

## Estudio de un consorcio de levaduras durante la fermentación de cacao y su efecto en la generación de compuestos aromáticos

Zamudio-Palacios B. B<sup>a</sup>., Ayora-Talavera T. del R<sup>a</sup>., Lugo-Cervantes E. del C<sup>a</sup>., Taillandier P<sup>b</sup>. y Gastélum-Martínez E\*<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. – Sede Sureste; Tablaje Catastral 31264 Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Parque Científico Tecnológico de Yucatán CP. 97302 Mérida, Yucatán, México.

<sup>b</sup>Institute National Polytechnique de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, 4, Allée Emile Monso, BP 83234, F-31432 Toulouse Cedex 4, France.

\*[egastelum@ciatej.mx](mailto:egastelum@ciatej.mx).

### RESUMEN:

El aroma del grano de cacao es el atributo principal de aceptación y calidad. La fermentación reduce la astringencia y amargura, y genera compuestos precursores de aroma (CPA). Los CPA se producen por degradación enzimática de azúcares en la pulpa y proteínas en la semilla; debido a levaduras, bacterias lácticas y acéticas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la fermentación del cacao con un consorcio de levadura para conocer su impacto en la generación de CPA. El cultivo mixto (CM) y cultivos puros (CP) se realizaron con cacao criollo inoculado con *S. cerevisiae* (L1), *C. humilis* (L2), *P. kluyveri* (L3) y *H. opuntiae* (L4). En el CM, L1 fue la predominante alcanzando un crecimiento máximo de  $8.43 \times 10^7$  UFC/g a las 24 h. El 48.65% de los azúcares fue consumido durante las 48 h. El ácido cítrico y láctico alcanzó una concentración máxima de 11.23  $\mu\text{g/g}$  y 2.26  $\mu\text{g/g}$ . El pH incrementó a 3.58. Los CPA predominantes fueron tetrametilpirazina (chocolate), alcohol fenil-etílico (miel), 3-metil-butanal (chocolate), 1-propanol (caramelo) y acetofenona (floral). La fermentación del consorcio de levaduras y los CP mostró un gran impacto en el contenido aromático en el grano de cacao.

**Palabras clave:** Compuestos aromáticos, cacao, *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *C. humilis*, *H. opuntiae*.

### ABSTRACT:

The aroma of cocoa beans is the main attribute of acceptance and quality. Fermentation reduces astringency and bitterness, while aroma precursor compounds (APC) are generated. APC are produced by enzymatic degradation of sugars and proteins in the pulp and seed, due to yeasts, lactic, and acetic bacteria. The objective of this work was to study the fermentation of cocoa with a yeast consortium to know its impact on the generation of APC. Mixed culture (CM) and pure cultures (CP) were carried out with Creole cocoa inoculated with: *S. cerevisiae* (L1), *C. humilis* (L2), *P. kluyveri* (L3), and *H. opuntiae* (L4). In CM, the predominant yeast was L1 reaching a maximum growth of  $8.43 \times 10^7$  CFU/g at 24 h. 48.65% of the sugars were consumed during the 48 h. Citric and lactic acid reached a maximum concentration of 11.23  $\mu\text{g/g}$  and 2.26  $\mu\text{g/g}$ . The pH increased to 3.58. The predominant APC were tetramethylpyrazine (chocolate), phenethyl alcohol (honey), 3-methyl-butanal (chocolate), 1-propanol (caramel), and acetophenone (flowery). The fermentation by the yeast consortium and the CP showed great impact on the aromatic content in the cocoa bean.

**Key words:** Aromatic compounds, cocoa, *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *C. humilis*, *H. opuntiae*.

**Área:** Microbiología y biotecnología.

## INTRODUCCIÓN

El aroma del grano de cacao es el principal atributo de aceptación y calidad para la industria del chocolate (Castro-Alayo et al., 2019). Este depende del origen genético, variedad, cultivo y los procesos post cosecha (fermentación, secado y tostado, principalmente). La fermentación reduce la astringencia y amargor, y permite la generación de compuestos precursores de sabor y aroma, como compuestos volátiles, péptidos y aminoácidos. Estos compuestos son producidos durante la degradación enzimática de azúcares y proteínas primero en la pulpa y posteriormente en la semilla; por efecto de levaduras, bacterias ácido-lácticas (BAL) y bacterias ácido-acéticas (BAA). Las levaduras y las BAL son los microorganismos predominantes en la etapa inicial de la fermentación (Romanens et al., 2018). Las levaduras producen enzimas pectinolíticas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa por la actividad de la invertasa, favoreciendo la difusión de ácidos orgánicos (cítrico, acético y láctico) y etanol, aumentando la temperatura de la semilla de cacao (Castro-Alayo et al., 2019; de Melo Pereira et al., 2013). Así mismo, las levaduras son los mayores productores de ésteres y alcoholes superiores, lo que puede contribuir a la compleja mezcla de compuestos volátiles que caracteriza el aroma del chocolate (Batista et al., 2016; Crafacck et al., 2013). Recientemente, Batista et al. (2016) empleo un consorcio iniciador conformado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*, obteniendo como resultado la generación de 67 compuestos volátiles en el grano fermentado, que fueron detectados sensorialmente en el chocolate, mostrando notas intensas afrutadas. De igual forma, Koné et al. (2016), encontró la generación de 33 compuestos volátiles a partir de cultivos individuales de 6 levaduras en medio Sabouraud. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia galeiformis*, *Galactomyces geotrichum* y *Wickerhamomyces anomalus*, fueron aisladas, identificadas y seleccionadas por ser predominantes en 3 métodos diferentes de fermentación espontánea con cacao de variedades mixtas originarios de Costa de Marfil, donde se identificaron 31 compuestos volátiles. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es estudiar la fermentación de cacao empelando un consorcio conformados por las levaduras aisladas de la fermentación espontánea de cacao para conocer su impacto en la generación de compuestos precursores de aroma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se empleó un consorcio conformado por *Saccharomyces cerevisiae* (L1), *Candida humilis* (L2), *Pichia kluyveri* (L3) y *Hanseniaspora opuntiae* (L4). Estas cepas fueron aisladas y seleccionadas de la fermentación espontánea de cacao en una plantación de Tikul, Yucatán. L1 y L2 se seleccionaron debido a que fueron las levaduras predominantes y de permanencia prolongada durante la fermentación espontánea. L3 se seleccionó porque existen reportes que es una cepa aromática que produce notas de aroma a miel y floral (Crafacck et al., 2014), mientras que, L4 fue seleccionada debido a que se detectó su presencia en el día 3 hasta el final de la fermentación espontánea.

### Conservación de las cepas

Las 4 levaduras fueron conservadas en placas Petri con medio de agar YPD. Cada levadura fue reactivada en 10 mL de medio líquido YPD por triplicado e incubadas a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, se inóculo 1 mL en medio agar YPD y se extendió por medio de la técnica de siembra en superficie por triplicado. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 48 h. Las placas Petri con los cultivos de cada levadura fueron almacenadas a 8 °C, para su posterior uso. El proceso de resiembra se realizó cada 15 días para la conservación de las cepas.

## Medio de cultivo e inóculo

El inóculo para la fermentación sólida de cacao se realizó en medio líquido de pulpa de cacao (MPC). El MPC se elaboró con semillas de cacao criollo de una plantación de Tikul, Yucatán. Las semillas de cacao se mezclaron con agua (1:2) durante 2 h, después las semillas fueron removidas. La mezcla fue clarificada por filtración y centrifugación a 4500 rpm/ 4 °C/ 15 min. El medio clarificado con 3 °Brix se le adicionó 10 % de β-ciclodextrina y fue secado por aspersión (T:130 °C, F:15.1 mL/ min). El cultivo inóculo de cada levadura se realizó colocando una asada en 50 mL de MPC esterilizado a 105 °C / 5 min (Meersman et al., 2017) e incubado a 30 °C durante 24 h.

## Fermentación de cacao

La fermentación sólida de cacao se realizó con semillas de cacao criollo de una plantación de Tikul, Yucatán cosechadas en el último cuatrimestre del año 2018. Las semillas fueron extraídas asépticamente de acuerdo con la metodología reportada por Ho et al. (2018) y almacenadas a -20 °C para su uso posteriormente. Se realizaron dos tipos de fermentaciones 1) cultivos puros (CP) con cada una de las levaduras seleccionadas y 2) cultivo mixto (CM) con la presencia de todas las levaduras. Todos los cultivos se llevaron a cabo en un fermentador para cacao (diseño CIATEJ A.C.), que consiste en un tanque cilíndrico dividido en 3 niveles con platos perforados y monitoreo manual de temperatura. El fermentador se operó con 1.2 kg de semillas de cacao. Se usó un inóculo de  $1.00 \times 10^6$  células/g de cada levadura. Los cultivos se llevaron a cabo durante 72 h a 34 °C con 2 volteos, el primero a las 24 h y el segundo a las 48 h. Los CP y el CM fueron monitoreados mediante muestreos cada 24 h, determinando los parámetros de crecimiento celular, azúcares totales, ácidos orgánicos, compuestos volátiles, °Brix, % humedad y pH.

## Cuenta celular diferencial

El seguimiento del crecimiento y cuenta celular se realizó empleando la metodología reportada por Miles & Misra, (1938) para los CP y el método de Green & Gray, (1951) con ciertas modificaciones para el CM. En ésta última, se mezclaron 10 g de cacao aproximadamente con 10 mL de NaCl 0.5 % (1:1) agitando manualmente durante 10 min. En cajas Petri con medio agar YPD se inoculó 10 µL de muestra de CP en la dilución apropiada y se incubaron a 30 °C durante 24 h. Por otra parte, en cajas Petri con medio agar WL (SIGMA-ALDRICH) y WL-diferencial, se inoculó 100 µL de muestra en la dilución apropiada y se incubaron a 30 °C durante 48 h. La morfología de cada levadura se identificó inicialmente en los medios de cultivo empleados. Después de la incubación, las colonias se identificaron y contaron. Los resultados fueron expresados en UFC/g de cacao.

## Azúcares totales

Los azúcares totales fueron determinados por el método de Dubois et al.(1956) modificado. La muestra de 10 g de granos de cacao aproximadamente se mezcló con agua destilada (1:1) y agitó manualmente durante 10 min. Se removieron los granos y la mezcla fue centrifugada a 4500 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación azúcares realizando las diluciones necesarias. El análisis se realizó con 0.2 mL de muestra, añadiendo 0.2 mL de fenol al 5 % y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, la solución se homogenizó y se dejó reposar durante 10 min. Después de colocar la solución en un baño de agua a 30 °C durante 15 min, se llevó a cabo la medición en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 490 nm. Se realizó una curva de calibración con glucosa a una concentración de 0 a 0.1 g/L. El consumo de azúcares expresado en porcentaje, se estimó empleando las ecuaciones (1) y (2), donde:

$$X_c = X_n - X_0 \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\%X_c = (X_c * 100) / X_0 \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde:

$X_0$  = g de azúcares / g de cacao inicial, es decir, en tiempo 0 de la fermentación.

$X_n$  = g de azúcares / g de cacao en los tiempos de fermentación, es decir,  $n = 24, 48$  y  $72$  h.

$X_c$  = consumo de g de azúcares / g de cacao cada 24 h de la fermentación.

% $X_c$  = consumo porcentual de azúcares / g de cacao cada 24 h de la fermentación.

### pH

El pH se determinó por el método de Afoakwa, (2014) con modificaciones. Se mezclaron 10 g de granos de cacao aproximadamente con agua destilada (1:1), agitando manualmente durante 10 min a temperatura ambiente. Después, se midió el pH con un potenciómetro Hanna calibrado, introduciendo el electrodo en la mezcla.

### Ácidos orgánicos

La determinación de ácido láctico, ácido cítrico y ácido acético en las semillas fermentadas de cacao se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se realizaron 3 curvas de calibración con estándares comerciales para cada uno de los ácidos a una concentración de 0 a 500 ppm. Las muestras de granos (10 g) se diluyeron con agua destilada en proporción 1:1 (p/v), agitando durante 10 min. Los granos fueron removidos y el resto de la mezcla fue centrifugada a 4500 rpm/ 4 °C /15 min. El sobrenadante recuperado y los estándares fueron filtrados con membranas de nylon (Millipore Millex-GN) con un tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m y almacenadas a - 40 °C. Posteriormente, se inyectaron 10  $\mu$ L en un UPLC Waters Acquity H Class (Milford, MA, USA) con una bomba cuaternaria (UPQSM), en modo HPLC equipado con una columna Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %) de 150 x 7.80 mm (Phenomenex ®). Se utilizó como fase móvil ácido sulfúrico al 0.005 N a un flujo constante de 0.5 mL/min a 37 °C con un tiempo de elución por corrida de 22 min (Pacheco et al., 2011). Analizando a una longitud de onda de 210 nm.

### Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles se determinaron en muestras de 2 g de granos de cacao. La extracción de los compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando la técnica de micro extracción en fase sólida en el Headspace (SPME-HS), y la separación e identificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC – MS) (Rodríguez-Campos et al., 2011a).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento microbiano

El comportamiento cinético de las 4 levaduras en los cultivos puros (Tabla I) y el cultivo mixto (Tabla II) se observó mediante la cuenta diferencial. En los cultivos puros se observó que las levaduras L1 y L2 presentaron su fase exponencial durante las primeras 24 h alcanzando una concentración celular de  $9.00 \times 10^7$  UFC/g para L1 y  $4.22 \times 10^8$  UFC/g para L2. Posteriormente, la levadura L1 mantuvo su presencia en el cultivo en la fase estacionaria, mientras que la levadura L2 disminuyó su concentración celular. Por otra parte, las levaduras L3 y L4 alcanzaron su máximo crecimiento a las 48 h con una concentración celular de  $3.60 \times 10^7$  UFC/g para L3 y de  $1.30 \times 10^8$  UFC/g para la levadura L4. Posteriormente, se observó continuidad en la presencia de la levadura L3 en el cultivo. Sin embargo, la levadura L4 presentó una fase de adaptación durante las primeras 24 h y después de las 48 h del cultivo su concentración celular disminuyó. En el cultivo mixto (Tabla II) el comportamiento cinético de las levaduras L1 y L2 fue similar al observado en sus CP y alcanzaron su máximo crecimiento celular

a las 24 h con una concentración celular de  $8.43 \times 10^7$  UFC/g y  $8.14 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente. Mientras que la levadura L4 alcanzó su máximo crecimiento a las 48 h del cultivo. Sin embargo, la presencia de la levadura L3 después de las 24 h del cultivo ya no se observó.

Tabla I. Crecimiento microbiano en UFC/ g durante los cultivos puros (CP) de *Saccharomyces cerevisiae* (L1), *Candida humilis* (L2), *Pichia kluyveri* (L3) y *Hanseniaspora opuntiae* (L4).

Crecimiento microbiano en los CP (UFC/g)				
tiempo (h)	L1	L2	L3	L4
0	$1.03 \times 10^6$	$1.55 \times 10^6$	$4.60 \times 10^5$	$7.00 \times 10^5$
24	$9.00 \times 10^7$	$4.22 \times 10^8$	$1.32 \times 10^7$	$6.00 \times 10^6$
48	$1.01 \times 10^8$	$5.00 \times 10^4$	$3.60 \times 10^7$	$1.30 \times 10^8$
72	$1.08 \times 10^8$	$1.00 \times 10^5$	$3.60 \times 10^7$	$5.00 \times 10^7$

Tabla II. Crecimiento microbiano en UFC/g durante el cultivo mixto (CM) de *Saccharomyces cerevisiae* (L1), *Candida humilis* (L2), *Pichia kluyveri* (L3), *Hanseniaspora opuntiae* (L4) y cuenta total de levaduras (LT).

Crecimiento microbiano en el CM (UFC/g)					
tiempo (h)	L1	L2	L3	L4	LT
0	$3.70 \times 10^5$	$1.10 \times 10^5$	$2.70 \times 10^5$	$2.00 \times 10^3$	$7.53 \times 10^5$
24	$8.43 \times 10^7$	$8.14 \times 10^7$	$2.10 \times 10^6$	$1.00 \times 10^6$	$1.69 \times 10^8$
48	$8.20 \times 10^7$	$6.30 \times 10^7$	0.00	$1.20 \times 10^6$	$1.46 \times 10^8$
72	$6.20 \times 10^7$	$1.40 \times 10^7$	0.00	$2.00 \times 10^4$	$7.66 \times 10^7$

Estos resultados mostraron que L1 fue la cepa predominante y con presencia durante las 72 h en los CP y en el CM de la fermentación. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos en un cultivo inoculado con *S. cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*, donde *S. cerevisiae* alcanzó su fase exponencial durante las primeras 24 h y fue la levadura con mayor concentración celular durante 160 h (Batista et al., 2015). Este mismo comportamiento lo reportó Visintin et al. (2017), en un cultivo durante 168 h inoculado con *S. cerevisiae* IC67 y *T. delbrueckii* IC103. Esta dominancia de *S. cerevisiae* se atribuye a su mayor poder fermentativo y la capacidad de soportar condiciones de estrés como altos niveles de etanol y ácidos orgánicos, altas temperaturas y bajos niveles de pH (Batista et al., 2015; Goddard, 2008).

L2 en su CP disminuyó su concentración celular después de las primeras 24 h, no obstante, en el CM permaneció en fase estacionaria. Esto podría indicar que la presencia del consorcio beneficia el crecimiento y permanencia de *C. humilis* en la fermentación. Batista et al. (2016), también reporta la presencia continua de *Candida* sp., en su cultivo inoculado con otras levaduras, en cambio, en su fermentación espontánea no fue detectada. Por otro lado, el crecimiento de L3 en el CM se observó diferente a lo reportado por Batista et al. (2015) donde ésta levadura tuvo presencia continua en todo el cultivo inoculado, mientras que su concentración celular fue mayor en la fermentación espontánea. Sin embargo, Crafs et al. (2013) en su cultivo inoculado con *P. kluyveri* CH, *Lactobacillus fermentum* L18 y *Acetobacter pasteurianus* A149, después de 24 h no detectaron la presencia de *P. kluyveri*. Por lo tanto, el crecimiento de *P. kluyveri* posiblemente sea afectado por la presencia de las levaduras del consorcio. Aunque, de acuerdo con diversos autores *P. kluyveri* es considerada una cepa aromática y autóctona de las fermentaciones de cacao, principalmente de Ghana y Brasil (Batista et al., 2015; Jepsen et al., 2005; Daniel et al., 2009). *Hanseniaspora opuntiae*, durante las primeras 24 h de la fermentación en CP presentó una fase de adaptación, que no se observó en el CM. Sin embargo, L4 fue la cepa con menor concentración celular en el CM. Batista et al. (2015), sugieren que *Hanseniaspora* podría ser inhibida por las otras cepas en su

cultivo inoculado. Por otra parte, Crafacck et al. (2013) en su fermentación inoculada con *P.kluyveri* tuvieron presencia de *H. opuntiae* durante las primeras 24 h y en la fermentación espontánea hasta las 36 h, mostrando su mayor concentración a las 12 h. Por lo que, las diferentes especies de *Hanseniaspora* y *Pichia* pueden considerarse competidoras de sustrato (De Vuyst & Weckx, 2016; Daniel et al., 2009). Así mismo, diversos autores reportan a *Hanseniaspora opuntiae / uvarum* como la levadura predominante durante la fase inicial del proceso de fermentación del grano de cacao, debido a su baja tolerancia al etanol y al calor, buena tolerancia a los ácidos y baja ompetitividad con especies de BAL por la fructosa (De Vuyst & Weckx, 2016; Hamdouche et al., 2015; Daniel et al., 2009).

### Consumo de azúcares

El consumo de azúcares disponibles en la pulpa de cacao en las fermentaciones CP y CM se muestran en la tabla III. Durante el CP de la levadura L1 se observó un consumo de azúcares de 79.70 % a las 48 h, aunque, su máxima concentración celular la alcanzó a las 24 h. El CP de la levadura L2 mostró un consumo continuo, alcanzando un 81.4 % a las 72 h de fermentación. Las levaduras L3 y L4 tuvieron un comportamiento similar, alcanzando el mayor consumo de azúcares de 56.12% y 82.40%, respectivamente a las 24 h. Sin embargo, el consumo de L3 disminuyó en las siguientes 24 h y el de L4 se mantuvo sin cambios significativos hasta 72 h. Esto podría estar relacionado con el comportamiento cinético mostrado de L3 y L4 durante el CP, donde después de las 48 h L3 permanece en estado estacionario y L4 disminuye su concentración celular. Por otra parte, durante el CM se observó un aumento gradual del consumo de azúcares hasta alcanzar el valor de 61.35 % a las 72 h de fermentación. Estos resultados mostraron que *P. kluyveri* (L3) fue la cepa con menor consumo de azúcares disponible en los CP. De igual manera, en el CM el consumo de azúcares alcanzado a las 72 h fue menor que

Consumo de azúcares porcentual					
tiempo (h)	L1-CP	L2-CP	L3-CP	L4-CP	CM
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	67.05	27.08	52.17	82.40	20.40
48	79.79	44.83	32.95	70.87	48.65
72	53.37	81.84	32.27	83.87	61.35

por las levaduras en sus cultivos puros. Posiblemente, el consumo total de azúcares por el consorcio de levaduras en el CM podría llevar más días de fermentación tal y como se reporta por otros autores (Batista et al., 2016; Ramos et al., 2014; Crafacck et al., 2014), que han realizado cultivos inoculados con periodos de tiempo más largos de hasta 168 h.

Tabla III. Consumo de azúcares porcentual durante los cultivos puros (CP) y el cultivo mixto (CM) de *Saccharomyces cerevisiae* (L1), *Candida humilis* (L2), *Pichia kluyveri* (L3) y *Hanseniaspora opuntiae* (L4).

### Ácidos orgánicos

La presencia de ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético fue determinada en el CM, debido a que la generación de los ácidos orgánicos en la fermentación de cacao se lleva a cabo por el consorcio de levaduras, BAL y BAA. Durante la fermentación de cacao la presencia de ácido cítrico, y la generación de ácido láctico y ácido acético son factores clave con respecto a la calidad del cacao. El ácido cítrico es convertido a ácido acético por las BAL, mientras que, el ácido láctico y el ácido acético migran a los cotiledones de las semillas procediendo a la degradación enzimática de proteínas. Estas condiciones de acidez y altas temperaturas favorecen la penetración en las semillas de los productos generados en la fermentación de la pulpa de cacao, causando hinchazón y estimulando las reacciones enzimáticas que producen precursores de sabor y aroma (De Vuyst and Leroy, 2020; Kadow et al., 2015; Hamdouche et al., 2015).

Durante el CM se observó la presencia de ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético (Fig. 1) desde el inicio de la fermentación. Esto podría estar asociado con el medio de inóculo a base de la pulpa de cacao. Dado que la inoculación del CM se llevó a cabo con los cultivos puros en medio líquido a base de pulpa de cacao. Por lo tanto, al realizar el inóculo se añadieron los metabolitos generados durante el cultivo en medio líquido de pulpa de cacao. En las primeras 24 h de la fermentación se observó una disminución en la concentración de ácido láctico y ácido acético y posteriormente se observó incremento en la concentración. Aunque, en nuestros recuentos en los cultivos diferenciales en placas, no fue observada ninguna colonia diferente a las identificadas a las 4 cepas del CM, no descartamos la presencia de alguna BAL, considerando de acuerdo con De Vuyst & Leroy, (2020) crecen de manera simultánea con las levaduras durante la fermentación de cacao. Por otra parte Ho et al., (2014), en sus cultivos realizados con inhibición de levaduras y con presencia de levaduras no observaron diferencias en la concentración de ácido acético. Por lo que ellos sugieren que hay otros mecanismos para la generación de ácido acético aparte de la oxidación de etanol por las BAA.

Por otra parte, el pH es importante en la degradación enzimática, debido a que las enzimas se activan e inactivan en función de este. Un grano bien fermentado tiene un valor bajo de pH de 4.5 a 5.4. En la fermentación en CM después de las 72 h el pH fue de 3.58, esto se podría asociar a la presencia de ácido cítrico en la fermentación. De acuerdo con lo reportado por De Vuyst and Leroy, (2020) la pulpa durante la etapa inicial de la fermentación con presencia de ácido cítrico tiene un pH de 3.0 aproximadamente. Posteriormente, el pH aumenta a 4 con la conversión de ácido cítrico a ácido acético por las BAL, que no fueron inoculadas en nuestro CM.

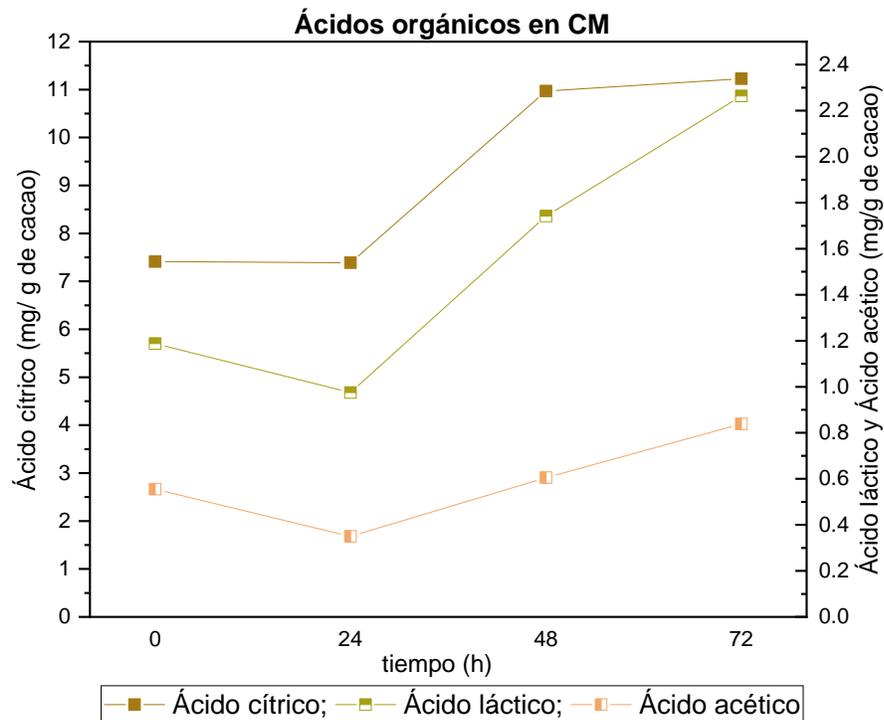


Figura 1. Comportamiento en la producción de ácidos orgánicos en CM siendo Eje X: tiempo (h); Eje Y-izquierdo: producción de ácido cítrico ( $\mu\text{g/g}$  de cacao); Eje Y-derecho: producción de ácido láctico y ácido acético ( $\mu\text{g/g}$  de cacao).

### Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron determinados en el CM, dado que la generación de estos compuestos en el cacao se lleva a cabo por la fermentación de un consorcio microbiano. La clasificación del grano de cacao en el mercado es determinada por su sabor y aroma. En el mercado mundial de cacao la categoría más alta es el “cacao fino” que se define por tener notas de sabor y aroma agradables. Por ejemplo, nuez, caramelo, frutal, melaza, floral y chocolate (Chetschik et al., 2017). En los granos fermentados por el consorcio de levaduras se identificaron 26 compuestos precursores de aroma que se pueden clasificar por grupos como se observa en la tabla IV.

Tabla IV. Compuestos volátiles precursores de aroma identificados en los granos de cacao fermentados después de 72 h en el CM.

Grupo	Compuesto aromático	Porcentaje %
Ésteres	Acetato de etilo	1.59 ± 0.29
	Éster etílico-ácido hexanoico	5.86 ± 0.72
	Éster etílico-ácido octanoico	1.43 ± 0.45
	Éster 2-etilhexílico-ácido hexanoico	0.63 ± 0.02
	Éster etílico-ácido benceno acético	0.05 ± 0.00
	Éster etílico-ácido decanoico	0.36 ± 0.00
Alcoholes	1-propanol	6.33 ± 0.19
	Etanol	61.05 ± 1.48
	3-metil-1-butanol	5.95 ± 0.39
	2-metil-1-propanol	1.55 ± 0.17
	2-pentanol	0.11 ± 0.02
	2-etil-hexanol	0.23 ± 0.05
	Alcohol fenil-etílico	6.23 ± 0.50
Aldehídos	2-metil-propanal	0.59 ± 0.02
	2-metil-butanal	0.80 ± 0.00
	3-metil-butanal	0.33 ± 0.06
	Benzaldehído	1.50 ± 0.33
	Benceno acetaldehído	2.07 ± 0.16
Pirazinas	Tetrametilpirazina	0.09 ± 0.01
Cetonas	Acetofenona	0.30 ± 0.02
Ácidos	2-metil-ácido propanoico	1.16 ± 0.01
	Ácido acético	0.88 ± 0.09
	3-hidroxi-ácido-dodecanoico	0.34 ± 0.09
	Ácido propanoico	0.13 ± 0.02
	Ácido butanoico	0.21 ± 0.00
	2-metil-ácido butanoico	0.23 ± 0.06

El grupo de compuestos predominante fueron los alcoholes con el 75.45 % del total de compuestos generados, seguido por los ésteres con 9.92 %. Siendo el etanol fue el compuesto volátil con mayor presencia en el CM con 61.05 ± 1.48 %. Estos resultados son asociados a que el alcohol es generado a partir de la glucosa presente en la pulpa del cacao principalmente por *S. cerevisiae*, la cual presentó mayor concentración celular durante el CM

con  $8.43 \times 10^7$  UFC/g. Así mismo, considerando que los ésteres derivan de la reacción de un alcohol y glucosa, posiblemente fueron sintetizados por las levaduras. Batista et al. (2016) y Koné et al. (2016) también reportaron un mayor número de compuestos ésteres en sus fermentaciones inoculadas con levaduras. Dentro del grupo de ésteres se observó la presencia del acetato de etilo, considerado un compuesto aromático clave del cacao (Koné et al., 2016). Es probable que esto influyera en la baja concentración observada de ácido acético  $0.84 \mu\text{g}$  a las 72 h del CM, porque el acetato de etilo es producto de la esterificación de ácido acético y alcohol (Rodríguez-Campos et al., 2011b; Pretorius, 2000). En el grupo de pirazinas, solo se detectó 1 compuesto la tetrametilpirazina. Sin embargo, (Rodríguez-Campos et al., 2011b) reportó un aumento en su concentración durante el secado del cacao y su detección al final del proceso. Por otra parte, la concentración de etanol junto con el aumento de temperatura, es crucial durante las etapas posteriores en la fermentación de cacao. Debido a que penetra parcialmente los cotiledones de las semillas y es oxidado por BAA en ácido acético. Que acidifican el cotiledón y promueven la degradación de proteínas, generando péptidos y aminoácidos, compuestos precursores de sabor y aroma (De Vuyst and Leroy, 2020; De Vuyst and Weckx, 2016; Kadow et al., 2015).

Los compuestos volátiles con notas aromáticas deseables para granos de cacao que predominaron en el CM fueron: tetrametilpirazina (asociada al aroma de chocolate, café con leche, terroso), alcohol fenil-etílico (asociado al aroma de miel, caramelo, rosa), 3-metil-butanol (asociado al aroma de malta, chocolate), 1-propanol (asociado al aroma de dulce o caramelo), 2-metil-butanol (asociado al aroma frutal y uva) y acetofenona (asociada al aroma floral, dulce, almendra) como se describe mejor en la tabla V.

Tabla V. Compuestos volátiles aromáticos generados durante el CM, y sus notas aromáticas asociadas.

Grupo	Compuesto aromático	Notas aromáticas asociadas
Ésteres	Acetato de etilo	Piña <sup>6,4</sup>
Ésteres	Hexanoato de etilo	frutal, manzana, plátano <sup>1</sup>
Ésteres	Octanoato de etilo	Frutal, floral, piña <sup>1</sup>
Ésteres	Hexanoato de 2-etilhexilo	
Ésteres	Fenilacetato de etilo	Dulce, miel <sup>1</sup>
Ésteres	Decanoato de etilo	Frutal <sup>7</sup> , pera, uva, brandy <sup>1</sup>
Alcoholes	1-propanol	Dulce <sup>4</sup> , caramelo <sup>1</sup>
Alcoholes	Etanol	
Alcoholes	3-metil-1-butanol	Malta <sup>8</sup>
Alcoholes	2-metil-1-propanol	Vino <sup>5</sup>
Alcoholes	2-pentanol	Hierba <sup>4</sup> , hierba suave <sup>1</sup>
Alcoholes	2-etil-hexanol	Rosa, dulce, cítrico, floral <sup>7</sup>
Alcoholes	Alcohol fenil-etílico	Rosa <sup>4</sup> , Miel <sup>5</sup> , caramelo <sup>5</sup>
Aldehídos	2-metil-propanal	Malta <sup>2</sup> , chocolate <sup>3</sup>
Aldehídos	2-metil-butanal	Malta <sup>2</sup> , chocolate <sup>7,5</sup>
Aldehídos	3-metil-butanal	Malta <sup>2</sup> , chocolate <sup>5</sup>
Aldehídos	Benzaldehído	Nuez <sup>7</sup> , Amargo <sup>1</sup>
Aldehídos	Benceno acetaldehído	
Pirazinas	Tetrametilpirazina	Café con leche <sup>3</sup> , chocolate <sup>7,5</sup> , tostado <sup>3,7,5</sup> , terroso <sup>2</sup>
Cetonas	Acetofenona	floral, dulce <sup>7</sup> , almendra <sup>1</sup>

Ácidos	Ácido 2-metilpropanoico	Rancio <sup>8</sup>
Ácidos	Ácido acético	Agrío <sup>2</sup>
Ácidos	Ácido 3-hidroxidodecanoico	
Ácidos	Ácido propanoico	Rancio <sup>8</sup>
Ácidos	Ácido butanoico	Sudoroso <sup>2</sup>
Ácidos	2-metil-ácido butanoico	Sudoroso <sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Bonvehí, 2005)

<sup>2</sup>(Frauendorfer & Schieberle, 2006)

<sup>3</sup>(Afoakwa et al., 2009)

<sup>4</sup>(Rodríguez-Campos et al., 2011b)

<sup>5</sup>(Rodríguez-Campos et al., 2012)

<sup>6</sup>(Ramos et al., 2014)

<sup>7</sup>(Batista et al., 2016)

<sup>8</sup>(Frauendorfer and Schieberle, 2008)

Es probable que la diferencia en los compuestos volátiles precursores de aroma generados durante el CM, fuera influenciada por la concentración celular, permanencia e interacciones de las especies en el consorcio. Como la presencia de *P. kluyveri* considerada una cepa aromática que produjo 55 compuesto aromáticos identificados en el chocolate elaborado con el cacao fermentado (Crafack et al., 2014). El cacao fue inoculado con *P. kluyveri*, *Lactobacillus fermentum* L18 y *Acetobacter pasteurianus* A149, y la fermentación duró 160 h. Aunque, en la fermentación en CM se detectó su presencia hasta las 24 h, se encontraron compuestos aromáticos como el 2-metilbutanal, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, alcohol fenil-etílico y fenilacetaldehído identificados en los chocolates de este estudio. No obstante, y considerando las condiciones de fermentación de este estudio, se lograron identificar 18 compuestos volátiles precursores de aromas de un cacao fino en lo granos fermentados por el consorcio conformado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora opuntiae*.

## CONCLUSIÓN

Los resultados mostraron que *Saccharomyces cerevisiae* fue la cepa predominante durante las fermentaciones tanto en CP como en CM. Además, fue la cepa con mayor consumo de azúcares disponibles en la pulpa de cacao en los CP. La fermentación de cacao criollo por el consorcio conformado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniospora Opuntiae* aisladas de la fermentación espontánea, tuvo impacto en la generación de 26 compuestos volátiles precursores de aroma. Dichos compuestos se clasificaron en 6 grupos: ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos, cetonas y pirazinas. Del total de compuestos detectados, se encontraron 18 compuestos deseables para un cacao fino. Durante la fermentación en CM se encontró además ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético. Dado que la presencia de *P. kluyveri* solo se detectó hasta las 24 h de fermentación se propone en una siguiente etapa, incrementar la concentración de inóculo con el propósito de obtener mayor potencial aromático.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo y financiamiento a CONACYT (240260) y al Eco Museo del Cacao Maya por proporcionar la materia prima para el desarrollo de los experimentos.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

- Afoakwa, E.O., 2014. Changes during fermentation of cocoa beans, Effects of fermentation and Reduced Pod Storage on Cocoa Pulp and cocoa bean quality. En "Cocoa Production and Processing Technology, Taylor & F. ed". CRC Press, 121-136, 205 - 248.
- Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A., 2009. Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food Chemistry*, 113, 208–215.
- Batista, N.N., Ramos, C.L., Dias, D.R., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F., 2016. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal Food Science Technology*, 53, 1101–1110.
- Batista, N.N., Ramos, C.L., Ribeiro, D.D., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F., 2015. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science Technology*, 63, 221–227.
- Bonvehí, J.S., 2005. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research Technology*, 221, 19–29.
- Castro-Alayo, E.M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., Cardenas-Toro, F.P., 2019. Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon* 5, e01157.
- Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., Schlüter, A., Bernath, K., Hühn, T., 2017. Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C.E., Petersen, M.A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S., 2014. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 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., Nielsen, D.S., 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 167, 103–116.
- Daniel, H.M., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P., De Vuyst, L., 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9, 774–783.
- de Melo Pereira, G. V., Magalhaes, K.T., de Almeida, E. g., da Silva Coelho, I., Schwan, R.F., 2013. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical – chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 121 - 133.
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2020. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol. Reviews*, 44, 432–453.
- De Vuyst, L., Weckx, S., 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 5–17.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Fraudendorfer, F., Schieberle, P., 2008. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56, 10244–10251.
- Fraudendorfer, F., Schieberle, P., 2006. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on

- molecular sensory correlations. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 54, 5521–5529.
- Goddard, M.R., 2008. Quantifying the complexities of *saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89, 2077–2082.
- Green, S.R., Gray, P.P., 1951. A differential procedure for bacteriological studies useful in the fermentation industry. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 32, 59–69.
- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K.B.D., Montet, D., Meile, J.C., 2015. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117–122.
- Ho, V.T.T., Fleet, G.H., Zhao, J., 2018. Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal Food Microbiology*, 279, 43–56.
- Ho, V.T.T., Zhao, J., Fleet, G., 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 174, 72–87.
- Jepersen, L., Nielsen, D.S., Hønholt, S., Jakobsen, M., 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5, 441–453.
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S., Lieberei, R., 2015. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 357–361.
- Koné, M.K., Guéhi, S.T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A.F., Brou, K., Boulanger, R., Montet, D., 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910–917.
- Meersman, E., Struyf, N., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Santiago, J.S., Baert, E., Hemdane, S., Vrancken, G., Verstrepen, K.J., Courtin, C.M., Hendrickx, M., Steensels, J., 2017. Characterization and Degradation of Pectic Polysaccharides in Cocoa Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9726–9734.
- Miles, A.A., Misra, S.S., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, (London), 38, 732–749.
- Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L., Shirai, K., 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*, 12, 3285–3290.
- Pereira, G.V. de M., Miguel, M.G. da C.P., Ramos, Cí.L., Schwan, R.F., 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5395–5405.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675–729.
- Ramos, C.L., Dias, D.R., Miguel, M.G. da C.P., Schwan, R.F., 2014. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908–918.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Contreras-Ramos, S.M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., Lugo-Cervantes, E., 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132, 277–288.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M.E., 2011a. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44, 250–258.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M.E., 2011b. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44, 250–258.
- Romanens, E., Näf, R., Lobmaier, T., Pedan, V., Leischtfeld, S.F., Meile, L., Schwenninger, S.M., 2018. A lab-scale model system for cocoa bean fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 3349–3362.

Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., Cocolin, L., 2017. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal Food Microbiology*, 257, 31–40.