





# Selección de levaduras promisorias para el desarrollo de un cultivo iniciador promotor de la fermentación del cacao

## Selection of promising yeasts for starter culture development promoter of cocoa fermentation

Jenifer Criollo-Nuñez<sup>1-4</sup>  Angélica P Sandoval- Aldana<sup>2</sup>  German Bolívar<sup>3</sup>  Cristina Ramírez Toro<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Nativama, Ibagué Tolima, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad del Tolima, Facultad de Ingeniería Agronómica, Ibagué Tolima, Colombia.

<sup>3</sup> Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Cali Valle del Cauca, Colombia.

<sup>4</sup> Universidad del Valle, Facultad de Ingeniería, Cali Valle del Cauca, Colombia.

## Resumen

La selección de microorganismo promisorios que atiendan los requerimientos de un proceso fermentativo es la etapa más importante en el desarrollo de iniciadores microbiológicos. Con el objetivo de seleccionar las cepas potenciales para ser integradas como iniciadores microbiológicos en fermentaciones de cacao, que promuevan la dinámica bioquímica, mejorando su calidad sensorial, se evaluó la resistencia de seis levaduras (GRAS), aisladas de masas fermentantes de cacao en los departamentos del Tolima, Huila y Antioquia, dos levaduras comerciales ATCC 28253 y ATCC 36633 seleccionadas por su producción aromática, sometiéndolas a pruebas de resistencia, a diferentes concentraciones de sólidos solubles (10, 15 y 20 °Brix), etanol (5, 10 %), ácido acético (pH 3, 4, 5, 6, y 7) y temperatura (30, 40 y 50 °C), que simulaban la dinámica bioquímica de la fermentación del cacao, cuantificando su resistencia expresada en células viables. La producción aromática fue medida mediante evaluación sensorial. Se seleccionaron las levaduras *Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia kudriavzevii* por su capacidad de transformar sustrato en productos de interés durante la fermentación de pulpa de cacao, producción de aromas específicos y resistencia a condiciones bioquímicas adversas propias de la fermentación del cacao.

## Abstract

The selection of promising microorganisms that meet the requirements of a fermentation process is the most important stage in the development of microbiological starters. With the objective of selecting potential strains to be integrated as microbiological starters in cocoa fermentations, which promote biochemical dynamics, improving their sensory quality, the resistance of six yeasts (GRAS), isolated from cocoa fermenting masses in the departments, was evaluated. from Tolima, Huila and Antioquia, two commercial yeasts ATCC 28253 and ATCC 36633 selected for their aromatic production, subjecting them to resistance tests, at different concentrations of soluble solids (10, 15 and 20 °Brix), ethanol (5, 10%), acetic acid (pH 3, 4, 5, 6, and 7) and temperature (30, 40 and 50 °C), which simulated the biochemical dynamics of cocoa fermentation, quantifying its resistance expressed in viable cells. Aromatic production was measured by sensory evaluation. The yeasts *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia kudriavzevii* were selected for their ability to transform substrate into products of interest during the fermentation of cocoa pulp, production of specific aromas and resistance to adverse biochemical conditions typical of cocoa fermentation.

**Keywords:** yeasts, Cocoa fermentation, Microbiological Starter, Biochemical dynamics, Quality.

**Palabras clave:** levaduras, Fermentación cacao, Iniciador microbiológico, Dinámica bioquímica, Calidad.

### ¿Cómo citar?

Criollo-Nuñez, J., Sandoval-Aldana, A., Bolívar, G., Ramírez, C. Selección de levaduras promisorias para el desarrollo de un cultivo iniciador promotor de la fermentación del cacao. *Ingeniería y Competitividad*, 2024, 26(2)e-20413296.

<https://doi.org/10.25100/iyc.v26i2.13296>

Recibido: 19-10-23 Aceptado: 20-04-24

**Correspondence:**  
jcriollo@agrosavia.co

Este trabajo está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución-No comercial-Compartir-like4.0.



Conflicto de intereses:  
ninguno declarado



### ¿Por qué se llevó a cabo?

El uso de iniciadores microbiológicos en la industria alimentaria para mejorar los procesos y la calidad del producto terminado exige la selección de microorganismos resistentes con potencial para transformar el sustrato en metabolitos de interés. Buscando promover la dinámica bioquímica de la fermentación del cacao, se evaluó el potencial de ocho levaduras frente a diferentes condiciones bioquímicas que simularon el proceso de fermentación del cacao para desarrollar un iniciador microbiológico que mejorará la dinámica bioquímica de la fermentación y la calidad sensorial del cacao.

### ¿Cuáles fueron los resultados más relevantes?

Las levaduras *Wickerhamomyces anomalus* y *Pichia kudriavzevii* son cepas prometedoras para el desarrollo de iniciadores microbiológicos debido a su capacidad para transformar sustrato en productos de interés durante la fermentación de la pulpa de cacao, con producción de aromas específicos y resistencia a condiciones bioquímicas adversas propias de la fermentación del cacao. Los microorganismos seleccionados tienen alta factibilidad de aplicación como cultivo iniciador promotor de la fermentación, pudiendo ser utilizados individualmente, en consorcio y en cultivo mixto.

### ¿Qué aportan estos resultados?

La identificación de cepas de levadura prometedoras para el desarrollo de un iniciador microbiológico que promueva la dinámica de fermentación del cacao que mejore las características sensoriales del chocolate.

### Graphical Abstract



## Introducción

La diversidad genética del cacao y las diferencias en sus características bioquímicas generan un rango amplio de condiciones en la fermentación. Esta es una etapa importante en la poscosecha del cacao, donde se desarrolla una serie de transformaciones bioquímicas inducidas por la acción microbiana (sucesión microbiana) que modifican el sustrato presente en la pulpa en sustancias de interés que modifican el perfil sensorial.

La microbiota del cacao, la cual se ha demostrado que interviene positivamente durante la fermentación está conformada por levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) (1). Al prolongarse la etapa de fermentación durante más de cuatro días los bacilos, enterobacterias y los hongos filamentosos, deseados o no, también pueden participar en el proceso de fermentación de cacao (2). Las levaduras han sido relacionadas con la producción de compuestos orgánicos volátiles, generadores de aromas característicos propios de algunos alimentos fermentados, asociándose la producción de enzimas endógenas que inducen la generación de precursores químicos del sabor como aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores (3–5).

La aplicación de cultivos iniciadores en la fermentación ha sido estudiada para mejorar la dinámica microbiana y las transformaciones bioquímicas en el proceso, reducir el tiempo, y mejorar la calidad sensorial del grano. En los últimos años ha crecido el interés en el uso de levaduras como cultivos iniciadores para la fermentación del cacao, especialmente, los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* y *Torulaspota* (6,7). Además, en algunos estudios, se evaluó la aplicación de iniciadores mixtos compuestos por levaduras y BAL (5,8). La gran capacidad de asimilar ácido cítrico, azúcares reductores, actividad pectinolítica, resistencia a condiciones de estrés, producción de compuestos volátiles y capacidad antagónica frente a patógenos ha direccionado la investigación al uso de estos microorganismos como estrategia biotecnológica promotora de la calidad sensorial en el cacao (9,10). Para esto se requiere la selección de microorganismos resistentes a las condiciones del proceso de fermentación, garanticen una alta transformación de sustratos y generación de productos de interés que modifiquen la calidad del sensorial del cacao para que presenten mayor aroma o sabor. Por esta razón, existe interés en aislar microorganismos promisorios para ser inoculados durante la fase de fermentación del cacao, esta investigación tiene como objetivo la selección de levaduras mediante la caracterización morfológica, su comportamiento durante el proceso de fermentación y producción de aromas por evaluación sensorial con potencial aplicación para la optimización de la fase de fermentación y calidad sensorial del cacao.

## Metodología

### Microorganismos estudiados

Se evaluaron ocho levaduras, seis aisladas de masas fermentativas de fincas productoras de cacao en los departamentos Huila, Tolima, Antioquia *Hanseniaspora opuntiae* (Y01), *Saccharomyces cerevisiae* (Y02), *Pichia kudriavzevii* (Y03), *Debaryomyces hansenii* (Y04), *Aureobasidium pullulans* (Y07), *Wickerhamomyces anomalus* (Y08) y dos cepas de levaduras certificadas ATCC 36633 *Candida versatilis* (Etchells y Bell) Meyer y Yarrow (Y05) y ATCC 28253 *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Milenrama (Y06).

### Pruebas de tolerancia de levaduras a las condiciones simuladas del proceso fermentativo del cacao

Los microorganismos fueron sometidos a pruebas de resistencia inoculando 1000  $\mu$ L de la suspensión del microorganismo con una turbidez igual al tubo 3 de McFarland en 9000  $\mu$ L en tubos de ensayo de 20 mL. Previo a la inoculación se acondicionaron los caldos extracto de malta a concentraciones de sólidos solubles de 10, 15 y 20 °Brix, etanol de 5 y 10 %,

ácido acético pH 3, 4, 5, 6, y 7 y temperatura de 30, 40 y 50 °C, en los caldos. Los cultivos fueron incubados 48 h bajo agitación constante de 120 rpm, cuantificando células viables en las diluciones decimales  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , al finalizar la incubación, de acuerdo con la metodología planteada por (11,12). Se utilizó como testigo el medio de cultivo sin inocular.

### Prueba de consumo de sustrato

Las levaduras fueron inoculadas de manera individual en 300 mL de medio estéril de pulpa de cacao, relación 3:1 pulpa: agua, adicionando 15 mL de suspensión del microorganismo a una turbidez igual al tubo 3 de McFarland e incubando bajo agitación constante de 1200 rpm y temperatura de 30 °C durante 35 h, mediante la metodología adaptada (13). Las fermentaciones se realizaron por triplicado, tomando alícuotas a las 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 h de fermentación, cuantificando el contenido de sólidos solubles, azúcares reductores, pH, acidez titulable, porcentaje de alcohol etílico y células viables, siguiendo las metodologías planteadas a continuación.

Sólidos solubles, alcohol etílico, pH y acidez titulable: las alícuotas a diferentes tiempos de fermentación fueron analizadas respecto a sólidos solubles totales, tomando 1 mL de la muestra y midiendo en un refractómetro portátil referencia PAL-1 (3810) marca Atago, el porcentaje de alcohol etílico se midió con un refractómetro digital referencia PAL-34S (4434) marca Atago; de manera homologa al contenido de sólidos solubles. La acidez volátil o pH presente en la muestra fue cuantificada, a una alícuota de 10 mL, utilizando el potenciómetro marca Thermo Scientific. La acidez total se estimó reduciendo con una solución básica de NaOH al 0,1 N la acidez presente en la muestra (14).

Azúcares reductores: para la cuantificación de azúcares fermentables presentes en el medio de pulpa de cacao, se realizaron diluciones de 1:1000 v/v. Todas las muestras fueron homogenizadas por 5 min y posteriormente pasadas a través de un filtro millipore de 0.22  $\mu$ m. El contenido de azúcares reductores se calculó a través del método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS), compuesto que, en presencia de calor, es reducido por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un cambio de color, que fue medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 575 nm, estimando las unidades reductoras presentes en los azúcares, con base en una curva patrón de glucosa (15).

Células viables: la viabilidad o conteo de microorganismos viables, se estimó diluyendo 1 mL de la alícuota a diferentes tiempos de fermentación en 9 mL de agua peptonada al 0,01%. Se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-6}$ , las tres últimas diluciones fueron sembradas en cajas de Petri, en medio extracto de malta, realizando la siembra en extensión superficial con perlas de vidrio. Las cajas se incubaron a 35°C por 48 h, realizando un conteo de colonias en placa, que fueron multiplicadas por el factor de dilución y por 10, expresando los resultados en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) (16).

Análisis sensorial para detectar la producción de aromas en medio de pulpa de cacao

En 150 mL de medio de pulpa de cacao, relación 3:1 pulpa: agua, se inocularon 15 mL de suspensión del microorganismo a una turbidez igual al tubo 3 de McFarland, incubando a bajas presiones de oxígeno durante 48 h, por triplicado. Las alícuotas de 20 mL fueron evaluadas por catadores entrenados mediante el método descriptivo de perfil olfativo. Las muestras se analizaron en términos de descriptores de olor (ácido, dulce, floral, frutal, alcohol, herbal y levadura), usando una escala ordinal de 0 a 10, donde 0 significa ausencia, 1 a 2 baja intensidad, 3 a 5 intensidad media, 6 a 8 intensidad alta y 9 a 10 intensidad muy alta; también se les preguntó acerca de las tres muestras que preferían respecto a formación de aromas (17).

## Análisis estadístico

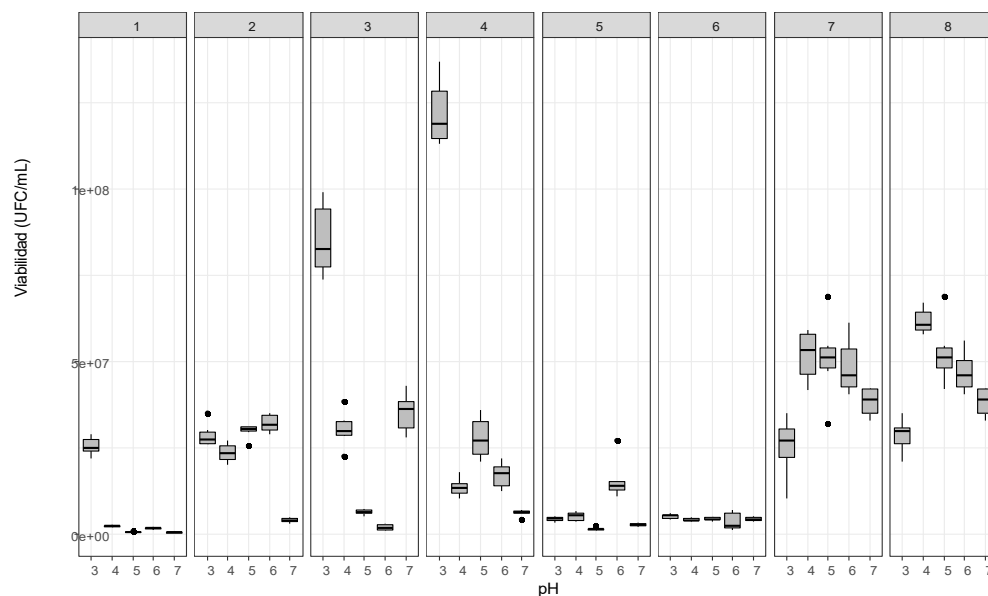
Los datos de resistencia a la dinámica de la fermentación de levaduras, y de consumo de sustrato fueron normalizados, aplicando posteriormente pruebas paramétricas de análisis de la varianza (ANOVA), seguida por el test de comparación múltiple para las diferencias entre las medias Tukey con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software estadístico R-studio.

## Resultados y discusión

### Tolerancia diferentes condiciones de pH

La fermentación del cacao presenta una dinámica microbiológica que genera cambios bioquímicos en parámetros como pH. La Figura 1. muestra la tolerancia expresada en viabilidad de las levaduras estudiadas, al ser sometidas a diferentes condiciones de pH, tomando como referencia lo expresado por autores como Bilenler et al. (2016), quienes reportaron como viabilidad mínima requerida para iniciadores microbiológicos aplicados en alimentos de  $10^6$  UFC/g (18)

La levadura *Hanseniaspora opuntiae* Y01 reportó la mayor viabilidad a pH 3, la cual se redujo drásticamente cuando se sometió a los otros pH de la dinámica bioquímica, tornándose por debajo de 6 log a pH 5 y 7, comportamiento análogo con los resultados del estudio de diversidad microbiana del cacao, donde esta especie fue aislada únicamente al comienzo de las fermentaciones (10), y no fue posible su detección en tiempos posteriores de fermentación. Las levaduras *S. cerevisiae* Y02, *Z. rouxii* Y06 y *A. pullulans* Y07 solo vieron afectada su viabilidad cuando fueron sometidas a pH 7, 6 y 3 respectivamente, sin registrar diferencias estadísticamente significativas en los demás niveles estudiados. La levadura *W. anomalus* Y08 no reportó diferencias estadísticamente significativas para la variable pH, manteniendo su viabilidad entre los niveles más altos respecto a las demás levaduras en estudio. De esta forma, demostró su capacidad de crecimiento a diferentes condiciones de pH y adaptabilidad a diferentes condiciones bioquímicas, que la han posicionado como levadura potencial para ser incorporada a procesos fermentativos bioquímicamente dinámicos, sin verse afectada su viabilidad (19).



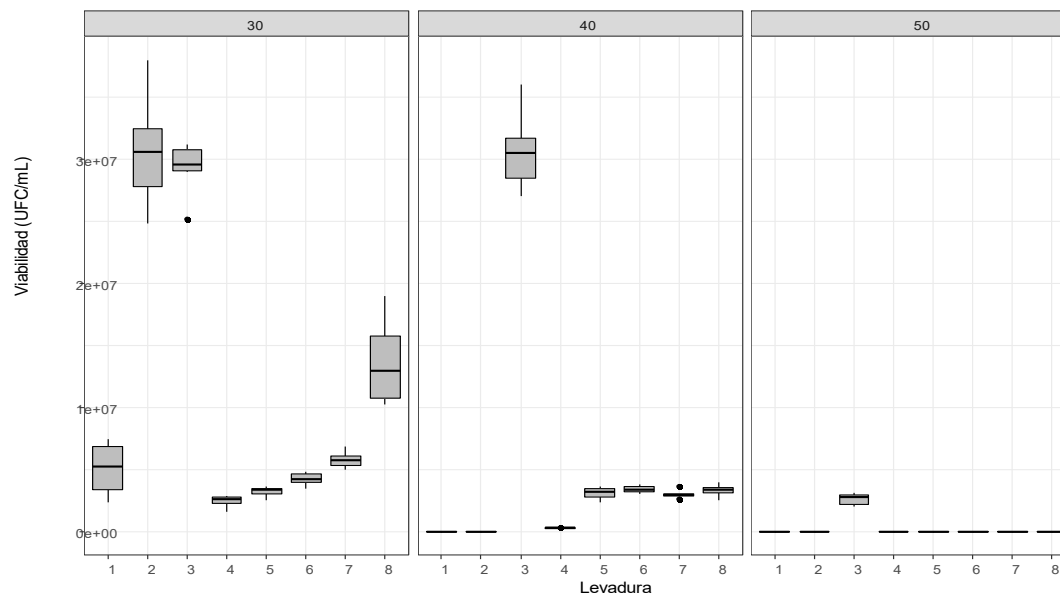
**Figura 1.** Prueba de tolerancia de levaduras a las diferentes condiciones de pH



## Tolerancia a diferentes condiciones de temperatura

La Figura 2 muestra la tolerancia de las levaduras en estudio a las condiciones de temperatura de la dinámica de la fermentación del cacao. Las levaduras deben presentar resistencia a temperaturas superiores a 45 °C para garantizar la muerte del embrión de la semilla, por lo que este factor es determinante en la selección del microorganismo (20, 21).

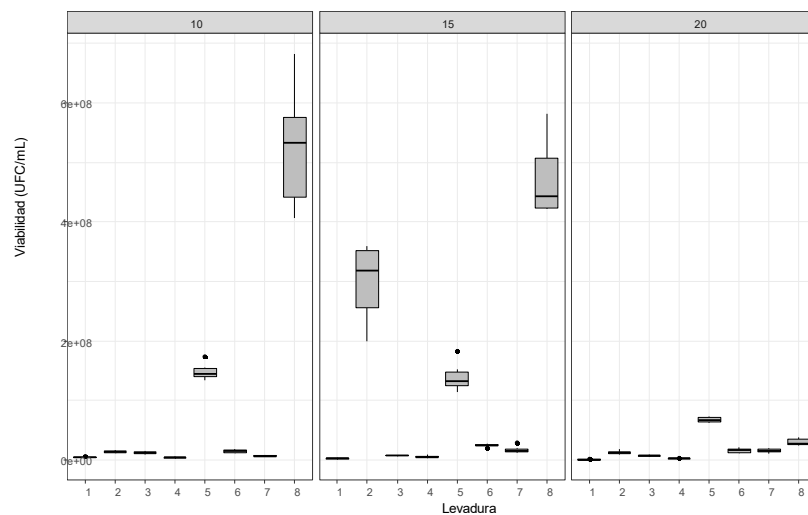
Se destacó la tolerancia a altas temperaturas de la levadura *P. kudriavzevii* (Y03) siendo la única cepa viable a la exposición a condiciones de temperatura de 50 °C, manteniéndose sobre los 6 Log de viabilidad, coincidiendo con el reporte de su eficacia en la capacidad de crecimiento y producción de etanol a alta temperatura a partir de jugo de caña de azúcar, hidrolizado de tallo de maíz e hidrolizado de yuca (22). Adicionalmente, fue la especie que registró la mayor viabilidad en todas las temperaturas estudiadas. Las cepas *D. hansenii* (Y04), *Z. rouxii* (Y06), *A. pullulans* (Y07) y *W. anomalus* (Y08) registraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza  $P > 0.05$ , para el factor temperatura viéndose afectada su viabilidad con el nivel térmico (23)



**Figura 2.** Prueba de tolerancia de levaduras a diferentes condiciones de temperatura (A)

## Tolerancia a diferentes condiciones de sólidos solubles

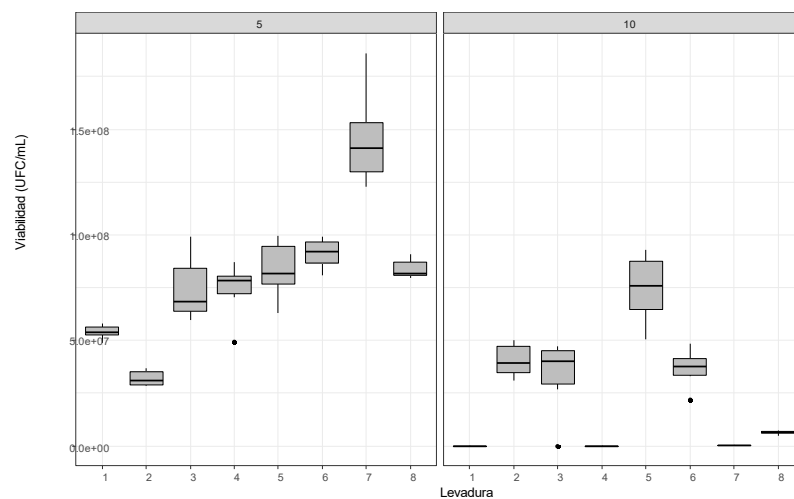
La variabilidad genética de materiales de cacao y su composición bromatológica demandan un cultivo iniciador para la fermentación del cacao con la capacidad de tolerar diferencias en el contenido de sólidos solubles de su pulpa, sin verse afectada su viabilidad. Los resultados de la prueba de tolerancia de las levaduras estudiadas se registran en la figura 3. La levadura *W. anomalus* (Y08) presentó la viabilidad más alta a 10 y 15 °Brix, con 8 log y 7 log en medios con contenidos de sólidos solubles de 20 °Brix (figura 3). Se destacó su osmotolerancia registrada también por la cepa *Candida versatilis* (Y05), la cual ha sido aislada de apiarios y usada en procesos fermentativos de soya, destacándose su capacidad de conversión de azúcares en etanol, metabolismo de ácidos orgánicos, formación de compuestos volátiles, describiéndola como una levadura tolerante y adaptativa.



**Figura 3.** Prueba de tolerancia de levaduras a diferentes condiciones de sólidos solubles

#### Tolerancia a diferentes concentraciones de etanol

La figura 4 muestra la tolerancia a concentraciones de etanol de 5 % y 10 %, de las levaduras en estudio.



**Figura 4.** Prueba de tolerancia de levaduras a diferentes concentraciones de etanol (%)

No se registraron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las levaduras cuando fueron expuestas a 5 % de etanol. Sin embargo, con el incremento de la concentración de etanol, levaduras como la Y01, Y04 y Y07 se vieron fuertemente afectadas en su viabilidad. Se destacó la resistencia de las levaduras Y05, Y03, Y02 y Y06 a altas concentraciones de etanol del medio, registrando viabilidades por encima de los 7 log, que en levaduras como la *P. kudriavzevii* (Y03) demuestran la posibilidad de soportar condiciones adversas durante la fermentación del cacao al mantenerse viables a condiciones de alta concentración de etanol y temperatura, por lo que puede considerarse como un microorganismo promisorio para ser utilizada como cultivo iniciador en la fermentación del cacao.

Las pruebas de tolerancia permitieron generar un primer tamizaje de las levaduras estudiadas para la selección de un cultivo iniciador que mejora la dinámica microbiana durante la fermentación, así como la calidad sensorial. Se descartó a la cepa de levadura *H. opuntiae* (Y01) la cual mantuvo baja tolerancia en los factores pH, contenido de sólidos



solubles, temperaturas y concentraciones de etanol de 10 % reflejado en su baja viabilidad y resistencia a la dinámica bioquímica de la fermentación del cacao.

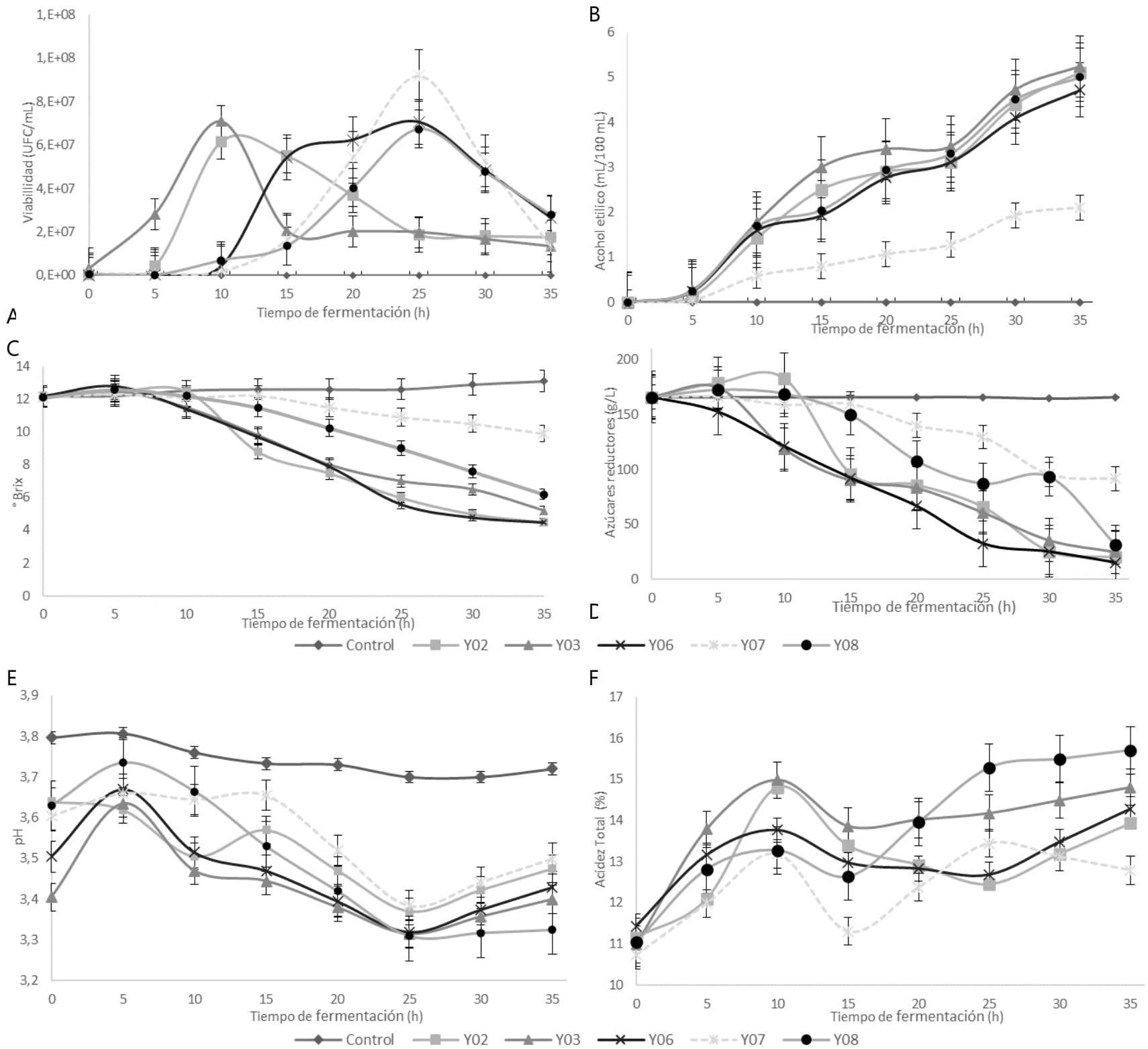
### Prueba de consumo de sustrato por las levaduras

La capacidad y velocidad de transformar macromoléculas en sustancia de interés es otro de los parámetros de selección que debe cumplir el cultivo iniciador; las levaduras interactúan en la primera fase de la fermentación del grano de cacao bajo condiciones ácidas y bajas presiones de oxígeno generando diversas transformaciones, según lo afirmado por (24). A partir del ácido cítrico y los carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) presentes en el mucilago de frutos de cacao maduro se produce etanol; el cual se difunde parcialmente en los cotiledones del grano de cacao, oxidándose posteriormente por efecto de las bacterias ácido-acéticas (3,25). En la figura 5 se observa la viabilidad, capacidad de consumo de sustrato y producción de ácido y alcohol de las levaduras estudiadas. Las levaduras Y02 y Y03 mostraron la culminación de su fase exponencial a las 10 h de fermentación en media pulpa de cacao, que para las levaduras Y07 y Y08 se reportó a las 25 h de fermentación. La levadura *Zygosaccharomyces rouxii* (Y06) registró una fase estacionaria prolongada al mantener su mayor viabilidad entre las 15 y 25 h de fermentación; estos resultados muestran la especificidad en el comportamiento viable de levaduras de diferentes géneros en un mismo sustrato (23).

El contenido de sólidos solubles mostró un comportamiento descendente para las cinco levaduras preseleccionadas en las 35 h de fermentación encontrándose el mayor descenso en los mostos de las levaduras *Z. rouxii* (Y06) y *S. cerevisiae* (Y02). Se registró un perfil evolutivo similar en el contenido de azúcares reductores generado por el consumo de hidratos de carbono y glucosa que fueron hidrolizados de la sacarosa de la pulpa de cacao mediante actividad de invertasa, lo cual explica el ascenso reportado en el contenido de azúcares reductores de las levaduras *W. anomalus* (Y08), *P. kudriavzevii* (Y03) y *S. cerevisiae* (Y02) las cuales durante las primeras cinco horas de fermentación mostraron una mayor disponibilidad de azúcares fermentables o monosacáridos que posteriormente son transformados a etanol como producto primario, y dióxido de carbono y glicerol como productos secundarios (10,25).

El pH presentó un comportamiento descendente durante las primeras 25 h de fermentación de las cinco levaduras preseleccionadas que demuestra la capacidad heterofermentativa de las levaduras en estudio, las cuales son capaces de producir ácidos orgánicos como el ácido acético y ácido succínico (26,27), compuestos probablemente responsables del ascenso en la acidez total del medio. Luego de 25 h de fermentación se registró un ascenso en el pH generado posiblemente por la reducción de la fuente principal de carbono (hidratos de carbono) que promovió el consumo de ácidos presentes en el medio. No se registraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de etanol de las levaduras *P. kudriavzevii* Y03, *W. anomalus* Y08, *S. cerevisiae* Y02 y *Z. rouxii* Y06, sin embargo, las levaduras *P. kudriavzevii* Y03 y *W. anomalus* Y08 fueron las de mayor producción del metabolito de interés registrando un menor consumo de azúcares reductores y acidez total que evidencia una mayor capacidad de transformar azúcares y ácidos presentes en la pulpa de cacao en alcohol, requerido para la muerte del embrión y posterior difusión en los granos de cacao durante el desarrollo aromático de los granos (6,20).

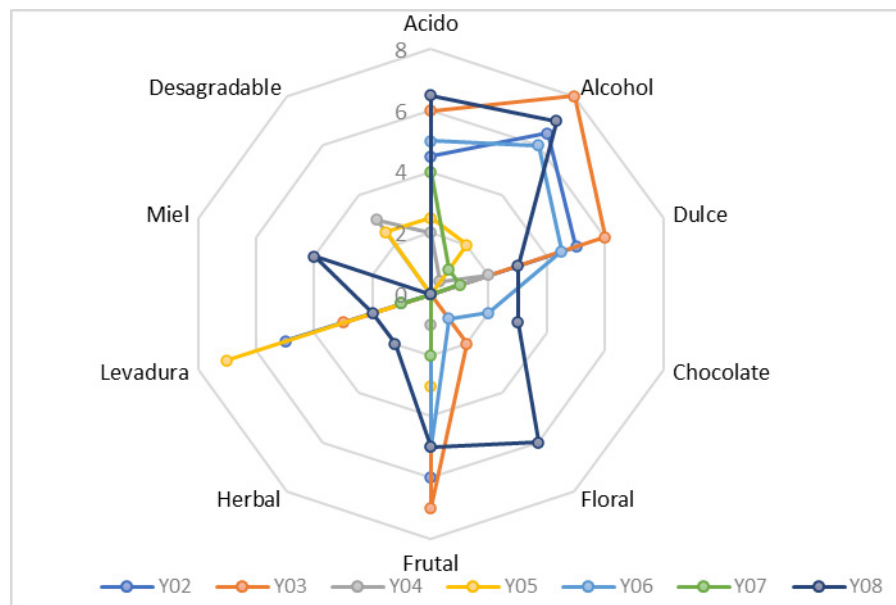




**Figura 5.** Dinámica de consumo de sustrato por levaduras preseleccionadas. Viabilidad (A), producción de alcohol (B), dinámica de sólidos solubles (C), Azúcares reductores (D), Acidez volátil (E), Acidez titulable (F).

## Producción de aromas de levaduras en mostos de pulpa de cacao

La producción de aromas durante la fermentación del cacao ha sido asociada principalmente al consorcio microbiológico de levaduras en el proceso (10,25,28,29) y está sujeta a factores como la concentración de nutrientes del sustrato, las condiciones bioquímicas del proceso, y la genética de las levaduras que, a su vez, interviene en la producción de enzimas y generación de metabolitos de interés según lo expresado por (30,31). La prueba de producción de aromas en sustrato de pulpa de cacao de las levaduras en estudio mediante perfil de aromas de los mostos se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Perfil sensorial de la producción de aromas de las levaduras en estudio

La calificación del cacao fino y de aroma demanda la presencia de notas específicas en su perfil sensorial, destacándose levaduras como la *P. kudriavzevii* Y03, *S. cerevisiae* Y02, *Z. rouxii* Y06 y *W. anomalous* Y08 las cuales registraron la mayor intensidad en el aroma frutal de los mostos estudiados con valores promedio de 7, 6, 5 y 5 respectivamente. El aroma floral fue detectado en mayor intensidad en la producción aromática de la levadura *Z. rouxii* Y08, especie que además registró en su perfil notas herbales y a miel que no fueron encontradas en los mostos fermentados de las demás levaduras estudiadas que concuerdan con la alta producción de acetato de etilo reportado para esta especie y que ha sido relacionada con notas frutales (32). El alcohol feniletílico y el 3-methyl-1-butanol acetato fueron detectados en fermentación de vino de arroz que se asocian a notas frutales y florales, destacándose esta especie por su producción aromática (33). La presencia de alcohol se detectó en mayor intensidad en los mostos fermentados de las levaduras *P. kudriavzevii* Y03, *Z. rouxii* Y08 y *S. cerevisiae* Y02 y dado que este compuesto es requerido para la muerte del embrión durante la fermentación del cacao, su mayor presencia puede favorecer la liberación de compuestos que actúen como precursores de moléculas organolépticas. Levaduras como la *D. hansenii* Y04 y *C. versatilis* Y05 registraron en su perfil aromas desagradables en intensidades de 3 y 2,5 respectivamente que fueron descritos como sobre fermentación o fruta descompuesta, lo que, unido a la baja producción de aromas específicos, alcohol y menor resistencia a la dinámica

bioquímica, respecto a las demás levaduras estudiadas permiten su eliminación en el proceso de selección de levaduras como cultivo iniciador de la fermentación del cacao.

## Conclusiones

Se seleccionaron las levaduras *W. anomalus* y *P. kudriavzevii* por su capacidad de transformar sustrato en productos de interés durante la fermentación de pulpa de cacao con producción de aromas específicos y resistencia a condiciones bioquímicas adversas propias de la fermentación del cacao. Los microorganismos seleccionados presentan una alta factibilidad de aplicación como promotores de la fermentación como cultivo iniciador los cuales pueden utilizarse en forma individual, por consorcio y cultivo mixto.

## Agradecimiento

Los autores agradecen la financiación de este trabajo que fue apoyado por el Departamento del Tolima, Minciencias [Convocatoria No. 755. "Formación de capital humano de alto nivel para el departamento del Tolima"].

## Referencias

1. Apriyanto M, Novitasari R. 688-691 Apriyanto, Rifni Novitasari. (2021) During Fermentation, Microbiology and Biochemistry of the Cocoa Bean. International Journal of Food Science and Agriculture [Internet]. [cited 2022 Apr 13];2021(4):688-91. Available from: <http://www.hillpublisher.com/journals/jsfa/>
2. Figueroa-Hernández C, Mota-Gutierrez J, Ferrocino I, Hernández-Estrada ZJ, González-Ríos O, Cocolin L, et al. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. Int J Food Microbiol [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 6];301:41-50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>
3. Loviso CL, Libkind D. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: Esters. Rev Argent Microbiol. 2018 Oct 1;50(4):436-46.
4. Venturini Copetti M. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. Curr Opin Food Sci. 2019 Feb 1;25:57-61.
5. Craack M, Mikkelsen MB, Saerens S, Knudsen M, Blennow A, Lowor S, et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. Int J Food Microbiol. 2013;167(1):103-16.
6. Batista KA, Fernandes KF. Development and optimization of a new culture media using extruded bean as nitrogen source. MethodsX [Internet]. 2015;2:154-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2015.03.001>
7. Melo Pereira G, Socol V, Socol C. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. Curr Opin Food Sci [Internet]. 2016 [cited 2023 May 8];7:50-7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799315001307>
8. Craack M, Keul H, Eskildsen CE, Petersen MA, Saerens S, Blennow A, et al. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. Food Research International. 2014;63(November):306-16.
9. Gutiérrez Ríos, H.G., Suárez Quiroz, M.L., Hernández Estrada, Z.J., Castellanos Onorio, O.P., Alonso Villegas, R., Rayas Duarte, P., Cano Sarmiento, C., Figueroa Hernández, C. Y.\*, González-Ríos, O.\* (2022). Yeasts as producers of flavor precursors during cocoa bean fermentation and their relevance as starter cultures: A review. Fermentation. 8, 331. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070331>.

10. Maicas S. The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms* 2020, Vol 8, Page 1142 [Internet]. 2020 Jul 28 [cited 2022 Apr 24];8(8):1142. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1142/htm>
11. Jurado Gámez H, Ramírez C, Aguirre D. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y Zootecnia*. 2013 Dec 20;Vol 7 No.2:37–53.
12. Lozano Tovar MD, Tibasosa G, González CM, Ballestas Alvarez K, Lopez Hernandez MDP, Rodríguez Villamizar F. Isolation and identification of microbial species found in cocoa fermentation as microbial starter culture candidates for cocoa bean fermentation in Colombia. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*. 2020;36(3):236–48.
13. Briceño Vélez DA. Efecto de las bacterias lácticas microencapsuladas en la calidad microbiológica y en las propiedades fisicoquímicas de salchichas cocidas [Maestría en Ingeniería de alimentos]. [Santiago de Cali]: Universidad del Valle; 2020.
14. AOAC. Official Methods of Analysis [Internet]. Vol. 21st Edition. 2019 [cited 2022 Apr 21]. Available from: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
15. Dumitru M, Tabuc C, Sorescu I, Vasilachi A, Hăbeanu M, Petre S, et al. Researches concerning the level of fermentable sugars from feed materials in relation with cellulase hydrolysis by carbohydrase enzyme. *Scientific Bulletin Series F Biotechnologies*. 2018;XXII.
16. Nuñez JC, Toro CR, Bolívar G, Aldana AS, Tovar MDL. Effect of microencapsulated inoculum of *Pichia kudriavzevii* on the fermentation and sensory quality of cacao CCN51 genotype. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2023 Jan 6 [cited 2023 Jan 15]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.12433>
17. Nutricional–IIN MDI de I, 2007 undefined. Guía para la evaluación sensorial de alimentos. academia.edu [Internet]. [cited 2024 Jan 20]; Available from: <https://www.academia.edu/download/61102947/Guia-para-la-evaluacion-sensorial-de-alimentos20191102-104797-1le28kv.pdf>
18. Bilenler T, Karabulut I, LWT KC, 2017 undefined. Efectos de los cultivos iniciadores encapsulados sobre las propiedades microbianas y fisicoquímicas de salchichas (sucuks) producidas tradicionalmente y tratadas térmicamente. Elsevier [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 23]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816305655>
19. Naumov G, Naumova ES, Schnürer J, Naumov GI, Naumova ES. Caracterización genética de la levadura no convencional *Hansenula anomala*. *Investigación en Microbiología* [Internet]. 2001 [cited 2022 Jul 23];152:551–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0923250801012293>
20. Calvo AM, Botina BL, García MC, Cardona WA, Montenegro AC, Criollo J. Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Mar 23];11(1):16746. Available from: [/pmc/articles/PMc8373873/](https://www.nature.com/articles/PMc8373873)
21. De Brito ES, García NHP, Gallão MI, Cortelazzo AL, Fevereiro PS, Braga MR. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *J Sci Food Agric*. 2001;81(2):281–8.

22. Chamnipa N, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Jul 21];49(2):378–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29154013/>
23. Frazier WC, Mesthoff DC. Microbiología de alimentos [Internet]. En lengua española. Vol. 4. Zaragoza España: ACRIBIA; 1993 [cited 2022 Jul 20]. 1–681 p. Available from: <https://iselavictoria06wordpress.files.wordpress.com/2019/04/l33.pdf>
24. Delgado-Ospina J, Acquaticci L, Molina-Hernandez JB, Rantsiou K, Martuscelli M, Franks Kamgang-Nzekoue A, et al. Exploring the capability of yeasts isolated from Colombian fermented cocoa beans to form and degrade biogenic amines in a lab-scale model system for cocoa. *mdpi.com* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 17]; Available from: <https://www.mdpi.com/934894>
25. Ruta LL, Farcasanu IC. Coffee and yeasts: From flavor to biotechnology. *Fermentation*. 2021;7(1).
26. Romanens E, Freimüller Leischfeld S, Volland A, Stevens M, Krähenmann U, Isele D, et al. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2019;290(October):262–72.
27. Schwan RF, Pereira GV de M, Fleet GH. Microbial activities during cocoa fermentation. *Cocoa and coffee fermentations*. 2014;(January 2014):129–92.
28. De Vuyst L, Leroy F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol Rev*. 2020;(May):432–53.
29. Fonseca Blanco JD, López Hernandez M del P, Ortiz Galeano LS, Criollo Nuñez J, Lozano Tovar MD. 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. *ccrjournal.com* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 17];36(2):154–72. Available from: <https://ccrjournal.com/index.php/ccrj/article/view/438>
30. Kongor JE, Hinneh M, de Walle D Van, Afoakwa EO, Boeckx P, Dewettinck K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International* [Internet]. 2016;82:44–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
31. Moreira I, Costa J, Vilela L, Lima N, Santos C, Schwan RF. Influence of *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* as starters on chocolate flavour. *J Sci Food Agric*. 2021;101:4409–19.
32. Zha M, Sun B, Wu Y, Yin S, Wang C. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Wickerhamomyces anomalus* for Chinese Baijiu making. *J Biosci Bioeng*. 2018 Aug 1;126(2):189–95.
33. Wu Y, Chen X, Fang X, Ji L, Tian F, Yu H, et al. Isolation and Identification of Aroma-producing Yeast from Mackerel Fermentation Broth and Its Fermentation Characteristics. <https://doi-org.recursos.agrosavia.co/101080/1049885020211988016> [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 30];30(10):1264–80. Available from: <https://www-tandfonline-com.recursos.agrosavia.co/doi/abs/10.1080/10498850.2021.1988016>