de compuestos antimicrobianos), fisiológicos (pruebas de tolerancia al estrés) y bioquímicos (actividad pectinolítica, capacidad de degradación del ácido cítrico). Los consorcios microbianos propuestos fueron conformados por levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas.

5.2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis multivariado de varianza (MANOVA) para el crecimiento de las levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas bajo las diferentes condiciones de estrés. Las diferencias entre los grupos se determinaron por el medio de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$) utilizando el software estadístico NCSS 21 (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, U.S.A.).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización morfológica de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao

Las levaduras estudiadas se caracterizaron morfológicamente de forma macroscópica y microscópica para describir los fenotipos de las levaduras presentes en la fermentación de cacao. La morfología descrita concuerda con la morfología presentada por Kurtzman (2011) y Lagos Narváez (2017).




6.1.1. Caracterización morfológica macroscópica

Cada una de las 16 cepas de levaduras aisladas mostró tener morfología colonial diferente; se tuvo en cuenta color, forma, tamaño, margen, propiedad óptica, apariencia, elevación y textura.





La mayoría de las colonias mostraron colonias de color blanco, textura cremosa, márgenes enteros, opacas con apariencia brillante, forma circular, tamaño de 1.5 mm y elevación convexa. Sin embargo, también se identificaron colonias con forma irregular, elevación plana, margen ondulado y rizado, tamaño entre 2 y 2.5 mm opacas con apariencia mate y textura seca. Adicionalmente, es posible observar que las cepas de levadura aisladas presentan similitudes y diferencias en la morfología colonial, indicando que algunas cepas podrían presentar variación intraespecífica, es decir, que a pesar de ser de la misma especie las levaduras presentan características morfológicas distintas (Galindo Segura, 2018).

En la Tabla 6.1 se presentan las características morfológicas macroscópicas de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao, así como las levaduras a caracterizar en agar YPD.

TABLA 6.1. Características morfológicas macroscópicas de las colonias de levadura (Agar YPD, 30 °C, 36 h)

CEPA DE LEVADURA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
<p>Levadura 1: Y-CTA-18-1</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 2: Y-CTA-18-12</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1-1.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 3: Y-CTA-18-3</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>





Continua TABLA 6.1.

<p>Levadura 4: Y-CTA-18-4</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1-2 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 5: Y-CTA-18-5</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1.5-2.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Plana Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 6: Y-CTA-18-6</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Irregular Tamaño: 1.5-3 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Seca</p>
<p>Levadura 7: Y-CTA-18-7</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 2 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Plana Textura: Seca</p>


Continua TABLA 6.1.

<p>Levadura 8: Y-CTA-18-8</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1.5 mm Margen: Lobulado Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 9: Y-CTA-18-9</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Irregular Tamaño: 2-2.5 mm Margen: Rizado Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Mate Elevación: Convexa Textura: Seca</p>
<p>Levadura 10: Y-CTA-18-10</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1-1.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 11: Y-CTA-18-11</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Irregular Tamaño: 1.5 mm Margen: Rizado Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Mate Elevación: Convexa Textura: Seca</p>

Continua TABLA 6.1.

<p>Levadura 12: Y-CTA-18-12</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Irregular Tamaño: 2.5 mm Margen: ondulado Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 13: Y-CTA-18-13</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1-1.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Plana Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 14: Y-CTA-18-14</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1-1.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>
<p>Levadura 15: Y-CTA-18-15</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 2.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Brillante Elevación: Convexa Textura: Cremosa</p>

Continúa TABLA 6.1.

<p>Levadura 16: Y-CTA-18-16</p> 	<p>Color: Blanco Forma: Circular Tamaño: 1.5 mm Margen: Entero Propiedad óptica: Opaca Apariencia: Mate Elevación: Convexa Textura: Seca</p>
--	--

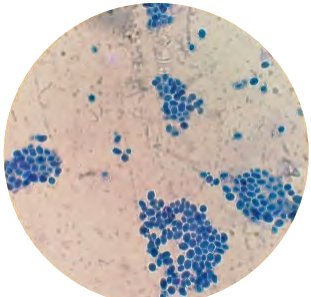
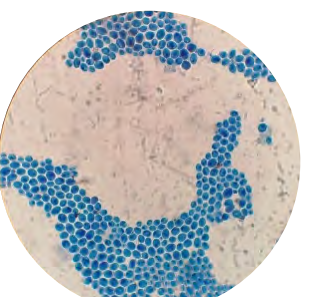
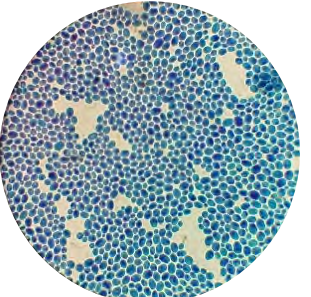
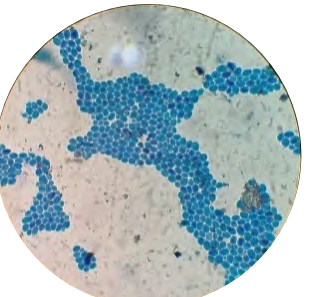
6.1.2. Caracterización morfológica microscópica

Al observar al microscopio, las colonias de cada una de las levaduras aisladas, se observó que la mayoría de levaduras presentaron principalmente morfologías ovoides o elípticas, sin embargo, también se observaron morfologías globosas y elongadas.

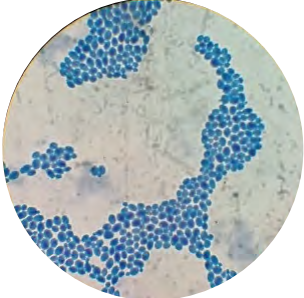
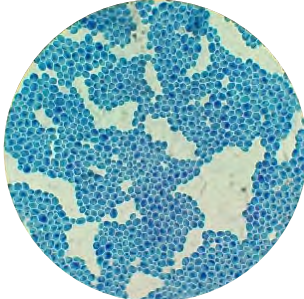
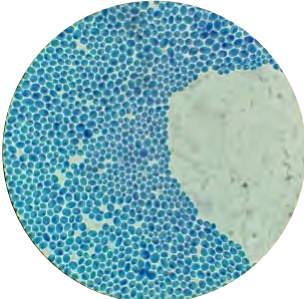
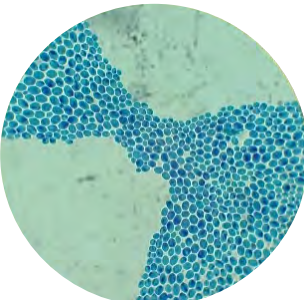
Se encontró que dos cepas de levaduras aisladas presentan pseudohifas, esto permite asumir la identidad de las levaduras, dado que la forma celular puede ser un diagnóstico para la diferenciación entre especies. Debido a esto, se identifican hipotéticamente las cepas con pseudohifas con especies pertenecientes al género *Pichia* y *Candida*, dadas las similitudes celulares (Choi *et al.*, 2017; Díaz-Nava *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). La morfología celular de las levaduras involucra varios eventos celulares como la progresión a través del ciclo celular, el establecimiento de la polaridad de la célula y la regulación del tamaño celular (Lagos Narváez, 2017).

En la Tabla 6.2. se presentan las características morfológicas (tamaño, forma y presencia de pseudohifas) microscópicas de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao, así como cada cepa observada al microscopio con el objetivo de inmersión 100X.

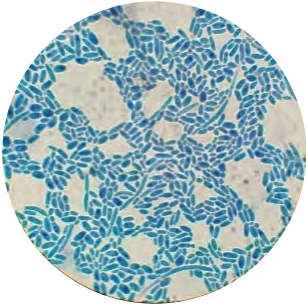
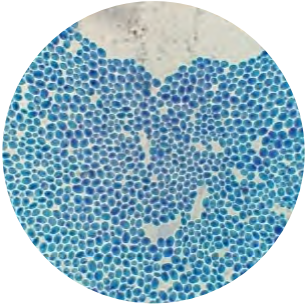
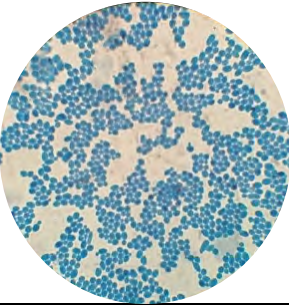
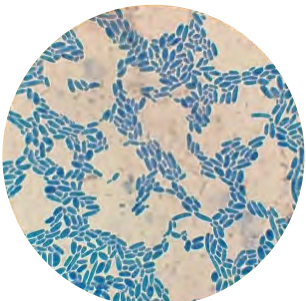
TABLA 6.2. Características morfológicas microscópicas de las colonias de levadura (Objetivo de inmersión 100X)

CEPA DE LEVADURA	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
<p>Levadura 1: Y-CTA-18-1</p> 	<p>Tamaño: 2.5 x 3.8 μm Forma: Ovoide/Redondeada Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 2: Y-CTA-18-2</p> 	<p>Tamaño: 2.4 x 3.5 μm Forma: Ovoide Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 3: Y-CTA-18-3</p> 	<p>Tamaño: 2 x 2.7 μm Forma: Elíptica Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 4: Y-CTA-18-4</p> 	<p>Tamaño: 2.1 x 3.1 μm Forma: Ovoide Pseudohifas: Escasas</p>


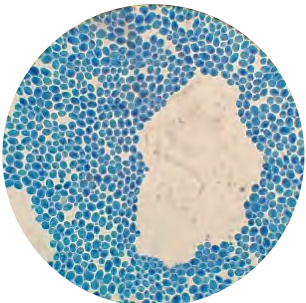
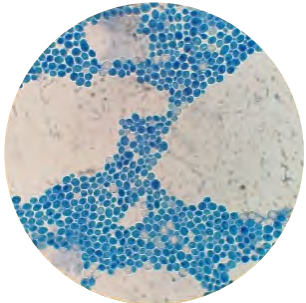
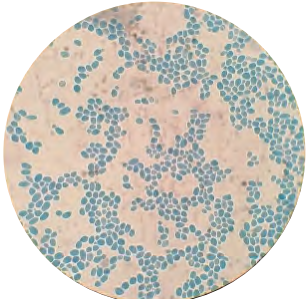
Continua TABLA 6.2.

<p>Levadura 5: Y-CTA-18-5</p> 	<p>Tamaño: 2.1 x 3.1 μm Forma: Elíptica Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 6: Y-CTA-18-6</p> 	<p>Tamaño: 2.3 x 3.3 μm Forma: Ovoide/Elíptica Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 7: Y-CTA-18-7</p> 	<p>Tamaño: 2.0 x 3.0 μm Forma: Ovoide Pseudohifas: Escasas Gemación: Monopolar</p>
<p>Levadura 8: Y-CTA-18-8</p> 	<p>Tamaño: 1.8 x 3.2 μm Forma: Elíptica Pseudohifas: Escasas</p>

Continua TABLA 6.2

<p>Levadura 9: Y-CTA-18-9</p> 	<p>Tamaño: 2.1 x 4.4 μm Forma: Elongada Pseudohifas: Presentes</p>
<p>Levadura 10: Y-CTA-18-10</p> 	<p>Tamaño: 2.3 x 3.4 μm Forma: Ovoide Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 11: Y-CTA-18-11</p> 	<p>Tamaño: 1.6 x 2.8 μm Forma: Globosa/Ovoide Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 12: Y-CTA-18-12</p> 	<p>Tamaño: 1.8 x 4.7 μm Forma: Elongada Pseudohifas: Presentes</p>

Continua TABLA 6.2.

<p>Levadura 13: Y-CTA-18-13</p> 	<p>Tamaño: 2.4 x 3.7 μm Forma: Ovoide Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 14: Y-CTA-18-14</p> 	<p>Tamaño: 2.5 x 3.6 μm Forma: Elíptica Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 15: Y-CTA-18-15</p> 	<p>Tamaño: 2.6 x 3.5 μm Forma: Ovoide Pseudohifas: Escasas</p>
<p>Levadura 16: Y-CTA-18-16</p> 	<p>Tamaño: 1.8 x 3.4 μm Forma: Ovoide/Apiculada Pseudohifas: Escasas</p>

6.2. Caracterización bioquímica de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao

Las pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos de las cepas de levadura se realizaron con el sistema miniaturizado API® 20C AUX. Los resultados de asimilación de sustratos se muestran en la Tabla 6.3, los sustratos asimilados en esta prueba son GLU=D-glucosa, GLY=Glicerol, 2KG=2-cetogluconato de calcio, ARA=L-Arabinosa, XYL=D-Xilosa, ADO=Adonitol, XLT=Xilitol, GAL=D-Galactosa, INO=Inositol, SOR=D-Sorbitol, MDG=Metil- α -D-Glucopir, NAG=N-Acetil-Glucosamina, CEL=D-Cellobiosa, LAC=D-Lactosa (origen bovino), MAL=D-Maltosa, SAC=S-Sacarosa, TRE=D-Trehalosa, MLZ=D-Melezitosa, RAF=D-Rafinosa.

Tabla 6.3. Sustratos asimilados por las 16 cepas identificadas con el software API WEB™.

Prueba	Cepa de levadura identificada															
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
CEL	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
LAC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
TRE	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MLZ	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

(+): Sustrato asimilado; (-): sustrato no asimilado

En la Tabla 6.4 se presentan las levaduras identificadas con su género, especie y porcentaje de identificación. Se identificaron nueve especies pertenecientes al género *Candida*, cuatro especies pertenecientes al género *Saccharomyces*, dos especies pertenecientes al género *Pichia*, y una especie del género *Kloeckera*. La identificación se consideró precisa bajo porcentajes de identificación superiores al 90 % (Aarstehfar *et al.*, 2019). Los resultados de las pruebas se encuentran en los Anexos 10.1.1 al 10.1.16.

TABLA 6.4. Identificación de las cepas con el software ApiWeb™

CEPA	GÉNERO	ESPECIE	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (% ID)
Y-CTA-18-1 (L1)	<i>Candida</i>	<i>sphaerica</i>	99.3
Y-CTA-18-2 (L2)	<i>Candida</i>	<i>sphaerica</i>	99.3
Y-CTA-18-3 (L3)	<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	96.1
Y-CTA-18-4 (L4)	<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	95.3
Y-CTA-18-5 (L5)	<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginosa</i>	96.9
Y-CTA-18-6 (L6)	<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	81.9
Y-CTA-18-7 (L7)	<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	81.9
Y-CTA-18-8 (L8)	<i>Candida</i>	<i>sphaerica</i>	61.5
Y-CTA-18-9 (L9)	<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>	92.1
Y-CTA-18-10 (L10)	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	94.4
Y-CTA-18-11 (L11)	<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	81.9
Y-CTA-18-12 (L12)	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	94.4
Y-CTA-18-13 (L13)	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	94.4
Y-CTA-18-14 (L14)	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	94.4
Y-CTA-18-15 (L15)	<i>Pichia</i>	<i>ohmeri</i>	95.7
Y-CTA-18-16 (L16)	<i>Kloeckera</i>	<i>sp</i>	94.5

La identificación bioquímica mostró más presencia de levaduras pertenecientes al género *Candida*, distribuidas en *utilis* y *spherica*, esta levadura correspondió a un 56 % de los géneros aislados en la fermentación de cacao, resultados que coinciden con Lagunes Gálvez *et al.* (2007); Nielsen *et al.* (2007); da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, (2017). Se ha reportado que la especie *Candida utilis* aislada del proceso fermentativo de cacao es una levadura productora de etanol, y que además, puede producir compuestos no deseables para el aroma del cacao (Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Jinda, 2014). Sin embargo, este género se ha

encontrado en menor proporción en fermentaciones de cacao alrededor del mundo, además algunas especies son patógenos oportunistas, lo cual descarta su posible utilización en cultivos iniciadores (Becker y Murphy, 1988; Bougnoux *et al.*, 1993; Lukic-Grić *et al.*, 2011; Mutlu Sarigüzel *et al.*, 2017).

Se identificó una cepa de *R. mucilaginosa*, la cual fue seleccionada en el presente estudio debido a que tiene potencial para el biocontrol de hongos fitopatógenos en la etapa de postcosecha, además de que en algunos estudios se ha reportado que tiene capacidad de crecer en ambientes extremos (Addis *et al.*, 2008; Deligios *et al.*, 2016; Lario *et al.*, 2020). Se identificaron cepas de *S. cerevisiae*, así como de *P. kudriavzevii*, *P. ohmeri*, y *Kloeckera sp* (género anamorfo de *Hanseniaspora sp*) las cuales fueron también seleccionadas para ser estudiadas debido a que se ha reportado que forman parte de la microbiota representativa del proceso de fermentación del cacao, además, producen compuestos volátiles deseables (ésteres, alcoholes y aldehídos), son tolerantes a ambientes en condiciones de estrés y también pueden presentar actividad antifúngica (Yuangsaard *et al.*, 2013; Craack *et al.*, 2014; Koné *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2017; Koffi *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Cabe mencionar que las cepas seleccionadas para ser estudiadas fueron *R. mucilaginosa* Y-CTA-18-5, *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9, *S. cerevisiae* CTA-18-10, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-14, *P. ohmeri* Y-CTA-18-15 y *Hanseniaspora sp* Y-CTA-18-16.

6.3. Caracterización fisiológica de las cepas de levadura aisladas del proceso de fermentación del cacao

Con el fin de caracterizar fisiológicamente las cepas de levadura se evaluó su crecimiento en medio YPD realizando cinéticas durante 24 horas con mediciones de crecimiento celular cada dos horas. Las curvas de crecimiento de cada levadura se presentan a continuación.

6.3.1. Pruebas de tolerancia a compuestos

6.3.1.1. Levaduras: Testigo

Las curvas de crecimiento celular de las cepas de levadura seleccionadas se presentan en la Figura 6.1, y corresponden al crecimiento de las levaduras sin condición de estrés, las cuales se utilizarán como testigo. Todas las curvas obtenidas fueron sigmoidales y muestran claramente las fases de crecimiento. Sin embargo, existen variaciones en las fases de crecimiento entre especies.

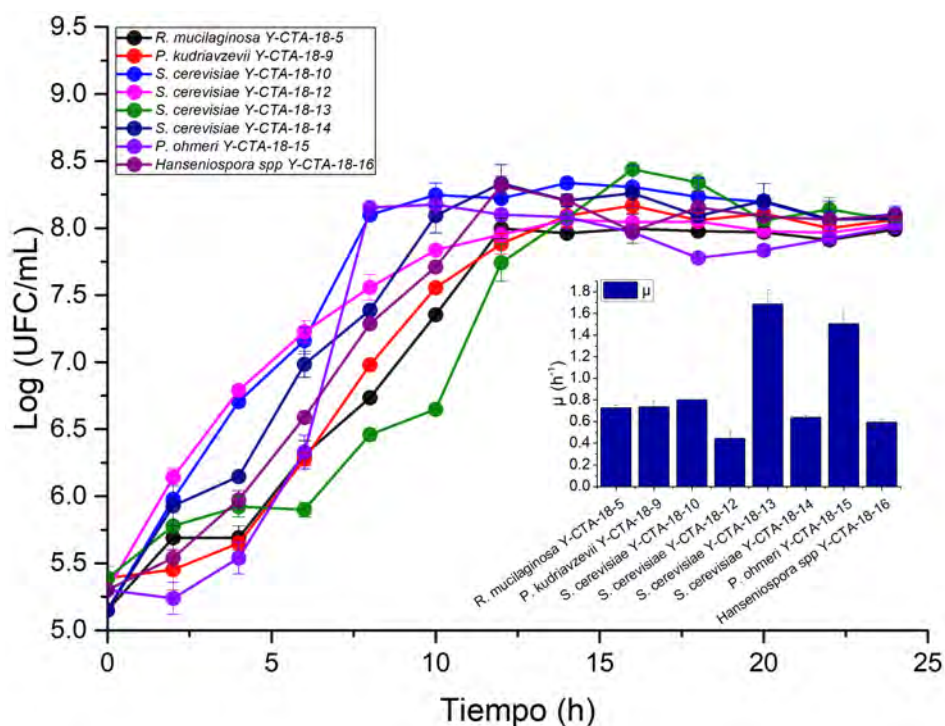


FIGURA 6.1. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

La cepa *R. mucilaginosa* Y-CTA-18-5 presentó una velocidad específica de crecimiento $\mu=0.727 h^{-1}$ y un tiempo de generación de 0.954 h. Se ha reportado que esta cepa también ha sido aislada de diferentes fermentaciones de cacao Forastero e híbridos (Meersman *et al.*, 2015; Magalhães da Veiga Moreira *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020). La levadura *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 tuvo una velocidad específica de crecimiento de $0.736 h^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 0.942 h, este microorganismo ha sido aislado de las fermentaciones de cacao, y se ha utilizado en cultivos iniciadores debido a su capacidad de resistir a estrés ambiental durante

la fermentación, además, de producir una gran variedad de ésteres, alcoholes y aldehídos que imparten aromas deseables a chocolate como frutal, floral y dulce (Li *et al.*, 2018; Chagas Junior *et al.*, 2020; Deng *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2020).

Entre las levaduras de la especie *S. cerevisiae*, la cepa *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13 mostró la mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu=1.685 \text{ h}^{-1}$), sin embargo, fue la cepa que más tardo en alcanzar la fase exponencial. Las diferencias presentadas en el crecimiento de cada cepa de *S. cerevisiae* pueden deberse a las diferencias interespecie. Esta levadura es una de las especies dominantes en la fermentación de cacao en varios países, además, se ha reportado que puede adaptarse fácilmente a diferentes condiciones de crecimiento y su uso en cultivos iniciadores ha mejorado el tiempo de fermentación, así como el aroma y sabor del chocolate (Cempaka *et al.*, 2014; Galvão *et al.*, 2016).

La cepa de *P. ohmeri* Y-CTA-18-15, forma anamorfa de *Kodamea ohmeri*, presentó una velocidad específica de crecimiento $\mu=1.505 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 0.461 h. Esta levadura ha sido aislada e identificada de fermentaciones de cacao en países como Brasil, Cuba, Malasia, Ghana y Ecuador (Kostinek *et al.*, 2008; Lagos Narváez, 2017; Daniel *et al.*, 2018). Además, ha sido asociada a sabores agradables en bebidas fermentadas (Takrama *et al.*, 2015).

Hanseniaspora/Kloeckera sp. Y-CTA-18-16 mostró una velocidad de crecimiento $\mu=0.594 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 1.167 h. Se ha reportado que esta levadura es predominante durante el proceso de fermentación de cacao híbrido (Batista *et al.*, 2015; Papalexandratou *et al.*, 2013). También es importante mencionar que ha sido aplicada en cultivos iniciadores y tiene la capacidad de producir compuestos aromaticos clave para los granos de cacao (Moreira *et al.*, 2018; Mota-Gutierrez *et al.*, 2019; Ooi *et al.*, 2020).

6.3.1.2. Tolerancia a etanol

Durante la fermentación espontánea de cacao se ha reportado que las concentraciones de etanol alcanzan hasta 8 % v/v cuando la concentración celular de las levaduras está en su valor máximo (Romanens *et al.*, 2019). Por esta razón,

se evaluó el efecto diferentes concentraciones de etanol (4, 8 y 12% v/v) sobre la viabilidad celular de las levaduras.

Las curvas de crecimiento de las levaduras con 4 % v/v de etanol se muestran en la Figura 6.2, las levaduras con mayor tolerancia a esta concentración de etanol son *R. mucilaginosa* Y-CTA-18-5 y *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Gil Barbarín (2020), que evaluó el crecimiento de cepas de levadura a diferentes concentraciones de etanol desde 4 hasta 12 %.

La fase de crecimiento exponencial de *R. mucilaginosa* Y-CTA-18-5 se obtuvo entre las 8 y 14 h de incubación. La velocidad específica de crecimiento (μ) que presentó la levadura fue 0.805 h^{-1} ($td=0.8606 \text{ h}$), lo cual indica que la levadura toleró bien la presencia de etanol al 4 % v/v. La levadura *R. mucilaginosa* es una de las levaduras no convencionales que presentan tolerancia muy baja al etanol, sin embargo, esta cepa logró adaptarse al ambiente de estrés al que se expuso, lo cual concuerda con lo reportado por Gil Barbarin (2020).

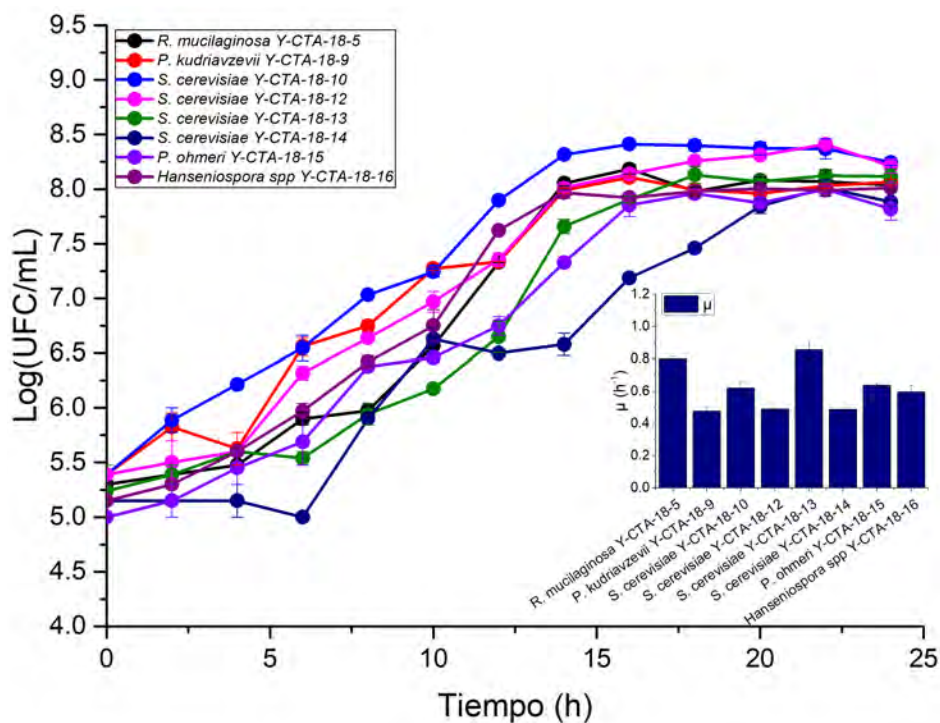


FIGURA 6.2. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 4 % v/v de etanol durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

La fase de crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13 se obtuvo entre las 10 y 12 h de incubación. La velocidad específica de crecimiento que presentó la levadura fue 0.853 h^{-1} ($td=0.813 \text{ h}$). Por otro lado, se observó que la cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-14 fue la cepa que presentó menos adaptación al medio con 4 % v/v de etanol resultando en un menor crecimiento celular.

Al incrementar la concentración de etanol en el medio a 8 % v/v, la mayoría de levaduras no presentaron tolerancia, y, por ende, su crecimiento fue inhibido (Figura 6.3). Solamente *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13 presentó crecimiento celular significativo, con una velocidad específica de crecimiento de 0.1932 h^{-1} . La presencia de etanol en una concentración de 12 % v/v afectó el crecimiento y viabilidad celular de las levaduras, tal como se observa en la Figura 6.4, el crecimiento fue inhibido.

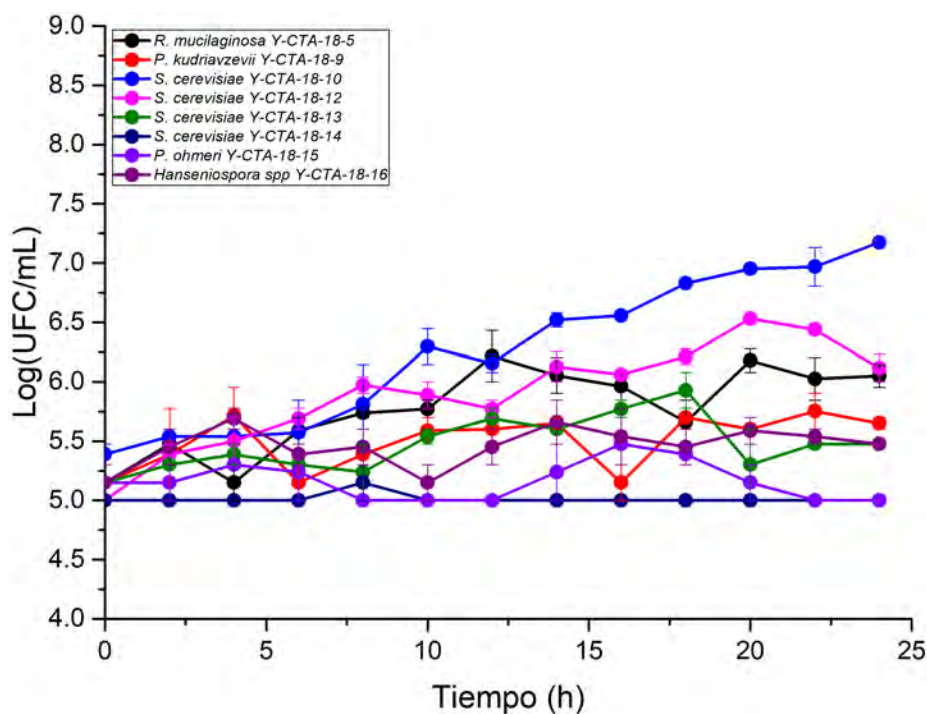


FIGURA 6.3. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 8 % v/v de etanol durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

Se ha reportado que durante la fermentación de cacao la concentración de etanol alcanza un valor aproximado de 8 % v/v (Koffi *et al.*, 2018), al exponer las levaduras a concentraciones de etanol mayores o iguales a 8 %, se observó que

solamente una cepa de la especie *S. cerevisiae* pudo tolerar el etanol y presentar crecimiento con dicha condición, está es una de las características importantes de las levaduras de esta especie, dado que pueden tolerar altas concentraciones de etanol que les permite sobrevivir en los ambientes fermentativos. Al contrario, las especies no-*Saccharomyces* no tienen la habilidad de sobrevivir a un aumento en la concentración de etanol, soportando como máximo un 6 % v/v (Ma *et al.*, 2013; Pina *et al.*, 2004).

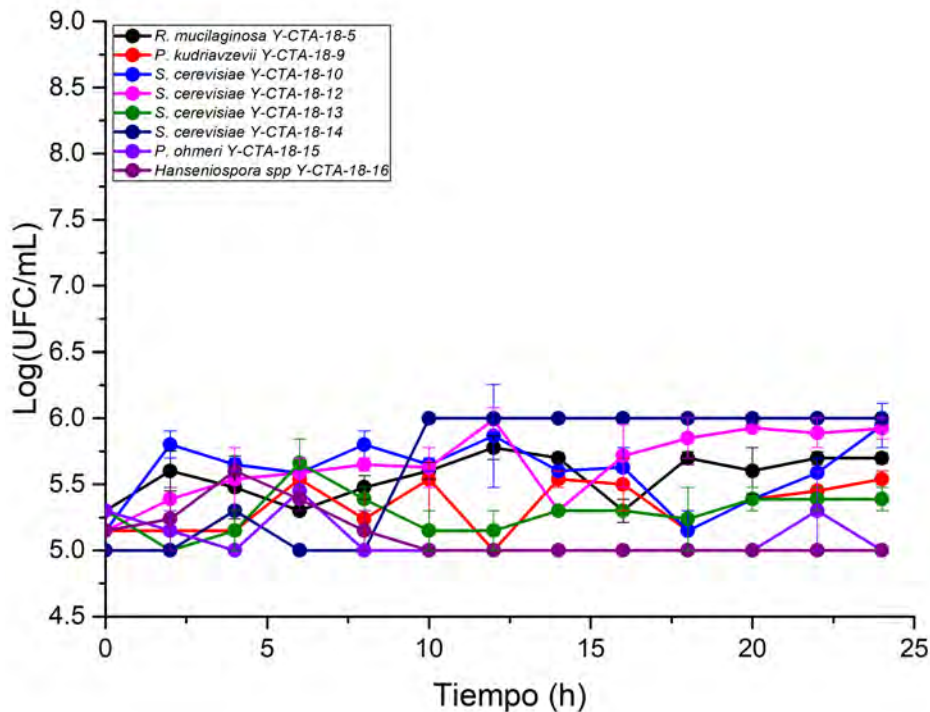


FIGURA 6.4. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 12 % v/v de etanol durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

La presencia y acumulación del etanol en el ambiente de crecimiento de las levaduras es un estrés químico al cuál las levaduras pueden sobrevivir mediante mecanismos de adaptación al medio (Pina *et al.*, 2004; Archana *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el etanol afecta la integridad de la membrana celular en las células de *S. cerevisiae*, porque influye negativamente en la función de la membrana plasmática, su fluidez y estructura, dado que la membrana es el primer objetivo del efecto tóxico del etanol (Ma *et al.*, 2013; Pina *et al.*, 2004; Jimoh *et al.*, 2013; Deparis *et al.*, 2017). Sin embargo, las células de *S. cerevisiae* generan respuestas

adaptativas cuando se induce estrés por etanol mediante la activación de rutas de biosíntesis de moléculas protectoras, como ácidos grasos insaturados, esteroides y carbohidratos (Miao *et al.*, 2018; Vamvakas y Kapolos, 2020).

Se ha reportado que cuando las células de *S. cerevisiae* crecen en presencia de etanol modifican la composición de la membrana, incrementando la concentración de ácidos grasos monoinsaturados y esteroides a medida que se aumenta la concentración de etanol, incluso, la tolerancia al etanol está relacionada con la habilidad de mantener una alta tasa de biosíntesis de fosfolípidos (Pina *et al.*, 2004; Archana *et al.*, 2015). Pina *et al.* (2004) reportaron que, ante exposición a etanol los compuestos más abundantes en la membrana celular de *S. cerevisiae* fueron el ácido oleico y ergosterol. El incremento en las proporciones de ácido oleico contrarresta los efectos de fluidización de la membrana ocasionados por el etanol brindando tolerancia a la célula (You *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha reportado que el ergosterol provee a las células una mejor adaptación a la presencia de etanol en el ambiente de crecimiento debido a que le da rigidez a la membrana celular. Lo anterior concuerda con lo reportado por Chi y Arneborg (1999), quienes establecen que una cepa de *S. cerevisiae* altamente tolerante al etanol tiene una mayor proporción de ergosterol y fosfolípidos que una cepa con tolerancia leve al etanol.

También, se ha reportado que el estrés por etanol causa un incremento en la síntesis de trehalosa, la cual se acumula en las células de *S. cerevisiae* y protege a las células de los efectos perjudiciales del incremento de la permeabilidad de membrana (Chandler *et al.*, 2004; Jimoh *et al.*, 2013). Sin embargo, este compuesto solo facilita la supervivencia de las células de *S. cerevisiae* en concentraciones letales de etanol (>10 % v/v); el rol de la trehalosa en concentraciones letales reside en estabilizar la membrana plasmática y proteger las proteínas citoplasmáticas (Bandara *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo anterior, es posible que la capacidad de la cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13 de crecer en la condición de 8 % de etanol puede deberse al efecto individual o en conjunto del ácido oleico y el ergosterol, compuestos que le

permitirían a la levadura sobrellevar los efectos tóxicos del etanol sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*.

6.3.1.3. Tolerancia al ácido láctico

Durante la fermentación de cacao espontánea se ha reportado que las concentraciones de ácido láctico están entre 0.1-2 % v/v cuando la concentración celular de las levaduras está en su valor máximo (Romanens *et al.*, 2019). Por esta razón, se evaluó el efecto diferentes concentraciones de ácido láctico (0.5, 1 y 2 % v/v) sobre la viabilidad celular de las levaduras.

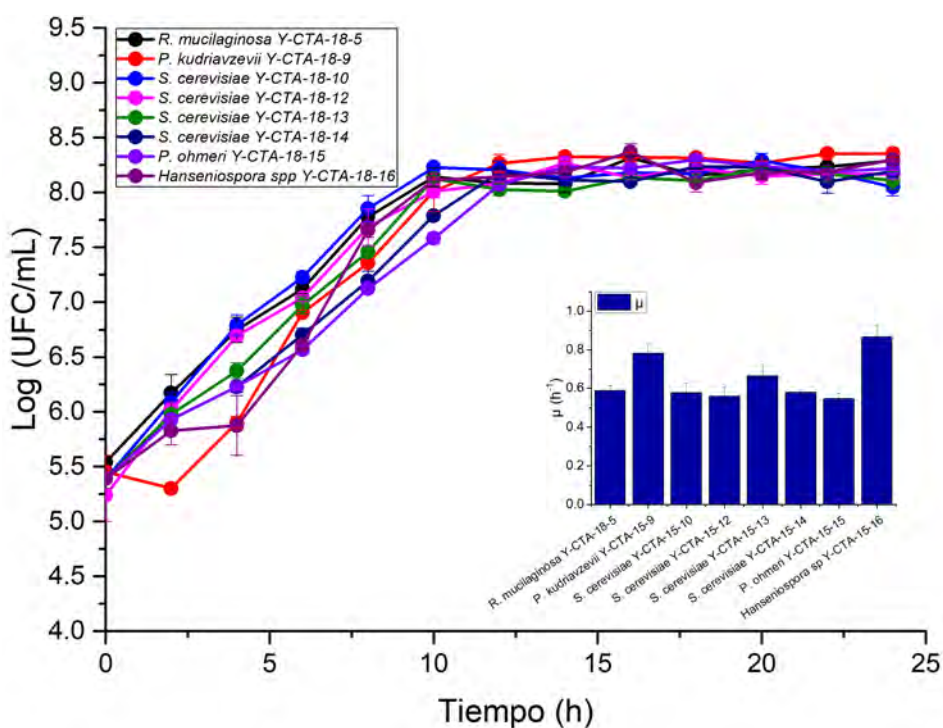


FIGURA 6.5. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 0.5 % v/v de ácido láctico durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

Las curvas de crecimiento celular de las levaduras con 0.5 % de ácido láctico añadido al medio se muestran en la Figura 6.5. Se puede observar que las levaduras que presentaron más tolerancia fueron *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16 y *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 respectivamente, por ende, fueron las cepas que mejor adaptación presentaron a la modificación en el medio de crecimiento.

La fase de crecimiento exponencial de *Hanseniaspora spp.* se encuentra entre las 6 y 10 h de incubación con un valor de velocidad específica de crecimiento igual a 0.867 h^{-1} ($td=0.799 \text{ h}$). Por otro lado, la fase de crecimiento exponencial de *P. kudriavzevii* estuvo entre las 6 y 10 horas de incubación, con un valor $\mu=0.782 \text{ h}^{-1}$ ($td=0.886 \text{ h}$). Resultados similares fueron reportados por Sirisan *et al.* (2013), quienes evaluaron el crecimiento de varias cepas de levadura en medio líquido utilizando ácido láctico como fuente de carbono. La fase de crecimiento exponencial se presentó desde las 8 a las 10 horas de incubación, con una velocidad específica de crecimiento de 1.102 h^{-1} ($td=0.629 \text{ h}$). También se observa que la cepa de *Hanseniaspora spp.* Y-CTA-18-16 presenta buena adaptación al medio de crecimiento modificado, con un valor de velocidad específica de crecimiento igual a 0.814 h^{-1} con su fase exponencial de las seis a las diez horas.

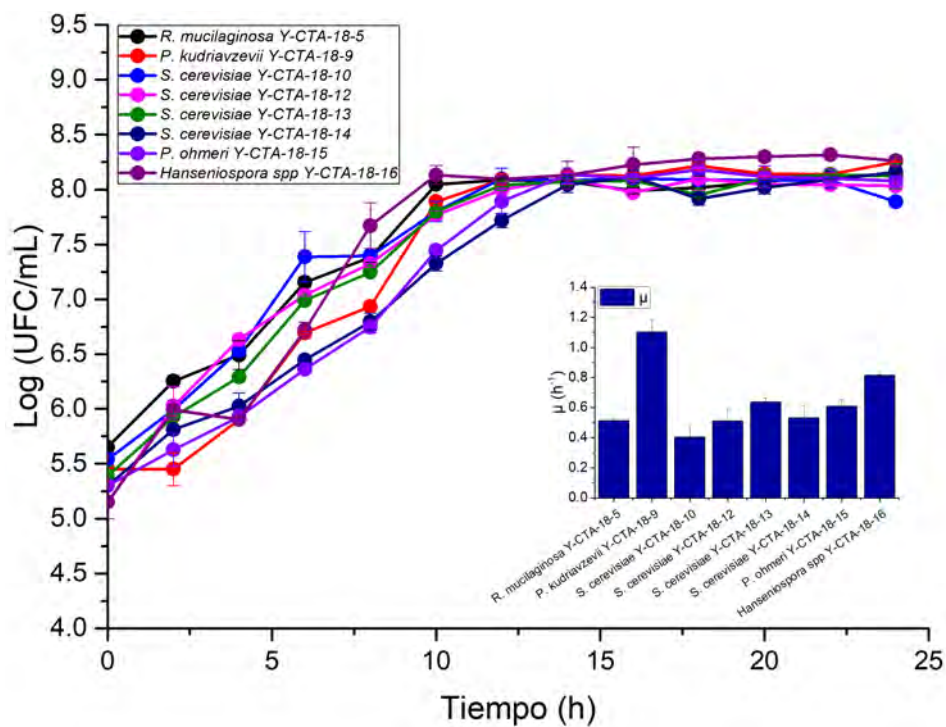


FIGURA 6.6. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 1 % v/v de ácido láctico durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

Cuando la concentración de ácido láctico en el medio es de 2% v/v la cepa de *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu=1.789 \text{ h}^{-1}$; $td=0.387 \text{ h}$), por lo cual esta levadura es la que mejor se adapta al

incremento de ácido láctico en el medio. Por otro lado, la cepa de *Hanseniaspora spp.* Y-CTA-18-16 también presenta buena adaptación a la condición de estrés, con una velocidad específica de crecimiento de 0.800 h^{-1} ($td=0.866 \text{ h}$). Las curvas de crecimiento de las levaduras con 2 % v/v de ácido láctico añadido al medio se presentan en la Figura 6.7.

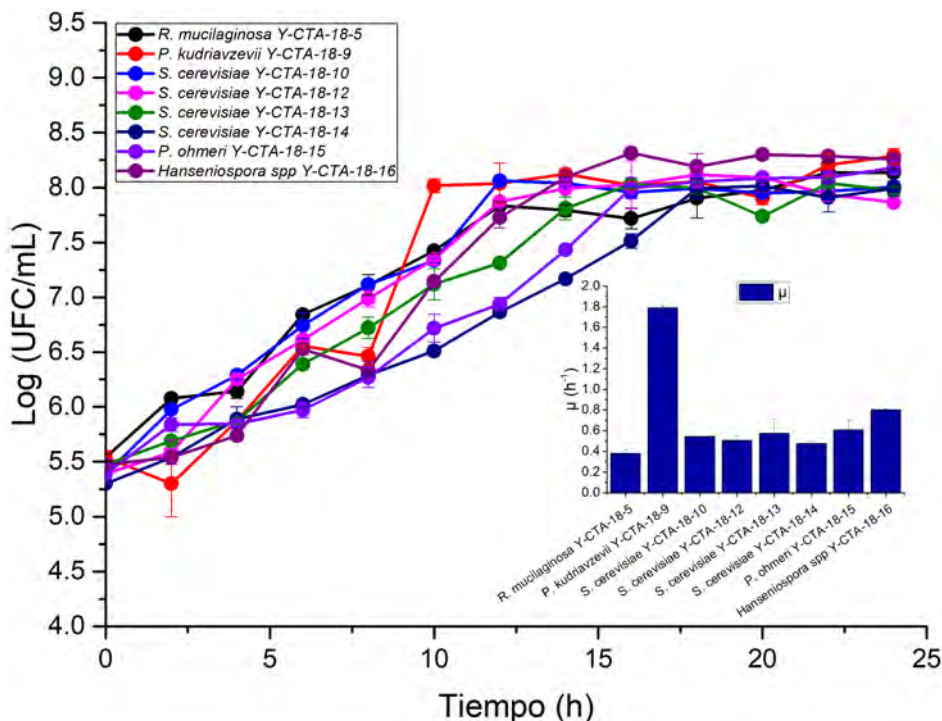


FIGURA 6.7. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD suplementado con 2 % v/v de ácido láctico durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

La respuesta adaptativa de tolerancia al estrés por ácido láctico que tiene la cepa de *P. kudriavzevii* puede deberse a que la levadura metaboliza el ácido orgánico. El ácido láctico no disociado se difunde a través de la membrana celular mediante difusión simple, en el citoplasma el ácido se disocia en iones de lactato y protones H^+ (Narendranath *et al.*, 2001; Vamvakas y Kapolos, 2020). El ion de lactato intracelular disociado del ácido láctico puede ser degradado por *P.kudriavzevii* a piruvato mediante la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (L-lactato deshidrogenasa; EC 1.1.1.27). Esto permite a la levadura utilizar el ácido láctico como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Con el fin de mantener el pH intracelular entre los valores fisiológicos de sobrevivencia, los iones de

hidrogeno pueden ser expulsados de la célula por la acción de la ATPasa transportadora de H⁺ (ATPasa transportadora de protones; EC 7.1.2.2) (Sirisan *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2020).

Por otro lado, la tolerancia que presentó la cepa de *Hanseniaspora spp.* Y-CTA-18-16 mantuvo la viabilidad celular ante el estrés causado por el ácido láctico, sin embargo, se observa que la velocidad específica de crecimiento disminuyó a medida que se aumentó la concentración de ácido láctico de 0.5% a 2% v/v. Lo anterior puede deberse a que al incrementar la concentración de H⁺ dentro de la célula, se consume una gran cantidad de energía en forma de ATP para sacar a los cationes a través de la membrana plasmática, evitando así la acidificación intracelular que induce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Kuthoose, 2016; Vamvakas y Kapolos, 2020). Se ha reportado que el ácido láctico en concentraciones de 0.8 a 1% v/v puede reducir el crecimiento de las levaduras bruscamente porque impide la formación de brotes de levadura (Narendranath *et al.*, 2001; Nayyeri *et al.*, 2017). A pesar de lo anterior, al añadir ácido láctico al medio, la cepa *Hanseniaspora spp.* Y-CTA-18-16 presentó una mayor velocidad específica de crecimiento respecto al testigo, indicando que posiblemente la levadura puede metabolizar el ácido láctico para la obtención de energía.

6.3.1.4. Tolerancia a pH

Durante la fermentación espontánea de cacao se ha reportado que el pH varía de 3.20 a 4.81 (Magalhães da Veiga Moreira *et al.*, 2016; Romanens *et al.*, 2019). Por esta razón, se evaluó el efecto de diferentes condiciones ácidas (pH 3.0, pH 4.0 y pH 5.0) sobre el crecimiento de las levaduras.

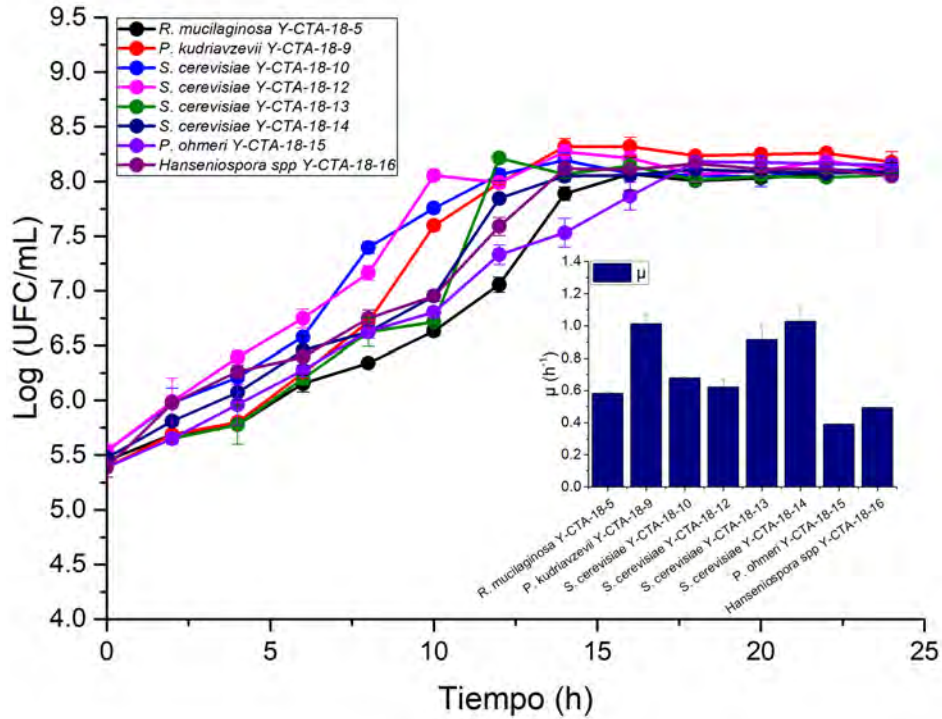


FIGURA 6.8. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD con pH modificado a 3.0 durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

Las curvas de crecimiento celular de las levaduras en medio con pH modificado a 3.0 se muestran en la Figura 6.8. Se puede observar que las levaduras que presentaron una mayor tolerancia fueron *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 y *S. cerevisiae* Y-CTA-18-14, y por lo tanto, estas cepas presentaron mejor adaptación a la modificación del pH en el medio de crecimiento. La fase de crecimiento exponencial de *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 se obtuvo entre las 8 y 10 h de incubación con un valor de velocidad específica de crecimiento igual a 1.012 h^{-1} ($t_d=0.685 \text{ h}$). Por otro lado, la fase de crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-14 estuvo entre las 10 y 12 horas de incubación, con un valor $\mu=1.027 \text{ h}^{-1}$ ($t_d=0.675 \text{ h}$). Se ha reportado que estas dos levaduras pueden crecer a pH bajo, incluso a pH 2.0; estos resultados están relacionados con el efecto observado en el apartado anterior (Nayyeri *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018).

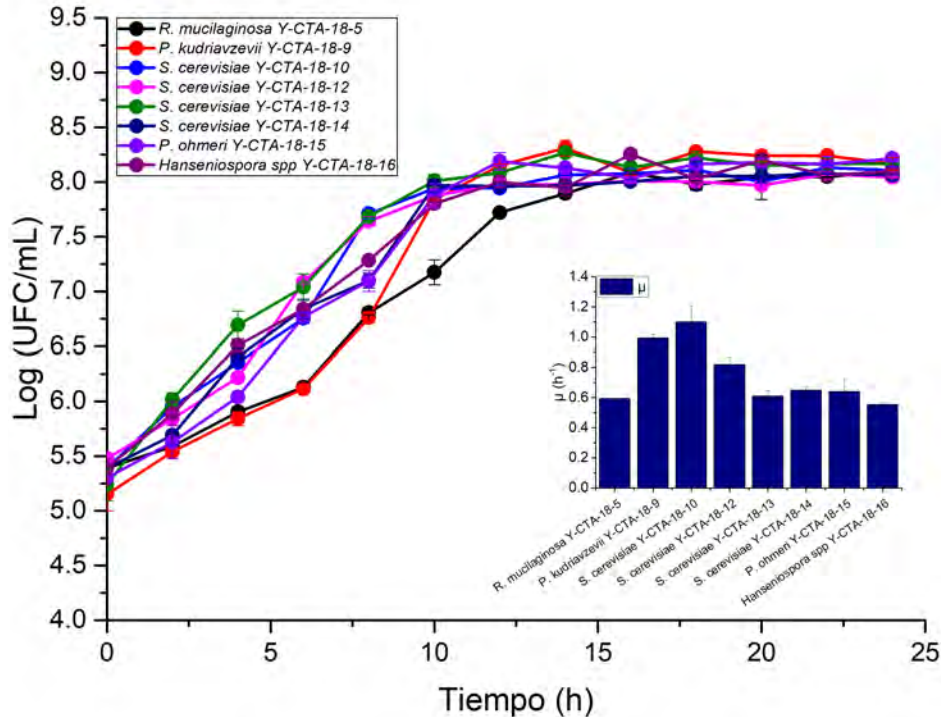


FIGURA 6.9. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD con pH modificado a 4.0 durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

Cuando el pH del medio se incrementó a 4.0, las cepas que presentaron mayor adaptación al medio fueron *S. cerevisiae* Y-CTA-18-10 y *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9. La cepa que presenta mayor velocidad específica de crecimiento es *S. cerevisiae* 1 ($\mu=1.100 \text{ h}^{-1}$), y su fase exponencial estuvo comprendida entre las 6 y 8 horas de incubación. Por otro lado, la cepa de *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 presentó la fase exponencial entre las 6 y 10, además de que continuó presentando buena tolerancia, con una velocidad específica de crecimiento de 0.994 h^{-1} ($td=0.697 \text{ h}$). Las curvas de crecimiento de las levaduras con pH modificado a 4.0 se presentan en la Figura 6.9.

El crecimiento de las levaduras en medio con pH modificado a 5.0 se muestra en la Figura 6.10. En esta condición, la cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-10 presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu=1.094 \text{ h}^{-1}$; $td=0.634 \text{ h}$), siendo la levadura que muestra una mejor respuesta de adaptación a la disminución de acidez en el medio. Por otro lado, la cepa de *P. ohmeri* Y-CTA-18-15 también muestra

buena tolerancia a esta condición de estrés, con una velocidad específica de crecimiento de 0.971 h^{-1} ($td=0.714 \text{ h}$).

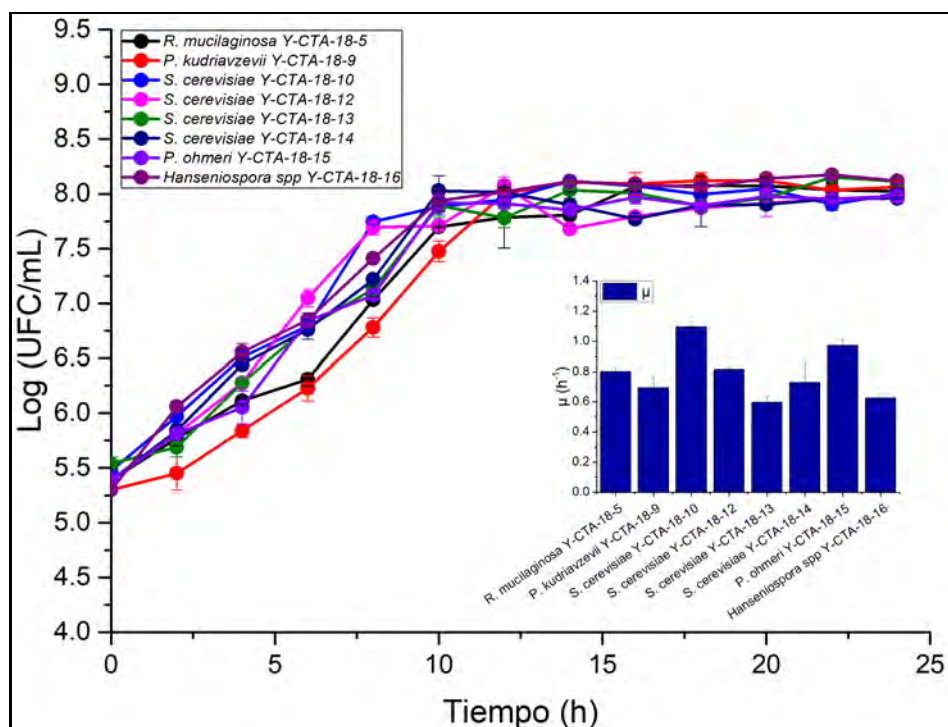


FIGURA 6.10. Curvas de crecimiento de las levaduras autóctonas de la fermentación de cacao crecidas en YPD con pH modificado a 5.0 durante 24 h a 30 °C y 150 rpm

Se ha reportado que a medida que un medio tiene menor pH el crecimiento de las levaduras es inhibido y que el pH óptimo para el crecimiento de las levaduras varía de 4.5 a 6.5 (Uribe-Gutierrez, 2007; Nayyeri *et al.*, 2017). También se ha reportado que *S. cerevisiae* crece en un amplio rango de pH externo, sin embargo, prolifera con más rapidez en pH ácido, siendo 4.0 el valor de pH óptimo (Serrano *et al.*, 2002; Yalcin y Ozbas, 2008).

De manera similar, los resultados reportados en esta investigación muestran que la cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-10 tolera bien pH 4.0 y 5.0, siendo la condición de pH 4.0 en la que presenta mayor crecimiento. La cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-14 toleró la condición más ácida, sin embargo, debido a que esta cepa no se adaptó a la condición de estrés con 4% de etanol, se descarta para su uso futuro como cultivo iniciador, debido a que no podría tolerar las condiciones presentadas durante la fermentación de cacao.

Por otro lado, la levadura *P. kudriavzevii* también puede tolerar estrés a condiciones ácidas hasta pH 1.5; sin embargo, al exponerse a ambientes ácidos extremos presenta crecimiento filamentoso, floculación e incluso puede formar pseudohifas induciendo diferenciación morfológica (Ji *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en este estudio para *P. kudriavzevii* muestran que al incrementar el pH de 3.0 a 5.0 hubo una disminución en su crecimiento, siendo la condición de pH 3.0 en la que se presenta un mayor valor de la velocidad específica de crecimiento.

Al estar en ambientes ácidos, las levaduras deben tener una respuesta apropiada con el fin de proteger las macromoléculas y procesos metabólicos esenciales, dado que a pH bajo la protonación influye en la carga de las moléculas biológicas como proteínas y enzimas afectando sus funciones y estructuras (Uribe-Gutierrez, 2007; Lund *et al.*, 2020). La tolerancia que presentan las levaduras al estrés ácido puede ser debido a varios factores, como la homeostasis del pH, la producción de arginina, la alteración de la composición de la membrana lipídica o reacciones enzimáticas (Deprez *et al.*, 2018; Guan y Liu, 2020; Ji *et al.*, 2020).

En primera instancia, la homeostasis eficiente del pH intracelular influye en la absorción y utilización de nutrientes, degradación de sustratos y en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Serrano *et al.*, 2002; Guan y Liu, 2020; Lund *et al.*, 2020;). La homeostasis genera un gradiente de pH, el cual es favorable para las levaduras acidotolerantes, dado que la energía que se consumiría para mantener un pH neutral, se aprovecha para el crecimiento y metabolismo de la levadura bajo condición de estrés ácido. Lo anterior, manteniendo el pH intracelular en valores mayores respecto al pH extracelular para evitar la destrucción de la homeostasis de pH (Deprez *et al.*, 2018; Guan y Liu, 2020). Como segunda estrategia de tolerancia a estrés ácido se tiene el desencadenamiento de reacciones enzimáticas que consumen protones, como reacciones de descarboxilación, debido a que el protón H^+ se incorpora como producto de reacción de manera irreversible (Lund *et al.*, 2020). Por otro lado, se tiene la eliminación de protones H^+ intracelulares mediante el consumo de energía, acción que en las levaduras es realizada por la V-ATPasa, una enzima encargada de translocar protones. Finalmente, las levaduras pueden producir diversos compuestos que contribuyan a la neutralización del pH bajo, como

la arginina, sobre la cual se ha reportado tener un rol positivo en la protección de levaduras como *P. kudriavzevii* del estrés ácido (Matsushika *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2020; Lund *et al.*, 2020).

6.4. Caracterización metabólica de las cepas de levadura aisladas de la fermentación del cacao

Con el fin de caracterizar metabólicamente las cepas de levadura se evaluó su crecimiento en medio enriquecido con pectina durante seis días, obteniendo resultados sobre la actividad pectinolítica de las cepas.

6.4.1. Prueba de actividad pectinolítica

A partir del crecimiento de las levaduras en el medio enriquecido con pectina, se identificó que solamente la cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12 presentó actividad pectinolítica. Los resultados se pueden observar en la Figura 6.11. La variación en la actividad pectinolítica se puede deber a diferencias asociadas a la especie y producción enzimática del microorganismo (Hurtado *et al.*, 2020).

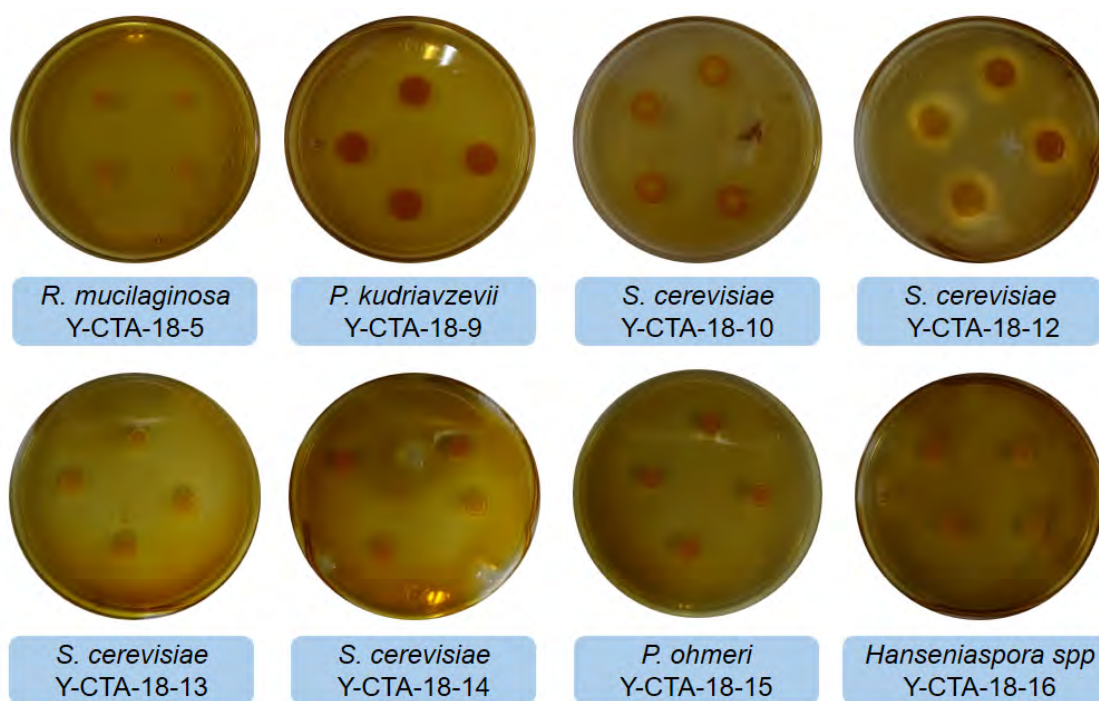


FIGURA 6.11. Levaduras autóctonas del cacao sembradas en medio enriquecido con pectina incubadas durante seis días a 30 °C

Como se mencionó con anterioridad, la única cepa que presentó un halo de degradación de pectina fue *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12, que además presentó crecimiento en casi todas las condiciones de estrés (a excepción de 8% v/v y 12 % v/v de etanol), indicando su tolerancia al ambiente fermentativo del cacao. En lo que respecta a la actividad pectinolítica, se obtuvo un halo de aproximadamente 6-8 mm y un índice de degradación (PDI) de 36 %. Hurtado *et al.*, (2020), determinaron la producción de pectinasas por levaduras aisladas a partir de suelos y frutos, identificando que solo el 9.6 % de las levaduras aisladas presentaron actividad pectinolítica. Por otro lado, se ha reportado que la especie *S. cerevisiae* puede presentar actividad pectinolítica y producir pectinasa durante la fermentación de cacao y de café (Koffi *et al.*, 2018; Haile y Kang, 2019).

Las pectinasas son las responsables de la degradación de las sustancias pecticas que le brindan al cacao su textura viscosa, la secreción de enzimas pectinolíticas es esencial para el crecimiento de otros microorganismos involucrados en la fermentación de cacao, como las BAL y BAA, dado que la reducción de la viscosidad de la pulpa permite el ingreso de aire favoreciendo su crecimiento (Crafack *et al.*, 2014; Samagaci *et al.*, 2014; Koffi *et al.*, 2018). Por lo tanto, la actividad pectinolítica es una característica importante para la selección de una levadura en un cultivo iniciador.

6.5. Caracterización funcional de las cepas de levaduras

Para caracterizar funcionalmente las levaduras se realizó una prueba cualitativa para determinar su capacidad antifúngica contra dos hongos productores micotoxigénicos del género *Aspergillus*, los cuales fueron previamente aislados de la etapas postcosecha del cacao por el grupo de investigación (Hernández-Medina, 2018).

6.5.1. Prueba de actividad antifúngica de las levaduras sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus carbonarius*.

Los resultados de la prueba de confrontación de los cultivos celulares de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao contra las esporas de los hongos *A. carbonarius* y *A. flavus* se presentan en la Tabla 6.2.

La capacidad germinativa de *A. carbonarius* fue mayormente fue afectado por las cepas de levadura de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-14, *P. ohmeri* Y-CTA-18-15 y *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16 Por otro lado, el crecimiento de *A. flavus* se afectó por la acción de *R. mucilaginosa* Y-CTA-18-5 y *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16. También, es posible observar que *A. flavus* muestra tener una mayor resistencia que *A. carbonarius* a la acción inhibitoria de las levaduras.

TABLA 6.2. Confrontación de las células de levadura contra los hongos toxigénicos (30 °C durante 96 h)

Levadura \ Hongo	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>
<i>R. mucilaginosa</i> Y-CTA-18-5	+ -	+
<i>P. kudriavzevii</i> Y-CTA-18-9	+	+
<i>S. cerevisiae</i> Y-CTA-18-10	+	+
<i>S. cerevisiae</i> Y-CTA-18-12	+	+
<i>S. cerevisiae</i> Y-CTA-18-13	+	+
<i>S. cerevisiae</i> Y-CTA-18-14	+	+ -
<i>P. ohmeri</i> Y-CTA-18-15	+	+ -
<i>Hanseniaspora spp.</i> Y-CTA-18-16	+ -	+ -

(+): crecimiento del hongo, (+-): poco crecimiento del hongo.

Se ha reportado que levaduras del género *Pichia*, *Rhodotorula*, *Scaccharomyces* y *Hanseniaspora* pueden actuar como agentes de biocontrol contra hongos tóxicos como *A. carbonarius*, *A. ochraceus* y *A. flavus* mediante la reducción del crecimiento fúngico (Romanens *et al.*, 2019; Jaibangyang *et al.*, 2020; Lino de Souza *et al.*, 2021). Las características antagónicas de las levaduras han sido atribuidas a diferentes mecanismos, entre los que destacan, los siguientes: (i) la competición de espacio y nutrientes, (ii) la inhibición del crecimiento de micelios

por la formación de películas alrededor de las hifas, (iii) la producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular fúngica, (iv) la producción de toxinas killer, (v) antibiosis y la producción de compuestos orgánicos volátiles con capacidad antifúngica (Tryfinopoulou *et al.*, 2020). Lino de Souza *et al.* (2021) y Sopin *et al.* (2020) reportaron que las levaduras utilizadas en sus investigaciones producen compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica, como el 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-metilbutil acetato, etil octanoato y 2-nonanona.

Sin embargo, la acción inhibitoria de las levaduras sobre el crecimiento micelial de los hongos no evita totalmente su esporulación y proliferación, sino que previene la aparición de la contaminación por un periodo de tiempo limitado (Paster *et al.*, 1993; Tryfinopoulou *et al.*, 2020). Resultados similares fueron obtenidos en este estudio, donde es posible observar que el crecimiento de los hongos no fue inhibido totalmente, sino que se afectó su capacidad de germinación presentando un desarrollo de hifas incompleto, tal como se muestra en la Figura 6.12.

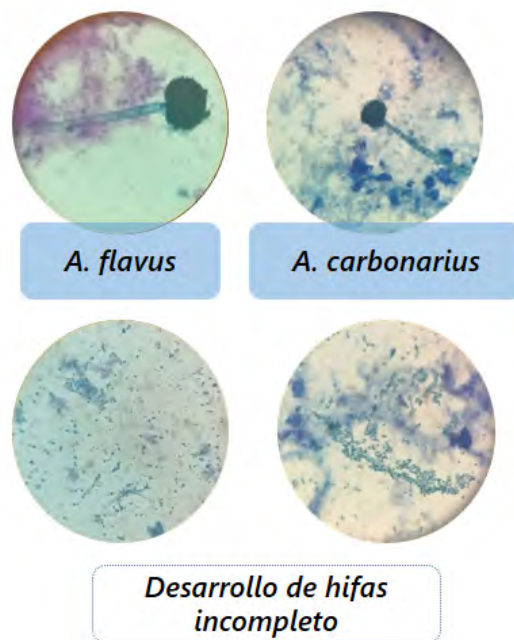


FIGURA 6.12. Proliferación completa e incompleta de los hongos a causa de la acción de las levaduras

Es importante resaltar que es necesario realizar más estudios para determinar el mecanismo mediante el cual las levaduras estudiadas actúan sobre la germinación de los hongos toxigénicos presentes en la fermentación de cacao.

A continuación, se discutirán los resultados obtenidos para las bacterias ácido lácticas.

6.6. Caracterización fisiológica y metabólica de las bacterias ácido lácticas

Se caracterizaron cuatro cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* respecto a su tolerancia a etanol, osmotolerancia, tolerancia a ambientes ácidos y su capacidad de metabolizar el ácido cítrico, esto, porque las funciones principales de las BAL en la fermentación de cacao son fermentar las glucosa y fructosa de la pulpa, y metabolizar el citrato. Las cepas analizadas fueron estudiadas con anterioridad por Cervantes Ilizaliturri (2019) reportando que presentan crecimiento a 37 °C, metabolismo heterofermentativo, crecen en rangos de pH de 4 a 8, son halófilas y tienen actividad antifúngica contra cepas toxigénicas como *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*.

6.6.1. Pruebas de tolerancia a compuestos

Durante la fermentación de cacao, las condiciones de estrés máximo que comúnmente se presentan durante la fermentación de cacao cuando las BAL tienen su metabolismo más activo son 8 % v/v de etanol, 10 % p/v de fructosa y 15 % p/v de glucosa, con un pH entre 4.0-5.0 (Romanens *et al.*, 2019; Visintin *et al.*, 2016). Por ende, la adaptación fisiológica de las cuatro cepas de BAL al ambiente de fermentación del cacao fue evaluada por el crecimiento que presentaron en 5, 10 y 15 % p/v de glucosa y fructosa, 6, 8 y 12 % v/v de etanol y pH 3.0, 4.0 y 5.0.

De las cuatro cepas probadas, tres toleraron la condición de 8 % v/v de etanol, ninguna toleró 12 % v/v de etanol y tres toleraron las condiciones de fructosa con 15 % p/v y 30 % p/v; las demás condiciones evaluadas fueron toleradas por las cuatro cepas de BAL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.13. El crecimiento testigo se estableció teniendo en cuenta el crecimiento de las BAL en medio MRS.

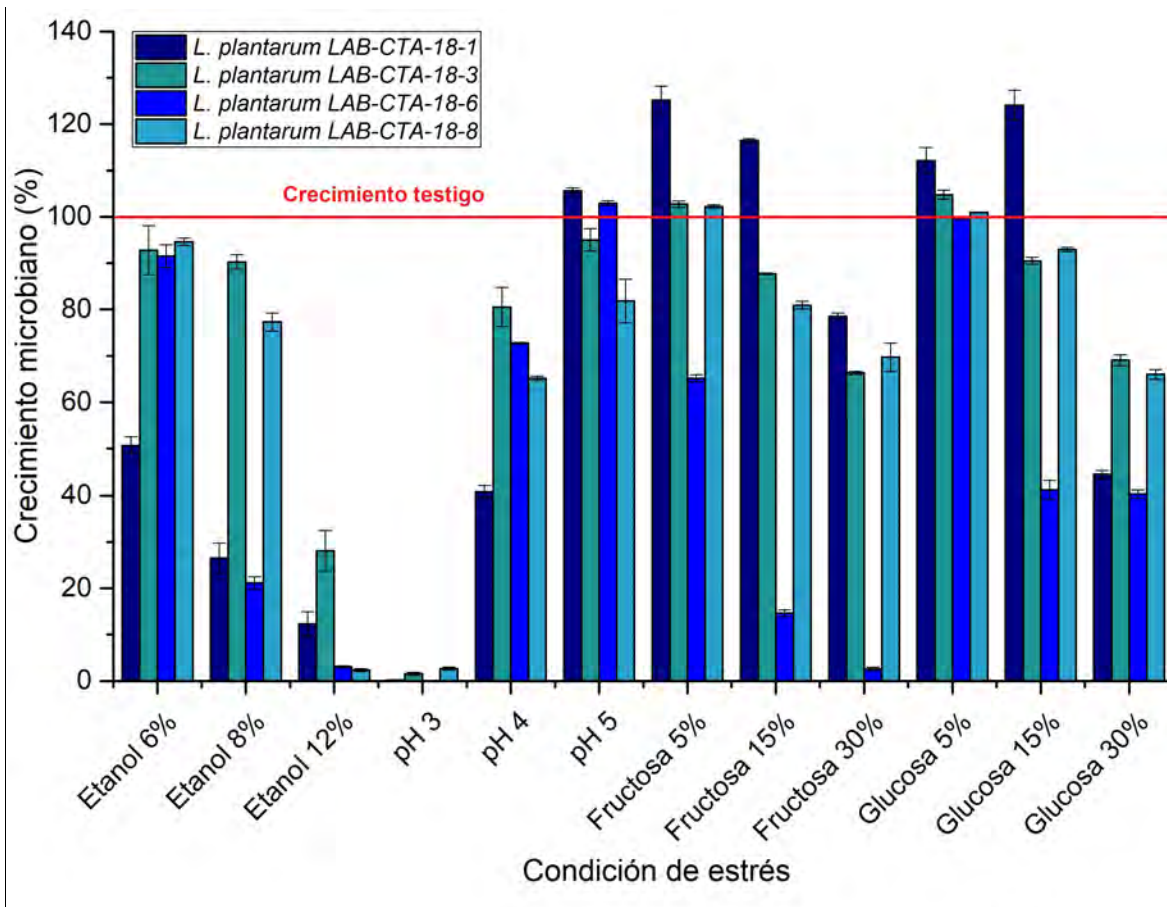


FIGURA 6.13. Crecimiento de las bacterias ácido lácticas autóctonas del cacao sometidas a diferentes condiciones de estrés incubadas 24 h a 30 °C

A partir de los resultados se encontró que la mayoría de cepas de *L. plantarum* son tolerantes a las concentraciones de fructosa y glucosa probadas, sin embargo, el crecimiento de *L. plantarum* LAB-CTA-18-6 se inhibe al incrementar la concentración de fructosa. Esto se debe a que la cepa no fue tolerante a las concentraciones de fructosa probadas, las cuales comprometen la turgencia celular y por ende, las funciones esenciales de la bacteria (De Angelis y Gobbetti, 2004; Sunny-Roberts y Knorr, 2008). Por otro lado, la cepa de *L. plantarum* LAB-CTA-1 crece mejor en presencia de 5 y 15 % p/v de glucosa y fructosa en comparación con el testigo, con un aumento de crecimiento en un 15-25 %, esto se debe a que el crecimiento de las bacterias se ve favorecido por los azúcares (Viesser *et al.*, 2020). Las cepas *L. plantarum* LAB-CTA-18-3 y LAB-CTA-18-8 fueron osmotolerantes, dado que a pesar de las condiciones hiperosmóticas (> 8% p/v de fructosa y glucosa) pudieron equilibrar las concentraciones extra e intracelulares de fructosa y

glucosa como resultado de su consumo (Guchte *et al.*, 2002; De Angelis y Gobbetti, 2004; Sunny-Roberts y Knorr, 2008), resultados similares fueron encontrados por Visintin *et al.*, (2016) quienes reportaron que todas las bacterias ácido lácticas que aislaron y probaron presentaron crecimiento en 30 % p/v de glucosa y fructosa.

El etanol es generalmente considerado como uno de los principales inhibidores del crecimiento bacteriano. Generalmente, una concentración de 6 % v/v de etanol puede inhibir el crecimiento de las BAL (Chen *et al.*, 2020), sin embargo, las cuatro cepas de *L. plantarum* mantuvieron su viabilidad celular bajo esa condición de estrés. Con el aumento de la concentración de etanol a 8 % v/v, sólo se afectó la viabilidad celular de *L. plantarum* LAB-CTA-18-6 inhibiendo su crecimiento, sin embargo, también se ha reportado que *L. plantarum* puede tolerar esta condición de estrés (van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011). Al probar la condición de 12 % v/v de etanol, se observó que el crecimiento de las cuatro cepas de BAL fue inhibido, dado que no pudieron mantener su estabilidad celular (Alegría *et al.*, 2004; Visintin *et al.*, 2016).

Se ha reportado que el efecto tóxico del etanol sobre *L. plantarum* causa cambios en su morfología celular, volviendo a las células rugosas y sin forma. Además, afecta la fluidez, estructura y permeabilidad de la membrana celular, dañando su función (Chen *et al.*, 2020). Por otro lado, el etanol reduce la biosíntesis de ácidos grasos y por ende afecta la organización de los lípidos y estabilidad de la membrana, disminuyendo los niveles de ácido oleico e incrementando los niveles de ácido palmítico, esteárico y linoleico (van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011). También se ha reportado que la respuesta central al estrés por etanol inducido en *L. plantarum* causó la activación del metabolismo del citrato. Lo anterior puede ser explicado por el potencial de membrana y los efectos de la generación de gradiente de pH, los cuales pueden contribuir al suministro de energía celular (van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011).

A medida que se incrementó el pH, el crecimiento de las BAL incrementó; esto quizás es debido a que la mayoría de bacterias ácido lácticas son neutrófilas, y presentan un pH óptimo de crecimiento de 5.0 a 9.0 (Guchte *et al.*, 2002). Por lo

tanto, al disminuir el pH el crecimiento de las BAL es afectado. Esto concuerda con lo reportado por Alegría *et al.*, (2004), en su estudio, al disminuir el pH de 4.7 a 3.3 la población celular disminuyó un 24 %, posteriormente, con un pH de 3.2 se disminuyó la población de *L. plantarum* en un 50 %. Por otro lado, Fu y Mathews, (1999) reportaron que el crecimiento de *L. plantarum* es afectado cuando es crecido en condiciones debajo de pH 4.0, teniendo una tasa de crecimiento más lenta, estos resultados son contrarios a los obtenidos para la cepas estudiadas, indicando que tienen la capacidad de resistir valores de pH por debajo de su pH óptimo de crecimiento.

Al estar en ambientes ácidos, es decir, con pH bajo, la pared y membrana celular de *L. plantarum* se dañan, afectando la homeostasis del pH y el potencial de membrana. La acidificación interna que se presenta reduce la actividad de las enzimas ácido-sensitivas, desnaturaliza las proteínas y causa daños en el ADN. En general, el estrés ácido afecta todo el metabolismo celular, conllevando al agotamiento de energía y por ende a la muerte celular (Guchte *et al.*, 2002; Papadimitriou *et al.*, 2016).

6.6.2. Prueba de metabolismo de ácido cítrico

La conversión de ácido cítrico es una de las funciones principales de las bacterias ácido lácticas durante la fermentación de cacao dado que permiten la regulación del pH de la pulpa de cacao, asegurando un mejor crecimiento y estabilidad de los microorganismos presentes en el proceso fermentativo (Lefeber *et al.*, 2010; Fonseca Blanco *et al.*, 2020;). Los resultados obtenidos de la prueba de consumo de ácido cítrico se presentan en la Figura 6.14, en esta se puede observar que las cepas de *L. plantarum* BAL-CTA-18-1, *L. plantarum* BAL-CTA-18-6 y *L. plantarum* BAL-CTA-18-8 presentan colonias con formación de un complejo azul como resultado de la degradación del citrato. Se ha reportado que la especie *L. plantarum* puede metabolizar el ácido cítrico, lo cual explica la presencia de estas bacterias en las etapas de la fermentación (Camu *et al.*, 2007).

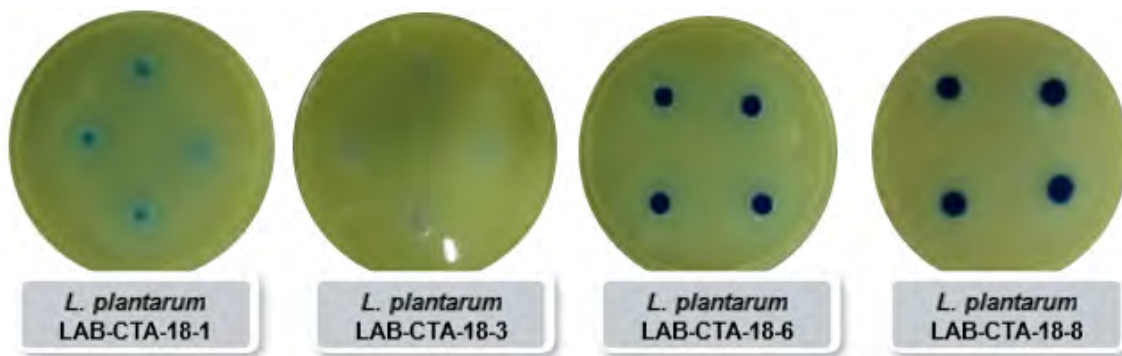


FIGURA 6.14. Resultado de la prueba de metabolismo de ácido cítrico de las bacterias ácido lácticas autóctonas del cacao

Los resultados de las pruebas de producción de acetoina y CO₂ realizadas para indicar cuál ruta metabólica de citrato tienen las cepas de BAL de este estudio se muestran en la Figura 6.15 y la Tabla 6 respectivamente. Se observa que *L. plantarum* LAB-CTA-18-6 fue la cepa con mayor producción de acetoina, mientras que *L. plantarum* LAB-CTA-18-1 tiene una escasa producción; las demás cepas, no presentan producción de acetoina a partir del citrato. Por otro lado, las cuatro cepas producen CO₂, siendo *L. plantarum* LAB-CTA-18-3 la cepa que produce este gas en menor cantidad a partir del citrato.

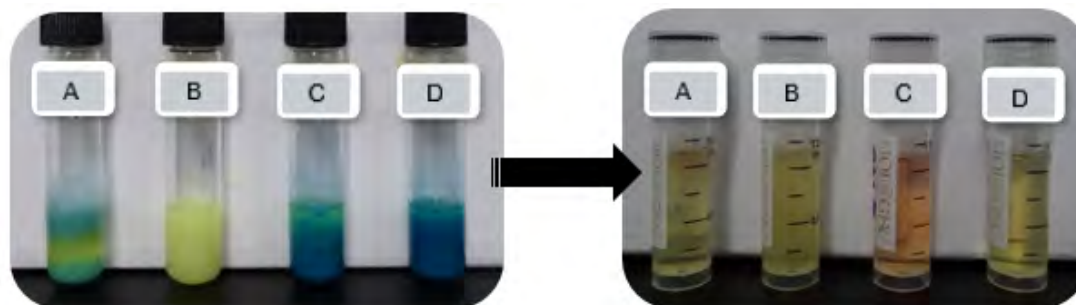


FIGURA 6.15. Resultados de la prueba de producción de acetoina; A: *L. plantarum* LAB-CTA-18-1; B: *L. plantarum* LAB-CTA-18-3; C: *L. plantarum* LAB-CTA-18-6; D: *L. plantarum* LAB-CTA-18-8

TABLA 6.3. Resultados de la producción de CO₂ a partir del citrato (48 h a 30 °C)

BAL	Producción de CO ₂
<i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-1	+
<i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-3	-
<i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-6	+
<i>L. plantarum</i> LAB-CTA-18-8	+

(+): Indica producción de CO₂; (-): No hay producción de CO₂

Las BAL tienen dos rutas principales para el consumo de citrato, en primera instancia (ruta I) se tienen las cepas que no producen CO₂, las cuales conducen a la producción de ácido succínico; en la segunda ruta (ruta II) las BAL producen gas y acetoina. Por otro lado, las BAL que producen CO₂ pero no acetoina, no utilizan completamente la segunda ruta, teniendo como producto metabólico acetaldehído o ácido láctico (Camu *et al.*, 2007; Ouattara *et al.*, 2016).

Se ha reportado que las bacterias ácido lácticas heterofermentativas pueden metabolizar el citrato tanto a acetoina, como a ácido láctico (Lefeber *et al.*, 2011); incluso se ha reportado que las cepas heterofermentativas pueden convertir el ácido cítrico a ácido láctico con más eficiencia que los carbohidratos, siendo la posible causa del consumo rápido de ácido cítrico que puede acelerar el proceso de fermentación (Pereira *et al.*, 2012; Ouattara *et al.*, 2016;). Teniendo en cuenta que la presencia de la acetoina, ácido láctico o acetaldehído son de interés para la fermentación de cacao, las cepas que los producen podrían formar parte de un cultivo iniciador (Lefeber *et al.*, 2011; Menezes *et al.*, 2016; Magalhães da Veiga Moreira *et al.*, 2017).

En los resultados obtenidos en este estudio, se encontró que *L. plantarum* LAB-CTA-18-1 metaboliza débilmente el ácido cítrico, produce gas y tiene una producción moderada de acetoina, indicando que probablemente sigue la ruta II; la cepa de *L. plantarum* LAB-CTA-18-3 produce gas levemente y no produce acetoina, esto es resultado de que la bacteria no metaboliza el citrato, sin embargo, para la formulación de un cultivo iniciador es importante tener en cuenta que esta cepa tiene propiedades antifúngicas y resistencia al estrés. La única cepa que metabolizó el ácido cítrico en acetoina y CO₂, fue *L. plantarum* LAB-CTA-18-6, por lo cual, esta cepa presuntivamente sigue la ruta II. Finalmente, la cepa de *L. plantarum* LAB-CTA-18-8 es productora de CO₂ pero no de acetoina, indicando que sus productos metabólicos pueden ser el ácido láctico o el acetaldehído.

6.7. Caracterización fisiológica de las bacterias ácido acéticas aisladas de la fermentación de cacao

Se caracterizaron cuatro cepas de bacterias ácido acéticas (BAA) respecto a su tolerancia a ácido láctico, a diferentes condiciones de pH y a su termoresistencia. De las cuatro cepas, tres son de la especie *A. pasteurianus* y una pertenece a la especie *A. malorum*. Estas cepas de BAA fueron aisladas de un proceso de fermentación de cacao en Comalcalco, Tabasco, cosecha 2018-2, por el grupo de trabajo de Tecnología de Alimentos de la UNIDA- ITVER. La identificación molecular fue realizada en la Universidad de Montpellier por Farrera (2020).

6.7.1. Pruebas de tolerancia a compuestos

La adaptación fisiológica de las cuatro cepas de BAA al ambiente de fermentación del cacao se evaluó por la resistencia al estrés al que se exponen cuando su metabolismo está más activo durante la fermentación de cacao; en esta etapa de la fermentación, las concentraciones de ácido láctico tienen valores cercanos al 2 % v/v, el pH del medio alcanza valores entre 4.1 y 5.0, y la temperatura de la masa fermentativa está por encima de los 40 °C (Yao *et al.*, 2014; Visintin *et al.*, 2016). Por ende, se evaluaron condiciones de estrés de ácido láctico de 1, 2 y 4 % v/v, pH con valores de 4.0, 5.0 y 6.0, y temperaturas de 40, 45 y 50 °C.

El crecimiento testigo se estableció teniendo en cuenta el crecimiento de las BAA en medio GEA. Las cuatro cepas estudiadas presentaron tolerancia a la condición de 1% v/v de ácido láctico, pero al aumentar la concentración del ácido a 2 y 4 % v/v el crecimiento de las bacterias fue inhibida, resultados similares fueron reportados por Visintin *et al.* (2016) quienes al exponer cepas de *A. pasteurianus* a concentraciones similares de ácido láctico reportaron una inhibición en su crecimiento considerablemente. Por otro lado, se observó una disminución en el crecimiento de *A. pasteurianus* BAA-CTA-18-4 cuando el medio de crecimiento fue ajustado a un valor de pH 4.0, y que, al incrementar el pH hasta 6.0 su crecimiento aumentó. Las demás cepas, toleraron las condiciones de pH, observándose que al incrementar el pH el crecimiento de las bacterias se ve favorecido. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.16.

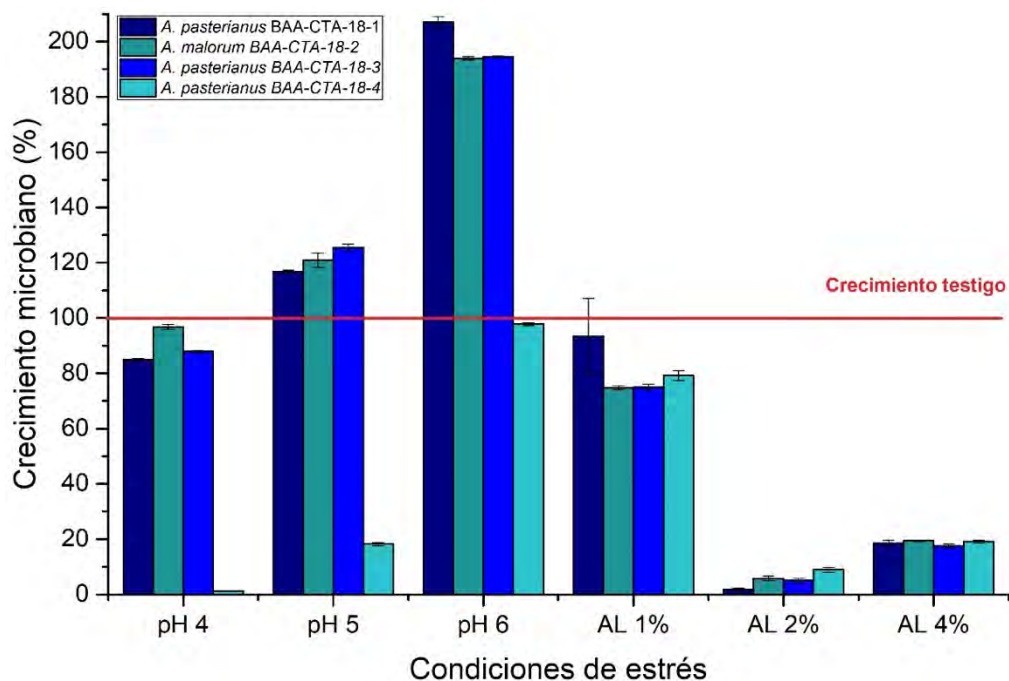


FIGURA 6.16. Crecimiento de las bacterias ácido acéticas autóctonas del cacao sometidas a diferentes condiciones de estrés (AL: Ácido láctico; incubadas 24 h a 30 °C)

El valor inicial de pH del medio de crecimiento afecta las funciones celulares, así como el consumo de nutrientes, por esta razón, al incrementar el pH las BAA aumentaron su concentración celular, dado que el rango de pH óptimo para el crecimiento de las BAA está entre 5.0-6.5 (Arifuzzaman *et al.*, 2014; Gerard, 2015). De manera similar, se ha reportado que las bacterias de la especie *A. pasteurianus* presentan crecimiento positivo en rangos de pH desde 4.5 a 7.0 y que con pH en valores de 3.0 su crecimiento es inhibido (Chen *et al.*, 2011; Arifuzzaman *et al.*, 2014). Hwang *et al.* (1999) también cultivaron BAA bajo diferentes condiciones pH (4.0-6.0) obteniendo que la masa celular aumentó a medida que el pH ascendió.

A causa del incremento de la concentración de ácido láctico el crecimiento de las BAA disminuyó, indicando que las cepas no presentan resistencia a concentraciones de ácido láctico por encima de 2 % v/v. Visintin *et al.* (2016), en su estudio de caracterización fisiológica de las bacterias ácido acéticas aisladas de la fermentación de cacao en África reportaron que el incremento de la concentración de ácido láctico actuó como un factor limitante para el crecimiento de *A. pasteurianus*.

Se ha reportado que las bacterias ácido acéticas del género *Acetobacter* pueden oxidar el ácido láctico, dado que tienen las enzimas necesarias para realizar la oxidación (Gerard, 2015). La mayoría de las cepas de *A. pasteurianus* puede utilizar el ácido láctico como fuente de carbono y de energía; primero, el ácido láctico es convertido a piruvato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa, después, la piruvato descarboxilasa (Piruvato descarboxilasa; EC 4.1.1.1) se encarga de convertir el piruvato a acetaldehído y finalmente el acetaldehído es oxidado a ácido acético por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa. La piruvato descarboxilasa es la enzima principal del metabolismo oxidativo de las BAA (Chandra Raj *et al.*, 2001; Gerard, 2015). También es posible que el ácido láctico sea oxidado a acetoina, cuando se obtiene el acetaldehído, este se puede unir a otra molécula de acetaldehído para formar la acetoina. Otra ruta metabólica para la producción de acetoina es la descarboxilación del acetolactato a partir de dos moléculas de piruvato. En todas las rutas metabólicas, la actividad de las deshidrogenasas durante la oxidación del lactato genera electrones que entran a la cadena de electrones localizada en la membrana citoplasmática (Moens, Lefeber, y Vuyst, 2014).

Por otro lado, con un incremento en la concentración de ácido láctico en el medio de crecimiento la proliferación de *A. pasteurianus* fue inhibida. Lo anterior se debe a los efectos tóxicos del ácido láctico que están relacionados con el ingreso de la forma no dissociada del ácido por la membrana plasmática. La difusión del ácido interfiere en los gradientes de protones, incrementando su concentración, esto cual interrumpe los procesos de membrana y lleva a la muerte celular (Shafiei *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2017).

6.7.2. Prueba de termoresistencia

Los resultados de la prueba de adaptación a diferentes temperaturas de las bacterias ácido acéticas se muestran en la Tabla 6.4. Las cuatro cepas de BAA fueron resistentes a las condiciones de temperatura de 40 °C y 45 °C, sin embargo, con un incremento de la temperatura a 50 °C la única cepa que presentó termoresistencia fue *A. pasteurianus* BAA-CTA-18-3.

TABLA 6.4. Crecimiento de las BAA a diferentes temperaturas (24 h de incubación en medio GEA)

Bacteria ácido acética	Termoresistencia		
	40 °C	45 °C	50 °C
<i>A.pasterianus</i> BAA-CTA-18-1	+	+	-
<i>A.malorum</i> BAA-CTA-18-2	+	+	-
<i>A.pasterianus</i> BAA-CTA-18-3	+	+	+
<i>A.pasterianus</i> BAA-CTA-18-4	+	+	-

(+): indica que hay crecimiento; (-): indica que no hay crecimiento

La termoresistencia de las BAA disminuyó con el incremento de la temperatura de incubación. Se han reportado efectos similares sobre la capacidad de crecimiento de las BAA en relación con el aumento de la temperatura. Coulibaly *et al.* (2018), aislaron BAA de la fermentación de cacao para determinar su termoresistencia, encontrando que 117 cepas de BAA crecieron a 40 °C, y que al incrementar la temperatura a 45 °C, solo 26 bacterias tuvieron la capacidad de crecer, y finalmente, a 50 °C solo seis cepas bacterianas presentaron termoresistencia. Yao *et al.* (2014), encontraron que las bacterias ácido acéticas que aislaron de la fermentación de cacao en Costa de Marfil fueron termoresistentes ya presentaron la habilidad de crecer a 45 °C. Konate *et al.* (2014) aislaron cinco cepas de *A. pasterianus* termoresistentes de vino de palma africano, observando que al incrementar la temperatura de los cultivos de 30 a 39 °C, solo dos cepas presentaron crecimiento. Resultados similares fueron obtenidos por Kanchanarach *et al.* (2010), quienes en su aislamiento y caracterización de cepas de *A. pasterianus* encontraron que solo dos cepas aisladas de maracuyá y uva presentaron resistencia a temperaturas de 41 °C. Por otro lado, Es-sbata *et al.* (2020) aislaron, detectaron y caracterizaron molecularmente cepas de *A. malorum* de frutos de cactus marroquí, encontraron que cinco cepas de *A. malorum* presentaron resistencia a 37 °C y que solo una cepa pudo tolerar la condición de 40 °C, indicando que esta cepa presentó una mayor la termoresistencia.

En relación con lo anterior, se ha reportado que la capacidad de las BAA de ser termoresistentes es resultado de la adaptación de las cepas a las condiciones de fermentación y el ambiente del cuál son aisladas (Coulibaly *et al.*, 2018). Esto, puede ser debido a que el mecanismo de termoresistencia está relacionado con el

desarrollo de mutaciones genéticas en el genoma de las especies mesofílicas permitiéndole a las bacterias sobrevivir a incrementos en la temperatura de 5 a 10 °C en comparación a su temperatura óptima de crecimiento (Es-sbata *et al.*, 2020). Sin embargo, cuando las cepas bacterianas no presentan crecimiento con el incremento de la temperatura se debe a que las altas temperaturas pueden desnaturalizar enzimas esenciales y causar daños en la membrana celular conllevando a la distribución de los constituyentes celulares, y por lo tanto, estos factores limitantes restringen el crecimiento de las células de BAA (Chen *et al.*, 2016).

6.8. Selección de consorcios microbianos para la fermentación de cacao

Con el propósito de seleccionar los cultivos iniciadores para obtener fermentaciones de cacao controladas y a partir de los resultados obtenidos en la investigación se tiene que los microorganismos formadores del consorcio deben soportar las condiciones a las que están expuestos durante la fermentación de cacao, también, se debe tener en cuenta que los microorganismos seleccionados formen parte de las especies dominantes durante el proceso fermentativo.

Generalmente, los microorganismos utilizados como inóculo definido para la fermentación de cacao debido a su adaptación al proceso fermentativo son *S. cerevisiae*, *P. kudravzevii*, *P. kluyveri*, *H. spp*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, y *A. pasteurianus* (Lefeber *et al.*, 2011; Vinícius *et al.*, 2012; Crafacck *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2015; Romanens *et al.*, 2020). Con base en los resultados obtenidos de las pruebas de caracterización, metabólicas y funcionales se proponen tres cultivos iniciadores para futuras aplicaciones para dirigir el proceso de fermentación de cacao. Es importante tener en cuenta que la resistencia a las condiciones de estrés, en conjunto con la presencia de actividades enzimáticas específicas, son criterios importantes para elegir cepas microbianas apropiadas para la formulación de cultivos iniciadores para la fermentación de cacao (Visintin *et al.*, 2016). Es importante resaltar que las cepas fueron seleccionadas bajo las condiciones de estrés del ecosistema de la pulpa de cacao.

Con respecto a las levaduras los factores de importancia para su selección son la actividad pectinolítica, la resistencia a condiciones de estrés de etanol, ácido láctico y pH. Como resultado, se seleccionaron cuatro cepas, de las cuales dos son de la especie *S. cerevisiae*, una de *P. kudriavzevii* y una de *Hanseniaspora spp.* La cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12 se seleccionó debido a que presenta actividad pectinolítica (actividad importante para la degradación de la pulpa de cacao). La cepa de *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13 es seleccionada por su tolerancia sobresaliente a la condición de 8 % v/v de etanol. La levadura *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 es seleccionada debido a su marcada tolerancia al ácido láctico, y a ambientes ácidos. Por último, la cepa de *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16 se selecciona como candidata del cultivo iniciador debido a que presenta buena tolerancia al ácido láctico, y tiene un efecto sobre la germinación de *A. carbonarius* y *A. flavus*.

Las bacterias ácido lácticas seleccionadas como candidatas para la formulación de un cultivo iniciador deben ser ácido tolerantes, osmotolerantes tolerantes a etanol, y utilizar citrato como fuente de carbono y energía. Por otro lado, es importante tener en cuenta que la actividad antifúngica presentada por algunas cepas de BAL también es importante para la inocuidad de los granos de cacao. En relación con lo anterior, *L. plantarum* LAB-CTA-18-3 fue seleccionada porque presenta actividad antifúngica, tolera la condición de 8 % v/v de etanol, y resiste a pH entre 4.0 y 5.0. Por otro lado, la cepa de *L. plantarum* LAB-CTA-18-6 metaboliza el ácido cítrico a acetoina, tolera 6 % v/v de etanol y valores de pH en el rango de 4.0-5.0 La cepa de *L. plantarum* LAB-CTA-18-8 también metaboliza el ácido cítrico teniendo como productos acetaldehído o ácido láctico, también tolera 8 % v/v de etanol y pH entre 4.0 y 5.0, además, esta cepa es osmotolerante, ya que puede crecer en condiciones de glucosa y fructosa al 15 % p/v. Debido a que se tienen dos cepas que pueden metabolizar el ácido cítrico y a que producen diferentes metabolitos, se puede utilizar cualquiera de estas dos cepas o una combinación de estas, según lo que se requiera en la fermentación.

Finalmente, para la selección de las bacterias ácido acéticas que forman parte de un cultivo iniciador es importante que sean tolerantes a ambientes con pH

ácido, al ácido láctico y a temperaturas por encima de 40 °C. Se seleccionó la cepa de *A. pasterianus* BAA-CTA-18-3, debido a que oxida el ácido láctico, tolera pH hasta 6.0 y resiste a temperaturas altas (50 °C), lo cual hace que esta esta cepa de BAA sea adecuada para ser considerada en el cultivo iniciador para la fermentación del cacao.

7. CONCLUSIONES

Se caracterizó bioquímica, fisiológica y metabólicamente las levaduras aisladas del proceso de fermentación de cacao y se encontró que *S. cerevisiae* Y-CTA-18-2 fue la única cepa que mostró actividad pectinolítica, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13 toleró etanol al 8 % v/v y pH 3.0-5.0; *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 tuvo mayor tolerancia a pH 4.0 y concentraciones de ácido láctico, y finalmente, *Hanseniaspora* Y-CTA-18-16 tolera el ácido láctico y presuntivamente afecta el crecimiento de hongos toxigénicos.

Se seleccionaron las bacterias ácido lácticas *L. plantarum* LAB-CTA-18-3 debido a que presenta resistencia a 6, 8 y 12 % v/v de etanol, a 5, 10 y 15 % p/v de fructosa y glucosa y pH 4.0 y 5.0, además, tiene actividad antifúngica, *L. plantarum* LAB-CTA-18-6 se seleccionó porque tolera concentraciones de etanol de 6 % v/v y metaboliza el ácido cítrico a acetoina, y por último, la cepa de *L. plantarum* LAB-CTA-18-8 también se propone debido a que resiste a las condiciones de estrés que se evaluaron y también tiene la capacidad de degradar el ácido cítrico produciendo acetaldehído o ácido láctico.

Se caracterizaron fisiológicamente las bacterias ácido acéticas y se encontró que *A. pasteurianus* BAA-CTA-18-3 fue más termoresistente y tuvo una mayor resistencia a pH 4.0 y 5.0, indicando su potencial para ser incluida en el cultivo iniciador.

Se plantearon tres cultivos iniciadores mixtos conformados por las levaduras *S. cerevisiae* Y-CTA-18-12, *S. cerevisiae* Y-CTA-18-13, *P. kudriavzevii* Y-CTA-18-9 y *Hanseniaspora spp* Y-CTA-15-16 bacterias ácido lácticas *L. plantarum* LAB-CTA-18-3 y *L. plantarum* LAB-CTA-18-6, y una cepa de bacteria ácido acética de la especie *A. pasteurianus* BAA-CTA-18-3.

El estudio de selección permitió tener una mejor panorámica sobre la adaptación que pueden presentar las levaduras, BAL y BAA al estar expuestas al ambiente

fermentativo del cacao, seleccionando así, diferentes cepas de cada grupo microbiano como potenciales candidatos para la formulación de cultivos iniciadores.

8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Identificación molecular de las cepas aisladas de levaduras y de bacterias ácido lácticas mediante técnicas de biología molecular.
- Realizar más estudios sobre la capacidad antifúngica de las levaduras aisladas de la fermentación de cacao, por ejemplo, realizar pruebas de confrontación con los extractos libres de células y estudiar la naturaleza química de los compuestos antifúngicos presentes en éste.
- Evaluar la eficiencia de la aplicación del cultivo iniciador como biocontrol sobre el crecimiento de los principales hongos toxigénicos presentes en la cadena productiva del cacao.
- Aplicar los cultivos iniciadores en la fermentación de cacao a escala laboratorio e industrial para evaluar su efecto en el proceso fermentativo y en los parámetros de calidad resultante de los granos de cacao.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aarstehfar, A., Daneshnia, F., Kord, M., Roudbary, M., Zarrinfar, H., Fang, W., Hashemi, S. J., Najafzadeh, M. J., Khodavaisy, S., Pan, W., Liao, W., Badali, H., Rezaie, S., Zomorodian, K., Hagen, F. y Boekhout, T. 2019. Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA sequencing for a wide range of clinically isolated yeast species: Improved identification by combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an alternative strategy for developing countries. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9.
- Abdul Kuthoose, M.F.B. 2016. Inhibitory activity of lactic acid bacteria against yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. Tesis de Maestría en Ciencias de Biotecnología Alimentaria. Universiti Sains Islam Malaysia. Nilai, Malasia.
- Addis, M.F., Alessandro, T., Landolfo, S., Cutzu, R., Biosa, G., Abbondio, M., Pagnozzi, D., Uzzau, S. y Ilaria Mannazzu. 2008. Proteomic analysis of *Rhodotorula mucilaginosa*: dealing with the issues of a non-conventional yeast. *Yeast.* 191–198.
- Adler, P., Bolten, C.J., Dohnt, K., Hansen, C.E. y Wittmann, C. 2013. Core fluxome and metafluxome of lactic acid bacteria under simulated cocoa pulp fermentation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(18):5670–5681.
- Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M. y Ryan, A. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48(9):840–857.
- Alvarez Robledo, M.N. 2018. Caracterización físico sensorial del cacao (*Theobroma cacao linneo*) proveniente de tres genotipos de la colección ARPROCAT (CAT), Zarumilla-Tumbes. Tesis de grado de Ingeniería Agrónoma. Universidad Nacional de Tumbes. Tumbes, Perú.
- Anónimo. (2021). Beneficio del cacao. Métodos de fermentación. <https://poscosechacacao.blogspot.com/2017/08/metodos-de-fermentacion.html>

- Aprotosoae, A.C., Luca, S.V. y Miron, A. 2016. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-an overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15(1):73–91.
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E. y Gschaedler-Mathis, A. 2015. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31(2):359–369.
- Archana, K. M., Ravi, R. y Anu-Appaiah, K.A. 2015. Correlation between ethanol stress and cellular fatty acid composition of alcohol producing non-*Saccharomyces* in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* by multivariate techniques. *Food Sci. Technol.* 52(10):6770–6776.
- Ardhana, M.M. y Fleet, G.H. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int. J. Food Microbiol.* 86(1–2):87–99.
- Arifuzzaman, Hasan, Z., Rahman, B. y Pramanik, K. 2014. Isolation and characterization of *Acetobacter* and *Gluconobacter* spp from sugarcane and rotten fruits. *Res. Rev. BioSci.* 8(9):359-365.
- Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. y Stanley, G. A. 2009. Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. *FEMS Yeast Res.* 9(8):1208–1216.
- Bartella, L., Di Donna, L., Napoli, A., Siciliano, C., Sindona, G. y Mazzotti, F. 2019. A rapid method for the assay of methylxanthines alkaloids: Theobromine, theophylline and caffeine, in cocoa products and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 278:261–266.
- Batista, N.N., Ramos, C L., Ribeiro, D.D., Pinheiro, A.C. M. y Schwan, R. F. 2015. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *Food. Sci. Technol.* 3(1):221–227.

- Becker, J. M. y Murphy, D. 1988. Catheter-associated candida utilis fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. *J. Clin. Microbiol.* 26(4):621-624.
- Beg, M.S., Ahmad, S., Jan, K. y Bashir, K. 2017. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends Food Sci Technol.* 66:108–116.
- Bonvehí, J.S. 2004. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *J. Agric. Food Chem* 52(20):6347–6352.
- Bortolini, C., Patrone, V., Puglisi, E. y Morelli, L. 2016. Detailed analyses of the bacterial populations in processed cocoa beans of different geographic origin, subject to varied fermentation conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 236:98–106.
- Bougnoux, M.E., Gueho, E. y Potocka, A.C. 1993. Resolutive *Candida utilis* fungemia in a nonneutropenic patient. *J. Clin. Microbiol.* 31(6):1644–1645.
- Caligiani, A., Marseglia, A. y Palla, G. 2015. Cocoa: Production, chemistry, and use. *Encyclopedia on Food and Health.* 1:185-190.
- Caligiani, Augusta, Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G. y Sforza, S. 2016. Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chem.* 211:431–439.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K.H. y Oomah, B.D. 2018. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends. Food Sci. Technol.* 81:172–184.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6):1809–1824.
- Castro-Alayo, E.M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R. y Cardenas-Toro, F.P. 2019. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon.* 5(1).e01157

- Cempaka, L., Aliwarga, L., Purwo, S. y Penia Kresnowati, M.T.A. 2014. Dynamics of cocoa bean pulp degradation during cocoa bean fermentation: Effects of yeast starter culture addition. *J. Math. Fund. Sci.* 46(1):14–25.
- Cevallos-Cevallos, J.M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M.G. y Molina-Miranda, M.J. 2018. Time-related changes in volatile compounds during fermentation of bulk and fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *J. Food Qual.* 1758381
- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N.R. y Lopes, A.S. 2020. The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: an overview. *Int. J. Food Sci. Technol.* 56:544-552.
- Chandler, M., Stanley, G.A., Rogers, P. y Chambers, P. 2004. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals. Microbiol.* 54(4):427–454.
- Chandra Raj, K., Ingram, L.O. y Maupin-Furlow, J.A. 2001. Pyruvate decarboxylase: A key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Arch. Microbiol.* 176(6):443–451.
- Chen, X.H., Lou, W.Y., Zong, M.H. y Smith, T.J. 2011. Optimization of culture conditions to produce high yields of active *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells for anti-Prelog reduction of prochiral ketones. *BMC Biotechnology.* 11:1–12.
- Chen, X., Wang, T., Jin, M., Tan, Y., Liu, L., Liu, L., Li, C. yang, Y. y Du, P. 2020. Metabolomics analysis of growth inhibition of *Lactobacillus plantarum* under ethanol stress. *Int. J. Food Sci. Technol.* 55(11):3441–3454.
- Chen, Y., Bai, Y., Li, D., Wang, C., Xu, N. y Hu, Y. 2016. Screening and characterization of ethanol-tolerant and thermotolerant acetic acid bacteria from Chinese vinegar Pei. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32(1):1–9.
- Choi, D.H., Park, E.H. y Kim, M.D. 2017. Isolation of thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* from nuruk. *Food Sci. Biotechnol.* 26(5):1357–1362.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J. L., Fungaro, M.H. y Taniwaki, M.H. 2011. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *Int. J. Food Microbiol.* 148(2):141–144.

- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pitt, J.I. y Taniwaki, M.H. 2014. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *Int. J. Food Microbiol.* 178:13–20.
- Coulibaly, P.M., Goualié, B.G., Samagaci, L., Ouattara, H.G. y Niamké, S.L. 2018. Screening of thermotolerant acetic acid bacteria involved in cocoa fermentation in six major cocoa producing regions in Côte d'Ivoire. *Biotechnol. J. Int.* 21(2):1–15.
- Crafack, M., Keul, H., Emil, C., Petersen, M.A., Blennow, A., Skovmand-larsen, M., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H. y Nielsen, D.S. 2014. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Res. Int.* 63:306-316.
- Crafack, M., Mikkelsen, M.B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H. y Nielsen, D.S. 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 167(1):103–116.
- Crowley, S., Mahony, J. y van Sinderen, D. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends. Food Sci Technol.* 33(2):93–109.
- da Cruz Pedrozo Miguel, M.G., Reis, L V. de C., Efraim, P., Santos, C., Lima, N. y Schwan, R.F. 2017. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *Food. Sci. Technol.* 77:362–369.
- Dalie, D., Deschamps, A., Richard-Forget, F., Lazzaroni, S. y Corsetti, A. 2010. Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control.* 21(4):370–380.
- Fonseca Blanco, J.D., López Hernández, M.P., Ortiz Galeano, L.S., Criollo Nuñez, J. y Lozano Tovar, M.D. 2020. Effect of addition of a specific mixture of yeast, lactic and acetic bacteria in the fermentation process to improve the quality and flavor of cocoa beans in Colombia. *Pelita Perkebunan.* 36(2):154–172.

- Da Vega Moreira, I.M., Da Cruz Pedroso. M.G, Duarte, W.F., Dias, D.R. y 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 Res. Int.* 54(1):9–17.
- Da Vega Moreira, I.M., Vilela, L., Santos, C., Lima, N. y Schwan, R.F. 2018. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. *Food Res. Int.* 109(2017):196–203.
- Daniel, H., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N. y De Vos, P. 2018. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.* 9:774–783.
- De Angelis, M. y Gobbetti, M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomic.*, 4(1):106–122.
- De Vuyst, L. y Weckx, S. 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J. Appl. Microbiol.* 121(1):5–17.
- Delgado-Ospina, J., Triboletti, S., Alessandria, V., Serio, A., Sergi, M., Paparella, A., Rantsiou, K. y Chaves-López, C. 2020. Functional biodiversity of yeasts isolated from Colombian fermented and dry cocoa beans. *Microorganisms.* 8(7):1–17.
- Deligios, M., Fraumene, C., Abbondio, M., Mannazzu, I., Tanca, A., Addis, M.F. y Uzzau, S. 2016. Draft genome sequence of *Rhodotorula mucilaginosa*, an emergent opportunistic pathogen. *Genome Announc.* 3(2): 4–5.
- Deng, N., Du, H. y Xu, Y. 2020. Cooperative response of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* to lactic acid stress in baijiu fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 68(17):4903–4911.
- Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M. R. y Thevelein, J. M. 2017. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* 17(4):1–35.

- Deprez, M.A., Eskes, E., Wilms, T., Ludovico, P. y Winderickx, J. 2019. pH homeostasis links the nutrient sensing PKA/TORC1/SchH9 ménage-à-trois to stress tolerance and longevity. *Microbial Cell*. 5(3):119–136.
- Díaz-Nava, L.E., Montes-García, N., Domínguez, J.M. y Aguilar-Uscanga, M.G. 2017. Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from sweet sorghum juice. *Bioproc Biosystems Eng*. 40(7):1069–1077.
- Dircks, H.D. 2009. Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. Tesis de Doctorado en Filosofía. University of New South Wales. Sydney, Australia.
- Dorán, P.M. 1995. Bioprocess engineering principles. 1st. Ed. Academic Press Limited. London.
- Engeseth, N.J. y Ac Pangan, M.F. 2018. Current context on chocolate flavor development— a review. *Curr. Opin. Food Sci*. 21:84–91.
- Es-sbata, I., Lakhlifi, T. yatim, M., El-Abid, H., Belhaj, A., Hafidi, M. y Zouhair, R. 2020. Screening and molecular characterization of new thermo- and ethanol-tolerant *Acetobacter malorum* strains isolated from two biomes Moroccan cactus fruits. Aceptado para publicación en el *Biotech. Appl. Biochem*.
- Fahrurrozi, Rahayu, E.P., Nugroho, I.B. y 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
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z. J., González-Ríos, O., Cocolin, L. y Suárez-Quiroz, M.L. 2019. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *Int. J Food Microbiol*. 301:41–50.
- Fowler, M.S. 2009. Cocoa Beans: From Tree to Factory. pp. 10-47. En: Industrial Chocolate Manufacture and Use: 4th ed., (Ed. Beckett, S.T.), Blackwell Publishing Ltd. york, UK.

- Fu, W. y Mathews, A.P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* 3(3):163–170.
- Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C. y Ruiz-Larrea, F. 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230(1):53–61.
- Galindo Segura, L.A. (2018). Variación intraespecífica de rasgos funcionales de *Cedrela odorata* sobre un gradiente climático en la Península de Nicoya, Costa Rica. Tesis de Maestría en Ciencias de Manejo de y Conservación de Bosques Tropicales y Biodiversidad. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Galvão, A., Menezes, T., Nara, N., Lacerda, C., Reis, A., Andrade, D., Efraim, P., Carla, A., Pinheiro, M. y Freitas, R. 2016. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *FRIN.* 81:83–90.
- Gardea, A.A., García-Bañuelos, M.L., Orozco-Avitia, J.A., Sánchez-Chávez, E., Sastré-Flores, B. y Ávila-Quezada, G. 2017. Cacao (*Theobroma cacao* L.). pp. 921-939. En: Exotic Fruits: Reference Guide, 1st Ed., (Ed. Rodrigues, S., De Oliveira Silva, E., De Brito, E.D.), Academic Press., Fortaleza, Brasil.
- Gerard, L. 2015. Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas. Tesis doctoral en Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Gil Barbarin, M. 2020. Evolution of the yeast population during fermentation of rufete. Tesis de fin de Grado en Biología. Universidad D Salamanca. Salamanca, España.
- Guan, N. y Liu, L. 2020. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Appl. Microbiol. Biotech.* 104(1):51–65.

- Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T. y Stanislav, D. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82:187–216
- Haile, M. y Kang, W.H. 2019. Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. *Microorganisms*. 7(10).
- Hernández-Medina, S. 2018. Impacto de las vías de procesamiento postcosecha del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre la contaminación por hongos toxigénicos. Tesis de maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, México.
- Ho, V.T.T. 2014. Investigation into the roles of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa bean fermentation. Tesis de doctorado en Filosofía. University of New South Wales. Sydney, Australia.
- Ho, V.T.T., Zhao, J. y Fleet, G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 174:72–87.
- Ho, V.T.T., Zhao, J. y Fleet, G. 2015. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 205:54–67.
- Huerta-Conde, J., Schorr-Galindo, S., Figueroa-Hernández, C., Hernández-Estrada, Z.J, Suárez-Quiroz, M.L. y González-Rios, O. 2013. Isolation of autochthonous microorganisms to formulate a defined inoculum for small-scale cocoa fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(3):505–511.
- Hwang, J.W. yang, Y.K., Hwang, J.K., Pyun, Y.R. y Kim, Y.S. 1999. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *J. Biosci. Bioeng.*, 88(2):183–188.
- Illegghems, K., Pelicaen, R., De Vuyst, L. y 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.

- Illegghems, K., Vuyst, L. De, y Weckx, S. 2015. Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes. *BMC Genom.* 1–13.
- Jaibangyang, S., Nasanit, R. y Limtong, S. 2020. Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. *BioControl*, 65(3):377–386.
- Ji, H., Xu, K., Dong, X., Sun, D., Peng, R., Lin, S., Zhang, K. y Jin, L. 2020. Transcriptional profiling reveals molecular basis and the role of arginine in response to low-pH stress in *Pichia kudriavzevii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(6), 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.07.014>
- Jimoh, S.O., Ado, S.A., Ameh, J.B. y Whong, C.M.Z. 2013. Heat-shock and ethanol-osmotic effect on fermentable yeast cells. *Int. J. Biol. Sci.* 2:91–96.
- Jinap, S., Ikrawan, Y., Bakar, J., Saari, N. y Lioe, H. 2008. Aroma precursors and methylpyrazines in underfermented cocoa beans induced by endogenous carboxypeptidase. *J. Food Sci.* 73(7):141-147.
- Jinda, N. 2014. Cocoa Fermentation I :Identification and metabolites study of natural cocoa fermentation microorganisms. *Kasetsart J.- Nat Sci.* 3:60-73.
- John, W.A., Böttcher, N.L., Aßkamp, M., Bergounhou, A., Kumari, N., Ho, P., Roy, N.D., Nevoigt, E. y Ullrich, M.S. 2018. Forcing fermentation: profiling proteins, peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation. *Food Chem.* 278:786-794.
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S. y Lieberei, R. 2015. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT.* 62(1):357–361.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G. yakushi, T., Toyama, H., Adachi, O. y Matsushita, K. 2010. Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotech.* 85(3):741–751.
- Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B. y Niamke, S. 2017. Diversity of yeasts involved in

cocoa fermentation of six major cocoa-producing regions in Ivory Coast. *ESJ*. 13(30):496-516.

Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B. y Niamke, S. 2018. Screening of potential yeast starters with high ethanol production for small-scale cocoa fermentation in ivory coast. *Food. Environ. Saf.* XVII(2):113–130.

Konate, M., Akpa, E.E., Koffi, L.B., Kra, K.A.S., Megnanou, R. M. y Niamke, S. 2014. Isolation of thermotolerant and high acetic acid-producing *Acetobacter pasteurianus* from Ivorian palm wine. *EJFA*, 26(9):773–785.

Koné, M.K., Guéhi, S.T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A.F., Brou, K., Boulanger, R. y Montet, D. 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Res. Int.* 89:910–917.

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

Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. 2008. Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Curr. Microbiol.* 56:306–314.

Kumari, N., Jean, K., Grimbs, S., Souza, R.N.D., Kuhnert, N., Vrancken, G. y Ullrich, M.S. 2016. Biochemical fate of vicilin storage protein during fermentation and drying of cocoa beans. *Food Res. Int.* 90:53–65.

Lagos Narváez, J.F. 2017. Identificador y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (*Theobroma cacao*) provenientes de centros de acopio de dos localidades de Ecuador. Tesis de grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador

Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M. y Guiraud, J.P. 2007. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int. J. Food Microbiol.* 114(1):24–130.

- Lario, L.D., Pillaca-Pullo, O.S., Durães Sette, L., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C. y Pessoa, A. 2020. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnol. Rep.* 28:1-9.
- Leal, G.A., Gomes, L.H., Efraim, P., De Almeida Tavares, F.C. y Figueira, A. 2008. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Res.* 8(5):788–798.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N. y De Vuyst, L. 2011. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiol.* 28(3):457–464.
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N. y De Vuyst, L. 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(23):7708–7716.
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W. y De Vuyst, L. 2011. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(18):6694–6698.
- Li, C., Li, L. yang, X., Wu, Y., Zhao, Y. y Wang, Y. 2018. Effect of inorganic salt stress on the thermotolerance and ethanol production at high temperature of *Pichia kudriavzevii*. *Ann. Microbiol.* 68(5):305–312.
- Lima, L.J.R., Almeida, M.H., Rob Nout, M.J. y Zwietering, M.H. 2011. *Theobroma cacao* L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 51(8):731–761.
- Lino de Souza, M., Silva Ribeiro, L., Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel, M., Roberto Batista, L., Freitas Schwan, R., Henrique Medeiros, F. y Ferreira Silva, C. 2021.

Yeasts prevent ochratoxin A contamination in coffee by displacing *Aspergillus carbonarius*. *Biol. Control*. 155:1-11

Lukic-Grić, A., Mlinarić-Missoni, E., Škaric, I., Važic-Babić, V. y Svetec, I. K. 2011. *Candida utilis* candidaemia in neonatal patients. *J. Med. Microbiol.* 60(6):838–841.

Lund, P.A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N.P., Cetecioglu, Z., Fernández, E.N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M. y O'Byrne, C. 2020. Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Front. Microbiol.* 11:1-8.

Ma, M., Han, P., Zhang, R. y Li, H. 2013. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. *Can. J. Microbiol.* 59(9):589–597.

Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M.G., Santos, C., Lima, N. y Freitas Schwan, R. 2017. Impact of a microbial cocktail used as a starter culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. *Molecules*. 22:1-15.

Magalhães da Veiga Moreira, I., Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel, M., Lacerda Ramos, C., Ferreira Duarte, W., Efraim, P. y Freitas Schwan, R. 2016. Influence of cocoa hybrids on volatile compounds of fermented beans, microbial diversity during fermentation and sensory characteristics and acceptance of chocolates. *J. Food. Qual.* 39(6), 839–849.

Martinez, S.J., Bressani, A.P.P., Dias, D.R., Simão, J.B.P. y Schwan, R.F. 2019. Effect of bacterial and yeast starters on the formation of volatile and organic acid compounds in coffee beans and selection of flavors markers precursors during wet fermentation. *Front. Microbiol.* 10:1-13.

Matsushika, A., Negi, K., Suzuki, T., Goshima, T. y Hoshino, T. 2016. Identification and characterization of a novel *Issatchenkia orientalis* GPI-anchored protein, IoGas1, required for resistance to low pH and salt stress. *PLOS ONE*, 11(9):1–25.

Medina-Pradas, E., Pe, I.M. y Noe, F. 2017. Review of Vegetable Fermentations With

- Particular Emphasis on Processing Modifications. *Microb. Ecol. Spoil.* 211–236.
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P. J., Saels, V., Struyf, N., Bernaert, H., Vrancken, G. y Verstrepen, K. J. 2013. Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLOS ONE*, 8(12);1-10.
- Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M., Koffi, J., Vrancken, G. y Verstrepen, K. J. 2015. Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(18), 6166–6176.
- Menezes, A.G.T., Batista, N.N., Ramos, C.L., de Andrade e Silva, A.R., Efraim, P., Pinheiro, A.C.M. y Schwan, R.F. 2016. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* 81:83–90.
- Miao, Y., Xiong, G., Li, R., Wu, Z., Zhang, X. y Weng, P. 2018. Transcriptome profiling of *Issatchenkia orientalis* under ethanol stress. *AMB Express*, 8(1).
- Moens, F., Lefeber, T. y De Vuyst, L. 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 8(6):1848-1857.
- Mota-Gutierrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I. y Cocolin, L. 2019. Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients*, 11(4):1-23.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P.R. y Guiraud, J. P. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. *Int. J. Food Microbiol.* 121(2):234–241.
- Mutlu Sarıgüzel, F., Koç, A.N. y Öztürk, M. 2017. *Candida Utilis* and *Candida Lusitaniae* meningitis in an infant with extraventricular drainage. *Van Med. J.* 24(1):40–43.
- Narendranath, N.V., Thomas, K.C. y Ingledew, W.M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J.*

Ind. Microbiol. Biotechnol. 26(3):171–177.

Navia-Orcés, A.A. y Pazmiño-Piedra, N.V. 2012. Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis de grado de Ingeniería de alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.

Nayeri, N., Edalatian Dovom, M.R., Habibi Najafi, M.B. y Bahreini, M. 2017. A Preliminary study on antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from different production stages of Lighvan cheese on *Penicillium expansum* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *J. Food Meas. Charact.* 11(4):1734–1744.

Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. y Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 114(2):168–186.

Nigam, P.S. 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.

Ooi, T.S., Ting, A.S.Y. y Siow, L.F. 2020. Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *Food Sci. Technol.* 122:1-8.

Ouattara, D., Ouattara, H., Adom, J., Goualié, B., Koua, G., Doué, G. y Niamke, S. 2016. Screening of lactic acid bacteria capable to breakdown citric acid during Ivorian cocoa fermentation and response of bacterial strains to fermentative conditions. *Brit. Biotechnol. J.* 10(3):1–10.

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E. y Kok, J. 2016. Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 80(3), 837–890.

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H.M. y De Vuyst, L.

2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. *Food Microbiol.* 35(2):73–85.
- Park, H.J., Bae, J.H., Ko, H.J., Lee, S.H., Sung, B.H., Han, J.I. y Sohn, J.H. 2018. Low-pH production of D-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. *Biotechnol. Bioeng.* 115(9):2232–2242.
- Paster, N., Droby, S., Chalutz, E., Menasherov, M., Nitzan, R. y Wilson, C.L. 1993. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycol. Res.* 97(10):1201–1206.
- Pereira, G., Alvarez, J.P., Neto, D.P.D.C., Thomaz, V., Tanobe, V.O.A., Rogez, H., Góes-neto, A. y Ricardo, C. 2017. Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Food Sci. Technol.* 84:290-297.
- Pereira, G.V., Miguel, M.G. da C.P., Ramos, C.L. y 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.
- Pereira, G.V., Soccol, V.T. y Soccol, C.R. 2016. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Curr. Opi. Food Sci.* 7:50–57.
- SIAP y SAGARPA. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. 1st Ed., Ciudad de México, México.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A. y Hogg, T. 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21(4):439–447.
- Pires, P.N., Vargas, E.A., Gomes, M.B., Vieira, C.B., Santos, E.A., Bicalho, A.A. C.,

- Silva, S. de C., Rezende, R.P., De Oliveira, I.S., Luz, E.D.M.N. y Trovatti Uetanabaro, A.P. 2019. Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 1-10.
- Prabhakaran Nair, K.P. 2010. The agronomy and economy of important tree crops of the developing world 1st. Ed. Elsevier. pp 131-180.
- Predan, G.M.I., Lazăr, D.A. y 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.
- Racine, K., Lee, A., Wiersema, B., Huang, H., Lambert, J., Stewart, A. y Neilson, A. 2019. Development and characterization of a pilot-scale model cocoa fermentation system suitable for studying the impact of fermentation on putative bioactive compounds and bioactivity of cocoa. *Foods.* 8(3):1-20.
- Rawel, H.M., Huschek, G., Sagu, S.T. y Homann, T. 2019. Cocoa bean proteins: characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing. *Nutrients.* 11(428):1-20.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Contreras-Ramos, S.M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E. y Lugo-Cervantes, E. 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chem.* 132(1):277–288.
- Rodriguez Gàmez, O. y Serrat Díaz, M. 2008. Poligalacturonasas de levaduras: Un producto biotecnológico de grandes potencialidades. *Tecnología Química*, XXVIII(1), 80–90.
- Romanens, E., Freimüller Leischtfeld, S., Volland, A., Stevens, M., Krähenmann, U., Isele, D., Fischer, B., Meile, L. y Schwenninger, S. 2019. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 290:262–272.

- Romanens, E., Pedan, V., Meile, L. y Schwenninger, S.M. 2020. Influence of two anti-fungal *Lactobacillus fermentum*-*Saccharomyces cerevisiae* co-cultures on cocoa bean fermentation and final bean quality. *PLOS ONE*, 15:4–17.
- Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Cocolin, L. y Dolci, P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Res. Int.* 115:519–525.
- Sadiq, F.A. Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. y Chen, W. 2019. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. *Emir. J Food Agric.*, 18(5):1403–1436.
- Samagaci, L., Ouattara, H.G., Goualié, B.G. y Niamke, S.L. 2014. Growth capacity of yeasts potential starter strains under cocoa fermentation stress conditions in Ivory Coast. *Emir. J. Food Agric.*, 26(10):861–870.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D. y Martínez-Culebras, P.V. 2008. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* 125(3):336–340.
- Sánchez Mafla, I. 2017. Evaluación de la calidad del grano de los clones de cacao FEAR 5, FSA 12, FSA 13 de acuerdo a la norma ICONTEC 1252 en 5 etapas de fermentación en el municipio de Granada en el departamento del Meta. Tesis de grado de Agronomía. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Acacias, Colombia.
- Sandhya, M.V.S. Yallappa, B.S., Varadaraj, M.C., Puranaik, J., Rao, L.J., Janardhan, P. y Murthy, P.S. 2016. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *Food Sci. Technol.* 65:731–738.
- Santos, D.S., Rezende, R.P., Santos, T.F., Marques, E. de L.S., Ferreira, A.C.R., Silva, A.B., Romano, C.C., Santos, D.W., Dias, J.C.T. y Tavares Bisneto, J.D. 2020. Fermentation in fine cocoa type Scavina: Change in standard quality as the effect of use of starters yeast in fermentation. *Food Chem.* 328:7–12.

- Sarbu, I. y Csutak, O. 2019. The microbiology of cocoa fermentation. pp. 463-446. En: Caffeinated and Cocoa Based Beverages, Vol 8., (Ed. Grumezescu, A.M., Holban, A.M.) Woodhrad Publising, Elsevier Inc.
- Schwan, R.F. y Wheals, A.E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 44(4):205–221.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J.R. y Ariño, J. 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for calcium-mediated signalling. *Molec Microbiol.* 46(5):1319–1333.
- Shafiei, R., Delvigne, F., Babanezhad, M. y Thonart, P. 2013. Evaluation of viability and growth of *Acetobacter senegalensis* under different stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 163(2–3):204–213.
- Sirisan, V., Pattarajinda, V., Vichitphan, K. y Leasing, R. 2013. Isolation, identification and growth determination of lactic acid-utilizing yeasts from the ruminal fluid of dairy cattle. *Lett. Appl. Microbiol.* 57(2):102–107.
- Souza, P., Moreira, L., Sarmento, D. y da Costa, F. 2017. Cacao (*Theobroma cacao* L.). pp. 921-939. En: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd ed., (Ed. Yahia, E.M.), John Wiley & Sons, Ltd., Querétaro, México.
- Steinkraus, K. 2002. Inaugural issue. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1:23–32.
- Sunny-Roberts, E.O. y Knorr, D. 2008. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* 25(1):183–189.
- Takrama, J F., Kumi, W.O., Otoo, G., Addo, K. y Camu, N. 2015. Optimization of cocoa pulp juice fermentation with yeast starter cultures of cocoa heap fermentations. *J. Agric. Sci. Food Tech.* 1(3):22–33.
- Tarka, S.M. y Cornish, H.H. 1982. The toxicology of cocoa and methylxanthines: A review of the literature. *Crit. Rev. Toxicol.* 9(4):275–312.
- Tran, P.D., Van de Walle, D., De Clercq, N., De Winne, A., Kadow, D., Lieberei, R.,

- Messens, K., Tran, D.N., Dewettinck, K. y Van Durme, J. 2015. Assessing cocoa aroma quality by multiple analytical approaches. *Food Res. Int.* 77:657–669.
- Tryfinopoulou, P., Chourdaki, A., Nychas, G.J.E. y Panagou, E.Z. 2020. Competitive yeast action against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production. *Int. J. Food Microbiol.* 317:1-9.
- Uribe-Gutierrez, L.A. 2007. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Tesis de grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Vamvakas, S.S. y Kapalos, J. 2020. Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36(8):1–8.
- Van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P.A., Kleerebezem, M. y Marco, M.L. 2011. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15):5247–5256.
- Vásquez, Z.S., de Carvalho Neto, D.P., Pereira, G.V.M., Vandenberghe, L.P.S., de Oliveira, P.Z., Tiburcio, P.B., Rogez, H.L.G., Góes Neto, A. y Soccol, C.R. 2019. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Manag.* 90:72–83.
- Vega, C. y Kwik-Urbe, C. 2012. Theobroma cacao-An Introduction to the plant, its composition, uses, and health benefits. pp. 35-62. En Cocoa Butter and Related Compounds, 1st ed., (Ed. Garti, N. y Widlak, N.R.), Academic Press and AOCS Press., EEUA.
- Viesser, J.A., Pereira, G.V.D.M., Pedro, D., Neto, D.C., Vandenberghe, L.P.D.S., Azevedo, V., Brenig, B., Góes-neto, A. y Soccol, C.R. 2020. Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: isolation, selection and evaluation. *Food Res. Int.* 136:1-12.
- Vinícius, G., Pereira, D.M., Gabriela, M., Miguel, P., Ramos, C.L. y Schwan, R.F. 2012. Cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a

defined starter culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(15):5395–5405.

Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P. y Cocolin, L. 2016a. 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. *Int. J. Food Microbiol.* 216:69–78.

Voigt, J., Janek, K., Textoris-Taube, K., Niewianda, A. y Wöstemeyer, J. 2016. Partial purification and characterisation of the peptide precursors of the cocoa-specific aroma components. *Food Chem.* 192:706–713.

Yalcin, S.K. y Ozbas, Z.Y. 2008. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Braz. J. Microbiol.* 39(2):325–332.

Yao, W., Ouattara, H., Goualie, B., Soumahoro, S. y Niamke, S. 2014. Analysis of some functional properties of acetic acid bacteria involved in Ivorian cocoa fermentation. *J. Appl. Biosciences*, 75(1):6282.

Yin, H., Zhang, R., Xia, M., Bai, X., Mou, J., Zheng, Y. y Wang, M. 2017. Effect of aspartic acid and glutamate on metabolism and acid stress resistance of *Acetobacter pasteurianus*. *Microb. Cell Fact.* 16(1):1–14.

You, K.M., Knipple, D.C. y Rosenfield, C. 2003. Ethanol tolerance in the yeast. *Society*, 69(3):1499–1503.

Yuangsaard, N. yongmanitchai, W. yamada, M. y Limtong, S. 2013. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Int. J. Gen. Molec. Microbiol.* 103(3):577–588.

Zhong, J. L., Muhammad, N., Gu, Y.C. y Yan, W.D. 2019. A simple and efficient method for enrichment of cocoa polyphenols from cocoa bean husks with macroporous resins following a scale-up separation. *J. Food Eng.* 243:82–88.

10. APENDICE

10.1. Resultado de la identificación por API 50 CHL en el programa APIWEB™ realizadas a las bacterias aisladas del cacao

10.1.1. *Candida sphaerica* Y-CTA-18-1

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA
Y1
COMENTARIO

FECHA
17/09/19

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0						
Perfil	6 0 4 0 6 7 3						
Nota							
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra				
<i>Candida sphaerica</i> 2	99.3	0.66	SOR	99%			
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra				
<i>Candida utilis</i>	0.6	0.22	GAL	5%	LAC	1% TRE 16%	

10.1.2. *Candida sphaerica* Y-CTA-18-2

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA
Y2
COMENTARIO

FECHA
17/09/19

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 6 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida spherica</i> 2	99.3	0.66	SOR 99%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida utilis</i>	0.6	0.22	GAL 5% LAC 1% TRE 16%

10.1.3. *Candida utilis* Y-CTA-18-3

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA Y3
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION	
Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 0 0 2 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida utilis</i>	96.1	0.76	TRE 16%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida pelliculosa</i>	3.6	0.55	MDG 95%

10.1.4. Candida utilis Y-CTA-18-4

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA

FECHA

Y4

17/09/19

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 2 3 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Candida utilis	95.3	0.6	GAL	5%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Saccharomyces cerevisiae 1	3.6	0.33	GLY	8%	CEL 0%

10.1.5. *Rhodotorula mucilaginosa* Y-CTA-18-5

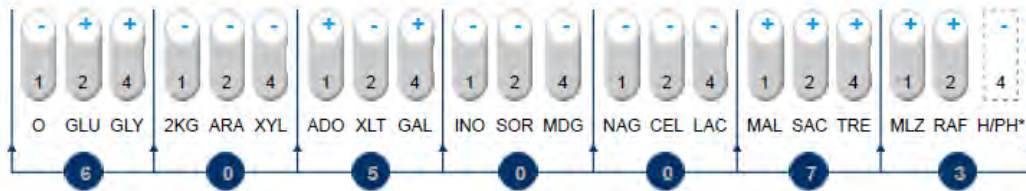
17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA Y5
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 5 0 0 7 3
Nota	Rhodo:PIGMENTATION/POSIBILIDAD DE R.glutinis

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Rhodotorula mucilaginosa 2	96.9	0.77	ARA	80%	XYL	80%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Rhodotorula glutinis	2.7	0.42	GLY	15%	2KG	91%	ADO	8%	SOR	84%

Pruebas complementarias(s)	NITRATOas			
Rhodotorula glutinis	+			
Rhodotorula mucilaginosa	0%			

10.1.6. *Candida utilis* Y-CTA-18-6

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA

L6

COMENTARIO

FECHA

17/09/19

IDENTIFICACION ACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 2 7 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Candida utilis</i>	81.9	0.48	GAL 5%	TRE 16%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Candida pelliculosa</i>	9.3	0.35	MDG 95%	MLZ 96%

10.1.7. *Candida utilis* Y-CTA-18-7

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA L7
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

IDENTIFICACION ACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 2 7 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida utilis</i>	81.9	0.48	GAL	5%	TRE	16%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida pelliculosa</i>	9.3	0.35	MDG	95%	MLZ	96%

10.1.8. *Candida sphaerica* Y-CTA-18-8

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA L8
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 6 0 7 7
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida spherica</i> 1	61.5	0.84				
<i>Candida pelliculosa</i>	38.3	0.83				

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida spherica</i> 2	0.1	0.39	LAC 99%	HYPH 1%		

Pruebas complementarias(s)	ACTIDIONA	NITRATOas	ERYas	
<i>Candida pelliculosa</i>	0%	+	91%	
<i>Candida spherica</i>	96%	-	0%	

10.1.9. *Pichia kudriavzevii* Y-CTA-18-9

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA L9
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION						
Galería	API 20 C AUX V5.0					
Perfil	6 3 0 0 1 0 4					
Nota	POSIBILIDAD DE <i>C.lambica</i> O <i>C.lipolytica</i>					
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida krusei/inconspicua</i>	92.1	0.35	2KG 1%	ARA 1%		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida zeylanoides</i>	7.7	0.14	ARA 0%	SOR 99%		
Pruebas complementarias(s)	GLUCOSAac	ERYas	TIAMINA	ACTIDIONA		
<i>Candida krusei</i>	+	0%	+	3%		
<i>Candida inconspicua</i>	-	0%	-	0%		
<i>Candida lambica</i>	+	0%	-	0%		
<i>Candida lipolytica</i>	-	100%	-	100%		

10.1.10. *Saccharomyces cerevisiae* Y-CTA-18-10

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA: L10
FECHA: 17/09/19
COMENTARIO:

BUENA IDENTIFICACION			
Galería	API 20 C AUX V5.0		
Perfil	6 0 4 0 0 3 2		
Nota	¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !		
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1	94.4	0.82	GLY 8%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida utilis</i>	4.2	0.64	GAL 5%

10.1.11. *Candida utilis* Y-CTA-18-11

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA L11
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

IDENTIFICACION ACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 2 7 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida utilis</i>	81.9	0.48	GAL	5%	TRE	16%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida pelliculosa</i>	9.3	0.35	MDG	95%	MLZ	96%

10.1.12. *Saccharomyces cerevisiae* Y-CTA-18-12

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA L12
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 0 3 2
Nota	¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1	94.4	0.82	GLY 8%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida utilis</i>	4.2	0.64	GAL 5%

10.1.13. *Saccharomyces cerevisiae* Y-CTA-18-13

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA
L13
COMENTARIO

FECHA
17/09/19

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 0 3 2
Nota	¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1	94.4	0.82	GLY 8%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida utilis</i>	4.2	0.64	GAL 5%

10.1.14. *Saccharomyces cerevisiae* Y-CTA-18-14

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA
L14
COMENTARIO

FECHA
17/09/19

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 4 0 0 3 2
Nota	¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1	94.4	0.82	GLY 8%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Candida utilis</i>	4.2	0.64	GAL 5%

10.1.15. *Pichia ohmeri* Y-CTA-18-15

29/10/2019

apiweb™ - Resultado de identificación



REFERENCIA FECHA
 COMENTARIO 29/10/19

BUENA IDENTIFICACION									
Galería	API 20 C AUX V5.0								
Perfil	6 0 4 4 3 3 2								
Nota									
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra						
<i>Kodamaea ohmeri</i>	95.7	0.26	2KG	96%	SOR	93%	TRE	93%	HYPH 84%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra						
<i>Candida pelliculosa</i>	3.7	0.09	NAG	1%	TRE	87%	MLZ	96%	

10.1.16. *Hanseniaspora spp* Y-CTA-18-16

17/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz

APIWEB™

API 20 C AUX V5.0



REFERENCIA L16
FECHA 17/09/19
COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 1 0 0 0 0
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Kloeckera spp	94.5	0.79	CEL 96%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Candida magnoliae	4.3	0.66	SAC 97% RAF 75%

Pruebas complementarias(s)	37°C	TIAMINA
Kloeckera apis	+	-
Kloeckera apiculata	-	v
Kloeckera japonica	-	+