



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Conservación de levaduras por microencapsulación con alginato de sodio

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor:

Juan Sebastián Muñoz Arpi

Director:

Ing. María Alicia Peña González., Msc.

CUENCA-ECUADOR

2024

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a Dios, quien me guio por un buen camino, dándome las fuerzas necesarias para poder seguir por el camino de la educación.

A mi mamá por haber sido mi guía, apoyo, inspiración y mi fuente de perseverancia y esmero, una mujer que supo cómo encarar las adversidades y darnos el ejemplo de salir adelante a pesar de todo lo que pueda pasar alrededor.

Y por último le dedicó a mi Abuela que siempre me ha alentando a seguir esta carrera creyendo en uno, dándome fuerzas, enseñándome a no desmayar y a seguir adelante.

Agradecimientos

Primero, especialmente agradecimientos a mi familia por darme la oportunidad de poder convertirme en profesional, con mucho sacrificio y esfuerzo y apoyo a lo largo de la carrera.

A mi mamá, por su paciencia y comprensión que ha sido de gran ayuda al vencer grandes dificultades presentes, siempre mejorando de acuerdo a los principios dados por su ejemplo.

A todas las personas de la escuela de ingeniería en alimentos que han contribuido a mi formación personal y profesional, a todos los docentes que mediante sus enseñanzas nos pudieron traspasar sus conocimientos y experiencias vividas a lo largo de sus vidas para poder contribuir al desarrollo de un nuevo ingeniero. A las personas del laboratorio, por su constante paciencia y ayuda, buena actitud y experiencia que ha sido importante para seguir ganando más conocimientos.

De manera muy importante le agradezco a la Mgst. María Alicia Peña, directora de la tesis quien de manera muy paciente y gentil me compartió y brindó sus conocimientos y experiencias vividas en mi para culminar exitosamente esta investigación, la Ing. Nicole Sarmiento, quien me dio su ayuda y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo.

Resumen:

La encapsulación con alginato de sodio ha demostrado ser una técnica confiable para la conservación de microorganismos, permitiéndolos almacenar por largos periodos sin afectar su viabilidad y estabilidad. En este estudio, se evaluó la encapsulación como método de almacenamiento para las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* aisladas de la fermentación del cacao. Se elaboraron microcápsulas de alginato de sodio con cada cepa de levadura y se evaluó su viabilidad (mediante siembra en placas) y vitalidad (tinción con azul de metileno) después de 60 días de almacenamiento. También se realizaron análisis macroscópicos y microscópicos de las levaduras antes y después de la encapsulación. Los resultados confirmaron la viabilidad de los encapsulados de levadura, ya que todas las cepas crecieron al ser reactivadas después de 60 días de almacenamiento. Sin embargo, se observó una disminución en la tasa de células vivas durante el almacenamiento, siendo *Pichia kudriavzevii* la especie que presentó el mayor número de colonias activas. Las características morfológicas de las levaduras se conservaron en los encapsulados durante los 60 días de almacenamiento.

Palabras clave: levaduras, viabilidad, vitalidad, encapsulación, alginato de sodio.

Abstract

Sodium alginate encapsulation has proven to be a reliable technique for the preservation of microorganisms, allowing them to be stored for long periods without affecting their viability and stability. In this study, encapsulation was evaluated as a storage method for the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, and *Pichia kudriavzevii* isolated from cocoa fermentation. Sodium alginate microcapsules were prepared with each yeast strain and their viability (by plate counting) and vitality (methylene blue staining) were evaluated after 60 days of storage. Macroscopic and microscopic analyses of the yeasts were also performed before and after encapsulation. The results confirmed the viability of the yeast encapsulates, as all strains grew when reactivated after 60 days of storage. However, a decrease in the rate of live cells was observed during storage, with *Pichia kudriavzevii* being the species that presented the highest number of active colonies. The morphological characteristics of the yeasts were preserved in the encapsulates during the 60 days of storage.

Keywords: yeasts, viability, vitality, encapsulation, sodium alginate.

Índice de Contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen:	iv
Abstract	iv
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
1.1 Fermentación de cacao:	3
1.2 Rol de las levaduras durante la fermentación del cacao	3
1.3 Métodos de conservación de microorganismos	4
MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1 Reactivación de las levaduras	7
2.2 Encapsulación de levaduras	7
2.3 Evaluación de la viabilidad y vitalidad de las levaduras encapsuladas	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
3.1 Encapsulación de levaduras	10
3.2 Viabilidad de levaduras encapsuladas	10
3.3 Vitalidad de las levaduras encapsuladas	12
3.2 Análisis Macroscópico de las levaduras	14
3.4 Análisis de la morfología de las levaduras.	17
Conclusiones	22
Recomendaciones	23
Referencias bibliográficas:	24
ANEXOS	28
Anexo 1. Análisis de viabilidad de las levaduras encapsuladas y almacenadas por 60 días.....	28

Índice de tablas

Tabla 1 Tabla de conteo de las colonias(levaduras) formadas, tras 60 días de almacenamiento	11
Tabla 2 Análisis Macroscópico de las levaduras	13
Tabla 3 Porcentaje de levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia Klivery</i> y <i>Pichia Kudriavzevii</i>	16
Tabla 4 Análisis morfológico y viabilidad de las levaduras encapsuladas (tiempo cero y después de 60 días de almacenamiento)	20

Índice de figuras

Figura 1 Esferas obtenidas después de la encapsulación de las levaduras	10
--	----

Índice de Anexos

Anexo 1. Análisis de viabilidad de las levaduras encapsuladas y almacenadas por 60 días	28
--	----

INTRODUCCIÓN

El cacao es la materia prima para la elaboración del chocolate, un producto que tiene gran demanda a nivel mundial. Ecuador es uno de los principales productores, ocupando el sexto lugar de la producción global, además es el proveedor del 65% del cacao fino de aroma (Beg et al., 2017). Este tipo de cacao es muy apetecido por sus características organolépticas, siendo de gran importancia las notas florales y frutales que poseen este tipo de granos (Escobar et al., 2021). Sin embargo, en el Ecuador se cultivan dos variedades de cacao: Fino de Aroma, que como se mencionó anteriormente poseen un excelente aroma y sabor y el CCN-51, que tiene un mejor rendimiento y resistencia a plagas, pero su calidad sensorial es inferior (Boza et al., 2014). Es importante mencionar que la calidad de los granos de cacao no solo depende de su variedad genética, sino de los procesos de postcosecha, siendo los más importantes la fermentación y el tostado (Febrianto, 2022).

Según Schwan et al., (2014.), el microbiota presente durante la fermentación del cacao está compuesta por levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA). Durante la fermentación del cacao están presentes dos etapas importantes; en la primera etapa, las levaduras proliferan en los azúcares reductores y el ácido cítrico de la pulpa y producen etanol y dióxido de carbono. Al mismo tiempo, las temperaturas y debido a reacciones anaeróbicas, permite que se desarrollen las BAL y BAA. Las BAL transforman principalmente azúcares y ácidos orgánicos en ácido láctico y, en condiciones aeróbicas, las BAA convierten el etanol en ácido acético. La segunda etapa implica la muerte del embrión, debido a las altas concentraciones de etanol y ácido acético, y el aumento de las temperaturas (Camu et al., 2007).

Durante la fermentación del cacao, los géneros de levaduras más comúnmente encontrados son: *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Candida*. En cuanto a las especies de levaduras más predominantes que se han encontrado en procesos de fermentación espontánea del cacao son, en orden decreciente de abundancia relativa: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia manshurica*, *Pichia kluyvert* y *Candida tropicalis*. Otros géneros de levadura que aparecen en procesos espontáneos de fermentación del cacao, pero con menores abundancias relativas son: *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Rhodotolura* (Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2022).

Las actividades funcionales de los diferentes grupos de microorganismos, han sido expuestas en revisiones realizadas sobre la fermentación de los granos de cacao, en donde se explica que las levaduras inician una fermentación alcohólica de los azúcares presentes en la pulpa,

generando etanol, el cual se difunde en el interior del grano causando la muerte del embrión y desencadenando reacciones bioquímicas, que producen los precursores del sabor del chocolate (Zhao & Fleet, .2014). Específicamente las levaduras, cumplen un rol fundamental dentro de la fermentación del cacao, pues los granos de cacao crudos poseen un sabor amargo y astringente debido a la presencia de compuestos fenólicos principalmente (Papalexandratou & Nielsen 2016). Durante la fermentación del cacao, estos compuestos fenólicos se descomponen y se eliminan por la actividad metabólica (Camu et al., 2008). Este proceso además permite la descomposición enzimática de proteínas y carbohidratos dentro de los granos, que llevan al desarrollo de diversos compuestos aromáticos. Los microorganismos fermentan la pulpa jugosa de los granos de cacao mediante diferentes métodos, generalmente siguiendo una fase anaeróbica y una aeróbica. Durante la fase anaeróbica, las levaduras consumen los azúcares de la pulpa (sacarosa, glucosa, fructosa) mediante la respiración anaeróbica para producir dióxido de carbono, etanol y bajas cantidades de energía. La etapa aeróbica está dominada por bacterias productoras de ácido láctico y ácido acético (Flota & Zhao 2018).

Según Lefeber et al. (2012) los objetivos de desarrollar cultivos iniciadores para la producción de cacao es mejorar y estandarizar la calidad de los granos y controlar la fermentación para evitar posibles contaminaciones; y por ende el desarrollo de sabores extraños y una inadecuada fermentación. Para este fin, se aíslan microorganismos con un adecuado potencial metabólico, a partir de fermentaciones de alimentos. Estos microorganismos, deben ser almacenados en condiciones adecuadas que garanticen su viabilidad y vitalidad a largo plazo. En este sentido, se pueden encontrar diversos métodos para la conservación de microorganismos, siendo la criopreservación la más común. Sin embargo, esta técnica presenta la desventaja de que con largos períodos de almacenamiento los microorganismos, pueden perder su viabilidad ya que dejan de crecer y su estructura se deteriora por efecto del estrés al que están sometidas.

Con los antecedentes antes expuestos, esta investigación se centra en el estudio del almacenamiento de levaduras aisladas del cacao, mediante la técnica de encapsulación con alginato de sodio, esto con el propósito de almacenar levaduras provenientes de la fermentación de granos de cacao, que conservan su viabilidad, características y funciones intactas durante largos periodos de tiempo.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Fermentación de cacao:

La fermentación del cacao es un proceso crucial dentro de los tratamientos postcosecha, el cual se compone por varias etapas. Comienza con la apertura de las vainas y la extracción de los granos, que están cubiertas de la pulpa rica en azúcares y agua (López-Hernández et al., 2017). La fermentación inicia con la actividad de las levaduras, las cuales transforman los carbohidratos en etanol y dióxido de carbono, seguido por el desarrollo de las bacterias ácido lácticas que aumentan la acidez y modifican la composición de la pulpa. A medida que avanza la fermentación, se introduce oxígeno, lo que favorece el crecimiento de bacterias ácido acéticas, generando ácido acético y elevando la temperatura por las reacciones exotérmicas que se suscitan. También pueden desarrollarse hongos filamentosos, que pueden estar asociados con la presencia de sabores desagradables (Ordoñez-Araque et al., 2020).

En la fermentación del cacao se desarrollan inicialmente reacciones microbianas en la pulpa y finalmente en los cotiledones, las cuales producen cambios significativos en la composición química y propiedades sensoriales del cacao. Las levaduras desempeñan un papel importante en la degradación de la pulpa y la producción de compuestos aromáticos, mientras que las bacterias lácticas y acéticas contribuyen a la acidificación y generación de sabores específicos. La temperatura, el pH y la disponibilidad de oxígeno son factores clave que regulan el desarrollo de los microorganismos y la calidad del cacao fermentado (Schwan & Wheals, 2004)

1.2 Rol de las levaduras durante la fermentación del cacao

La principal función metabólica de las levaduras es realizar una fermentación alcohólica de los azúcares de la pulpa, para producir principalmente etanol, dióxido de carbono y una amplia gama de metabolitos secundarios, tales como: alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, cetonas, azufre, nitrógeno volátil. Estos metabolitos generalmente tienen un alto impacto en el sabor y se difunden en el grano afectando la calidad del cacao.

Además, de la fermentación alcohólica a las levaduras también se les atribuye las siguientes actividades metabólicas: aceleración del consumo de carbohidratos, actividad pectinolítica y la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos (Lefeber et al., 2012; Batista et al., 2015).

En varias investigaciones se ha estudiado el efecto de la incorporación de distintas especies de levaduras en la fermentación de cacao. La especie de levadura con la que más se ha trabajado es la *Saccharomyces cerevisiae*, los resultados demuestran algunas ventajas obtenidas por su incorporación como cultivo iniciador, entre las cuales se pueden citar: aumento más rápido de la temperatura, mayor porcentaje de granos fermentados, adecuadas tasas de producción de etanol y ácido acético, disminución de diversidad de levaduras (Lefeber et al., 2012; Meersman et al., 2016). Por el contrario, en algunas investigaciones, se ha reportado que la inclusión de levaduras en el proceso de fermentación no tuvo un efecto significativo en el chocolate obtenido (Schwan., 1998; Romanens et al., 2020).

Las principales levaduras identificadas en la fermentación espontánea de cacao son en orden decreciente de abundancia relativa: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia manshurica*, *Pichia kluyveri*, y *Candida tropicalis* (Díaz-Muñoz & De Vuyst., 2022).

1.3 Métodos de conservación de microorganismos

La conservación de microorganismos no es una tarea sencilla. Se requiere de un método eficaz que asegure la viabilidad, pureza y estabilidad del microorganismo durante su almacenamiento (Weng et al., 2005). Para ello, se han desarrollado diversas técnicas de preservación que permiten a la industria contar con microorganismos puros y con buena actividad metabólica para la obtención de diferentes productos.

Dado que existen diferentes métodos de conservación, la clave está en identificar la técnica más adecuada para cada caso, buscando un mínimo de 70% de supervivencia celular por un período considerable de tiempo. La población sobreviviente debe ser lo más similar posible a la original, para garantizar que se conserven las propiedades de interés del cultivo y se minimicen cambios genéticos indeseados.

Existen varias técnicas y métodos para la conservación de microorganismos, los más importantes se detallan a continuación:

1.3.1 Congelación: Los microorganismos se mantienen a temperaturas muy bajas, generalmente a -70°C y -196°C utilizando nitrógeno líquido, esta disminución de temperatura ralentiza las actividades metabólicas y reduce el daño celular, permitiendo la conservación a largo plazo (Weng et al., 2005). El almacenamiento por congelación puede reducir la

contaminación de microorganismos del material que se está congelado, por la drástica disminución de la actividad del agua.

Según Wójcik-Stopczyńska & Jadcak (2007) la congelación es más destructiva para las bacterias que para los hongos y levaduras. Después de la congelación, el porcentaje de supervivencia promedio de las bacterias es de 28 % a 95 %, mientras que en las levaduras y mohos es de 77-78% y 76-96% respectivamente.

1.3.2 Liofilización: La preservación de microorganismos mediante desecación ha sido el método preferido para el almacenamiento de microorganismos a largo plazo (Costa et al., 2000). Esta técnica consiste en eliminar el agua de un material biológico (microorganismo) a través de la sublimación. La sublimación es el proceso mediante el cual el agua pasa directamente del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido; por lo que, básicamente se deshidratan los microorganismos para detener cualquier acción o reacción bioquímica y actividad metabólica.

La liofilización, si bien es una técnica útil para la conservación de microorganismos, tiene el inconveniente de reducir su actividad y función celular. Este proceso puede ocasionar daño celular que, en última instancia, conduce a la pérdida de funcionalidades o incluso a la muerte del microorganismo (Wang et al., 2020).

Para evitar estos daños, es crucial la incorporación de sustancias protectoras durante el proceso de liofilización. Estas sustancias actúan como escudos, mitigando el impacto negativo del proceso en las células microbianas.

Es común la aplicación de glicerol en la conservación de microorganismos (Erol et al., 2021). El glicerol también conocido como crioprotector, ayuda a proteger a los microorganismos de los daños causados por la congelación, especialmente por la formación de cristales de hielo que pueden dañar las células. Este compuesto es capaz de penetrar en las células y reducir la formación de cristales de hielo, lo que mejora la viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento (Fuller, 2004).

1.3.3 Cultivo Continuo: Consiste en mantener los microorganismos en un estado activo de crecimiento continuo, proporcionando nutrientes constantemente. Este método implica mantener las células en un estado estacionario mientras se cambia continuamente un parámetro ambiental se mantiene constante (Adamberg et al., 2015). Este método presenta la desventaja de que no se puede garantizar la estabilidad genética, por la alta alternancia de generaciones, lo que incide que con el tiempo las células que se están guardando serán descendientes muy lejanas de las células iniciales, por lo que, es posible que ya no conserven algunas de sus características. A fin de minimizar este inconveniente, se pueden seguir las siguientes estrategias: disminución de la cantidad de inóculo; rebajar la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inocular en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido.

1.3.4 Encapsulación: Los métodos de encapsulación se basan en recubrir o atrapar un material o mezcla de materiales dentro de una matriz. El material que está recubierto o atrapado es mayoritariamente líquido, pero puede ser sólido o gas. El encapsulante se conoce como material de pared (Risch.,1995). La encapsulación es una técnica interesante para el almacenamiento de microorganismos, misma que puede ofrecer varias ventajas tales como: facilidad de separación y recuperación de biomasa, menor riesgo de contaminación microbiana, mayores densidades celulares y cargas celulares, tiempos de reacción más cortos y calidad constante del producto (Nedovic et al., 2011). La encapsulación también protege a las levaduras de entornos potencialmente agresivos y permite liberarlas de forma activa, es decir, en lugares específicos y con un ritmo de liberación deseado (Coradello & Tirelli., 2021). Esta técnica podría utilizarse para desarrollar cultivos iniciadores de levaduras de alta calidad para la fermentación del cacao.

1.3.5 Alginato de sodio: El alginato de sodio es un polímero que se utiliza en la encapsulación de células de levaduras. Este compuesto se obtiene de algas pardas, principalmente la laminaria *hyperborea*. El alginato de sodio tiene propiedades útiles en la encapsulación debido a su capacidad para formar una red cuando entran en contacto con cationes bivalentes, como el calcio. Esta red puede adoptar la forma de una cápsula o perla, proporcionando un entorno protector para las células de levaduras encapsuladas. En un estudio realizado por Utami et al. (2024) se empleó el alginato de sodio como un medio para proteger las células de levaduras durante el proceso de secado y almacenamiento, demostrando que se mejora su viabilidad.

Se realizó un estudio en el que se utilizó alginato de sodio para la encapsulación de *Candida tropicalis*, se evaluó la viabilidad de células de levaduras y su influencia en la producción de pan. Para este estudio, se utilizaron concentraciones de alginato de sodio del 10% al 15 %. El análisis estadístico mostró efectos significativos, especialmente a una concentración del 15% de alginato de sodio. Los resultados sugieren que el alginato de sodio tiene el potencial de mejorar la viabilidad de la levadura y la calidad del pan (Utami et al., 2024).

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

Para esta investigación se trabajó con las siguientes especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii*. Las cuales fueron previamente aisladas de una fermentación de cacao y se encontraban almacenadas en el banco de microorganismos del laboratorio de biotecnología de la Universidad del Azuay.

2.1 Reactivación de las levaduras

Se tomaron 20 μ L del stock de levadura respectivo y se inoculó en placas PDA (Agar Dextrosa-Papa), las cuales se distribuyeron en toda la placa mediante la técnica de rastrillo. Se dejó incubar a 30 ° C durante 24 a 48 horas dependiendo del tipo de levadura, hasta que se evidencie crecimiento de colonias.

2.2 Encapsulación de levaduras

Para la encapsulación de las levaduras, se siguió el protocolo descrito por Bokkhim et al., (2018) en el cual, de las placas obtenidas de la reactivación de levaduras, se procedió a raspar las colonias de la superficie con un bisturí estéril, dentro de la cámara de flujo laminar y teniendo cuidado de no tomar medio de cultivo. Para la encapsulación, las colonias de las levaduras se colocaron en una solución de alginato de sodio al 1,5% (p/v) y se mantuvieron bajo condiciones de agitación, en un agitador magnético (Thermolyne; Estados Unidos) durante una hora, con el fin de garantizar una correcta homogeneización.

Posteriormente, se procedió a filtrar la solución de alginato con la levadura a través de un tamiz metálico previamente esterilizado, el material retenido en el filtro se descartó.

Para formar las cápsulas de levadura, con una micropipeta se tomó 1000 μ L de la solución de alginato con levadura y se realizó un goteo a una altura de aproximadamente 2 cm sobre la solución encapsulante de cloruro de calcio 0,1 M, esta operación se realizó con agitación constante.

Al entrar en contacto las gotas de la solución de alginato se forman inmediatamente las perlas, que en su interior contienen la levadura utilizada. Las perlas formadas se dejan por un lapso de 20 minutos en la solución encapsulante para asegurar una correcta gelificación.

Finalmente, con un tamiz metálico estéril se recogieron las perlas de alginato de sodio con la levadura y se colocaron en una solución crioprotectora de sacarosa estéril 0,75 M a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se recogieron las perlas y se colocaron en cajas Petri para su proceso de secado, lo cual se realizó dentro de una estufa (Esco Isotherm; Singapur) a 25 °C durante 24 a 48 horas, hasta que estén completamente secas. Las perlas obtenidas se almacenaron en crioviales y se mantuvieron almacenadas bajo condiciones de refrigeración a 4°C.

2.3 Evaluación de la viabilidad y vitalidad de las levaduras encapsuladas

2.3.1 Evaluación de la viabilidad

Para evaluar si las levaduras encapsuladas conservan su viabilidad, se recurrió al método de conteo de colonias crecidas. Esta determinación se realizó después de 60 días de almacenamiento de los encapsulados. Para lo cual, se colocó una perla en tubos de 5ml con caldo PDB (Papa-Dextrosa), posteriormente se dejó en incubación a 30° C por 24 horas. De la biomasa obtenida se realizaron diluciones 10^{-2} y 10^{-4} y se sembraron en placas PDA (con la dilución 10^{-4}), se dejó incubar a 30 °C por 24 o 48 horas, dependiendo de la levadura sembrada para poder observar su crecimiento y posteriormente realizar las tinciones.

2.3.2 Evaluación de la vitalidad

2.3.2.1 Análisis macroscópico de las levaduras

Para evaluar si las levaduras encapsuladas conservan sus características propias de su identidad y estado de las mismas, se realizó un análisis macroscópico de las colonias crecidas en placas, para lo cual, se tomaron en cuenta los siguientes descriptores: color, forma, tamaño y textura.

Este análisis se realizó de las levaduras reactivadas de las perlas.

2.3.2.2 Análisis microscópico de las levaduras

Para este ensayo, de cada una de la especie de levadura encapsulada se colocaron tres perlas en placas (PDA) y se dejó crecer, una vez que se visualizaron las colonias se realizaron tinciones de azul de metileno. Para lo cual, con un asa circular estéril se picaron las colonias formadas alrededor de la perla y se esparció sobre el portaobjetos, posteriormente se sumergió en una solución de azul de metileno por un minuto. Finalmente, se realizaron las observaciones en el microscopio (Olympus CX21/NSI) con lente 40x.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

3.1 Encapsulación de levaduras

Las perlas de alginato de calcio encapsulando levaduras presentaron una forma predominantemente esférica, aunque algunas exhibieron ligeras irregularidades. La Figura 1 ilustra las esferas obtenidas. Cabe destacar que las microcápsulas presentaron un diámetro aproximado de 2 mm.

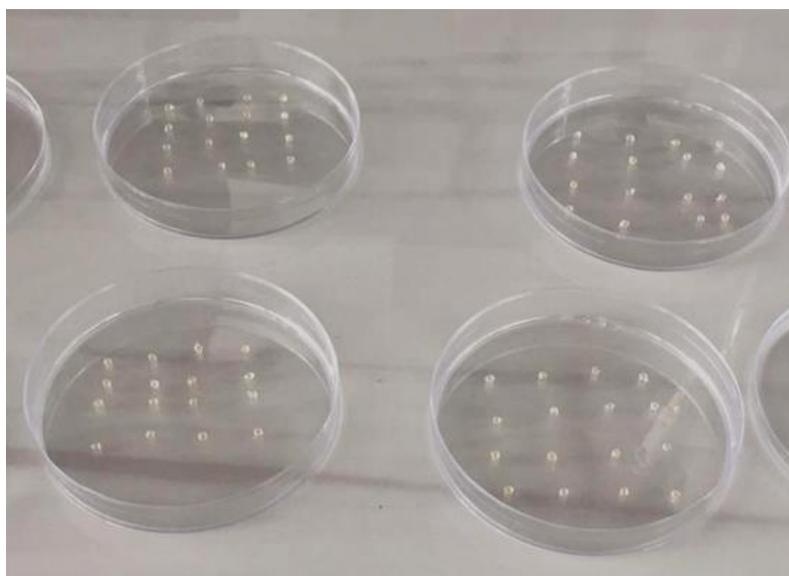


Figura 1. Esferas obtenidas después de la encapsulación de las levaduras

3.2. Viabilidad de levaduras encapsuladas

Para analizar la viabilidad de las levaduras se realizó una siembra de los encapsulados con la levadura al momento cero y posterior a 60 días de almacenamiento. Como se puede evidenciar en la Tabla 1., en todos los casos si hubo crecimiento de colonias de los encapsulados, lo que nos permite concluir que la encapsulación si puede ser un método efectivo en la conservación de microorganismos ya que no se vio afectada la viabilidad.

Tabla 1. Resultados expresados en UFC/ml de levaduras presentes en placas

Levadura	Tiempo de incubación (horas)	Después del almacenamiento (60 días) UFC/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Réplica-1)	48	214x10 ⁴
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Réplica-2)	48	630x10 ⁴
<i>Pichia kluyveri</i> (Réplica-1)	24	172x10 ⁴
<i>Pichia kluyveri</i> (Réplica-2)	24	395x10 ⁴
<i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-1)	24	15x10 ⁵
<i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-2)	24	342x10 ⁴
<i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-3)	24	370x10 ⁴

Se observa una cierta variabilidad en el número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) entre las diferentes cepas y réplicas. Esto podría deberse a ciertos factores, tales como: diferencias iniciales en la viabilidad de las levaduras utilizadas, variación de la carga microbiana en el proceso de encapsulación y diferencias dadas en el proceso de sembrado.

En una investigación en la cual se evaluó la encapsulación en levaduras utilizadas para producción de vino, reportaron resultados favorables en cuanto a viabilidad, llegando a una tasa 90%, estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo (Marañón et al., 2008).

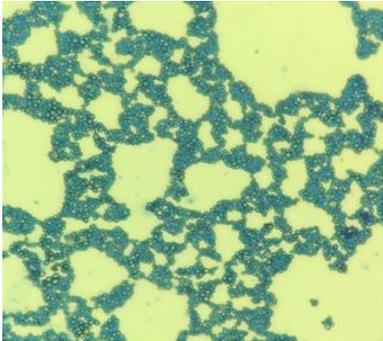
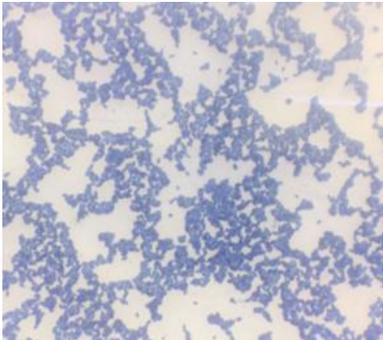
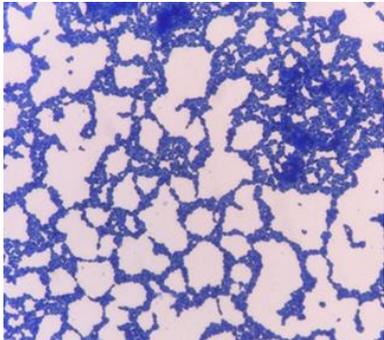
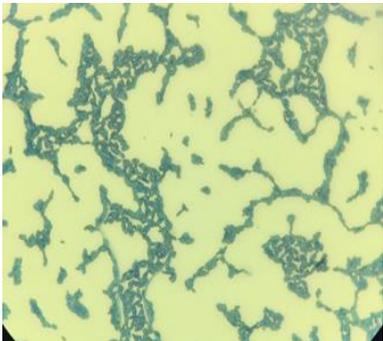
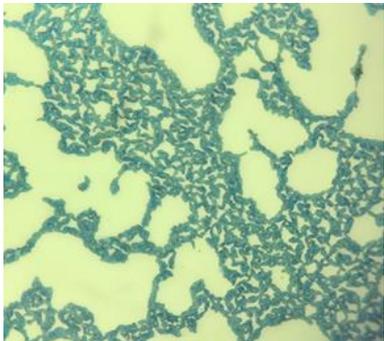
Así mismo en un estudio reportado por Gulli et al. (2020) en el cual evaluaron la encapsulación de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando cuatro matrices diferentes: alginato de sodio reticulado con Ca^{2+} y quitosano, alginato de sodio reticulado con Ca^{2+} , alginato Protanal reticulado con Ca^{2+} y quitosano, y alginato Protanal reticulado con Ca^{2+} . Los resultados demostraron que los encapsulados conservaron una buena viabilidad destacando el que contenía alginato Protanal reticulado con Ca^{2+} y quitosano, incluso se reportó un aumento en la tasa de producción de etanol. Estos resultados sugieren que al igual que en este estudio, la encapsulación permite almacenar levaduras por períodos largos de tiempo.

3.3 Vitalidad de las levaduras encapsuladas

La evaluación de la vitalidad de las levaduras encapsuladas es crucial para garantizar su eficacia en diversas aplicaciones, pues permite determinar si efectivamente se está entregando células activas. Por lo tanto, esta evaluación implica determinar la proporción de células encapsuladas que permanecen vivas y funcionales después del proceso de encapsulación y durante su almacenamiento o uso. Para ello se utilizó el método de azul de metileno que está basado en que las células muertas tienen membranas celulares permeables que permiten el ingreso del azul de metileno, uniéndose a componentes celulares como el ADN y proteínas. En contraste, las células vivas poseen membranas celulares semipermeables que actúan como barrera, impidiendo el paso del azul de metileno y manteniendo el tinte fuera de la célula. De esta manera, las células conservan su transparencia. Por lo tanto, al observar las levaduras teñidas bajo el microscopio, las células incoloras se consideran viables, mientras que las células azules se consideran no viables (Kwolek et al., 2014).

Tabla 2

Observación y Análisis de las levaduras mediante tinción con azul de metileno

Levadura	Tiempo cero	Después del almacenamiento (60 días)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Pichia kluyveri</i>		
<i>Pichia kudriavzevii</i>		

La Tabla 2 muestra la tinción con azul de metileno de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el tiempo cero y después del almacenamiento (60 días). En el tiempo cero, las células presentan una coloración menos intensa, lo que indica una menor cantidad de azul de metileno penetrando en la membrana celular, por lo que se puede presumir que se tiene una mayor tasa de células vivas. Sin embargo, también se observan algunas células con una mayor intensidad

de azul, lo que confirma la muerte de algunas levaduras en ese momento. Después del almacenamiento, la coloración es más intensa, lo que sugiere una mayor cantidad de células muertas. Se observa un menor número de células incoloras, lo que indica una menor viabilidad de las levaduras después del almacenamiento. Estos resultados difieren con los reportados por Qi et al. (2006) quienes afirman que tuvieron un gran crecimiento microbiano después de la encapsulación, esta diferencia en los resultados puede deberse a que en ese estudio se incluyó quitosan en la matriz de la encapsulación.

Un comportamiento similar se evidencia en el caso de la levadura *Pichia kluyveri*, en la que se puede observar una disminución de células vivas después del almacenamiento a los 60 días, para este caso incluso es más notorio la pérdida de viabilidad. Este hecho puede estar asociado a que la concentración de la solución de azúcar que se utilizó en esta experimentación podría no haber sido la más adecuada y no ejerció su efecto como crioprotector.

Por otro lado, en cuanto a la levadura *Pichia kudriavzevii* se evidencia que todavía conserva una adecuada viabilidad después del almacenamiento, pues como se observa en la tabla el color de las células teñidas no es muy intenso y se ve una proporción alta de células viables. Según un estudio reportado por Cozmuta et al. (2021) en el que se encapsularon levaduras para panificación en alginato de sodio, se mostró que el uso de almidones mejoró la viabilidad de las levaduras, por lo cual, se podría mejorar la tasa de viables en las levaduras encapsuladas incorporando almidón en la matriz.

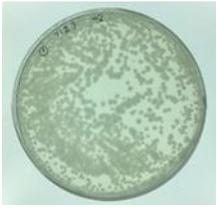
3.2 Análisis Macroscópico de las levaduras

En la Tabla 3 se muestran las características macroscópicas de las levaduras con las que se trabajó en la presente investigación. Como se puede evidenciar en cada una de las réplicas de las diferentes especies de levaduras, las características macroscópicas son las mismas y se observa que las colonias de cada especie tienen sus propias características.

Por otro lado, los descriptores indicados en las tablas para las levaduras utilizadas en este estudio coinciden con las reportadas en la investigación reportada por Maita & Vele (2022).

Tabla 3 Análisis Macroscópico de las levaduras

Levadura	Color	Forma	Tamaño	Fotografía
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Replica-1)	Las colonias tienen un color blanco.	Su forma es circular.	Tienen un tamaño muy pequeño, casi imperceptible a simple vista.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Replica-2)	Las colonias tienen un color blanco.	Su forma es circular.	Tienen un tamaño pequeño, pero con cierta visibilidad a simple vista.	
<i>Pichia kluyveri</i> (Réplica-1)	Su color tiende a ser blanco y/o crema.	Su forma es circular, pero tiene bordes irregulares.	Tienden a ser más grandes que las <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con un diámetro mediano.	
<i>Pichia kluyveri</i> (Réplica-2)	Su color tiende a ser blanco y/o crema.	Su forma es circular, pero tiene colonias irregulares.	Como tiene formas irregulares su diámetro también va a ser irregular con diámetros desde pequeños hasta medianos.	

<p><i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-1)</p>	<p>Su color tiende a ser blanco y/o crema.</p>	<p>Su forma es circular, pero con algunas colonias irregulares.</p>	<p>Tienden a ser más grandes que las <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con un diámetro pequeño a medianos.</p>	
<p><i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-2)</p>	<p>Su color tiende a ser blanco y/o crema.</p>	<p>Su forma es circular, pero tiene colonias irregulares.</p>	<p>Como tiene formas irregulares su diámetro también va a ser irregular con diámetros desde pequeños hasta medianos.</p>	
<p><i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-3)</p>	<p>Su color tiende a ser blanco y/o crema.</p>	<p>Su forma es circular, pero tiene colonias irregulares.</p>	<p>Como tiene formas irregulares su diámetro también va a ser irregular con diámetros desde pequeños hasta medianos.</p>	

Las características macroscópicas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la réplica 1 y 2, se puede observar que existe una forma esférica u ovalada, su color es blanco y su tamaño es relativamente pequeño, algunas de las colonias en la réplica 2 tienden a unirse entre sí esto también es confirmado por Eddy (1955) que afirma que las colonias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tienen una ligera tendencia a adherirse entre sí.

Las *Pichia kluyveri* de la réplica 1, 2 y *Pichia Kudriavzevii* de la réplica 1,2,3 poseen características morfológicas y fisiológicas comunes ya que pertenecen al mismo género, ambas *Pichia* poseen un color blanco crema, poseen un tamaño similar, sus texturas tienden a ser lisas

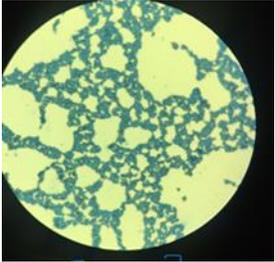
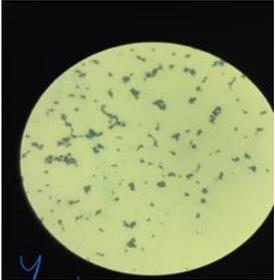
y redondas. En el caso de la *Pichia kudriavzevii* se puede observar que las colonias crecieron unidas por ende no se visualiza una mayor cantidad de colonias, esto podría deberse a un mal rastrillado en la caja Petri antes de la incubación. En el trabajo de Carnicer et al., (2009) se indica que las levaduras durante su incubación también presentaron características macroscópicas como forma y tamaño esférico ovalado, un tamaño pequeño, colonias en su materia de color blanco, coincidiendo con lo reportado en este estudio.

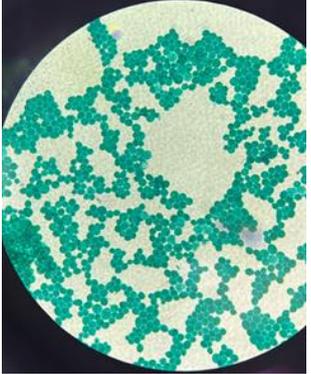
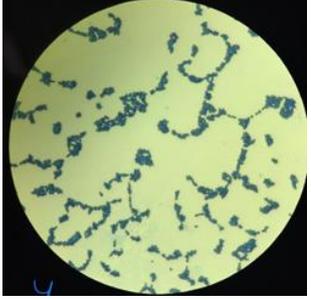
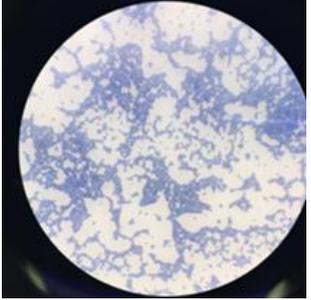
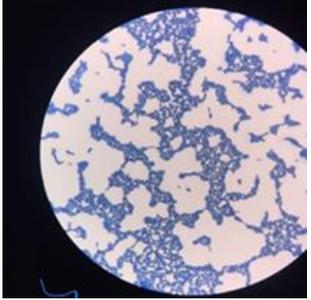
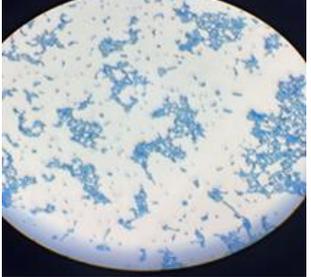
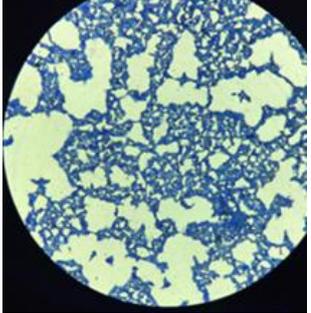
3.4 Análisis de la morfología de las levaduras.

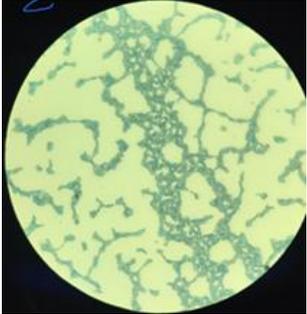
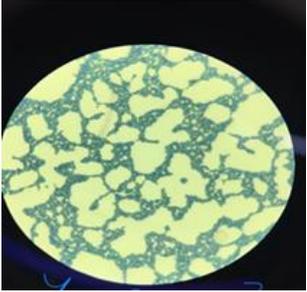
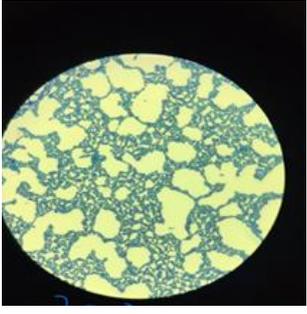
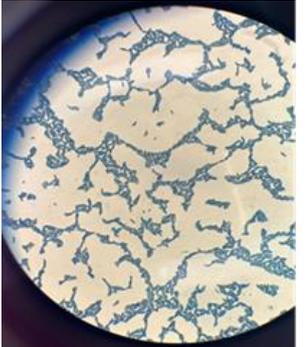
En la siguiente tabla se muestra el análisis de la morfología de las levaduras después de la encapsulación y posterior a los 60 días de almacenamiento.

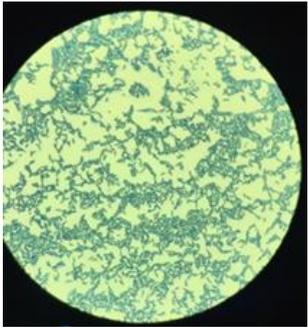
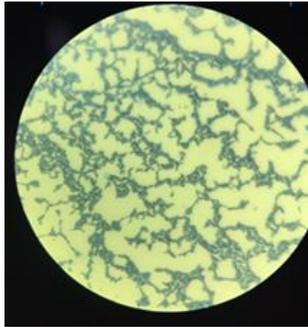
En la morfología de las levaduras se detallan sus características físicas y estructurales. Se define el tamaño, forma, reproducción y la distribución de las células.

Tabla 4. Análisis morfológico de las levaduras encapsuladas (tiempo cero y después de 60 días de almacenamiento).

Levadura	Tiempo cero	Después del almacenamiento (60 días)	Morfología (forma)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Replica-1)			<p>Antes del almacenamiento: En la levadura predomina la forma esférica, en todas las colonias.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: A pesar de la poca formación de colonias, aún se puede visualizar las levaduras la cual tiene una forma esférica igual que al tiempo cero.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>

<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Replica-2)</p>			<p>Antes del almacenamiento: En la levadura predomina la forma esférica.</p> <p>En el tamaño tiene un diámetro ligeramente más pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: Tiene las mismas características que tuvo antes del almacenamiento, predomina la forma esférica, todas las colonias tienen forma esférica.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>
<p><i>Pichia kluyveri</i> (Réplica-1)</p>			<p>Antes del almacenamiento: La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>
<p><i>Pichia kluyveri</i> (Réplica-2)</p>			<p>Antes del almacenamiento:</p> <p>La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: La</p>

			<p>levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>
<p><i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-1)</p>			<p>Antes del almacenamiento:</p> <p>La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>
<p><i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-2)</p>			<p>Antes del almacenamiento:</p> <p>La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>

<p><i>Pichia kudriavzevii</i> (Réplica-3)</p>			<p>Antes del almacenamiento:</p> <p>La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p> <p>Después del almacenamiento: La levadura predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes.</p> <p>En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño.</p>
---	---	---	--

Como se menciona en la anterior tabla la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la réplica 1 y 2 tienen esférica y su diámetro es ligeramente pequeño, además en el tiempo cero presentan ciertas ramificaciones grandes en gran parte de la levadura, también observamos un gran número de células presentes en la tinción a diferencia, de después del almacenamiento que se observa una menor cantidad de colonias, pero aún conserva sus características del tiempo cero. Según Visser et al., (1995) las levaduras durante su análisis en el microscopio se observaron que existe una mayor ramificación de células de células que son grandes y numerosas.

Las levaduras pertenecientes a la especie *Pichia kluyveri* de la réplica 1, 2 y *Pichiakudriavzevii* de la réplica 1,2,3 poseen características morfológicas y fisiológicas comunes ya que pertenecen al mismo género, antes del almacenamiento tiene una morfología que predomina la forma ovalada en todas las colonias presentes. En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño, después del almacenamiento sigue manteniendo las mismas características morfológicas y la forma ovalada en todas las colonias presentes. En tamaño, la levadura tiene un diámetro ligeramente pequeño. En el estudio de Kim et al., (2013). Se menciona que la mayoría de las levaduras tiene una forma similar, todas las células de las levaduras examinadas tiene una forma ovalada, todas las colonias son circulantes vista en el microscopio.

CONCLUSIONES

En este estudio, se investigó la viabilidad y vitalidad de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* encapsuladas en alginato de sodio tras 60 días de almacenamiento, obteniendo las siguientes conclusiones:

- Se confirma la viabilidad de los encapsulados de levadura, se puede evidenciar en todos los casos que posterior a 60 días de almacenamiento las levaduras crecieron al ser reactivadas.
- En cuanto a la vitalidad, se vio disminuida la tasa de células vivas posterior al almacenamiento, siendo menor en el caso de la *Pichia kudriavzevii* donde se pudo observar un mayor número de colonias activas.
- El análisis macroscópico al tiempo cero y posterior a los 60 días de almacenamiento reveló que las características morfológicas se conservan en los encapsulados y no se ve afectada en ninguna de las especies de levadura.

Los resultados obtenidos, demuestran que la encapsulación puede ser un método efectivo para preservar las características de las levaduras durante largos períodos de tiempo.

RECOMENDACIONES

- Realizar una evaluación de la viabilidad y la vitalidad de las levaduras encapsuladas por un mayor periodo de tiempo, debido a que en este estudio solo se realizó por 60 días y sería interesante dar un seguimiento en el tiempo.
- Para mejorar la vitalidad de las levaduras encapsuladas, se podrían incluir otros compuestos en matriz encapsulante.

Referencias bibliográficas:

- Adamberg, K., Valgepea, K. y Vilu, R. (2015). Métodos avanzados de cultivo continuo para microbiología de sistemas. *Microbiología*, 161 (9), 1707-1719.
- Beg, MS, Ahmad, S., Jan, K. y Bashir, K. (2017). Revisión del estado, cadena de suministro y procesamiento del cacao-A. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 66, 108-116.
- Boza, E. J., Motamayor, J. C., Amores, F. M., Cedeno-Amador, S., Tondo, C. L., Livingstone, D. S., ... & Gutiérrez, O. A. (2014). Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: its impact and significance on global cacao improvement and production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139(2), 219-229.
- 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 and Technology*, 63(1), 221-227.
- Bokkhim, H., Neupane, P., Gurung, S. y Shrestha, R. (2018). Encapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* en perlas de alginato y su aplicación en la elaboración de vino. *Revista de ciencia y tecnología de los alimentos Nepal*, 10, 18-23.
- Costa, E., Usall, J., Teixido, N., Garcia, N., & Vinas, I. (2000). Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 793-800.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, JS, ... y De Vuyst, L. (2007). Dinámica y biodiversidad de poblaciones de bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético involucradas en la fermentación espontánea en pilas de los granos de cacao en Ghana. *Microbiología aplicada y ambiental*, 73 (6), 1809-1824
- Coradello, G. y Tirelli, N. (2021). Células de levadura en microencapsulación. Características generales y factores de control del proceso de encapsulación. *Moléculas*, 26 (11), 3123.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, SK, Takrama, JS, Bernaert, H. y De Vuyst, L. (2008). Fermentación de los granos de cacao: influencia de las actividades microbianas y las concentraciones de polifenoles en el sabor del chocolate. *Revista de Ciencias de la Alimentación y la Agricultura*, 88 (13), 2288-2297.
- Carnicer, M., Baumann, K., Töplitz, I., Sánchez-Ferrando, F., Mattanovich, D., Ferrer, P., & Albiol, J. (2009). Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of *Pichia pastoris* growing at different oxygen levels. *Microbial cell factories*, 8, 1-14.

Cozmuta, A. M., Jastrzębska, A., Apjok, R., Petrus, M., Cozmuta, L. M., Peter, A., & Nicula, C. (2021). Immobilization of baker's yeast in the alginate-based hydrogels to impart sensorial characteristics to frozen dough bread. *Food Bioscience*, 42, 101143.

Díaz-Muñoz, C., & De Vuyst, L. (2022). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 39-66.

Escobar, S., Santander, M., Zuluaga, M., Chacón, I., Rodríguez, J., & Vaillant, F. (2021). Producción de granos de cacao fino: seguimiento de los precursores del aroma a través de un análisis integral de la formación de los atributos del sabor. *Química de los Alimentos*, 365, 130627.

Erol, OD, Pervin, B., Seker, ME y Aerts-Kaya, F. (2021). Efectos de los medios de almacenamiento, suplementos y métodos de criopreservación sobre la calidad de las células madre. *Revista mundial de células madre*, 13 (9), 1197.

Eddy, A. A. (1955). Flocculation characteristics of yeasts: 1. comparative survey of various strains of *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 61(4), 307-312.

Febrianto, NA (2022). *Compuestos bioactivos de los granos de cacao: diversidad genética y procesamiento poscosecha* (tesis doctoral, ResearchSpace @ Auckland).

Fuller, BJ (2004). Crioprotectores: los anticongelantes imprescindibles para proteger la vida en estado congelado. *CryoLetters* , 25 (6), 375-388.

Flota, GH y Zhao, J. (2018). Desentrañar la contribución de las bacterias del ácido láctico y del ácido acético a la fermentación del cacao utilizando organismos inoculados. *Revista internacional de microbiología de alimentos*, 279, 43-56.

Gulli, J., Yunker, P., & Rosenzweig, F. (2020). Matrices (re) loaded: Durability, viability, and fermentative capacity of yeast encapsulated in beads of different composition during long-term fed-batch culture. *Biotechnology Progress*, 36(1), e2925.

Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS yeast research*, 14(7), 1068-1079.

Kim, HR, Kim, JH, Bai, DH y Ahn, BH (2013). Características microbiológicas de la cepa de levadura silvestre *Pichia anomala* Y197-13 para la elaboración de makgeolli. *Micobiología* , 41 (3), 139-144.

Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food microbiology*, 30(2), 379-392.

López-Hernández, M., Díaz-Ruiz, G., & Wachter, C. (2017). Cocoa Fermentation. In *Fermented Foods, Part II* (pp. 324-352). CRC Press.

Marañón, I., Elejalde, E., Chavarri, M., de Armentia, I. L., & del Carmen Villarán, M. (2008). Inmovilización de levaduras por microencapsulación para la fermentación de mostos-v. congreso de ingeniería y tecnología de alimentos.

Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., ... y Verstrepen, KJ (2016). Ajuste del sabor del chocolate mediante el desarrollo de cultivos iniciadores termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor producción de éster de acetato. *Microbiología aplicada y ambiental*, 82 (2), 732-746.

Maita, D., Vele, M., (2022). Obtención de bancos de microorganismos provenientes de la fermentación de cacao de la variedad CCN-51 con mezcla de frutas a partir de medios de cultivo estandarizados. Escuela de Ingeniera en Alimentos.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. y Bugarski, B. (2011). Una descripción general de las tecnologías de encapsulación para aplicaciones alimentarias. *Procedía ciencia de los alimentos*, 1, 1806-1815.

Ordoñez-Araque, R. H., Landines-Vera, E. F., Urresto-Villegas, J. C., & Caicedo-Jaramillo, C. F. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: Systematic review.

Papalexandratou, Z. y Nielsen, DS (2016). Hace calor aquí: obtención de cultivos iniciadores de levadura robustos para la fermentación del cacao. *Tendencias en microbiología*, 24 (3), 168-170.

Qi, W. T., Ma, J., Yu, W. T., Xie, Y. B., Wang, W., & Ma, X. (2006). Behavior of microbial growth and metabolism in alginate–chitosan–alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 697-704.

Risch, SJ (1995). Encapsulación: descripción general de usos y técnicas.

Schwan, RF y Fleet, GH (Eds.). (2014). Fermentaciones de cacao y café. Prensa CRC.

Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 205-221.

Utami, U., Putra, DCW y Harianie, L. (febrero de 2024). Prueba de viabilidad de encapsulación de levadura (*Candida tropicalis*) Utilizando polímero de alginato de sodio en la producción de pan. En *Serie de conferencias del IOP: Ciencias de la Tierra y el Medio Ambiente* (Vol. 1312, No. 1, p. 012053). Publicación PIO.

Visser, W., van Spronsen, E. A., Nanninga, N., Pronk, J. T., Kuenen, J. G., & van Dijken, J. P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 67, 243-253.

Wójcik-Stopczyńska, B. y Jadczyk, D. (2007). El efecto del almacenamiento en congelación sobre la calidad microbiológica de algunas plantas de especias. *Revista de investigación de plantas frutales y ornamentales*, 66 (1), 85-93.

Wang, Guang, Pu, J., Yu, X., Xia, Y., & Ai, L. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066–3075.

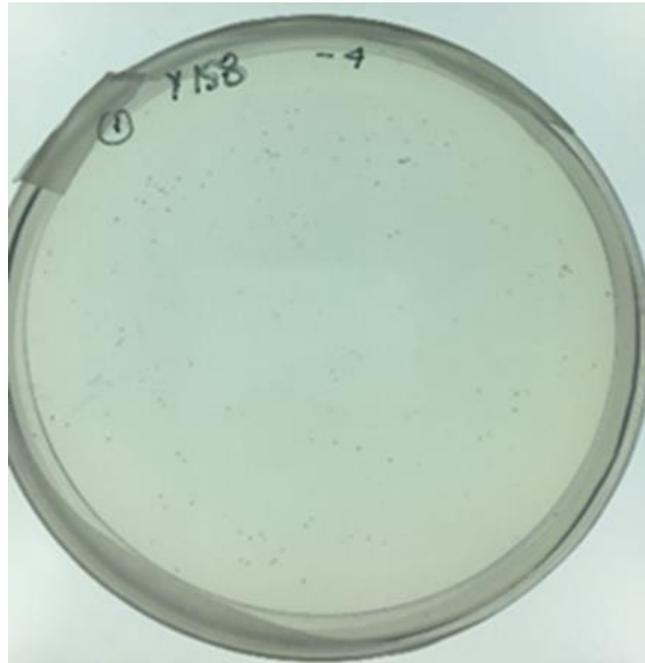
Weng, Z., Díaz E. & Molina, Á. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 43(3), 0-0.

Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International journal of food microbiology*, 174, 72-87.

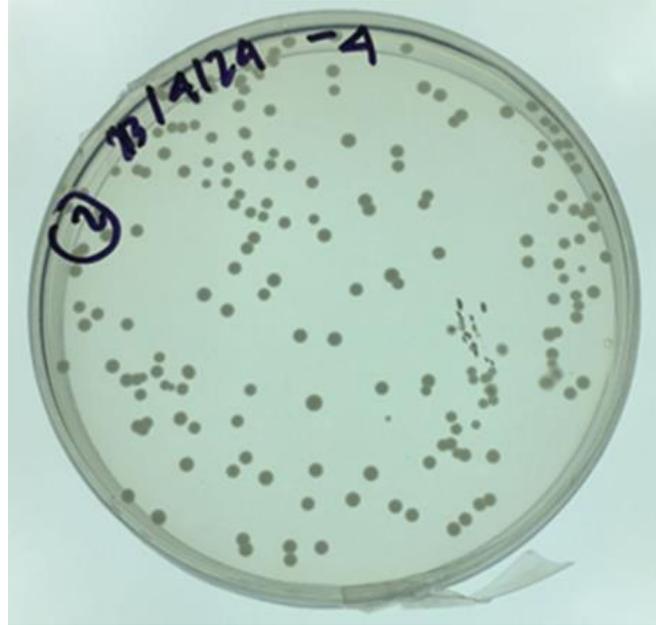
ANEXOS

Anexo 1. Análisis de viabilidad de las levaduras encapsuladas y almacenadas por 60 días

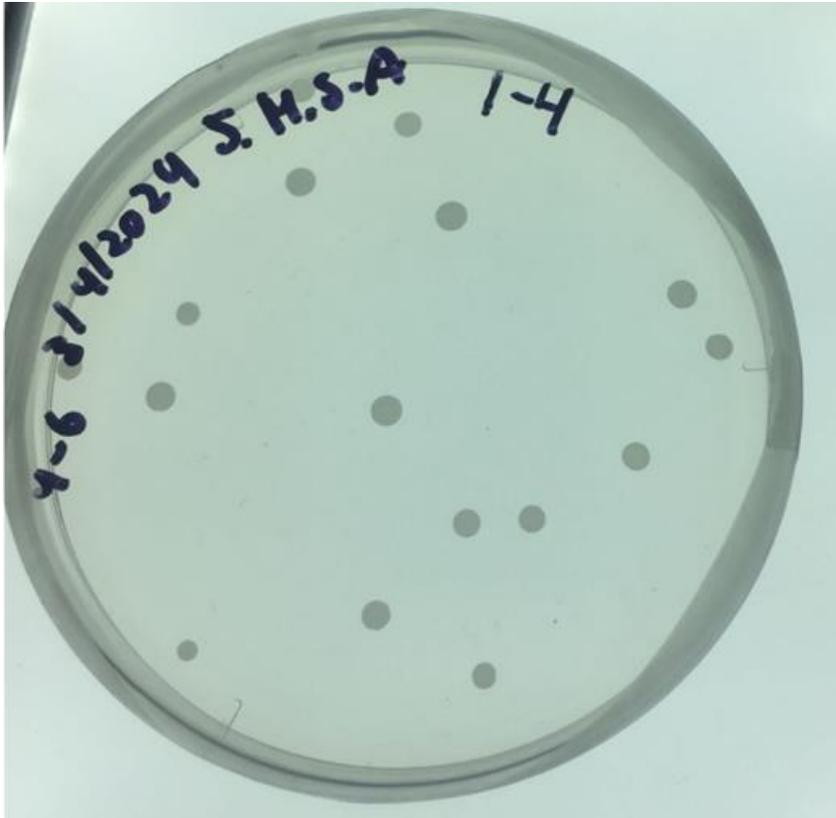
Saccharomyces cerevisiae (Replica1)



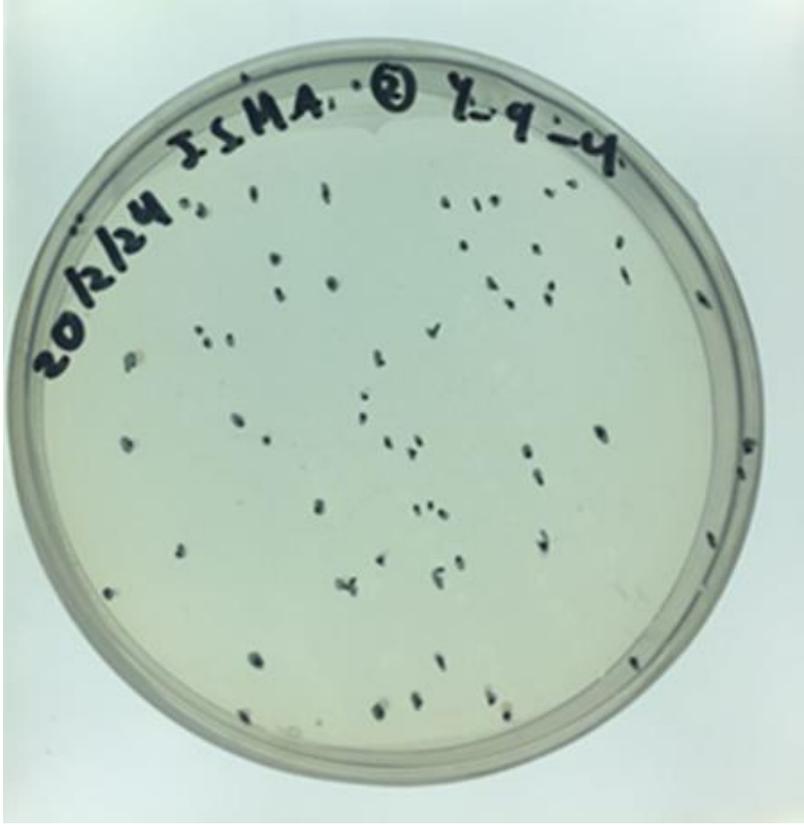
Saccharomyces cerevisiae (Replica-2)



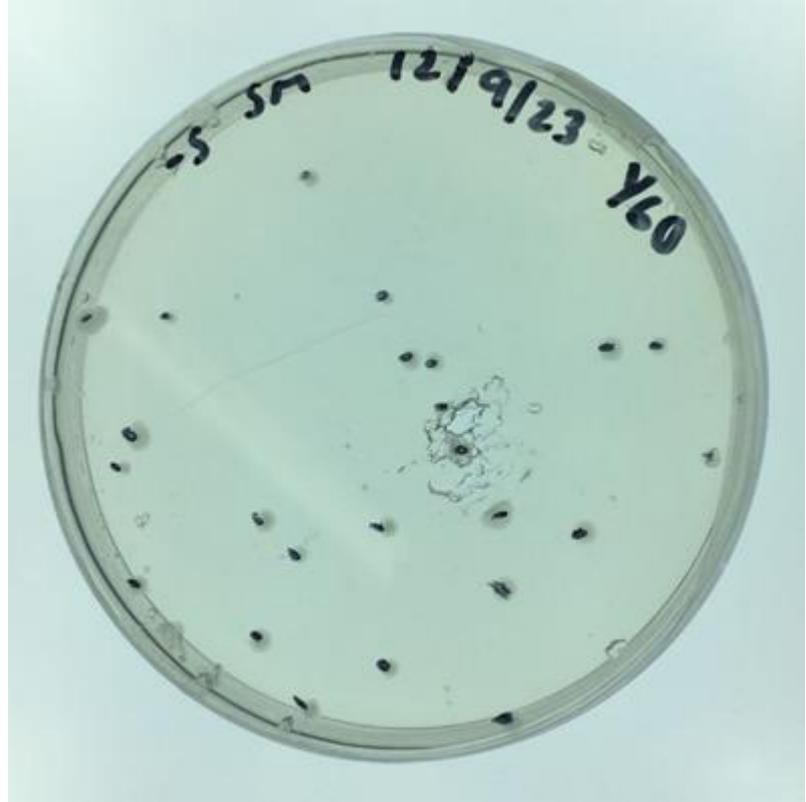
Pichia Kluyveri (Réplica-2)



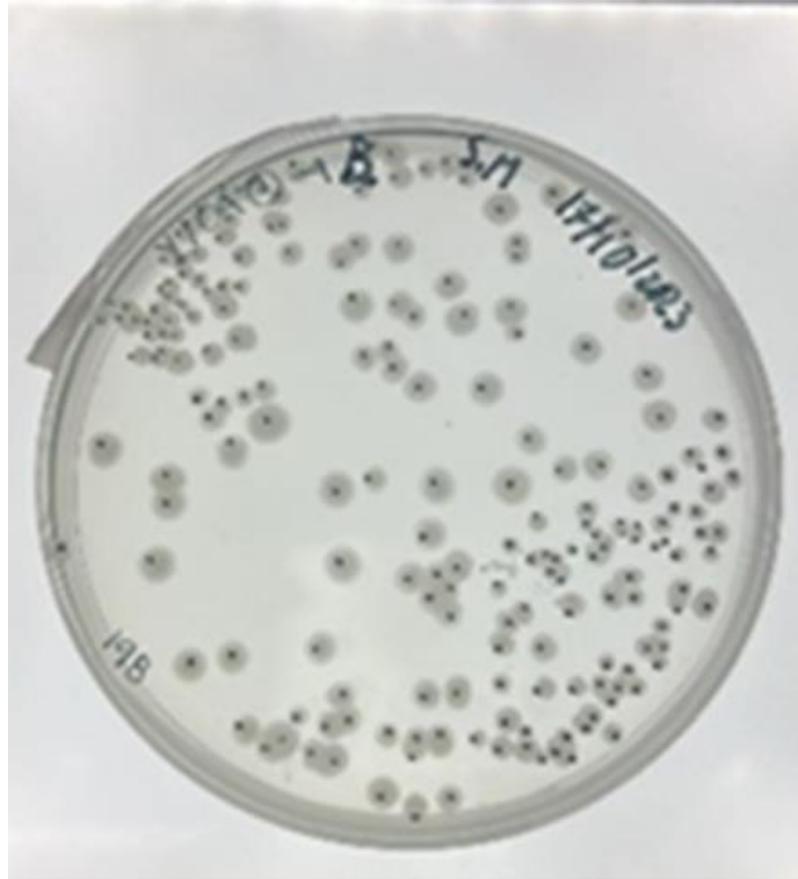
Pichia Klivery (Réplica-1)



Pichia kudriavzevii (Réplica-1)



Pichia kudriavzevii (Réplica-2)



Pichia Kudriavzevii (Réplica-3)

