



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Potencial metabólico de levaduras aisladas de la fermentación modificada de cacao CCN-51.

Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:

INGENIERA EN ALIMENTOS

Autora:

MAYRA ALEXANDRA PEÑA CHILLOGALLO

Director:

MGST. MARÍA ALICIA PEÑA GONZÁLEZ

Cuenca - Ecuador

2024

Dedicatoria

"A mis queridos padres Julia y Mesias quienes han sido mi roca y mi fuente de inspiración a lo largo de este arduo camino académico. A ustedes les debo mi perseverancia y mi determinación para alcanzar mis metas. A mis hermanas y a mi abuelita por su constante apoyo y alegría compartida, que han aligerado las cargas más pesadas. A mis profesores y mentores, cuya sabiduría y orientación han sido cruciales en mi desarrollo académico y personal. A todos los que creyeron en mí, les dedico este logro. Este trabajo es un tributo a su confianza en mí y a nuestra inquebrantable conexión. ¡Gracias ser parte de este proceso arduo!"

No puedo pasar por alto el apoyo brindado por mis amigos y seres queridos durante este exigente período. Agradezco sus palabras de aliento, su comprensión y su presencia constante, que me ayudaron a superar los desafíos y mantenerme enfocado en mis objetivos.

A todas estas personas y a aquellas cuyos nombres no figuran aquí pero que de alguna manera contribuyeron en mi vida académica.

¡Muchas gracias!"

Agradecimiento

"Agradezco a Dios por el regalo de una familia excepcional, quienes siempre han creído en mí y han sido un ejemplo de superación, humildad y sacrificio. Su apoyo incondicional y amor han sido fundamentales para valorar todo lo que tengo y para cultivar en mí el deseo constante de superación y éxito. Este maravilloso sueño no sería posible sin su constante
aliento.

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Mgtr. María Alicia Peña, cuyos sabios consejos fueron un faro en los momentos en que las ideas parecían escaparse de mi mente. Su paciencia y guía fueron clave en este proceso.

También quiero reconocer la paciencia y el apoyo incondicional de la Ing. Nicole Sarmiento en la realización de este proyecto académico. Su dedicación y colaboración fueron indispensables para alcanzar este logro.

Agradezco a todos aquellos que han formado parte de mi vida y han contribuido, de una u otra manera, a hacer este viaje universitario más llevadero. Su presencia ha sido un regalo invaluable."

Resumen:

Las levaduras juegan un papel crucial en la fermentación del cacao, como lo demuestran diversos estudios que han incorporado diferentes especies como cultivos iniciadores para mejorar la calidad de los granos fermentados. En este trabajo, se evaluó el potencial metabólico de las levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevi* aisladas de una fermentación de cacao CCN-51 con pulpas de frutas, con el objetivo de identificar una candidata ideal para un cultivo iniciador. Para ello, se analizó la tolerancia de estas levaduras a distintas concentraciones de metabolitos (azúcares, ácidos orgánicos y etanol), pH y temperatura, así como su capacidad para producir CO₂. Además, se realizó una revisión bibliográfica sobre la actividad pectinolítica de estas levaduras. Los resultados revelaron que *Pichia kudriavzevii* mostró una mejor tolerancia a azúcares, etanol, ácido láctico y temperaturas elevadas en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri*, las cuales exhibieron una menor capacidad de adaptación a condiciones de estrés, siendo esto particularmente evidente en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe destacar que todas las levaduras evaluadas demostraron capacidad para producir CO₂ tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Finalmente, la investigación reveló algunos estudios en los que se reportó que la *Saccharomyces cerevisiae* si posee actividad pectinolítica.

Palabras clave: Cultivo iniciador, levaduras, estrés, producción de CO₂, actividad pectinolítica.

Abstract:

Yeasts play a crucial role in cocoa fermentation, as demonstrated by various studies that have incorporated different species as starter cultures to improve the quality of fermented beans. In this work, the metabolic potential of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Pichia kudriavzevi* isolated from a CCN-51 cocoa fermentation with fruit pulps was evaluated, with the aim of identifying an ideal candidate for a starter culture. To do this, the tolerance of these yeasts to different concentrations of metabolites (sugars, organic acids and ethanol), pH and temperature, as well as their ability to produce CO₂, was analyzed. In addition, a bibliographic review was carried out on the pectolytic activity of these yeasts. The results revealed that *Pichia kudriavzevii* showed better tolerance to sugars, ethanol, lactic acid and high temperatures compared to *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*, which exhibited a lower capacity for adaptation to stress conditions, being this particularly evident in the case of *Saccharomyces cerevisiae*. It is noteworthy that all the yeasts evaluated demonstrated the ability to produce CO₂ under both aerobic and anaerobic conditions. Finally, the research revealed some studies in which it was reported that *Saccharomyces cerevisiae* does have pectolytic activity.

Keywords: starter culture, yeasts, stress, CO₂ production, pectinolytic activity.

Índice de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Resumen:.....	iv
Abstract:.....	v
Introducción.....	1
Materiales y métodos	5
1.1 Reactivación de levaduras	5
1.2 Estandarización de levaduras	5
1.3 Ensayos de tolerancia.....	5
1.3.1 Tolerancia a temperatura	5
1.3.2 Tolerancia a pH	6
1.3.3 Tolerancia frente a metabolitos.....	6
1.3.4 Evaluación de la capacidad para producir CO₂	6
Resultados y Discusión	7
2.1 Ensayos de tolerancia frente a metabolitos.....	7
2.2 Ensayos de Tolerancia frente a Temperatura	10
2.3 Ensayos de Tolerancia frente a pH y Ácido Acético 1%	12
2.4 Ensayos de Capacidad para producir CO₂.....	13
2.5 Actividad pectinolítica de levaduras.....	13
Conclusiones	15

Referencias.....16

Anexos23

Índice de figuras

Figura 1	7
Figura 2	9
Figura 3	10
Figura 4	11

Índice de Tablas

Tabla 1.....	12
---------------------	-----------

Índice de Anexos

Anexos 1	23
Anexos 2	23
Anexos 3	24
Anexos 4	24

Introducción

Las habas de cacao (*Theobroma cacao*), cuyo origen en la región amazónica ecuatoriana se remonta a al menos 5.000 años (Lanaud et al., 2024), son la base del chocolate, un producto con gran demanda internacional. Ecuador es reconocido como uno de los principales productores mundiales de cacao, siendo proveedor del 65% de la variedad fino de aroma (Díaz-Montenegro et al., 2018), un cacao muy apetecido por su alta calidad sensorial.

En Ecuador, el cultivo de cacao tiene una gran importancia, pues es uno de los principales rubros de las exportaciones y con alto impacto en la economía rural. Principalmente se cultivan dos variedades genéticas, “Nacional” y “CCN-51”, cada una de ellas con diferentes características. Por un lado, el cacao Nacional o fino de aroma, es ampliamente reconocido por sus sabores y aromas únicos, sin embargo, presenta una baja productividad y es altamente susceptible a plagas. En contraste, el cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal) se destaca por su resistencia a condiciones climáticas adversas y altos rendimientos por su alto contenido de grasa, no obstante, su sabor es astringente y amargo, por lo que se le considera cacao de menor calidad (bulk), con un precio inferior (Díaz & Pinoargote, 2012; Herrmann et al., 2015). Se destaca la relevancia del cultivo del cacao CCN-51 en Ecuador, el cual representa aproximadamente el 50% de la producción nacional (Quiroz, 2020).

La elaboración del chocolate comienza con la recolección de mazorcas y la extracción de las semillas, las cuales se someten a la fermentación. Este proceso resulta de gran importancia en el desarrollo del sabor y aroma en los granos de cacao. La diversidad microbiana que se desarrolle a lo largo de la etapa de fermentación estará influenciada por muchos factores tales como: el grado de madurez de los granos de cacao, temporada de la cosecha, materiales y utensilios utilizados en postcosecha, recipientes en los cuales se monten las fermentaciones y condiciones ambientales externas (Nielsen et al., 2005; Figueroa-Hernández et al., 2019; Ouattara & Niamké, 2021). Para la fermentación, tradicionalmente se colocan los granos de cacao en cajas de madera, bandejas plásticas, sacos de yute u hojas de plátano. Posteriormente, los granos fermentados pasan al secado hasta alcanzar un contenido de humedad $\leq 7\%$ (Santander et al., 2020) y se someten al tostado para resaltar su sabor y aroma por las altas temperaturas que alcanza en el proceso. El resultado de estos tratamientos permite obtener los nibs de cacao, los cuales se muelen para producir una pasta denominada licor de cacao. Este se mezcla con otros ingredientes como azúcar, lecitina de soya y se somete

al proceso de refinamiento para mejorar su textura y sabor. Finalmente, se moldea la masa de chocolate y se enfría para formar la barra de chocolate (Afoakwa, 2016).

Como se indicó anteriormente, la fermentación es una etapa de gran importancia dentro de los procesos postcosecha del cacao, pues en esta fase se elimina la pulpa, muere el embrión y se desarrollan los precursores de sabor y color característicos del cacao. Este proceso puede durar de dos a diez días, dependiendo de la variedad genética y condiciones del lugar donde se lleva a cabo la fermentación (Watson et al., 2013; De Vuyst & Leroy, 2020; Santander Muñoz et al., 2020). Por lo general, este proceso se realiza de manera espontánea, por lo que, existe gran variabilidad en la cinética y diversidad de microorganismos. La microbiota que participa en el proceso, puede provenir del ambiente en el que se desarrolla, de las cáscaras de cacao, hojas de plátano, insectos, superficies y utensilios empleados o incluso las manos de los trabajadores (Camu et al., 2008; Watson et al., 2013; De Vuyst & Weckx, 2016). Durante esta etapa, se da la síntesis de moléculas como alcoholes y ésteres, involucrados en el desarrollo de aroma y sabor en los granos de cacao (Mota et al., 2018).

El desarrollo de una gran variabilidad de microorganismos en el proceso puede resultar en una pérdida significativa de la calidad sensorial de los granos, afectando negativamente su aroma y sabor (Salazar et al., 2022). Durante la fermentación se desarrollan dos etapas, inicialmente en las primeras 48 horas se da la fase anaeróbica, en la cual dominan las levaduras y las bacterias ácido lácticas (BAL), dada la actividad metabólica, principalmente se consumen los carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) presentes en la pulpa de cacao. Además, por la acción de las levaduras la pectina se degrada, causando la licuefacción de la pulpa y la liberación del exudado. Por otro lado, también se generan varios productos del metabolismo tales como dióxido de carbono, etanol, glicerol, lactato, manitol y diversos precursores de aroma y sabor obtenidos a partir de la conversión de aminoácidos (Schwan & Wheals, 2004; Afoakwa et al., 2008; Saltini et al., 2013; De Vuyst & Leroy, 2020; Santander Muñoz et al., 2020). A partir del tercer día (72 horas), comienza la fase aeróbica en la que predomina la actividad de las bacterias ácido acéticas (BAA) las cuales oxidan el etanol en ácido acético. Además, se forman otros productos como acetato de etilo, butanol, isopropanol, compuestos intermedios de acetaldehído y ácidos orgánicos (Bastos et al., 2019; Ordoñez-Araque et al., 2020). Esta reacción, altamente exotérmica, eleva la temperatura del cotiledón a unos 50°C. Este aumento de temperatura favorece diversas reacciones físicas y químicas dentro del grano, como la degradación de compuestos fenólicos por acción de la enzima polifenoloxidasas. Esta

degradación reduce el amargor y la astringencia, disminuye el pH y contribuye a la formación de los compartimentos internos del grano. Durante esta fase, las elevadas cantidades de ácido acético que ingresan al grano de cacao, junto con las temperaturas elevadas, producen la muerte del embrión, lo cual garantiza una adecuada fermentación del grano (Bastos et al., 2019; Figueroa et al., 2019; De Vuyst & Leroy., 2020).

Se conoce que los géneros de levaduras más comunes durante la fermentación del cacao son *Saccharomyces*, *Pichia* y *Hanseniaspora*, pero estas pueden variar en función de la región y el tipo de fermentación (Papalexandratou et al., 2019). Sin embargo, son las especies *Saccharomyces* y *Pichia* las que predominan mayormente dentro de estos grupos, contribuyendo de manera significativa al desarrollo de las características sensoriales y organolépticas de los productos finales (De Vuyst & Leroy, 2020; Díaz-Muñoz & De Vuyst, 2022).

La especie *Saccharomyces cerevisiae* se destaca en el proceso de fermentación por su gran tolerancia a distintos niveles de pH y gran resistencia al etanol y al calor (De Vuyst & Weckx, 2016). Al mismo tiempo, sobresale por su capacidad para la formación de compuestos aromáticos deseables para el chocolate, mismos que aportan notas florales, frutales y cítricos (Koné et al., 2016). Por su parte, la especie *Pichia kudriavzevii*, durante la fermentación de cacao, puede producir ésteres, cetonas, alcoholes y aldehídos, compuestos químicos esenciales para los característicos aromas frutales, florales y dulces del chocolate (Moreira et al., 2013). Recientes investigaciones destacan que inóculos elaborados con las levaduras *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* mejoran la calidad de los granos de cacao fermentados, al enriquecer su perfil de aroma, reducir acidez, aumentar antioxidantes y acelerar la fermentación, favoreciendo la productividad (Moreira et al., 2017; Ooi et al., 2020). Por otro lado, investigadores determinaron que *Pichia kluyveri* tuvo un papel importante en la formación y aumento de los aminoácidos precursores del sabor, que participan en la reacción de Maillard, durante la fermentación (Santos et al., 2020).

Existen varias investigaciones, en las que se ha estudiado la incorporación de cultivos iniciadores en el proceso de fermentación del cacao, esta herramienta podría ser clave para mejorar y controlar los procesos, logrando una calidad en el grano mucho más homogénea y con un mejor perfil sensorial (Saltini et al., 2013; De Vuyst y Weckx, 2016). Algunos de los objetivos de la incorporación de mezclas de microorganismos seleccionados durante la fermentación son: mejorar el drenaje de la pulpa, acortar los períodos de fermentación, mejorar la calidad de los granos de cacao curados (Saltini et al., 2013; De Vuyst y Weckx, 2016; Pereira

et al., 2016; Figueroa-Hernández et al., 2019; Mota-Gutiérrez et al., 2019; De Vuyst y Leroy, 2020; Santander Muñoz et al., 2020). Estas ventajas pueden promover una mejora en la competitividad al inhibir la microbiota no deseada, incrementar la calidad y los perfiles sensoriales de los productos finales. Es necesario comprender la dinámica fisiológica de las levaduras y su interacción con la microbiota para desarrollar cultivos iniciadores efectivos. Esto permitirá establecer parámetros para su uso en la producción de chocolate de alta calidad (Gutiérrez et al., 2022).

Por lo antes expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la tolerancia de las levaduras de estudio, frente a distintas concentraciones de metabolitos, condiciones de pH, temperatura y capacidad para formación de CO₂ de distintas especies de levaduras. Los resultados obtenidos, permitirán identificar las mejores levaduras que pueden ser candidatas para la incorporación en cultivos iniciadores.

Materiales y métodos

1.1 Reactivación de levaduras

Para este estudio se trabajaron con las levaduras previamente aisladas de una fermentación del cacao, las cuales se encuentran almacenadas en el biobanco del laboratorio de biotecnología de la Universidad del Azuay. Las especies que se utilizaron para esta investigación fueron: *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii*.

Para su reactivación, se tomaron 10µl del stock de glicerol almacenado a -80°C y se sembraron en placas de agar PDA (Potato Dextrose Agar) de la marca Condalab, mediante la técnica del rastrillo, asegurándose que se distribuya homogéneamente sobre la placa. Se dejó incubar por 24 horas a 30°C.

A partir de las colonias desarrolladas en las placas, se picaron algunas de ellas con una punta estéril y se procedió a inocular en medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth) de la marca Condalab, los tubos se incubaron a 30°C durante 12 horas, tiempo en el cual la levadura se encuentra en su fase de crecimiento exponencial. Este protocolo se realizó para cada una de las especies de levadura.

1.2 Estandarización de levaduras

Para la estandarización de las levaduras, se utilizó un espectrofotómetro que permite ajustar la Densidad Óptica (OD) de los inóculos a un valor dado. Para lo cual, se calibró la longitud de onda a 600 nm del espectrofotómetro (GENESYS 50 UV-Visible) de la marca Thermo Fisher scientific para realizar las mediciones. Inicialmente se determinó una OD₆₀₀ del blanco (agua peptonada) y de cada uno de los tubos inoculados con las levaduras en medio PDB, las cuales previamente se homogeneizaron adecuadamente.

Los tubos inoculados se diluyeron con agua peptonada hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.160±0.03 nm.

1.3 Ensayos de tolerancia

Con el objetivo de evaluar la tolerancia de las levaduras a diferentes condiciones fisicoquímicas, incluyendo la concentración de metabolitos, se utilizaron cultivos con una densidad óptica (OD₆₀₀) ajustada a 10⁻⁴.

A continuación, se detallan cada uno de los ensayos de tolerancia.

1.3.1 Tolerancia a temperatura

Se tomaron 100 µl de la dilución 10⁻⁴ de levaduras y mediante la técnica de rastrillo, se sembraron en placas de Agar ELP (agar bacteriológico 2%, glucosa 1%, 0.3% peptona y 0.05% extracto de levadura). Se dejó en incubación a 30°C, 37°C y 45°C por 48 horas y cada 24 horas

se realizó el conteo de colonias. Los resultados se reportaron como UFC/ml, tomando en cuenta la dilución empleada.

1.3.2 Tolerancia a pH

Se ajustó el pH del medio líquido ELP (PDB bacteriológico 2%, glucosa 1%, 0.3% peptona y 0.05% extracto levadura) a valores de 4, 5 y 6. En estos medios se inoculó 100µl de la dilución 10^{-4} de cada especie de levadura y se incubó los tubos a 30°C. Los resultados se reportaron como positivos (formación de biomasa) y negativo (ausencia de biomasa).

1.3.3 Tolerancia frente a metabolitos

Se llevaron a cabo ensayos de tolerancia en placas con medio ELP conteniendo diferentes concentraciones de glucosa (5% y 15%), fructosa (5% y 15%), ácido láctico (1%, 2%, 3% y 5%) y etanol (6%, 10% y 12%). Para el ácido acético (1%) se empleó caldo ELP.

Para cada ensayo se inoculó 100 µl de la dilución 10^{-4} sobre la superficie de las placas utilizando la técnica de rastrillo. En el caso de los tubos con caldo y ácido acético se adicionó directamente a estos. Las placas y tubos se incubaron a 30°C y se realizaron observaciones y recuentos a las 24 y 48 horas.

1.3.4 Evaluación de la capacidad para producir CO₂

Para esta determinación, se tomó 3 ml de levadura previamente estandarizada y se suspendió en 12 ml de medio PDB estéril en tubos de ensayo con campanas Durham invertidas. Se realizó el ensayo en condiciones aerobias y anaerobias (cámara de anaerobiosis). Se incubaron los tubos en ambas condiciones a 30°C durante 48 horas. Finalmente, se evaluó el volumen de gas producido en cada tubo mediante la observación de burbujas en las campanas Durham invertidas.

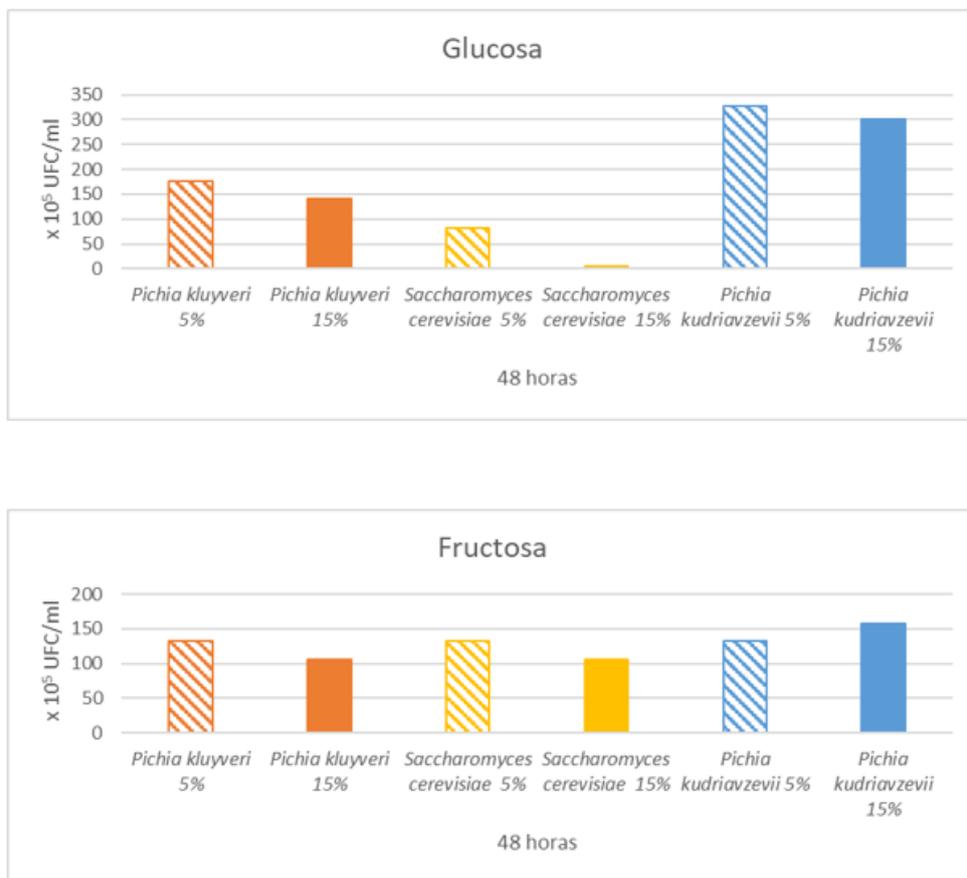
Resultados y Discusión

2.1 Ensayos de tolerancia frente a metabolitos

Se realizaron ensayos de tolerancia frente a metabolitos en levaduras durante un período de observación de 48 horas. Los resultados de estos ensayos se resumen en las siguientes figuras y los valores de UFC/ml se encuentran en Anexos:

Figura 1.

Ensayo de Tolerancia frente a azúcares



En los resultados de los ensayos de tolerancia frente a azúcares, se observa que la especie *Pichia kudriavzevii* presenta una mayor tasa de crecimiento tanto en glucosa como en fructosa. Este efecto es más evidente en la glucosa, aunque se observa un comportamiento similar con la fructosa. Por otro lado, esta diferencia fue particularmente notable en concentraciones de glucosa del 5% y 15% en *Pichia kudriavzevii*, en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*. Cabe destacar que todas las especies mostraron un mejor

desempeño con una concentración de azúcar del 5% y experimentaron una disminución en el crecimiento al aumentar la concentración al 15%.

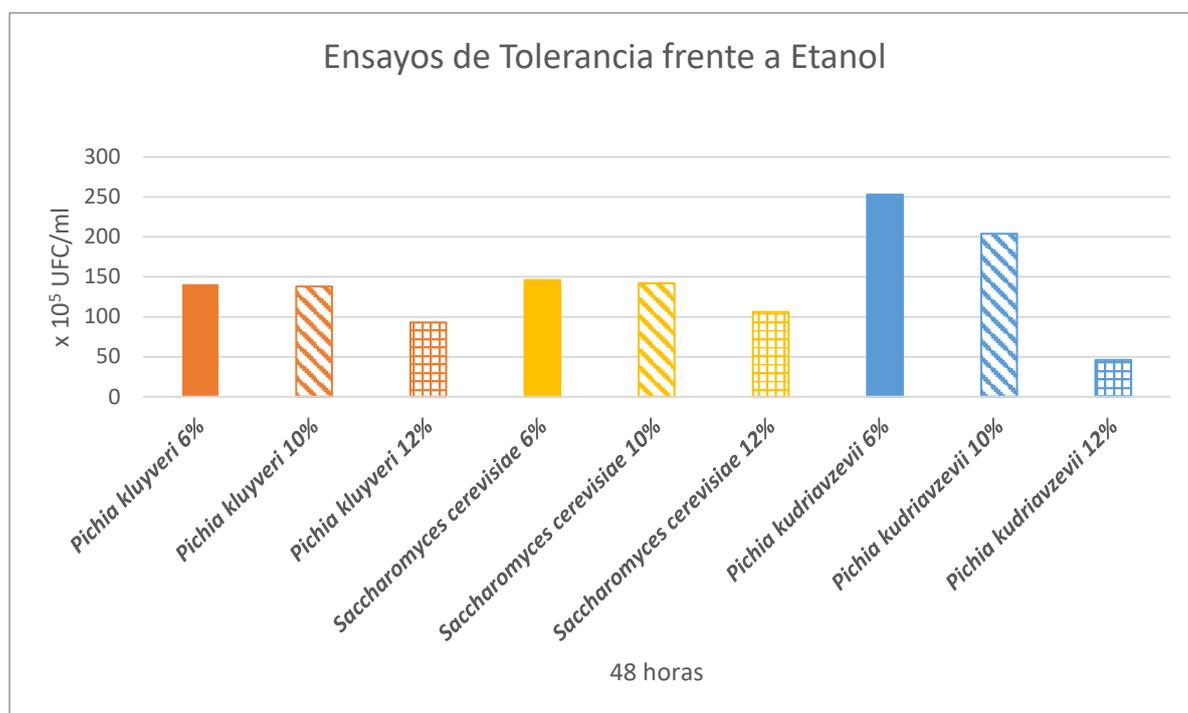
Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con los de Ulya et al. (2020), quienes reportaron que *Pichia kudriavzevii* puede tolerar hasta un 30% de contenido de azúcar.

Si bien los hallazgos de Savitri et al. (2024) sobre la supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de glucosa (10, 20, 30, 40 y 50%) (p/v), demostró crecimiento de la levadura hasta en concentraciones de 50%, sin embargo, se evidenció una baja en la tasa de crecimiento desde la concentración de 20% en adelante. De igual manera a partir de los datos obtenidos en nuestro ensayo, se observa que al aumentar la concentración del 5% al 15% se evidencian una notable disminución en las UFC/ml.

A diferencia de lo observado por Guimaraes et al. (2006), donde *Saccharomyces cerevisiae* mostró alta tolerancia a sacarosa y glucosa al 20% (p/v), esta investigación no respalda tal afirmación. De hecho, *Saccharomyces cerevisiae* presentó una de las menores cantidades de UFC/ml para tolerar glucosa, mientras que en fructosa se muestra un comportamiento similar a las otras especies, lo que sugiere que podría ser una especie con características particulares.

Figura 2.

Ensayos de Tolerancia frente a etanol



Los ensayos de tolerancia al etanol revelan que *Pichia kudriavzevii* es la levadura más resistente. Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri* también exhiben resistencia al etanol, aunque en menor medida, como lo indica la menor cantidad de UFC/ml observado. En concentraciones del 12% se pudo observar que todas las levaduras presentaron una menor tasa de crecimiento.

Levaduras de las especies *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* y *P. kluyveri* poseen una alta tolerancia al etanol y temperatura, como han reportado estudios de Papalexandratou et al. (2013), De Vuyst y Leroy (2020) y Díaz-Muñoz et al. (2021).

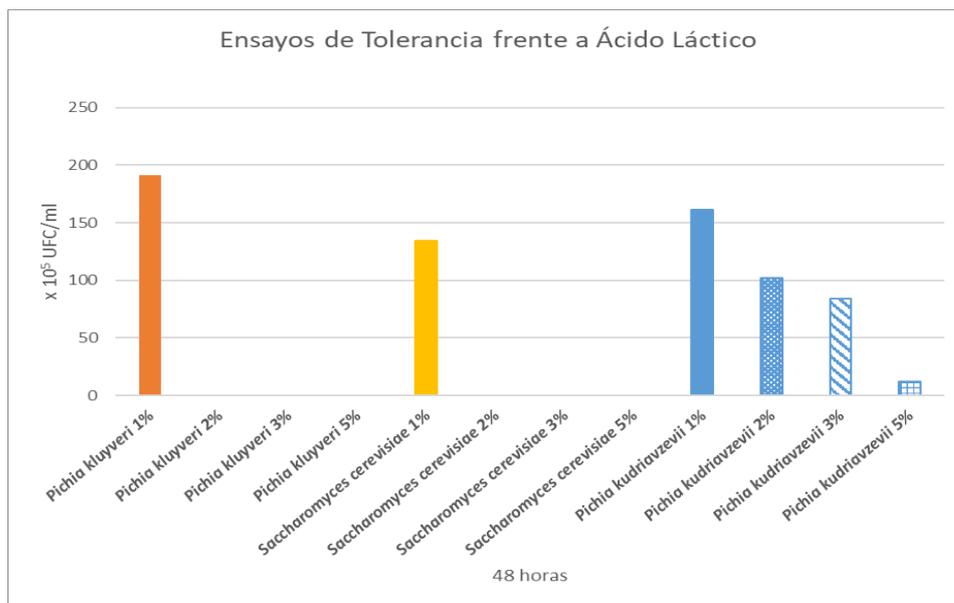
Los resultados de esa investigación demostraron que *Pichia kudriavzevii* es la una de las levaduras más resistente al etanol, ya que presenta la mayor cantidad de UFC/ml en relación con las otras especies. Este hallazgo coincide con el estudio de Ulya et al. (2020), quienes también observaron una alta tolerancia al etanol en esta especie, lo que demuestra su robustez.

Por su parte, *Pichia kluyveri*, si bien baja su tasa de UFC/ml a una concentración de etanol del 12%, se demuestra que, si es capaz de tolerar altas concentraciones de etanol, lo cual coincide con lo reportado por Vicente et al. (2021) en la que reportaron una tolerancia de hasta un 14% de etanol.

Finalmente, en cuanto a *Saccharomyces cerevisiae*, por su parte, es conocida por su alta tolerancia al etanol, como lo confirma el segundo lugar que ocupa en UFC/ml en nuestros resultados. Este hecho está respaldado por los resultados de Araujo et al. (2016), quienes señalan su reconocida capacidad para tolerar altas concentraciones de etanol.

Figura 3.

Ensayos de Tolerancia frente a ácido láctico



Los resultados demostraron que *Pichia kudriavzevii* exhibió la mayor tolerancia al ácido láctico, con crecimiento incluso en la concentración del 5%. En contraste, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri* fueron cepas altamente sensibles al ácido láctico, sin crecimiento a concentraciones sobre el 1% de este metabolito.

Sin embargo, en estudios previos (Daniel et al., 2009; Pereira et al., 2012; Samagaci et al., 2016, Chu et al., 2023) se respalda que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii* están bien adaptadas a condiciones estresantes, a diferencia de nuestro estudio en donde observamos que *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri* no muestran una alta tolerancia a ácido láctico, pudiendo tratarse de cepas diferentes.

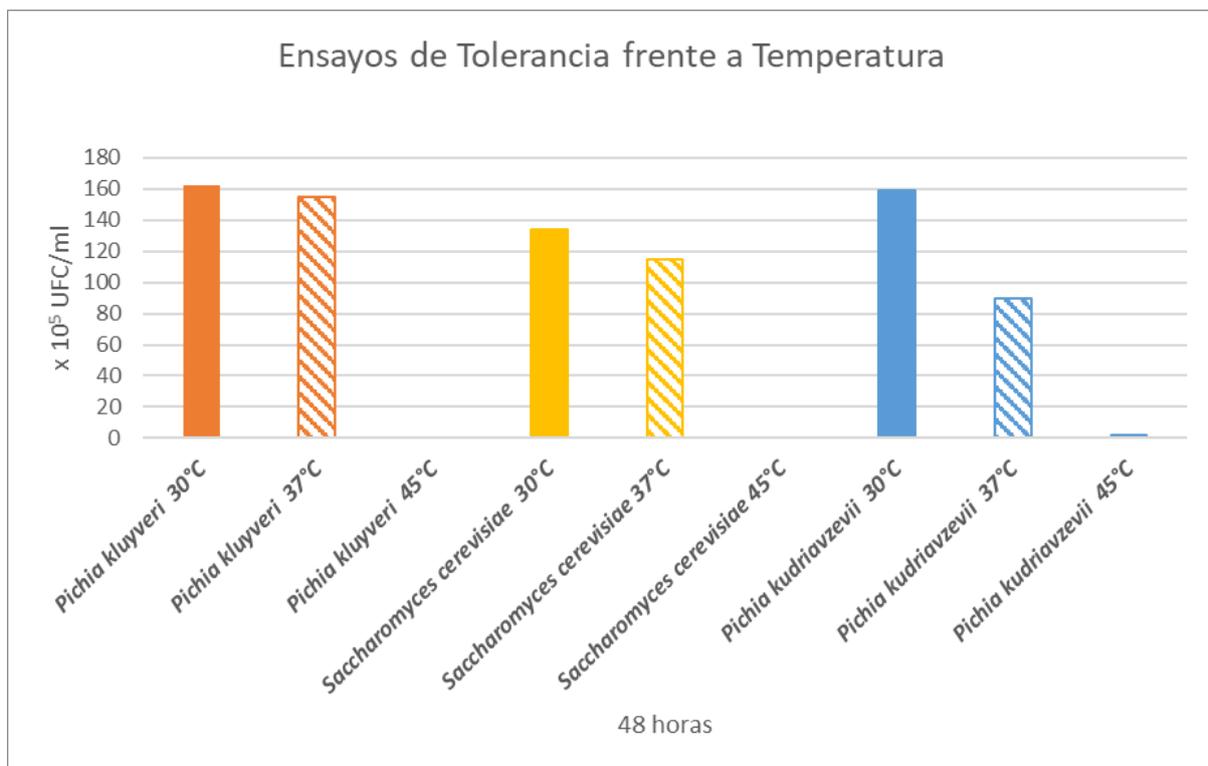
2.2 Ensayos de Tolerancia frente a Temperatura

En los ensayos de tolerancia frente a la temperatura en levaduras se evaluó el crecimiento a 30°C, 37°C y 45°C, durante un período de observación de 48 horas. Se registraron y analizaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) como medida de viabilidad y

adaptación de las levaduras a las condiciones térmicas variadas. Los resultados se resumen en la **Figura 4**.

Figura 4.

Ensayos de Tolerancia frente a Temperatura



Los resultados indican que *Pichia kudriavzevii* es la más resistente a altas temperaturas, seguida por *Pichia kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae*. Concretamente, la viabilidad de las levaduras puede verse altamente afectada por las temperaturas elevadas, por ejemplo a 45°C no hay crecimiento para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kluyveri* a una dilución de 10^5 ; aunque se podrían haber realizado ensayos experimentales a menores diluciones para verificar si existe crecimiento de colonias. Mientras que en el caso de *Pichia kudriavzevii* si hubo crecimiento de 2×10^5 UFC/ml, demostrando así la mayor capacidad de esta levadura para adaptarse al estrés térmico.

Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación de Ulya et al. (2020), quienes destacaron que *Pichia kudriavzevii* mostró una notable tolerancia a temperaturas de hasta 42°C. Además, la investigación de Samagi et al. (2016) indica que *Pichia kudriavzevii* resiste temperaturas de hasta 40°C, mostrando así validez en nuestro experimento. En nuestro ensayo,

se observó que la levadura *Pichia kudriavzevii* resistió hasta los 45°C, lo que sugiere que estas pueden soportar temperaturas aún más elevadas.

2.3 Ensayos de Tolerancia frente a pH y Ácido Acético 1%

Se realizaron ensayos de tolerancia frente a distintas condiciones de pH y a 1% de ácido acético, con el propósito de evaluar su capacidad de adaptación a diferentes condiciones de estrés. Los ensayos se realizaron en medio líquido, por lo que se reportan los resultados de manera cualitativa (Tabla 1).

Tabla 1

Ensayos de Tolerancia frente a pH y Ácido Acético 1%

Ensayos de tolerancia				
Levaduras				Ácido
	pH4	pH5	pH6	Acético 1%
<i>Pichia kluyveri</i>	✓	✓	✓	X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Pichia kudriavzevii</i>	✓	✓	✓	X

Las cepas de *Pichia kluyveri* y *Pichia kudriavzevii* mostraron tolerancia a las distintas condiciones de pH, sin embargo, no sobrevivieron en presencia de ácido acético al 1%. Esto podría sugerir que estas cepas son sensibles al ácido acético, incluso en concentraciones bajas. Las especies de *Saccharomyces cerevisiae* parecen ser más tolerantes, ya que sobrevivieron en todos los niveles de pH probados, así como en presencia de ácido acético al 1%. Esto podría sugerir que sería interesante analizar la tolerancia de esta levadura a concentraciones mayores de ácido acético. Arias et al. (2009) encontraron en su investigación que todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* exhiben tolerancia a un pH extremadamente ácido, entre 2,8 y 3,2, lo que evidencia su notable capacidad de adaptación a ambientes hostiles. Este hallazgo concuerda con la resistencia observada en este estudio a todos los niveles de pH y a la presencia de ácido acético, lo que resalta la capacidad de adaptación de esta levadura.

Finalmente, tanto Suárez et al. (2016) como Pilco et al. (2023) señalan que la mayoría de las levaduras prefieren ambientes ligeramente ácidos con un pH entre 4,5 y 6,5. Esto concuerda con los resultados de tolerancia de pH obtenidos en este estudio.

2.4 Ensayos de Capacidad para producir CO₂

Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad para producir CO₂ en las distintas especies de levaduras, con el objetivo de conocer su presunta capacidad fermentativa durante un período de 48 horas. Durante este tiempo, se registró y se observó la producción de dióxido de carbono como medida de la actividad fermentativa de las levaduras.

Los ensayos realizados indican que todas las levaduras utilizadas en esta investigación mostraron una capacidad fermentativa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas durante el periodo establecido. Esto sugiere que estas cepas poseen una buena capacidad fermentativa, pues en este ensayo se pudo evidenciar que en todos los casos los microorganismos fueron capaces de consumir los azúcares disponibles, generar CO₂ y presuntamente produjeron etanol.

En un estudio realizado por Samagaci et al. (2014) se demuestra la capacidad de las levaduras aisladas de cacao para oxidar el azúcar, en particular la glucosa, resultando como productos de su metabolismo etanol y gas. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en este estudio, quedando demostrada la importancia de las levaduras en el proceso de fermentación de cacao.

2.5 Actividad pectinolítica de levaduras

Entre los microorganismos que participan en la fermentación del cacao, las levaduras juegan un papel crucial, ya que son responsables de desencadenar varias reacciones bioquímicas que ayudarán a desarrollar las características sensoriales del grano (Ho et al., 2012). Un papel fundamental en este proceso lo juega la actividad pectinolítica, donde se elimina la pulpa mucilaginosa rica en pectina que envuelve los granos de cacao, cuya eliminación es necesaria para una correcta fermentación (De Vuyst & Leroy, 2020).

A las levaduras y otros microorganismos, se le atribuye la actividad pectinolítica. Esta actividad puede venir dada por un conjunto de enzimas que degradan la pectina, dentro de las cuales están: poligalacturonasa, pectinesterasa, pectinoliasa y pectatoliasa. Estas enzimas catalizan la descomposición de sustancias pécticas unidas mediante distintos tipos de enlaces, rompiendo las cadenas homogalacturónicas de las pectinas, siendo las encargadas de la degradación de la cadena principal de estas moléculas (Otárola, 2018).

La pectinólisis en levaduras está mediada generalmente por la expresión de genes de (endo) poligalacturonasa (Meersman et al., 2017). Sin embargo, la presencia de estos genes no siempre está relacionada con la degradación de la pectina, ya que puede verse influenciada por condiciones fisicoquímicas durante la fermentación del cacao (Samagaci et al., 2014). La enzima poligalacturonasa presente en las levaduras descompone la estructura principal de la pectina en la pulpa de cacao al hidrolizar los enlaces α -1,4-glicosídicos, lo que conduce a la reducción significativa de la firmeza elástica y fibrosa de la pulpa. Por su parte, las condiciones físico-químicas bajo las cuales la enzima se activa van a variar mucho dependiendo del tipo de levadura, pH y temperaturas, e incluso los niveles de oxígeno (Blanco et al., 1999; Samagaci et al., 2014).

En el caso específico del género *Saccharomyces cerevisiae*, estudios de Buamah et al. (1997) y Dzogbefia et al. (1999) han demostrado que esta levadura posee una notable actividad pectinolítica. Esta capacidad enzimática es de gran relevancia, ya que favorece una descomposición más rápida de la pulpa de cacao, lo cual presenta implicaciones significativas para la optimización de los procesos de fermentación.

Conclusiones

Este estudio demostró que la levadura *Pichia kudriavzevii* posee una notable tolerancia a azúcares, etanol, ácido láctico y altas temperaturas, superando la capacidad de adaptación de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo crecimiento se vio disminuido por el estrés inducido. *Pichia kluyveri*, por otro lado, exhibió una tolerancia variable, mostrando tolerancia media a los azúcares y alta tolerancia al ácido láctico al 1% y pH. En cuanto a la temperatura, presentó una tolerancia media, a diferencia de otras levaduras como *Pichia kudriavzevii*, y no toleró el ácido láctico.

Respecto a la producción de CO₂, se evidenció actividad fermentativa en todas las especies evaluadas, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que confirma su capacidad para fermentar los azúcares.

Finalmente, a partir del estudio sistemático, se destaca la importancia de la actividad pectinolítica de las levaduras en la fermentación del cacao, ya que descomponen la pectina de la pulpa y mejoran la permeabilidad de los granos, facilitando así las reacciones durante el proceso.

Referencias

- Afoakwa, E. O. (2016). *Chocolate science and technology*. John Wiley & Sons.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 840-857.
- Araujo, K., Berradre, M., Rivera, J., Cáceres, A., Páez, G., Aiello, C., & Pérez, D. (2016). Fusión intergénica de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora guilliermondii*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36(2), 51-57.
- Arias, A., Barrio, E., Belloch, C., Quillama, E., & Querol, A. (2009). Caracterización fisiológica y enzimática de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de masato, bebida fermentada tradicional de Perú. En VII International Symposium on the Production of Alcohols and Yeasts.
- Bastos, V. S., Uekane, T. M., Bello, N. A., de Rezende, C. M., Flosi Paschoalin, V. M., & Del Aguila, E. M. (2019). Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *Journal of food science and technology*, 56(6), 2874-2887.
- Blanco, P., Sieiro, C., & Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 175(1), 1-9.
- Buamah, R., Dzogbefia, V.P. & Oldham, J.H. (1997) Pure yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 457–462.
- Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., ... & De Vuyst, L. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 86-98.
- Chagas Junior, G. C. A., Ferreira, N. R., Andrade, E. H. D. A., Nascimento, L. D. D., Siqueira, F. C. D., & Lopes, A. S. (2021). Profile of volatile compounds of on-farm fermented

and dried cocoa beans inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* KY794742 and *Pichia kudriavzevii* KY794725. *Molecules*, 26(2), 344.

Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L., ... & Ji, H. (2023). Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. *Journal of Fungi*, 9(2), 170.

da Veiga Moreira, I. M., Miguel, M. G. D. C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54(1), 9-17.

Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS yeast research*, 9(5), 774-783.

de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 7, 50-57.

De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 432-453.

De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5-17.

De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5-17.

Díaz Ponce, S. L., & Pinoargote Chang, M. H. (2012). Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas (Bachelor's thesis, 2012).

Díaz-Montenegro, J., Varela, E., & Gil, J. M. (2018). Livelihood strategies of cacao producers in Ecuador: Effects of national policies to support cacao farmers and specialty cacao landraces. *Journal of Rural Studies*, 63, 141-156.

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

Díaz-Muñoz, C., Van de Voorde, D., Comasio, A., Verce, M., Hernandez, C. E., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2021). Curing of cocoa beans: fine-scale monitoring of the starter cultures applied and metabolomics of the fermentation and drying steps. *Frontiers in Microbiology*, 11, 616875.

Dzoghbeia, V.P., Buamah, R. & Oldham, J.H. (1999) The controlled fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L) using yeasts: enzymatic process and associated physico-chemical changes in cocoa sweatings. *Food Biotechnology*, 13, 1–12.

Figuroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z.J., González-Ríos, O., Cocolin, L. et al. (2019) The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41–50.

Guimarães, T. M., Moriel, D. G., Machado, I. P., Picheth, C. M., & Bonfim, T. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 119-126.

Gutiérrez-Ríos, H. G., Suárez-Quiroz, M. L., Hernández-Estrada, Z. J., Castellanos-Onorio, O. P., Alonso-Villegas, R., Rayas-Duarte, P., ... & González-Ríos, O. (2022). Yeasts as producers of flavor precursors during cocoa bean fermentation and their relevance as starter cultures: a review. *Fermentation*, 8(7), 331.

Herrmann, L., Felbinger, C., Haase, I., Rudolph, B., Biermann, B., & Fischer, M. (2015). Food fingerprinting: characterization of the Ecuadorean type CCN-51 of *Theobroma cacao* L. Using microsatellite markers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(18), 4539-4544.

Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., ... & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910-917.

Lanaud, C., Vignes, H., Utge, J., Valette, G., Rhoné, B., Garcia Caputi, M., ... & Argout, X. (2024). A revisited history of cacao domestication in pre-Columbian times revealed by archaeogenomic approaches. *Scientific Reports*, 14(1), 2972.

Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M. G., Santos, C., Lima, N., & Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a microbial cocktail used as a starter culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. *Molecules*, 22(5), 766.

Meersman, E., Struyf, N., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Santiago, J. S., Baert, E., ... & Steensels, J. (2017). Characterization and degradation of pectic polysaccharides in cocoa pulp. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(44), 9726-9734.

Mota-Gutierrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I., & Cocolin, L. (2019). Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients*, 11(4), 884.

Mota-Gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., ... & Cocolin, L. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01164-18.

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, 22(4), 271-284.

Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., & Siow, L. F. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *Lwt*, 122, 108977.

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

Otárola Gamarra, A. (2018). Efecto de la enzima pectolítica y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en la fermentación y calidad del cacao var. criollo (*Theobroma cacao*).

Ouattara, H. G., & Niamké, S. L. (2021). Mapping the functional and strain diversity of the main microbiota involved in cocoa fermentation from Cote d'Ivoire. *Food Microbiology*, 98, 103767.

Papalexandratou, Z., Kaasik, K., Kauffmann, L. V., Skorstengaard, A., Bouillon, G., Espensen, J. L., ... & Nielsen, D. S. (2019). Linking cocoa varietals and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *International Journal of Food Microbiology*, 304, 106-118.

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35(2), 73-85.

Pereira, G. V. D. M., Miguel, M. G. D. C. P., Ramos, C. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5395-5405.

Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013). *Chocolate in health and nutrition* (pp. 289-297). R. R. Watson (Ed.). London, UK:: Humana Press.

Quiroz Vera, J. (2020). *El cacao, historia y relevancia para América Latina y el Caribe*. Instituto Nacional de Industrias Agropecuarias.

Salazar, M. M. M., Alvarez, O. L. M., Castaneda, M. P. A., & Medina, P. X. L. (2022). Bioprospecting of indigenous yeasts involved in cocoa fermentation using sensory and chemical strategies for selecting a starter inoculum. *Food Microbiology*, 101, 103896.

Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food control*, 29(1), 167-187.

Samagaci, L., Ouattara, H., Niamké, S., & Lemaire, M. (2016). *Pichia kudrazevii* and *Candida nitrativorans* are the most well-adapted and relevant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. *Food Research International*, 89, 773-780.

Santander Muñoz, M., Rodríguez Cortina, J., Vaillant, F. E., & Escobar Parra, S. (2020). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(10), 1593-1613.

Santander Muñoz, M., Rodríguez Cortina, J., Vaillant, F. E., & Escobar Parra, S. (2020). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(10), 1593-1613.

Santos, D. S., Rezende, R. P., Dos Santos, T. F., Marques, E. D. L. S., Ferreira, A. C. R., e Silva, A. B. D. C., ... & Bisneto, J. D. T. (2020). Fermentation in fine cocoa type Scavina: Change in standard quality as the effect of use of starters yeast in fermentation. *Food chemistry*, 328, 127110.

Savitri, E. S., Rahmah, A., & Daryono, R. N. H. (2024, February). Screening and characterization of potential bioethanol production yeast from tropical fruits. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1312, No. 1, p. 012037). IOP Publishing.

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.

Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20-28.

Ulya, D., Astuti, R. I., & Meryandini, A. (2020). The ethanol production activity of indigenous thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* 1P4. *Microbiology Indonesia*, 14(4), 1-11.

Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196.

Watson, R.R., Preedy, V.R. & Zibadi, S. (2013) *Chocolate in health and nutrition*. Totowa: Humana Press.

Anexos

Anexos 1

Ensayos de Tolerancia frente a azúcares

Levadura	Glucosa 5%	Glucosa 15%	Fructosa 5%	Fructosa 15%
<i>Pichia kluyveri</i>	175 x 10 ⁵	141 x	133 x	106 x
	UFC/ml	10 ⁵ UFC/ml	10 ⁵ UFC/ml	10 ⁵ UFC/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	133 x	106 x
	UFC/ml	UFC/ml	10 ⁵ UFC/ml	10 ⁵ UFC/ml
<i>Pichia kudriavzevii</i>	326 x	300 x	132 x 10 ⁵	157 x 10 ⁵
	10 ⁴ UFC/ml	10 ⁵ UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml

Fuente: Elaboración propia

Anexos 2

Ensayos de Tolerancia frente a Etanol

Levadura	Etanol 6%	Etanol 10%	Etanol 12%
<i>Pichia kluyveri</i>	141 x 10 ⁵	138 x 10 ⁵	93 x 10 ⁵
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	146 x 10 ⁵	142 x 10 ⁵	106 x 10 ⁵
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
<i>Pichia kudriavzevii</i>	253 x 10 ⁵	204 x 10 ⁵	46 x 10 ⁵
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml

Fuente: Elaboración propia

Anexos 3

Ensayos de Tolerancia frente a Ácido Láctico

Levadura	Ácido Láctico	Ácido Láctico	Ácido Láctico	Ácido Láctico
	1%	2%	3%	5%
<i>Pichia kluyveri</i>	191 x 10 ⁵	0	0	0
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	ufc/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	134 x 10 ⁵	0	0	0
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	ufc/ml
<i>Pichia kudriavzevii</i>	161 x 10 ⁵	102 x 10 ⁵	84 x 10 ⁵	12 x 10 ⁵
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml

Fuente: Elaboración propia

Anexos 4

Ensayos de Tolerancia Frente a Temperatura

Levadura	30°C	37°C	45°C
<i>Pichia kluyveri</i>	162 x 10 ⁵	155 x 10 ⁵	0
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	134 x 10 ⁵	115 x 10 ⁵	0
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
<i>Pichia kudriavzevii</i>	159 x 10 ⁵	90 x 10 ⁵	2 x 10 ⁵
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml

Fuente: Elaboración propia