



**CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS (BAL) RECUPERADAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
CACAO CON POTENCIAL USO INDUSTRIAL.**

**Carlos Daniel Herrera Acosta**

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Microbiología Industrial  
Bogotá D.C, Colombia

2021

**CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS (BAL) RECUPERADAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
CACAO CON POTENCIAL USO INDUSTRIAL.**

Carlos Daniel Herrera Acosta

**Trabajo de grado**

**Microbiología Industrial**

Deyci Roció Rodríguez Cordero

**Directora**

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología Industrial

Bogotá D.C, Colombia

2021

**CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS (BAL) RECUPERADAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
CACAO CON POTENCIAL USO INDUSTRIAL.**

**Carlos Daniel Herrera Acosta**

---

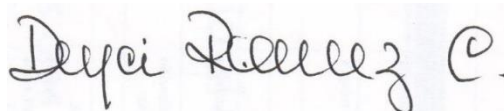
**Directora de Carrera**  
Marcela Franco Correa, M.Sc. Ph.D.

Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Microbiología Industrial  
Bogotá D.C, Colombia

2021

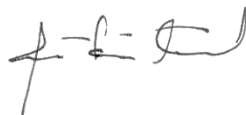
**CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS (BAL) RECUPERADAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
CACAO CON POTENCIAL USO INDUSTRIAL.**

**Carlos Daniel Herrera Acosta**



**Tutora**

Deyci Roció Rodríguez Cordero, M. Sc.



**Jurado**

Ana Karina Carrascal Camacho, M. Sc.

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología Industrial

Bogotá D.C, Colombia

2021

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución *n.º* 13 de Julio de 1946

## **Agradecimientos**

A mis padres Ruby Acosta y Carlos Herrera por ser mi apoyo incondicional e inspiración y ejemplo de vida, por darme su amor, comprensión y paciencia.

A mi directora Deyci Rodríguez por su disposición y orientación en este proceso de aprendizaje continuo, por depositar su confianza y apoyarme en mi trabajo de grado.

Al Team por la lealtad y el apoyo durante todo mi trayecto universitario, son personas y amigos increíbles.

## Tabla de contenido

<b>1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>Planteamiento de problema .....</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>Marco teórico .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Fermentación .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Probióticos del cacao .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Levaduras.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Bacterias ácido lácticas (BAL) .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Microorganismos de interés .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Antecedentes .....</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>General.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Condiciones de crecimiento e identificación de microorganismos.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Actividad antimicrobiana .....</b>	<b>25</b>
<b>5.3</b>	<b>Tolerancias a pH ácido .....</b>	<b>27</b>
<b>5.4</b>	<b>Tolerancia a temperatura.....</b>	<b>28</b>
<b>5.5</b>	<b>Viabilidad de las cepas al almacenamiento .....</b>	<b>28</b>
<b>5.6</b>	<b>Pruebas bioquímicas API .....</b>	<b>29</b>
<b>5.6.1</b>	<b>API 20 C AUX .....</b>	<b>29</b>
<b>5.6.2</b>	<b>API 50 CH.....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1</b>	<b>Microorganismos obtenidos de la fermentación autóctona del cacao .....</b>	<b>31</b>
<b>6.2</b>	<b>Actividad antimicrobiana .....</b>	<b>34</b>
<b>6.3</b>	<b>Tolerancia a pH ácido y temperatura.....</b>	<b>36</b>
<b>6.4</b>	<b>Viabilidad de las cepas al almacenamiento.....</b>	<b>39</b>
<b>6.5</b>	<b>Pruebas bioquímicas API. ....</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>Recomendación .....</b>	<b>44</b>
<b>9.</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>45</b>

10. Anexos.....	52
-----------------	----

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1. Caracterización macroscópica de las levaduras .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 2. Características microscópicas (100X) y macroscópicas de las BAL .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 3. Microscopia de algunas de las cepas aisladas de la fermentación del cacao</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 4. Macroscopia de algunas de las cepas aisladas de la fermentación del cacao</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 5. Promedio de réplicas BAL vs <i>L. monocytogenes</i> y BAL vs <i>E. coli</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 6. Promedio de réplicas BAL vs <i>L. monocytogenes</i> y BAL vs <i>E. coli</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 7. Cambio de nomenclatura de los microorganismos seleccionados .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 8. Promedio de réplicas BAL vs <i>L. monocytogenes</i> y BAL vs <i>E. coli</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 9. Promedio de réplicas Levaduras vs <i>L. monocytogenes</i> y Levaduras vs <i>E. coli</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 10. Tolerancia por triplicado a diferentes pH y temperaturas de las cepas de levaduras .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 11. Tolerancia por triplicado a diferentes pH y temperaturas de las cepas de BAL .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 12. Recuento de ensayo de adaptabilidad .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 13. Recuentos de viabilidad en almacenamiento primer ensayo (L2 + B3) ....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 14. Recuentos de viabilidad en almacenamiento segundo ensayo (L5 + B5) ..</b>	<b>41</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1. Microscopias en 100X .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 2. Resultado API 20 C AUX .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 3. Resultado API 50 CHL .....</b>	<b>54</b>

## Resumen

La fermentación del cacao es un proceso en el que están involucrados diferentes grupos microbianos, dentro de lo que se incluye levaduras: bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias del ácido acético. Estas, juegan un papel importante no solo en la fermentación del fruto, sino también en la producción de diferentes moléculas precursoras del aroma, sabor y color distintivo, que se forman en el secado y tostado, lo que conduce a una calidad y sabores variables del cacao. A partir, de estos microorganismos autóctonos del cacao principalmente levaduras y BAL, las cuales tienen potencial actividad probiótica, ya que reducen el crecimiento de bacterias y hongos por competencia de sustratos y producen metabolitos antimicrobianos como alcoholes, ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, entre otros; permitiendo la reducción de microorganismos patógenos. De aquí, el interés en evaluar y caracterizar cepas de levaduras y BAL de la fermentación del cacao en búsqueda de cepas probióticas que tengan potencial uso en la industria. Entre estos microorganismos se encuentran cepas de levaduras de los géneros: *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, entre otros. Respecto a las BAL encontramos de los géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Lactiplantibacillus*, entre otros.

De esta manera, se realizó una revisión de la literatura científica y sucesivamente se llevó a cabo la evaluación y caracterización de la capacidad probiótica de cepas de levaduras y BAL de la fermentación del cacao en el laboratorio de microbiología de alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana. Para caracterizar las BAL y las levaduras se aislaron e identificarán por morfotipo las cepas de estudio. Posteriormente se realizaron ensayos para la actividad probiótica como crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia pH, actividad antimicrobiana y viabilidad en almacenamiento. Finalmente, de las 16 cepas se encontraron 2 con potenciales características de probióticos la #13 y la #4, las cuales mostrarán mejores resultados y se identificarán mediante pruebas de identificación bioquímica API de Biomerieux® obteniendo los siguientes microorganismos: *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (# 13) y *Saccharomyces cerevisiae* (# 4).

## Abstract

Cocoa fermentation is a process in which different microbial groups are involved, among them we find yeasts, lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria. These play an important role not only in the fermentation of the fruit, but also in the production of different precursor molecules of the aroma, flavor and distinctive color, which are formed during drying and roasting, which leads to variable cocoa quality and flavors. From these autochthonous cacao microorganisms, mainly yeasts and LAB, which have potential probiotic activity since they reduce the growth of bacteria and fungi by competition of substrates and produce antimicrobial metabolites such as alcohols, organic acids, enzymes, bacteriocins, among others; allowing the reduction of pathogenic microorganisms. Hence the interest in evaluating and characterizing yeast strains and LAB from cocoa fermentation in search of probiotic strains that have potential use in the industry. Among these microorganisms we find yeast strains of the genera: *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, among others; and regarding the LAB we find the genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Lactiplantibacillus*, among others. In this way, a review of the scientific literature was carried out and the evaluation and characterization of the probiotic capacity of yeast strains and LAB from cocoa fermentation was carried out in the food microbiology laboratory of the Pontificia Universidad Javeriana. To characterize the LAB and yeasts, the study strains were isolated and identified by morphotype, later tests were carried out for probiotic activity such as growth at different temperatures, pH tolerance, antimicrobial activity and viability in storage. Finally, of the 16 strains, 2 were found with potential probiotic characteristics # 13 and # 4, which showed better results and were identified by API biochemical identification tests of Biomerieux® obtaining the following microorganisms: *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (# 13) and *Saccharomyces cerevisiae* (# 4).

## 1. Introducción

La fermentación de materias primas de la agricultura es un proceso biotecnológico que se practica para producir alimentos fermentados de alta calidad microbiológica, organoléptica y nutricional. Para este fin, se utilizan los microorganismos autóctonos de la materia prima o se puede inocular un cultivo iniciador microbiano. Un ejemplo de fermentación autóctona es el caso del cacao de cultivo comercial, estas fermentaciones se realizan en lotes y pueden diferir en las especies, recuentos microbianos, los compuestos, condiciones ambientales (temperatura, pH y tensión de oxígeno), concentraciones de sustratos y metabolitos a lo largo del tiempo, lo que conduce a una calidad de fermentación y sabores variables del cacao [1, 2].

En el inicio de la fermentación es necesaria la colonización microbiana definida de levaduras, bacterias ácido-lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), en ese orden para eliminar la pulpa ácida que rodea los granos de cacao, permite que los metabolitos ingresen al cotiledón, convirtiendo los sabores astringentes y amargos en precursores de aroma y sabor como aldehídos, ácidos orgánicos y ésteres. Sin embargo, los hongos filamentosos también pueden crecer en las capas externas durante el secado, esta colonización se asocia con sabores desagradables y producción de micotoxinas [1, 3, 4, 32]. Es así, como las levaduras y las bacterias ácido lácticas (BAL) reducen el crecimiento de hongos y bacterias por la competencia de sustratos y la producción de metabolitos antimicrobianos como alcohol, ácido láctico y acético. También, limitan su crecimiento el pH bajo y las altas temperaturas [3].

En el proceso de fermentación del cacao se busca potenciales microorganismos probióticos, es decir cepas de BAL y levaduras que pueden ser más prometedoras y útiles para aplicaciones industriales y para la salud humana en la prevención de enfermedades. De acuerdo con lo anterior, la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definieron que los probióticos son microorganismos vivos que al administrarse en proporciones adecuadas otorgan un beneficio para la salud del hospedero [5, 6]. Entre los beneficios se encuentra el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal, la reducción del colesterol sérico,

reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa, reducción de cáncer de colon, la prevención de alergias en individuos susceptibles y una mejor respuesta inmune. Los microorganismos probióticos deben ser tolerantes a los factores de estrés que prevalecen en el tracto gastrointestinal, el pH y las sales biliares para mantener su viabilidad garantizando beneficios para la salud del consumidor. Además, es importante que las cepas probióticas sean sensibles a antibióticos, para evitar que algunas presenten genes de resistencia a antibióticos que sean transferibles a microorganismos patógenos cuando lleguen a el intestino humano o animal [5, 8]. De esta manera, se pretende dar respuesta a la siguiente pregunta. ¿Cuál es la capacidad probiótica de cepas aisladas de levaduras y BAL recuperadas de la fermentación del cacao con potencial uso industrial?

## **2. Planteamiento de problema**

Analizar las características de cepas aisladas de la fermentación del cacao potencialmente probióticas, las cuales pueden ser beneficiosas para la salud referenciado en la literatura científica; en los cuales se han demostrado ventajas competitivas en la colonización del intestino contra las infecciones entero-patógenas, gracias a la adhesión de estas cepas a la mucosa intestinal que conduce a la formación de biopelículas, evitando la adhesión de patógenos que pueden invadir las células epiteliales intestinales [9, 10]. Además, la búsqueda de nuevos probióticos que podrían tener efectos únicos y beneficiosos en la salud humana, y/o para ser utilizados en el continuo desarrollo de la biotecnología industrial de alimentos, teniendo en cuenta que cada cepa de microorganismos posee diferentes propiedades metabólicas eficaces y eficientes que pueden tener o que pueden ir adquiriendo mediante la adaptabilidad evolutiva de manera natural o antropogénica. Es importante, que estas cepas probióticas se evalúen por sus características funcionales principalmente su resistencia gastrointestinal a pH ácido, su viabilidad y estabilidad en el almacenamiento industrial, su resistencia a temperaturas mimetizando tanto procesos industriales como en sistema gastrointestinal [7, 11].

Por lo expuesto anteriormente, esta investigación pretende buscar y encontrar nuevas cepas de microorganismos o microorganismos ya estudiados con mejores adaptaciones aislados del proceso de fermentación autóctona del cacao que sean potenciales probióticos, para llegar a ser utilizados en el desarrollo de la biotecnología industrial de alimentos así como en la industria farmacéutica, en la generación tanto de productos alimenticios con adición de probióticos como productos farmacéuticos, que mejore y ayude a la salud de los seres humanos y los procesos fermentativos e industriales del cacao u otros alimentos.

### **3. Marco Teórico**

#### **3.1 Fermentación**

Hoy en día, existe una gran cantidad de evidencia que afirma el regreso y apreciación de las prácticas tradicionales de la fermentación de alimentos y bebidas, las cuales fueron originalmente utilizadas para ampliar la vida útil de materias primas perecederas. Sin embargo, las razones para comprender esta tendencia en la actualidad, está asociada a la fermentación como vehículo para obtener probióticos y prebióticos con alta viabilidad y funcionalidad. A partir de estas prácticas, aplicar el conocimiento actual y prospectar a aplicaciones industriales. Así mismo, esta tecnología de bioprocesos utiliza microorganismos autóctonos del alimento y sus enzimas metabólicas que, a condiciones de temperatura, disponibilidad de oxígeno, pH, y concentración de azúcar adecuadas, realizan transformaciones bioquímicas de acidificación, alcoholización, proteólisis y conversión de aminoácidos, aumentando las propiedades organolépticas de los alimentos de calidad en cuanto al aroma, la textura, el sabor, el color y su vida útil [9, 12, 13, 22, 23].

La fermentación es una herramienta que desempeña un papel importante para producir y elaborar alimentos y bebidas funcionales no solo nutritivos de forma natural, barata y sostenible, sino también alimentos entre estos el cacao que cuenta con microorganismos probióticos, que interactúan directamente con el hospedero o promueven la ingesta de sus metabolitos sintetizados, obteniendo beneficiosos para la salud, como la modulación de la microbiota, hipocolesterolemia (inhibición de la formación del colesterol), antihipertensivas (reduce la presión arterial) y efectos inmunomoduladores (estimulan el sistema inmunitario) [9, 12, 13, 22].

#### **3.2 Probióticos del cacao**

En el proceso de fermentación del cacao se involucran y predominan tres diferentes grupos microbianos que realizan su actividad en una sucesión cronológica bien definida de levaduras, BAL y bacterias del ácido acético. Las actividades microbianas son importantes no solo para la degradación del mucilago sino también para la producción de diferentes moléculas precursoras del aroma, sabor y color distintivo, que se forman durante el secado y tostado; y que son dependientes del tipo de cacao y la adición de comunidades microbianas o no [9, 12, 13, 27, 30]. Durante un tiempo, se pensó que la fermentación era una manera fácil de remover la pulpa para facilitar el proceso de secado, pero su importancia en la calidad del cacao ha sido bien establecida [29].

Es por esta razón, que se ha estimulado la investigación, el desarrollo y la comercialización de preparaciones de microorganismos provenientes de fermentaciones autóctonas de diferentes alimentos que tienen potenciales capacidades beneficiosas para ser posibles probióticos. De esta manera, se prevé que el valor del mercado mundial de probióticos genere un valor de 69,3 mil millones de dólares para el 2023. Debido a que los consumidores tienen la posibilidad de comprar productos “Premium” incorporados con probióticos, ya que recurren a bebidas y alimentos funcionales para mejorar la salud en general. Los productos lácteos han sido la fuente más popular de probióticos disponibles en el mercado. Sin embargo, la demanda de productos de origen vegetal a base de cereales, frutas y verduras como alternativa para los probióticos, está aumentando como resultado de la elección de estilo de vida como lo son: el vegetarianismo y el veganismo; y también al aumento de las tasas de alergias a la leche [9, 22].

Los probióticos no siempre pertenecen a la microbiota autóctona del hospedero, se pueden seleccionar de otras fuentes como alimentos y bebidas fermentadas, encontrando cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, entre otros; estos microorganismos afectan de manera benéfica la salud del hospedero cuando se ingieren en cantidades suficientes, protegiendo contra patógenos en el tracto digestivo del hospedero a través del antagonismo, la competencia de sustrato, por la producción de ácidos orgánicos y compuestos antimicrobianos. Algunos efectos prácticos de los probióticos sobre infecciones intestinales son principalmente, el mantenimiento de la microbiota autóctona e incluso el alivio de la intolerancia a la lactosa [14, 24]. Para el tratamiento de enfermedades



infecciosas como la diarrea se recomienda la rehidratación y en algunos casos el uso de antibióticos para combatir patógenos. No obstante, la OMS recomienda evitar el uso de estos antibióticos porque modifican la microbiota intestinal protectora lo que facilita la colonización de patógenos. Además, el uso excesivo de antibióticos ha acelerado la resistencia antimicrobiana de los patógenos, por lo tanto, se inició la búsqueda de tratamientos alternos para estas infecciones, y se propuso los probióticos. Los más utilizados comercialmente en humanos pertenecen al grupo de las BAL y provienen del tracto gastrointestinal humano debido a que estos tienen una mejor adaptación al reintroducirse. Sin embargo, han aumentado el uso de probióticos que provienen de fuentes alternativas no convencionales tales como alimentos y bebidas fermentadas, como se mencionó anteriormente [10, 14, 20].

Para la selección de cepas probióticas se consideran varios aspectos importantes, en los que se incluye estar relacionados con uno o más de estos mecanismos, como la modulación de la microbiota intestinal, el bloqueo de los sitios de adhesión de patógenos, la modulación de las respuestas inmunitarias del hospedero, la competencia por nutrientes y como prioridad la seguridad del consumidor, es decir la susceptibilidad a antibióticos y actividad hemolítica; y las funcionalidades fisiológicas como tolerancia a ácidos y sales biliares, hidrofobicidad de la superficie celular, autoagregación, coagregación con patógenos y actividad antagonista contra patógenos. Además, la temperatura de desarrollo y su supervivencia en el entorno alimentario son características principales para la selección de cepas probióticas, ya que deben permanecer viables a la temperatura interna que se encuentra en el hospedero, en el caso de los seres humanos debe ser de 37°C [9]. Respecto a el pH y las sales biliares, los microorganismos probióticos deben poder sobrevivir a condiciones ácidas en el estómago debido a que deben tolerar el bajo pH del jugo gástrico y resistir los ácidos biliares al comienzo del intestino delgado. El pH del HCL excretado en el estómago es de 1. Sin embargo, la presencia de alimentos eleva el valor de pH de 2 a 3 [24, 26]. Las sales biliares se sintetizan a partir del colesterol en el hígado, se almacenan en la vesícula biliar y se liberan en el intestino delgado después de la ingesta de una comida grasosa. Algunos microorganismos son capaces de hidrolizar las sales biliares con la enzima hidrolasa de sales biliares disminuyendo su solubilidad y debilitando así su efecto detergente. La resistencia a estas sales varía entre especies de microorganismos, uno de estos es *Lactobacillus* sp. Para

seleccionar probióticos para el hombre las cepas deben resistir concentraciones de 0,3% de sales biliares, así como valores de pH 2 a 3 como ya se mencionó [24].

El aislamiento de microorganismos no solo a partir del cacao sino de otros alimentos fermentados tienen una variabilidad asociada con la fermentación espontánea, casi todos los procesos de fermentación en alimentos, incluido la producción de cerveza, vino y pan, se inoculan con cultivos iniciadores definidos, obteniendo parámetros de fermentación reproducibles y una calidad constante del producto, de aquí la importancia de encontrar un grupo de microorganismos adecuados para los procesos de fermentación del cacao y que cuenten con capacidad probiótica para el consumo humano y animal. Estos cultivos iniciadores definidos deben ser fuertes competidores contra la microbiota, crecer hasta cantidades que puedan tener efecto de promoción de la salud, para mejorar la seguridad, aumentar la calidad nutricional y sensorial. Además, estos pueden ser bio-preservantes naturales que eviten el uso de conservantes sintéticos y sean útiles en la inhibición de fitopatógenos en el alimento [9, 24, 27, 30, 31].

### **3.2.1 Levaduras**

La población microbiana de levaduras en determinadas frutas es de alrededor de  $10^2 - 10^6$  UFC/g, son el grupo predominante y *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, entre otras, son los géneros comúnmente encontrados. La diversidad de estas levaduras se asocia a como se realiza el proceso de fermentación, variando en términos de ubicación, país productor, condiciones climáticas y métodos de duración de la fermentación. Estas se han destacado por su comportamiento propicio en aplicaciones biotecnológica, demostrando un potencial probiótico al producir metabolitos como ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas y exopolisacáridos [9, 27, 29, 31]. A pesar de su importancia y amplia distribución en alimentos, las levaduras como posibles candidatos probióticos han sido poco investigadas. Actualmente, una de las pocas levaduras cuyo uso es respaldado por un marco regulatorio y aceptación comercial es *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Las levaduras pueden interferir benéficamente con la salud del hospedero, como la estimulación del sistema

inmunológico, la inducción del crecimiento de otros probióticos, la degradación de toxinas bacterianas y la competencia con patógenos por la adhesión a las células epiteliales gastrointestinales. También, las levaduras son resistentes a los antibióticos (sin transferir genes de resistencia a otros microorganismos). Finalmente, se ha demostrado que varias de ellas producen compuestos bioactivos (folato, péptidos bioactivos, betaglucano, carotenoides, entre otras) los cuales promueven la salud en el cuerpo teniendo efecto protector del sistema cardiocirculatorio, reducción en la presión sanguínea y del riesgo de cáncer, regulación de la glucemia y la colesterolemia, entre otros beneficios [22].

De manera que, a partir de la fermentación de un alimento como el cacao se da el desarrollo y la actividad de las levaduras, las cuales cumplen un papel esencial para la obtención de propiedades sensoriales codiciadas en el cacao. Estos microorganismos dominan el primer paso de la fermentación debido a sus actividades pectinolíticas, su tolerancia al etanol, ácido, calor y su adaptación a la pulpa y al grano del cacao realizando la fermentación alcohólica de los azúcares de la pulpa y la degradación de la pectina facilitando la aireación del grano, lo que favorece el crecimiento de BAL [12, 13, 31].

### **3.2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)**

Las bacterias del ácido láctico son residentes normales del tracto gastrointestinal, algunas de estas bacterias funcionan como probióticos, pero representan una parte minoritaria de la microbiota autóctona del cacao comparándolas con las levaduras [9, 24]. Los lactobacilos han sido investigados extensamente sobre su crecimiento, requerimientos nutricionales y actividad metabólica para mejorar su actividad fermentativa. *Lactobacillus acidophilus* es una de las especies presentes en la microbiota natural del intestino humano y animal, pero también se ha encontrado en frutas. Cuando están presente en cantidades suficientes, como probióticos son capaces de crear un equilibrio saludable entre la microbiota beneficiosa y los microorganismos patógenos en el intestino previniendo infecciones intestinales [25, 28]. Las BAL pueden tener propiedades probióticas, metabolizando los azúcares y el ácido cítrico para producir ácidos orgánicos (ácido láctico principalmente), enzima, etanol, bacteriocinas y otros compuestos que contribuyen a aumentar la vida útil de los productos alimenticios,

mejoran sus características fisicoquímicas y sensoriales, y confieren efectos en la salud de las personas sí se consumen en cantidades adecuadas. Las cepas más utilizadas como probióticos son las BAL, representadas por especies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*), *Lactiplantibacillus* (*L. plantarum*), *Ligilactobacillus* (*L. salivarius*), *Lacticaseibacillus* (*L. rhamnosus*). Además, cepas de *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. animalis*), *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, entre otros [9, 27, 31]. Es de resaltar, que tanto las levaduras como las BAL predominan en la mayoría de los productos fermentados como carnes, cereales, frutas, bebidas alcohólicas, entre otros alimentos; algunos de estos microorganismos son probióticos y la mayoría son potenciales probióticos que pueden prevenir infecciones en el tracto gastrointestinal [12, 13].

### **3.3 Microorganismos de interés**

#### **3.3.1 *Escherichia coli***

*E. coli* es un bacilo Gram negativo, no esporulado, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas, es anaerobio facultativo, es una bacteria mesófila, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Puede crecer a pH de 4 – 9 y con una actividad de agua ( $a_w$ ) < 0,94. No todas las especies son patógenas, es transmitida por los alimentos, produce enfermedades gastrointestinales, que pueden llegar a la muerte. Algunas de estas cepas son *E. coli* productora de la toxina Shiga y *E. coli* enterohemorrágica [33, 34].

#### **3.3.2 *Listeria monocytogenes***

Es un bacilo corto Gram positivos patógeno, anaerobia facultativa, móvil, no esporulada, es un microorganismo psicrótrofo. Su tamaño esta entre 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho. Crece en diversos ambientes en plantas de alimentos generando biofilms, en temperaturas que oscilan entre 0 a 45°C. Puede crecer a niveles de pH entre 4,4 - 9,4 y con una actividad de agua ( $a_w$ )  $\geq$  0,90. Esta especie produce  $\beta$ -hemólisis, es una bacteria oportunista, transmitida por alimentos contaminados [35].

*E. coli* y *L. monocytogenes* han sido utilizados para evaluar las sustancias como bacteriocinas y ácidos orgánicos que producen las BAL y levaduras probióticas debido a que estos microorganismos de interés que se transmiten por los alimentos contaminados y los probióticos tienen un efecto protector contra estos. Por ejemplo, el ácido láctico es producto del metabolismo de las BAL que actúa tanto en el aumento de la vida útil de los productos alimenticios, como desnaturalizando las proteínas, alterando la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias patógenas, y las bacteriocinas son sustancias proteicas inhibitoras producidas también por BAL (como nisina, lactocidina, bulgaricina, reuterina) que actúan contra patógenos como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella spp.* [9, 14].

Además, la colonización intestinal es el principal mecanismo de acción de las levaduras probióticas y ocurre por la adhesión a la mucosa intestinal que conduce a la coagregación y a la formación de biopelículas, evitando la adhesión de enteropatógenos a las células epiteliales intestinales [9, 10].

Los probióticos son capaces de suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos potenciales en el intestino, que están relacionados con la capacidad de microorganismos tanto Grampositivos como Gramnegativos para protegerse y excluir bacterias competitivas en entornos ecológicos mediante la producción de las sustancias antimicrobianas como el peróxido de oxígeno, ácidos orgánicos y bacteriocinas. Estas últimas son de gran interés por su actividad antimicrobiana, por ser usadas como bio-conservantes en alimentos y para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas. Estas bacteriocinas mostraron actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Las bacteriocinas se mantuvieron estables entre 4 y 121°C y pH 2 y 12, estas fueron producidas por *L. plantarum* LE27, aisladas de maíz y tienen amplia estabilidad en condiciones fisicoquímicas y podrían usarse como control de enfermedades transmitidas por alimentos. El mecanismo que utilizan estas bacteriocinas incluye la formación de poros en la membrana celular y la biosíntesis de proteínas [17].

### **3.4 Antecedentes**

Según investigaciones realizadas por De Vuyst y Leroy, 2020 [1], encontraron y recuperaron diversidad de especies de levaduras a partir de la fermentación de pulpa de cacao en grano

pertenecientes a los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Saccharomyces*. Las especies más frecuentes fueron *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii*, esto significa que una gran diversidad de levaduras está implicada en el proceso de fermentación del cacao, de las cuales algunas pueden ser potenciales probióticos. En otro estudio realizado por Dos Santos et al. 2021 [5] evaluaron la capacidad probiótica de las cepas identificadas en la fermentación de planta forrajera, salami artesanal y granos de cacao en condiciones gástricas y pancreáticas simuladas, actividad antimicrobiana, susceptibilidad a los antibióticos, entre otras. Los autores destacaron que la cepa más prometedora fue *Lactobacillus plantarum* SBR64.7 ya que presentó la reducción de viabilidad más baja al exponerse en condiciones gástricas y pancreáticas, y mostró una alta actividad antimicrobiana inhibiendo bacterias patógenas con compuestos como ácido láctico, ácido acético o las bacteriocinas. De igual manera, Oliveira et al. 2018 [14], evaluaron dos cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas como probióticos potenciales en estudios anteriores y los resultados que obtuvieron al evaluar las cepas fue la producción de compuestos inhibidores difusibles de patógenos, así como mayor supervivencia de la exposición a enteropatógenos.

Además, Alaves et al. 2017 [11], evaluaron la resistencia durante el tránsito gastrointestinal y estabilidad en el almacenamiento de la cepa TCUESC01 de *Lactobacillus fermentum* que se aisló durante la fermentación de cacao de alta calidad. Primero examinaron el impacto del pH en el crecimiento de la cepa y analizaron la supervivencia en condiciones similares al tracto gastrointestinal humano. *L. fermentum* TCUESC01 resistió a condiciones que imitan el estómago y los intestinos humanos y creció bien entre pH 5-7. Luego la cepa se almacenó a 4°C en solución de leche y sobrevivió bien durante 28 días. Finalmente, se midió la respuesta de la cepa a varios antibióticos mostrando susceptibilidad a la mayoría de estos. Es decir, que en este estudio los hallazgos apoyan el uso potencial de esta bacteria como probiótico.

Finalmente, Kouitcheu et al. 2020 [15], encontraron que algunas cepas de BAL aisladas de jugo de cacao fermentado secretan ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas para antagonizar el crecimiento de *Helicobacter pylori* el cual se reconoce como un agente patógeno que causa gastritis, úlceras y tumores. Es decir, que estas cepas son probióticos

potenciales ya que antagonizan el crecimiento de patógenos, pero también son capaces de resistir a un pH gástrico bajo y no transfieren genes de resistencia a antibióticos.

## **4. Objetivos**

### **4.1 General**

Evaluar la capacidad probiótica de cepas de levaduras y BAL recuperadas de la fermentación del cacao, con potencial uso industrial.

### **4.2 Específicos**

- Identificar las BAL y levaduras aisladas del proceso de fermentación del cacao con potencial uso probiótico.
- Evaluar la capacidad probiótica y la actividad antimicrobiana de las cepas obtenidas a partir del proceso fermentativo del cacao.
- Determinar si las cepas probióticas encontradas tienen potencial uso y beneficio en el almacenamiento industrial.



## 5. Metodología

### 5.1 Condiciones de crecimiento e identificación de microorganismos

Las cepas de levaduras y BAL fueron aisladas e identificadas a partir de la fermentación espontánea del cacao, tanto del mucílago como de la semilla de este. Las cepas de levaduras y BAL aisladas en placas de agar YGC, PDA y MRS respectivamente estaban almacenadas y conservadas a -20°C. Para los ensayos, se reactivaron en los medios de cultivos correspondientes y condiciones de incubación adecuadas para su caracterización microscópica y macroscópica, se trabajó con 9 cepas de levaduras y 7 cepas de BAL, con un total de 16 microorganismos con los que se buscó identificar mediante pruebas iniciales características para selección de los probióticos potenciales mediante la aplicación de diferentes ensayos de crecimiento a condiciones de PH, temperatura y actividad antimicrobiana para finalmente realizar la identificación de género y especie mediante pruebas bioquímicas Miniaturizadas API Biomerieux®. [6, 11, 16, 17].

### 5.2 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de levaduras y BAL frente *E. coli* y *L. monocytogenes* se evaluó primero mediante ensayos screening de “Spot-on-Grass” y discos de papel, y se realizó un ensayo final con discos de papel con los microorganismos que pasaron las pruebas de screening. Los aislamientos de estos microorganismos se probaron frente a los siguientes microorganismos *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, los cuales se obtuvieron de la colección de bacterias del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (CMPUJ, Bogotá, Colombia). Ambas cepas, las levaduras y las BAL se activaron un día antes en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, Condalab), PDA (Condalab) y MRS (Condalab) incubándolas a 37°C, 25°C y 30°C respectivamente. Para los ensayos screening de discos de papel, se inocularon juntos (Patógeno y microorganismo a evaluar), primero los patógenos se sembraron en superficie (0,1 ml) de manera masiva a una concentración final de  $10^7$ - $10^8$  unidades formadoras de colonias

(UFC/ml) en diferentes cajas de agar PDA para las levaduras y MRS para las BAL, enseguida se humedecieron discos de papel (5 mm de diámetro) en los medios líquidos que contenían las BAL y levaduras reactivadas, los discos ya húmedos con su respectiva cepa se inocularon encima del masivo de los microorganismos de interés evaluando así las diferentes cepas contra ambos patógenos, se dejaron incubando a 25°C para las levaduras y 30°C para las BAL para favorecer su crecimiento respecto al microorganismo de interés, durante 24 - 48h, pasado este tiempo se observó la formación de halos de inhibición [16, 17]. También, se realizaron ensayos screening de discos de papel realizando una ligera modificación para las BAL, luego del periodo de activación en caldo MRS de las cepas, se centrifugó cada una a 2700 rpm durante 15 min a 10°C para obtener y utilizar el sobrenadante, desechando el precipitado celular, y de esta manera se evaluó las sustancias producidas por las cepas de BAL, humedeciendo los discos de papel en el sobrenadante e inoculado sobre el masivo de cada microorganismo de interés (*E. coli* y *L. monocytogenes*), ya que las BAL producen sustancias que pueden inhibir las bacterias patógenas [17].

Por otro lado, el ensayo de screening Spot-on-Grass, llamado también de doble capa, se utilizó de igual manera para evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas contra los microorganismos de interés. Se prepararon los medios y caldos de cultivo, se reactivó las cepas en caldos, se inoculó individualmente cada cepa de las levaduras en su respectiva placa de medio por triplicado haciendo una punción en el centro de cada caja de agar y para la inoculación de las cepas de BAL se usaron discos de papel húmedo en su respectivo medio también en triplicado. Luego, se superpuso con 10 ml de agar Plate count para las placas en las que se evaluó contra *E. coli* y 10 ml de TSA + Extracto de levadura para las demás placas en las que se evaluó *L. monocytogenes*, previamente inoculados cada medio con 1 ml de los caldos en los que se activó cada patógeno. Se dejó solidificar el agar y las placas se incubaron a 25°C (Levaduras) y 30°C (BAL) durante 24-48h y se observó la inhibición antimicrobiana de los patógenos [45].

Se realizó la estandarización del inóculo de ambos microorganismos patógenos (*E. coli* y *L. monocytogenes*), sin necesidad de realizar una curva patrón, de acuerdo con García et al. [39, 40] se realizó un inóculo en caldo BHI para incubar 12 h *E. coli* y por 14 - 18 h *L. monocytogenes*, con ayuda del patrón de McFarland N. 0,5 realizando comparaciones hasta

obtener la misma turbidez tanto el inóculo como el patrón. Luego, se siembran por triplicado en profundidad en agar nutritivo para *E. coli* y en agar TSA + levadura para *L. monocytogenes* durante 12 h a 37°C y se alcanzan concentraciones entre  $10^7$  y  $10^8$  de ambos microorganismos patógenos obteniendo un recuento final para *E. coli* de  $2,82 \times 10^8$  UFC/ ml y para *L. monocytogenes* de  $2,98 \times 10^8$  UFC/ml.

Finalmente, se realizó un último ensayo con discos de papel con los microorganismos que pasaron las pruebas de screening, los ensayos de tolerancia a pH ácido y crecimiento a diferentes temperaturas, se destaca que las cepas de BAL se centrifugaron para este ensayo como ya se había mencionado anteriormente. De esta manera, se obtuvieron los microorganismos con mayor posibilidad de ser potenciales probióticos derivados de la fermentación del cacao.

### **5.3 Tolerancias a pH ácido**

En este ensayo se utilizaron las cepas que pasaron los screening de actividad antimicrobiana, en total 6 cepas de BAL y 6 cepas de levadura de las 16 cepas aisladas anteriormente. Se reactivaron las cepas de BAL en caldo MRS se incubaron durante 14h y las cepas de levaduras en caldo PDA en incubación durante 12h. Para realizar el ensayo se preparó caldo tripticasa de soya (TSB) el cual se dividió en cinco frascos schott de 250 ml y se ajustó el pH con HCL 3N en cuatro frascos hasta pH 2, 3, 4 y 5 con ayuda de un potenciómetro digital (TRANS-INSTRUMENTS BP3001); y el quinto frasco fue el control a pH 7,3 (pH del caldo TSB). Luego, se distribuyó el contenido de diferente pH en 36 tubos Khan para cada pH (18 tubos para las 6 cepas de BAL y 18 tubos para las 6 cepas de levaduras), para un total de 180 tubos Khan. En cada ensayo se inoculó cada microorganismo por triplicado y fueron incubados durante 6h las levaduras y 8h las BAL, observándose cada 2h la turbidez o no del caldo TSB indicando el crecimiento o no de las cepas bajo las diferentes condiciones de pH. Finalmente, se aisló en agar MRS las 6 BAL y en agar PDA las 6 levaduras cada una de estas para cada pH en triplicado, de esta manera se verificó la viabilidad y resistencia a cada pH, al observar el crecimiento de los microorganismos en las placas de agar [17, 18, 24].

#### **5.4 Tolerancia a temperatura**

La tolerancia a diferentes temperaturas de las 6 cepas de levadura y las 6 cepas de BAL que pasaron los ensayos screening de actividad antimicrobiana. Se evaluaron incubando durante 2h a 42, 84, 101 y 121°C las cepas de levaduras y las cepas de BAL se sometieron a temperaturas de 42, 63, 84 y 121°C; cada una de las cepas tanto levaduras como BAL se incubaron en caldo agua peptonada buferada. Pasada la hora de incubación a las diferentes temperaturas se sembró en aislamiento cada cepa por triplicado en agar PDA para las levaduras y agar MRS para las BAL y se dejaron incubando a sus temperaturas optimas de crecimiento durante 12-24h, finalmente se observó el crecimiento de cada cepa en su respectivo medio de cultivo [17, 18, 19].

#### **5.5 Adaptabilidad y viabilidad de las cepas al almacenamiento**

Se realizó un ensayo de adaptabilidad con las cepas que pasarón los ensayos de actividad antimicrobiana, tolerancia a pH y temperaturas, evaluando el crecimiento en conjunto de las cepas de BAL + Levadura. Se realizó primero la reactivación de las cepas a evaluar (BAL y levaduras) la noche anterior, en caldos MRS y BAL incubando a 30°C y 25°C respectivamente. En el primer ensayo se evaluó en conjunto de las cepas L2 (levadura n°2) y B3 (BAL n°3) y luego en un segundo ensayo se evaluó las otras dos cepas: L5 y B5. Estos ensayos tuvieron una duración de 6 h, en incubación a 30°C en caldo combinado MRS + PDA, evaluando el crecimiento cada 2 horas por turbidez y sembrando en placas de medio solido combinado MRS + PDA para favorecer el crecimiento de los microorganismos con un periodo de incubación de las placas de 24-48h. A las 6 h de incubación se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$  [21].

Después, se realizó el ensayo de viabilidad al almacenamiento, primero se reactivaron las cepas de levaduras y BAL en caldos PDA y MRS a sus respectivas temperaturas de incubación durante 14 h. Luego se centrifugaron todas las cepas en sus respectivos caldos a 2600 rpm durante 15 min a 25°C y se obtuvieron los sedimentos celulares, los cuales se

resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril. Para el montaje de viabilidad sobre el cacao, se molieron aproximadamente 120g de nibs de cacao natural, los cuales se distribuyeron así: 10g nibs molidos + 30ml de agua destilada estéril en frascos Schott con tapa (para cada ensayo se usaron seis frascos), y además se añadió por ensayo en tres frascos 0,6g de azúcar blanca [21, 36, 37]. Los doce frascos que contenían las diferentes mezclas de cacao con agua destilada estéril y azúcar blanca se fundieron en el microondas en baño maría, hasta homogenizar correctamente la mezcla. Cuando las mezclas alcanzaron una temperatura de 35°C se les añadió 1ml de inóculo (resuspendió con 10 ml de agua destilada estéril anteriormente) de BAL y/o de levadura; para el primer ensayo: primer schott (L2 + B3 + azúcar); segundo schott (L2 + B3); tercer schott (L2); cuarto schott (L2 + azúcar); quinto schott (B3) y sexto schott (B3 + azúcar), para el segundo ensayo se distribuyó de igual manera que en el primer ensayo con las cepas (L5 y B5); todos los frascos se incubación a 25°C. Para el control inicial del inóculo (tiempo 0), se tomó un 1 ml de cada uno de los doce frascos, se sembró en profundidad en medios combinados y normales: MRS + PDA, MRS y PDA. De esta manera, durante cada 6 días, 1 mes, se evaluó la viabilidad en almacenamiento como si fuera un producto con adición de probióticos almacenado en la industria [21, 36].

## **5.6 Pruebas bioquímicas API**

Después de realizar todos los ensayos anteriormente descritos se obtuvo solo una levadura y una BAL con características de resistencia a pH, viabilidad y actividad antimicrobiana. Como ensayo final se le realizó la prueba de identificación bioquímica API Biomerieux® correspondiente a cada microorganismo. De esta manera, se identificaron los microorganismos como potenciales probióticos provenientes de la fermentación del cacao.

### **5.6.1 API 20 C AUX**

La galería API 20 C AUX es un sistema para la identificación precisa de las levaduras que se encuentran más frecuentemente. Este, está constituido por 20 cúpulas que contienen sustratos deshidratados y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación. Las cúpulas se

inoculan con un medio mínimo semi-agar y las levaduras crecen solamente si son capaces de utilizar el substrato correspondiente. La lectura de estas reacciones se realiza por comparación con un control negativo que es la cúpula 0 (contiene solo medio), es decir que luego de 48 h de incubación a 30°C se observa en cada cúpula si hay crecimiento evidenciado por la turbidez del medio. Es decir, que una cúpula con mayor turbidez que la del control nos indica una reacción positiva. Luego de revisar todas las reacciones de las 20 cúpulas, se llena un formato y se obtiene un perfil numérico que se introduce en API-web™ un programa de identificación para obtener la levadura correspondiente al perfil numérico de 7 cifras obtenido [38].

### **5.6.2 API 50 CH**

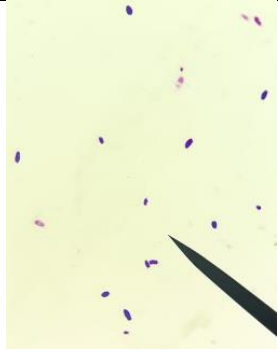
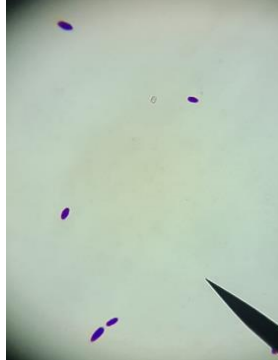
La galería API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio de metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. Este se utiliza para la identificación precisa del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos (BAL). Este, está compuesto por 50 microtubos y permite el estudio de la fermentación de substratos. El microorganismo se inocula en medio API 50 CHL y luego se adiciona en los microtubos rehidratando los substratos. En el periodo de incubación a 30°C durante 48 h, la fermentación se observa por un cambio de color en los microtubos debido a una producción de ácido en aerobiosis revelada por el indicador de pH del medio (Purpura de bromocresol). La fermentación positiva se observa de color amarillo y la negativa no se observa cambio de color (purpura). Luego de revisar todas las reacciones de los 49 microtubos, se llena un formato que se introduce en API-web™ un programa de identificación para obtener la BAL correspondiente a las pruebas positiva y negativas obtenidas [38].

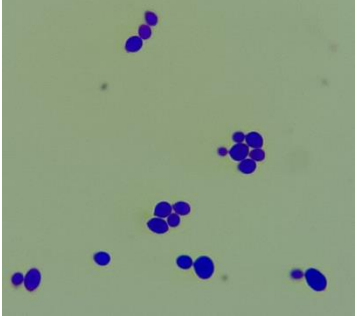
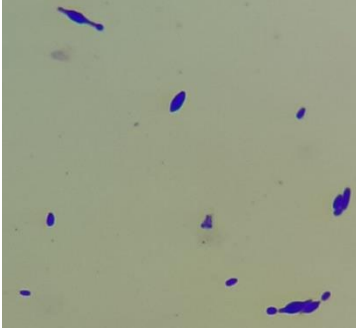
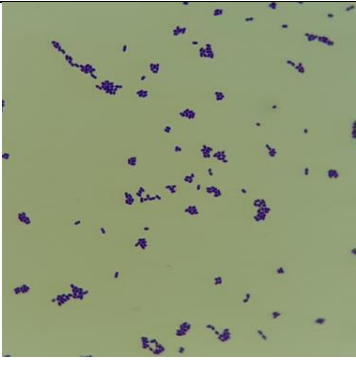
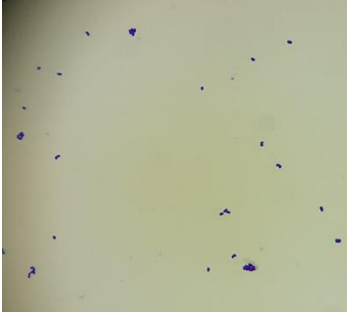
## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Microorganismos obtenidos de la fermentación autóctona del cacao


A partir de la fermentación autóctona del cacao, se obtuvieron 16 cepas en total, 7 BAL y 9 levaduras, a las cuales se les realizó caracterización macroscópica y microscópica. Las levaduras eran colonias blancas (unas amarillentas cremosas) de bordes tanto regulares como irregulares, algunas con elevación y unas pocas dismórficas (Anexos. Tabla 1). La BAL eran cocos o bacilos Grampositivos en duplas o individuales, las colonias son blancas y en su mayoría pequeñas (Anexos. Tabla 2). Una vez se identificaron y confirmaron por morfotipo para cada cepa, se continuo con los demás ensayos.

**Tabla 3.** Microscopia de algunas de las cepas aisladas de la fermentación del cacao

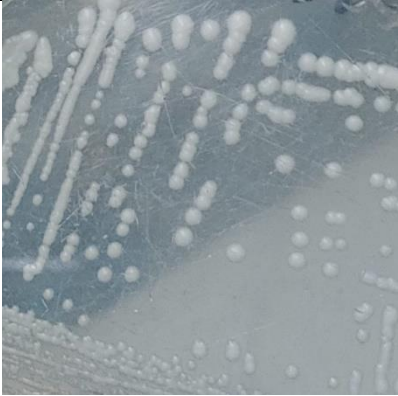

Número de la cepa	Microscopía
#4 (levadura, ovalada, alargada)	
#8 (levadura, ovalada, alargada)	


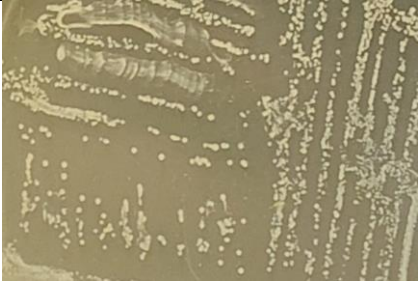
Número de la cepa	Microscopía
#6 (levadura, circular, en gemación)	
#2 (levadura, ovalada, alargada, en gemación)	
#10 (BAL, cocobacilos Gram positivos)	
#13 (BAL, cocos Gram positivos en duplas)	



Número de la cepa	Microscopía
#14 (BAL, cocos Gram positivos en cadenas)	

**Tabla 4.** Macroscopía de algunas de las cepas aisladas de la fermentación del cacao.

Número de la cepa	Macroscopía
#4 (levadura, colonias blancas brillante, sin elevación, borde irregular)	
#7 (levadura, colonia blanca opaca, con elevación)	

Número de la cepa	Macroscopía
#8 (levadura, colonia blanca brillante, sin elevación, borde irregular, dismórfica)	
#13 (BAL, colonia blanca amarillenta, sin elevación, puntiforme)	

## 6.2 Actividad antimicrobiana

Se realizaron ensayos screening como se mencionó en la metodología, todos se realizaron por triplicado, partiendo 7 cepas de BAL y 9 cepas de levaduras.

El primer ensayo se realizó con el método de discos de papel, se enfrentaron las cepas de BAL vs *L. monocytogenes* solo de la cepa #11 a la #15 presentaron halos de inhibición contra el patógeno. Al enfrentar las cepas de BAL vs *E. coli* ninguna cepa presentó actividad inhibitoria. Para las cepas de levaduras al enfrentarse vs *L. monocytogenes* solo las cepas #1 y la #3 presentaron halos de inhibición-

El segundo ensayo se realizó con las cepas de BAL por el método de discos de papel vs *L. monocytogenes* y las cepas que no presento presuntos halos de inhibición fueron la #10 y #16.

El tercer ensayo se realizó con ambos grupos de microorganismos, para las levaduras se utilizó el método de doble capa, vs *L. monocytogenes* se obtuvieron halos de inhibición solo de las cepas #4, 8 y 9 y vs *E. coli* se obtuvo inhibición en las cepas #3, 4 y 8. Para las BAL se utilizó la técnica de discos de papel (húmedos con solo el sobrenadante), vs *L.*

*monocytogenes* se observó capacidad antimicrobiana (halos de inhibición) en todas las cepas y vs *E. coli* se obtuvo halos de inhibición en las cepas #10 y de la #13 a la #15.

El cuarto ensayo se realizó con ambos grupos de microorganismos, pero solo se pudo medir los halos de inhibición de las BAL contra ambos patógenos, debido a que ninguna cepa de levadura presentó actividad antimicrobiana, con el ensayo de discos de papel (húmedos con solo el sobrenadante). (Anexos – Tabla 5)

El quinto ensayo se realizó con ambos microorganismos, para las BAL se utilizó el ensayo de discos de papel (húmedos solo con el sobrenadante) contra ambos patógenos como se ve en la tabla 4. Para las levaduras también se utilizó el método de discos de papel (húmedos con el inóculo de microorganismo), solo hubo halos de inhibición en la #7 y en la #8. (Anexos – Tabla 6)

Obtenidos todos estos ensayos de actividad antimicrobiana se descartaron 3 cepas de levaduras (la #1, #2 y #5) y una cepa de BAL (la #12). Es decir que se mantuvieron las siguientes cepas.

**Tabla 7.** Cambio de nomenclatura (respecto al código de identificación recibido) de los microorganismos seleccionados.

Levaduras	BAL
L1 = #3	B1 = #10
L2 = #4	B2 = #11
L3 = #6	B3 = #13
L4 = #7	B4 = #14
L5 = #8	B5 = #15
L6 = #9	B6 = #16

Con estas 12 cepas se realizaron los ensayos de tolerancia a pH y temperatura (obsérvense estos resultados en el numeral 6.3 de los resultados y discusión). Después de realizar esos ensayos se escogieron 2 cepas de levaduras (L2 y L5) y 2 cepas de BAL (B3 y B5) con potencial capacidad probiótica.

Finalmente, se realizó un último ensayo de actividad antimicrobiana utilizando el ensayo de discos de papel (húmedos solo con el sobrenadante) para evaluar las cuatro cepas finales con potencial actividad probiótica enfrentándolas con los inóculos estandarizados de los patógenos. Este ensayo se realizó por triplicado, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 8.** Promedio de réplica. BAL vs *L. monocytogenes* y BAL vs *E. coli*.

Cepas	BAL vs <i>L. monocytogenes</i> (Halos de inhibición en mm)	BAL vs <i>E. coli</i> (Halos de inhibición en mm)
B3	0,7 (+/- 0,29)	0,5 (+/- 0,5)
B5	0,7 (+/- 0,58)	0,2 (+/- 0,29)

**Tabla 9.** Promedio de réplica. Levaduras vs *L. monocytogenes* y Levaduras vs *E. coli*.

Cepas	Levaduras vs <i>L. monocytogenes</i> (Halos de inhibición en mm)	Levaduras vs <i>E. coli</i> (Halos de inhibición en mm)
L2	2,3 (+/- 1,5)	0,5 (+/- 0,5)
L5	0	0

### 6.3 Tolerancia a pH ácido y temperatura.

Con las 12 cepas obtenidas en la tabla 7 se realizaron los ensayos de tolerancia a pH y temperatura, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 10.** Tolerancia por triplicado a diferentes pH y temperaturas de las cepas de levaduras.

		L1	L2	L3	L4	L5	L6
pH 2	R1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
pH 3	R1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	✓	✓	✓	✓	✓	✓

	R3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
pH 4	R1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
pH 5	R1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
42°C	R1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	R3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
84°C	R1	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X	X	X	X	X
	R3	X	X	X	X	X	X
101°C	R1	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X	X	X	X	X
	R3	X	X	X	X	X	X
121°C	R1	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X	X	X	X	X
	R3	X	X	X	X	X	X

La tolerancia de las levaduras a pH fue de un 100% ya que las seis levaduras resistieron pH de 2-5. Esto quiere decir que todas las levaduras resisten el paso del tracto gastrointestinal que puede llegar a valores de pH de 2-3 [24, 26]. Respecto a los resultados de la tolerancia a temperatura todas las levaduras resistieron y crecieron hasta pH de 42°C, de modo que estas son capaces de soportar la temperatura interna normal de 37°C a la que se encuentra el cuerpo humano [9]. De manera que, según este ensayo todas las levaduras mostraron resistencia pH lo cual es óptimo de su crecimiento en la fermentación del cacao. Sin embargo, no todas las levaduras tuvieron buen desempeño respecto a la actividad antimicrobiana, reduciendo la lista a 2 cepas (como se especifica en el tercer y quinto ensayo, L2 y L5). Posteriormente, se realizó una última prueba de actividad antimicrobiana con estas dos cepas y según los resultados obtenidos en la tabla 9 la cepa L2 de levaduras es la que tiene mayor potencial de ser un probiótico de la fermentación del cacao.

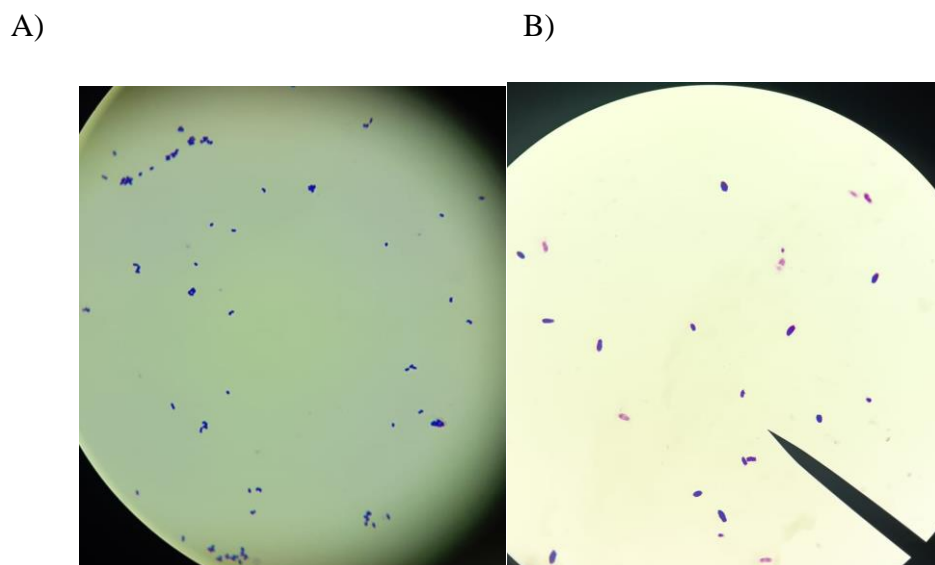
**Tabla 11.** Tolerancia por triplicado a diferentes pH y temperaturas de las cepas de BAL.

	B1	B2	B3	B4	B5	B6
--	----	----	----	----	----	----

pH 2	R1	✓	X	✓	X	✓	X
	R2	✓	X	X	X	✓	X
	R3	X	X	X	X	✓	X
pH 3	R1	✓	X	✓	X	✓	X
	R2	✓	X	✓	X	✓	X
	R3	✓	X	✓	X	✓	X
pH 4	R1	✓	X	✓	X	✓	X
	R2	✓	✓	✓	X	✓	X
	R3	✓	X	✓	X	✓	X
pH 5	R1	✓	✓	✓	✓	✓	X
	R2	✓	X	✓	✓	✓	X
	R3	✓	X	✓	✓	✓	✓
42°C	R1	✓	X	✓	X	✓	X
	R2	✓	X	✓	X	✓	✓
	R3	✓	X	✓	X	✓	X
63°C	R1	✓	X	✓	✓	X	X
	R2	✓	X	✓	X	X	X
	R3	✓	X	✓	X	X	X
84°C	R1	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X	X	X	X	X
	R3	X	X	X	X	X	X
121°C	R1	X	X	X	X	X	X
	R2	X	X	X	X	X	X
	R3	X	X	X	X	X	X

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 11, las bacterias ácido-lácticas que pueden ser posibles probióticos son la B1 (resistiendo temperaturas de hasta 63°C y pH de 2), B3 (resistiendo temperaturas de hasta 63°C y pH de 3) y B5 (resistiendo temperaturas de hasta 42°C y pH de 2), esto concuerda con lo observado en investigaciones pasadas [9, 24, 26]. Sin embargo, la bacteria B1 no tuvo actividad antimicrobiana frente a los organismos evaluados en el presente estudio en todas las pruebas realizadas anteriormente (específicamente en el primer y segundo ensayo), lo que reduce la lista a dos bacterias ácido lácticas B3 y B5. A las cuales se les realizó un último ensayo de actividad antimicrobiana y según los resultados obtenidos en la tabla 8 la cepa B3 de BAL es la que tiene mayores características para continuar estudios de potencial de ser un probiótico con posible interés industrial.

Según los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana en la tabla 8 y en la tabla 9 se obtuvo un mejor diámetro en los halos de inhibición de las cepas resaltadas con naranja. De acuerdo con esto, se realizaron dos pruebas de identificación bioquímica API Biomerieux® para la cepa de levadura (L2) y la cepa de BAL (B3). Debido a que son los microorganismos más próximos a ser potenciales probióticos de la fermentación del cacao.



**Figura 1.** Microscopias en 100X. A) B3 – *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (Cocos Grampositivos). B) L2 - *Saccharomyces cerevisiae* (Levaduras ovaladas alargadas).

#### 6.4 Viabilidad de las cepas al almacenamiento

Primero se realizó un ensayo de adaptabilidad, para observar el comportamiento de los géneros de estas cepas al combinarse (L2 + B3 // L5 + B5) en medios de cultivo combinado (MRS + PDA) ideal para favorecer el crecimiento de ambos géneros de microorganismos. Se observó, en el recuento en placa que ambas combinaciones de microorganismos se adaptaron bien al observar el crecimiento en las placas de agar. Sin embargo, se observó que las BAL en ambas combinaciones superan en comparación al recuento en placa de las levaduras una unidad logarítmica: como se observa en la siguiente tabla.

**Tabla 12.** Recuento de ensayo de adaptabilidad.

Combinación de cepas	Recuento en placa (UFC/ml)	
	BAL	Levaduras
L2 + B3	<u>B3</u>	<u>L2</u>
	7,20E+06	9,00E+05
L5 + B5	<u>B5</u>	<u>L5</u>
	2,00E+07	1,13E+06

La viabilidad al almacenamiento de las cepas de BAL (B3 y B5) y las cepas de levaduras (L2 y L5) en cacao natural fermentado se determinó utilizando el método de recuento total en placa a intervalos de 6 días durante 1 mes a 25°C. Se evaluó de manera individual cada cepa y en combinación con y sin azúcar blanca añadida a la mezcla (Por ejemplo: L2 + B3 // L2 + B3 + azúcar // L2 // L2 + azúcar // B3 // B3 + azúcar, y del mismo modo se distribuyó las otras dos cepas restantes). En el primer ensayo (L2 + B3 y todas sus combinaciones en conjunto e individuales, con y sin azúcar) se evaluó del día 0 a el día 25 del proceso debido a que tres de las seis combinaciones de este primer ensayo se contaminaron con un hongo micelar el día 25 (B3 // L2 + B3 // L2 + B3 + azúcar). Los recuentos en placa fueron aumentando, el día 18 el proceso se estabilizó, el recuento no disminuyó ni aumento más a partir de ese día (Excepto uno o dos recuentos que si aumentaron su concentración). Respecto al segundo ensayo (L5 + B5 y todas sus combinaciones, con y sin azúcar) se evaluaron hasta el día 12 del proceso, debido a que todas las combinaciones de este segundo ensayo se contaminaron con un hongo micelar que se observó al día 18 (L5 + B5 // L5 + B5 + azúcar // L5 // L5 + azúcar // B5 // B5 + azúcar). Los recuentos en placa fueron aumentando cada 6 días hasta el día 12. Para todos los recuentos fue necesario aumentar las diluciones para permitir el recuento correspondiente.

**Tabla 13.** Recuentos de viabilidad en almacenamiento, primer ensayo (L2 + B3).

(UFC / g)	Días	0 DIAS	6 DIAS	12 DIAS	18 DIAS	24 DIAS
Recuentos de viabilidad	L2	1,10E+05	1,07E+07	4,25E+09	6,75E+09	1,25E+10
	L2 + azúcar	4,50E+04	1,72E+07	1,23E+10	1,35E+10	3,25E+10
	B3	Incontables	2,17E+07	4,25E+09	1,05E+10	-
	B3 + azúcar	Incontables	6,72E+07	1,28E+10	8,50E+09	2,75E+10
Recuento (L2)	L2 + B3	4,20E+04	4,75E+07	6,50E+09	3,53E+10	-



<b>Recuento (B3)</b>		5,30E+04	9,25E+07	1,30E+10	1,43E+11	-
<b>Recuento (L2)</b>	<b>L2 + B3 + azúcar</b>	4,90E+04	1,00E+08	1,33E+10	3,43E+10	-
<b>Recuento (B3)</b>		Incontables	1,55E+08	1,68E+10	1,30E+11	-

(-) = No recuento por contaminación.

**Tabla 14.** Recuento de viabilidad en almacenamiento, segundo ensayo (L5 + B5).

<b>(UFC / g)</b>	<b>Días</b>	<b>0 DIAS</b>	<b>6 DIAS</b>	<b>12 DIAS</b>	<b>18 DIAS</b>
<b>Recuentos de viabilidad</b>	<b>L5</b>	6,60E+05	1,03E+08	6,50E+10	-
	<b>L5 + azúcar</b>	5,60E+05	8,00E+07	3,00E+10	-
	<b>B5</b>	Incontables	1,60E+08	9,25E+10	-
	<b>B5 + azúcar</b>	Incontables	5,50E+07	6,25E+10	-
<b>Recuento (L5)</b>	<b>L5 + B5</b>	2,05E+05	1,18E+08	2,00E+10	-
<b>Recuento (B5)</b>		Incontables	Incontables	6,00E+10	-
<b>Recuento (L5)</b>	<b>L5 + B5 + azúcar</b>	2,65E+05	5,25E+07	1,75E+10	-
<b>Recuento (B5)</b>		Incontables	2,25E+07	5,25E+10	-

(-) = No recuento por contaminación.

Según lo evidenciado en la tabla 13 y 14, en la mayoría de las combinaciones, las concentraciones de bacterias y levaduras aumentan a medida que pasan los días del ensayo, lo que nos indica que la viabilidad de las combinaciones en almacenamiento a 25°C es adecuada, simulando de esta manera las condiciones de almacenamiento en la industria con un posible producto a base de cacao que tuvo un almacenamiento durante 15 días (según lo obtenido en este ensayo). Respecto a la tabla 13, en la que se evaluó de manera conjunta los dos potenciales probióticos (L2 + B3) obtenidos en los resultados de los otros ensayos, se podría pensar que esta combinación de microorganismos puede llegar a ser un consorcio de microorganismos probióticos añadidos a un producto con cacao o como cultivos iniciadores para procesos de fermentación de cacao. Se ha demostrado, que el chocolate es un excelente vehículo para administrar oralmente una mezcla probiótica de *L. helveticus* y *Bifidobacterium logum*. También se demostró que el probiótico potencial *L. plantarum* aislado de granos de cacao fermentados sobreviven bien en los subproductos del cacao, al

observar una ligera disminución en el recuento de colonias después de tres meses de almacenamiento a 4°C [21]. Es decir, que este ensayo demostró que las levaduras y bacterias ácido-lácticas evaluadas y con mejores resultados obtenidos pueden sobrevivir en subproductos alimenticios como el cacao un periodo considerable de tiempo. Por lo tanto, estos microorganismos pueden tener potencial uso industrial en un alimento de cacao o a base de cacao en especial *Saccharomyces cerevisia* (Probiótico comercial). También, *Leuconostoc mesenteroides*, puede ser utilizado como potencial probiótico ya que fue uno de los principales microorganismos encontrados en la fermentación del cacao en Costa de Marfil, y en la fermentación espontánea en pilas de granos de cacao en Ghana [2, 43]. Además, es importante hacer bioensayos de coagregación y autoagregación que son importantes para confirmar si este microorganismo es un probiótico en el atrapamiento de patógenos y aumenta la estabilidad de las cepas microbianas en el tracto gastrointestinal como explican en su investigación Taveres et al. 2020 [10].

## 6.5 Pruebas bioquímicas API.

Según los resultados obtenidos en la prueba API 20 C AUX para levaduras, se obtuvo que L2 es un 93,1% *Saccharomyces cerevisiae* 1, gracias al software APIWEB™ (Anexos – Figura 2). Por otro lado, el API 50 CH para *Lactobacillus* y microorganismos similares se obtuvo que B3, según el APIWEB™ es un *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (Anexos – Figura 3.)

La importancia de las levaduras en la fermentación del cacao ha sido mucho menos investigada que las bacterias. La utilización de las últimas tecnologías de secuenciación se ha utilizado para obtener nuevos conocimientos de los alimentos fermentados que nos permiten descubrir un ecosistema complejo. A partir de estos procesos se encontró que *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* se detectaron y utilizaron como cultivos iniciadores en la fermentación del cacao, mostrando un impacto positivo en el perfil aromático del producto final, de modo que estas cepas en especial *Saccharomyces* pueden ser potenciales probióticos generados a partir de esta fermentación [41]. La inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* se ha evidenciado que acelera los procesos de fermentación, el

rápido consumo de los carbohidratos y genera alta producción de etanol, se ven favorecidos por la mayor concentración de glucosa, ácido cítrico, la baja disponibilidad de oxígeno previniendo el crecimiento de patógenos indeseados [30, 32]. También, en relación con estudios de translocación hepática de *S. Typhimurium* se atenuó en animales que recibieron *Saccharomyces cerevisiae* [42]. De acuerdo con lo encontrado, en la literatura sobre *Saccharomhces cerevisiae* se infiere que este microorganismo es un probiótico, que ha sido utilizado y se conoce su funcionalidad como probiótico en la fermentación de muchos alimentos no solo del cacao, además este genera inhibición contra *Listeria monocytogenes* más que frente a *E. coli* debido a las dimensiones del diámetro de los halos de inhibición; pese a que este no es un nuevo microorganismo del que no se conocía su capacidad probiótica, es de gran interés el ampliar el conocimiento en microorganismos comunes en el área investigativa.

De acuerdo a lo arrojado por el API 50 CHL nuestra BAL es un *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris*, estos son cocos Grampositivos, y se pueden desarrollar a una temperatura de hasta 63°C y a pH 3 según los resultados obtenidos. Además, según lo encontrado en literatura es una BAL encontrada en fermentaciones de cacao en el continente africano, principalmente en Costa de Marfil y Ghana. Es necesario seguir realizando investigaciones para determinar si este microorganismo es un probiótico, mediante más ensayos y bioensayos de actividad antimicrobiana, adhesión, agregación, entre otros [2, 43]. Además, en otra investigación *Leuconostoc mesenteroides* se está utilizando como cultivo iniciador en la fermentación del Kimchi (Vegetales) en Corea, lo que nos confirma que posiblemente sea un probiótico presente en distintos alimentos fermentados [44].

## 7. Conclusiones

- Se identificaron y caracterizaron morfológicamente dos microorganismos, *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* y *Saccharomyces cerevisiae* aislados de la fermentación autóctona del cacao con potencial uso probiótico en la industria.
- Según los resultados obtenidos, *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron las cepas con mejor actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y capacidad probiótica evaluados en la presente investigación.
- *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron las cepas con mejor adaptabilidad y viabilidad en el almacenamiento a 25°C, siendo éstos potencialmente usados en matrices alimentarias para uso y beneficio industrial.

## 8. Recomendación

Se recomienda seguir investigando en proyectos futuros, los probióticos a partir de cualquier alimento o bebida fermentada con el fin de encontrar cada vez más microorganismos que ayuden a enfrentar a los patógenos cada vez más resistentes a los antibióticos. Además, continuar con estudios de características probiótica y bioensayos para establecer un posible uso en alimentos, suplementos, medicamentos, a base de cacao con probióticos de la fermentación de cacao con potencial beneficio industrial.

## 9. Referencias

- [1] De-Vuyst L, Leroy F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4): 432-453, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- [2] Ouattara H, Ouattara H, Droux M, Reverchon S, Nasser W, Niamke S. Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256: 11-19, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
- [3] Ruggirello M, Nucera D, Cannoni M, Peraino A, Rosso F, Fontana M, Cocolin L, Dolci P. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115: 519-525, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.002>
- [4] Romanens E, Freimüller-Leischtfeld S, Volland A, Stevens M, Krähenmann U, Isele D, Fischer B, Meile L, Miescher-Schwenninger S. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 262-272, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001>
- [5] Dos-Santos-Leandro E, Cortez-Ginani V, Rodrigues-deAlencar E, Gomes-Pereira O, Cardoso-Paes-Rose E, Martins-do-Vale H, Pratesi R, Machado-Hecht M, Hermes-Cavalcanti M, Oliveira-Tavares C. Isolation, identification, and screening of lactic acid bacteria with probiotic potential in silage of different species of forage plants, cocoa beans, and artisanal salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13: 173-186, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09679-y>
- [6] Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Probiotics in food: Health and nutrition properties and guidelines for evaluation. *FAO*. 2006. <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- [7] Alaves-Melo T, Ferreira-dos-Santos T, Evangelista-de-Almeida M, Gusmao-Fontes-Junior L, Ferraz-Andrade E, Passos-Rezende R, Miranda-Marques L, Romano C. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine

- cocoa. *BMC Microbiology*, 16(250): 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0871-8>
- [8] Guimaraes G, Soares L, Silva- Tuania N, de-Carvalho L, Valadares M, Sodre A, Goncalves B, Neumann E, Da F, Flacio G, Vinderola G, Granjeiro P, de-Magalhaes J. Cocoa pulp as alternative Food matrix for probiotic delivery. *Recent Patents of Food, Nutrition and Agriculture*, 11(1): 82-90, 2020. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190408151826>
- [9] Colombo-Pimentel T, Gomes-de-Oliveira L, Chaves-Macedo E, Nobre-Costa G, Ribeiro-Dias D, Freitas-Schwan R, Magnani M. Understanding the potential of fruits, flowers, and ethnic beverages as valuable sources of techno-functional and probiotics strains: Current scenario and main challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 114: 25-59, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.024>
- [10] Tavares-Menezes A, de-Sousa-Melo D, Lacerda-Ramos C, Intra-Moreira S, Alaves E, Freitas-Schwan R. Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 140: 103-969, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103969>
- [11] Alaves-Melo T, Ferreira-dos-Santos T, Ramos-Pereira L, Moreira Passos H, Passos-Rezende R, Romano C. Functional profile evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: A new potential probiotic strain isolated during cocoa fermentation. *BioMed Research International*, 2017: 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5165916>
- [12] Delgado-Ospina J, Acquaticci L, Molina-Hernandez J, Rantsiou K, Martuscelli M, Kamgang-Nzekoue A, Vittori S, Paparella A, Chaves-Lopez C. Exploring the capability of yeasts isolated from Colombian fermented cocoa beans to form and degrade biogenic amines in a lab-scale model system for cocoa fermentation. *Microorganisms*, 9(1): 28, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010028>
- [13] De-Roos J, De-Vuyst L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 115-119, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>

- [14] Oliveira J, Costa K, Acuarcio L, Sandes S, Cassali G, Uetanobaro A, Costa A, Nicoli A, Neumann E, Porto A. In vitro and in vivo avaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Fuctional Foods*, 47: 184-191, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.055>
- [15] Kouitcheu-Mabeku L, Ngue S, Bonsou-Nguemo I, Leundji H. Potential of selected lactic acid bacteria from *Theobroma cacao* fermented fruit juice and cell-free supernatants from cultures as inhibitors of *Helicobacter pylori* and as good probiotic. *BMC Research Notes*, 13(64): 2020. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4923-7>
- [16] Oliveira T, Ramalhosa E, Nunes L, Pereira J, Colla E, Pereira E. Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 44: 167-172, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.003>
- [17] Amortegui J, Rodriguez-lopez A, Rodriguez D, Carrascal A, Almeciga-Diaz C, Melendez A, Sanchez O. Characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* LE5 and LE27 isolated from ensiled corn. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172: 3374-3389, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0757-x>
- [18] Tavares A, Lacerda C, Cenzi G, Sousa D, Ribeiro D, Freitas R. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12: 280-288, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9518-z>
- [19] Neves N, Braga H, Dos-Anjos Y, Ferreira H, Almeida B, Lopes T, Mares M, Santos T, Almeida C, Carvalho L, Ferraz L, Ornelas R, et al. *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae* are effectively inhibited by *Lactobacilli* with probiotic properties isolated from Brazilian Cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) fruit. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6626249>
- [20] Anisimova E, Yarullina D. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Current Microbiology*, 76: 1407-1416, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01769-7>
- [21] Foong Y, Lee S, Ramli N, Tan Y, Ayob M. Incorporation of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented cocoa beans into dark chocolate:

- Bacterial viability and physicochemical properties analysis. *Journal of Food Quality*, 36: 164-171, 2013. <https://doi.org/10.1111/jfq.12028>
- [22] Di Cagno F, Filannino P, Cantatore V, Polo A, Celano G, Martinovic A, Cavoski I, Gobbetti M. Design of potential probiotic yeast starters tailored for making a cornelian cherry (*Cornus mas L.*) functional beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 323, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108591>.
- [23] Coexa. Guia de buenas practicas de cosecha, fermentacion y secado para la produccion de cacao especiales, 2017. Recuperado en Septiembre de 2021, de [https://www.swisscontact.org/\\_Resources/Persistent/d/3/b/f/d3bfbb5a8d042f05cbf5533494e288f2c52800b8/Guia\\_de\\_buenas\\_practicas\\_de\\_poscosecha.pdf](https://www.swisscontact.org/_Resources/Persistent/d/3/b/f/d3bfbb5a8d042f05cbf5533494e288f2c52800b8/Guia_de_buenas_practicas_de_poscosecha.pdf)
- [24] Erkkilä S, Petäjä E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55: 297-300, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00156-4).
- [25] Šušković J, Kos B, Matošić S, et al. The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 673–678, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008909505651>
- [26] Johansson M, Sjövall H, Hansson G. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 352–361, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- [27] Thuy Ho V, Zhao J, Fleet G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 174: 72-87, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- [28] Passos, Fml, Silva, Do, Lopez, A., Ferreira, Clif, Guimarães, WV. Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cocoa Bean Fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 49: 205-208, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13708.x>



- [29] Leal G, Gomes L, Priscilla E, Tavares F, Figueira A, Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*. 8: 788–798, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00405.x>
- [30] Menezes A, Batista N, Ramos C, Silva A, Efraim P, Pinheiro A, Schwan R. Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81: 83-90, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.036>
- [31] Meersman E, Steensels J, Mathawan M, Wittcox P, Saels V, Struyf N, Bernaert H, Vrancken G, Verstrepen K. Detailed Analysis of the Microbial Population in Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals a Core and Variable Microbiota. *PLOS ONE*, 8: 12, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>
- [32] Hernández F, Gutierrez J, Ferrocino I, Estrada Z, Ríos O, Cocolin L, Quiroz M. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301: 41-50, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>.
- [33] Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2: 123–140, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- [34] Canet J. *Escherichia coli*: características, patogenicidad y prevención (I). *Betelgeux Christeyns Food Hygiene*. 2016. Recuperado en Septiembre de 2021, de <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- [35] Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. *Listeria monocytogenes*. *BIOBIO*. (s/f). Recuperado en Septiembre de 2021, de <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Listeria+monocytogenes+2017.pdf/208c08ac-07fb-4d57-8012-dd77d138d9e1?version=1.0&t=1531401632545>
- [36] Mirković M, Seratlić S, Kilcawley K, Mannion D, Mirković N, Radulović Z. The Sensory Quality and Volatile Profile of Dark Chocolate Enriched with Encapsulated

- Probiotic *Lactobacillus plantarum* Bacteria. *Sensors*. 18(8): 2570, 2018. <https://doi.org/10.3390/s18082570>
- [37] Condalab. Agar Dextrosa y Patata EP/USP/BAM. N° de catalogo: 1022. 2021. Recuperado en Septiembre de 2021, de <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/3-12348-agar-dextrosa-y-patata-ep-usp-bam.html>
- [38] Biomérieux. API®. 2018. Recuperado en Septiembre de 2021, de <https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/apir>
- [39] Rodríguez J, Cantón R, Sánchez J, Lus M, Martínez L, Avial C, Vila J. Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Procedimiento en Microbiología Clinica*. (s/f). Recuperado en Septiembre de 2021, de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- [40] Baker C, Thornsberry C, Hawkinson R. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar culture and the rapid inoculum standardization system. *Journal of clinical microbiology*, 17(3). 2021. <https://doi.org/10.1128/jcm.17.3.450-457.1983>
- [41] Gutierrez J, Botta C, Ferrocino I, Glordano M, Bertolino M, Doici P, Cannoni M, Cocollin L. Dynamics and Biodiversity of Bacterial and Yeast Communities during Fermentation of Cocoa Beans. *Journal of clinical microbiology*, 84(19). 2018. <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- [42] Ornellas R.M.S. et al. Selection of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential Isolated from the Fermentation Process of “Cupuaçu” (*Theobroma grandiflorum*). In: Donelli G. (eds) *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 973, 2017. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2017\\_5](https://doi.org/10.1007/5584_2017_5)
- [43] Camu N, Winter T, Verbrugge K, Cleenwerk I, et al. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in

- Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 2020. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- [44] Jung J, Lee S, Lee H, Seo H, Park W, Jeon C. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 378-387, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.030>.
- [45] Syal P, Vohra A. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5: 390-398, 2013. <http://dx.doi.org/10.9735/0975-5276.5.2.390-398>

## 10. Anexos

**Tabla 1.** Caracterización macroscópica de las levaduras.

Cepas encontradas	Macroscopía
#1	Colonias blancas hueso opaca, borde irregular, con elevación y dismórfica
#2	Colonias blancas amarillenta brillante, borde irregular, puntiforme, sin elevación
#3	Colonias blancas opaca, borde brillante, sin elevación, dismórfica
#4	Colonias blancas brillantes, sin elevación, borde irregular
#5	Colonias blancas amarillenta brillante, con elevación, borde irregular, en el centro de las colonias color naranja claro
#6	Colonias blancas crema brillante, borde irregular, con elevación
#7	Colonias blancas opaca, con elevación, borde regular
#8	Colonias blancas hueso brillantes, dismórfica, borde irregular, sin elevación
#9	Colonias blancas hueso brillante, borde irregular, con elevación

**El dimorfismo de algunas colonias se presenta luego de 48h aproximadamente.**

**Tabla 2.** Características microscópicas (100X) y macroscópicas de las BAL.

Cepas encontradas	Microscopía óptica	Macroscopía
#10	Cocobacilos Gram positivos en duplas	Colonias blancas super translucidas, puntiformes.
#11	Bacilos Gram positivos	Colonias blancas
#12	Cocos Gram positivos	Colonia blanca, puntiforme, borde regular

#13	Cocos Gram positivos en duplas	Colonia blanca amarillenta, sin elevación, puntiforme
#14	Cocos Gram positivos en duplas	Colonia blanca translúcida
#15	Cocos Gram positivos	Colonias blancas cremosas brillantes
#16	Cocos Gram positivos	Colonias translúcidas blancas amarillentas, puntiformes.

**Tabla 5.** Promedio de replicas (triplicado), BAL vs *L. monocytogenes* y BAL vs *E. coli*.

Cepas	BAL vs <i>L. monocytogenes</i> (mm)	BAL vs <i>E. coli</i> (mm)
#10	1,5	1,8
#11	1,2	2
#12	1,5	0
#13	2	2,3
#14	1,5	2,5
#15	1,7	2
#16	1	0,5

**Tabla 6.** Promedio de replicas (triplicado), BAL vs *L. monocytogenes* y BAL vs *E. coli*.

Cepas	BAL vs <i>L. monocytogenes</i> (mm)	BAL vs <i>E. coli</i> (mm)
#10	1	1,4
#11	0,5	1
#12	0,5	1,5

#13	1	0,9
#14	0,5	0,4
#15	0,5	1,1
#16	0,75	0,8

API 20 C AUX V5.0 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA:  FECHA: 20/11/21

COMENTARIO:

**BUENA IDENTIFICACION**

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

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Saccharomyces cerevisiae 1	93.1	0.83	MAL	75%		

**Figura 2.** Resultado API 20 C AUX.

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+-----+-----+
Nota	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris			GAL	90%	GLU	90%
			INU	0%	TUR	0%
			NAG	90%	ESC	0%
			5KG	0%		

**Figura 3.** Resultado API 50 CHL.