

Evaluación Del Impacto De Un Medio De Crecimiento Sobre Los Compuestos Volátiles  
Producidos Por Levaduras Nativas

Jerónimo Arteaga Gómez y Estefany Katherine Flórez Suarez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniero Químico

Director

Claudia Johanna Sandoval Lozano

Magister en ciencias biológicas área microbiología

Codirector

Luis Javier López Giraldo

Doctor en química, bioquímica y ciencia de alimentos

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Ingeniería Química

Bucaramanga

2024

### **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a todas las personas que me apoyaron a lo largo de mi carrera, quienes con su aliento y guía me ayudaron a completar este importante capítulo de mi vida. Especialmente a mi mamá, mi abuelito y mi abuelita, mis tíos y primos, cuyo apoyo incondicional ha sido fundamental en cada paso que di.

**Jerónimo Arteaga Gómez.**

A Dios por darme la perseverancia para poder culminar este escalón más en mi vida, también va dedicado a mis padres y hermano por el apoyo constante e incondicional, siempre estuvieron durante todo este camino de formación. A mi fiel compañero, Lucky, por su lealtad y compañía en las noches de estudio. A todas las personas que siempre me apoyaron incondicionalmente, creyeron en mí, en cada uno de los pasos que di, a esas personas que siempre que tuve dudas me ayudaron a tomar las decisiones correctas, gracias es estas hoy me encuentro culminado una etapa más en mi vida.

**Estefany Katherine Flórez Suárez.**

### **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento al grupo CICTA y al Laboratorio 405 de la sede UIS Guatiguará, así como a todos sus integrantes, por proporcionarme los materiales y equipos necesarios para el desarrollo, así como por su valioso tiempo, ayuda y consejos. También, a nuestros directores, por su sabiduría y guía, y a todos los compañeros que brindaron su ayuda en algún momento. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

**Jerónimo Arteaga Gómez.**

A Dios, que siempre ha sido mi guía incondicional. A la Magister Claudia Johanna Sandoval Lozano, directora de trabajo de grado, por su orientación, apoyo y experticia en microbiología. Al ingeniero Luis Javier López Giraldo, codirector de trabajo de grado, por su valiosa contribución y guía en química y bioquímica. A mi familia, por su apoyo incondicional, por estar presente siempre en el proceso, motivándome y acompañándome en el desarrollo y crecimiento de este gran proceso. Y a mi fiel compañero, Lucky, por su lealtad y presencia en los momentos más desafiantes.

**Estefany Katherine Flórez Suárez.**

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	12
1. Objetivos .....	14
1.1. Objetivo General .....	14
1.2. Objetivos Específicos.....	14
2. Estado del Arte .....	15
3. Metodología .....	18
3.1. Cuantificar los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas de Santander usando lixiviado de cacao como medio de crecimiento. ....	18
3.1.1. Medio de crecimiento .....	18
3.1.2. Preparación de la muestra .....	19
3.1.3. Determinación de la concentración celular .....	19
3.1.4. Extracción de compuestos volátiles .....	19
3.1.5. Recuperación de compuestos volátiles .....	20
3.1.6. Cuantificación de compuestos volátiles.....	20
3.1.7. Análisis de datos .....	21
3.2. Identificar los posibles cambios en los perfiles de los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas al usar distintos medios de crecimiento.....	21
3.3. Determinar los rendimientos a las 5 levaduras con mejor desempeño en la producción de compuestos volátiles. ....	22
4. Resultados .....	22

4.1. Cuantificar los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas de Santander usando lixiviado de mucílago de cacao como medio de crecimiento. ....	22
4.2. Identificar los posibles cambios en los perfiles de los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas al usar distintos medios de crecimiento.....	32
4.3. Determinar los rendimientos a las 5 levaduras con mejor desempeño en la producción de compuestos volátiles. ....	38
5. Conclusiones .....	42
6. Recomendaciones.....	43
Referencias Bibliográficas .....	45
Apéndices.....	50

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Concentración de las levaduras en el medio de fermentación. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Ejemplo de screening de la levadura L33. ....	26
<b>Tabla 3.</b> P-Valor prueba U de Mann-Whitney para cada compuesto. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Concentración (mg/kg) de compuestos volátiles producidos por levaduras nativas en medio de cultivo Sabouraud y en lixiviado de mucílago de cacao a 20 g/L.....	35
<b>Tabla 5.</b> Resultados densidad óptica y biomasa. ....	39
<b>Tabla 6.</b> Concentración de azúcares consumidos y etanol producido. ....	40
<b>Tabla 7.</b> Rendimientos de las levaduras. ....	40

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Diagrama metodológico. ....	18
<b>Figura 2.</b> Biplot PCA de las levaduras y los CVs identificados. ....	28
<b>Figura 3.</b> Análisis de conglomerados de las levaduras agrupadas por su producción de CVs. ..	30

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
<b>Apéndice A.</b> Concentración de compuestos volátiles (mg/kg) producidos por levaduras en medio con lixiviado de mucílago de cacao a 20g/L.....	50
<b>Apéndice B.</b> Tabla OTV por compuesto y screening OAV. ....	53
<b>Apéndice C.</b> Prueba del codo.....	55
<b>Apéndice D.</b> Prueba de normalidad Shapiro-Wilk.....	56
<b>Apéndice E.</b> Prueba U de Mann-Whitney.....	56

## Glosario

**Compuestos volátiles:** Moléculas que se evaporan fácilmente a temperatura ambiente, contribuyendo a aromas y sabores característicos en alimentos y bebidas.

**Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS):** Método analítico que separa y analiza compuestos químicos, identificando y cuantificando sus componentes en mezclas complejas.

**Lixiviado:** Líquido resultante de la filtración de agua a través de un material, arrastrando compuestos solubles presentes en él.

**Medio de crecimiento:** Sustancia o solución que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos o células en un laboratorio o proceso industrial.

**Micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME):** Técnica de análisis que utiliza una fibra absorbente para captar compuestos volátiles en la fase gaseosa de una muestra, permitiendo su análisis.

**Mucílago de cacao:** Sustancia viscosa y pegajosa que rodea los granos de cacao, compuesta por azúcares y otras moléculas.

**Perfil aromático:** Conjunto de aromas característicos de una muestra, determinado por la combinación de compuestos volátiles que se encuentran en ella.

**Proceso fermentativo:** Serie de reacciones bioquímicas en las que microorganismos transforman sustancias orgánicas, produciendo compuestos como alcohol, ácidos o gases en condiciones anaeróbicas o semi aeróbicas.

## Resumen

**Título:** Evaluación del impacto de un medio de crecimiento sobre los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas\*

**Autor:** Jerónimo Arteaga Gómez y Estefany Katherine Flórez Suarez\*\*

**Palabras Clave:** Levaduras, Compuestos orgánicos volátiles, Lixiviado de mucílago de cacao, Medio de cultivo.

**Descripción:** La producción de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) es esencial en la fermentación, ya que influyen en las características sensoriales de los productos finales. En la fermentación de cacao, el medio de cultivo desempeña un papel clave en la optimización de la producción de estos compuestos, aunque su impacto no ha sido completamente explorado. Este estudio se centró en evaluar el efecto del medio de cultivo basado en lixiviado de mucílago de cacao en la producción de volátiles por levaduras nativas de Santander. Se cultivaron 17 cepas de levaduras en un medio de lixiviado de cacao CCN51, con una concentración de 20 g/L de azúcares fermentables y 0.1 g/L de peptona, y se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 12 horas. Los volátiles se extrajeron mediante micro extracción en fase sólida y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), comparándose con los volátiles producidos en medio Sabouraud.

Los resultados mostraron que el lixiviado de cacao favoreció la producción de compuestos volátiles, incluyendo el dodecanoato de etilo, un éster con notas florales y frutales, y el 3-metilbutanal (C7), un aldehído con notas chocolatosas. Las cinco cepas de mejor desempeño (L1a, L29a, L33, L110mrs y L195) demostraron altos rendimientos, lo que sugiere que el lixiviado de cacao puede ser una alternativa viable a los medios sintéticos. Se concluyó que este medio natural tiene el potencial de mejorar los perfiles sensoriales de productos fermentados, destacando las cepas L1a, L110mrs y L195 como candidatas para aplicaciones específicas.

---

\*Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Ingeniería Química. Director: Claudia Johanna Sandoval Lozano. Título académico completo de mayor rango. Codirector: Luis Javier López Giraldo. Título académico completo de mayor rango.

### Abstract

**Title:** Evaluation of the impact of a growth medium on the volatile compounds produced by native yeasts\*

**Author(s):** Jerónimo Arteaga Gómez & Estefany Katherine Flórez Suarez\*\*

**Key Words:** Yeast, Volatile organic compounds, Cocoa mucilage leachate, Culture medium.

**Description:** The production of Volatile Organic Compounds (VOCs) is crucial in fermentation processes, as they are responsible for the sensory characteristics and flavor of the final products. In the context of cocoa fermentation, the selection of the growth medium is key to optimizing the production of these compounds; however, the impact of the growth medium on the volatiles produced remains largely unknown. This study aimed to evaluate the effect of a specific growth medium on the production of volatile compounds by native yeasts from the Santander region, using cocoa mucilage leachate as the growth medium. Seventeen native yeast strains isolated from cocoa fermentations were cultured. A medium based on CCN51 cocoa mucilage leachate was used, with a concentration of 20 g/L of fermentable sugars and 0.1 g/L of peptone. The yeasts were cultured in sterile vials with magnetic stirring at 30°C and 150 rpm for 12 hours. Volatile compounds were extracted by solid-phase microextraction and analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results were compared with the volatiles produced by yeasts grown in Sabouraud medium.

The findings revealed that the cocoa leachate medium promoted the production of a variety of volatile compounds, showing a distinct profile compared to synthetic media. Multiple compounds were identified, such as ethyl dodecanoate, an ester associated with floral and fruity notes, and 3-methylbutanal (C7), an aldehyde with chocolate-like notes, both crucial for the sensory characteristics of fermented products. The five best-performing yeasts (L1a, L29a, L33, L110mrs, and L195) showed significant yields in the production of these compounds, suggesting that cocoa leachate could be a viable alternative to synthetic media. The natural cocoa leachate medium demonstrated potential to influence volatile compound profiles, particularly in ester production, highlighting its utility in improving the sensory characteristics of fermented products. Strains L1a, L110mrs, and L195 stood out as ideal candidates for specific applications, such as biomass maximization, ethanol production, or achieving a balanced profile.

---

\*Degree Work

\*\*Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Chemical Engineering. Director: Claudia Johanna Sandoval Lozano. Full academic title of highest rank. Co-director: Luis Javier López Giraldo. Full academic title of highest rank.

## Introducción

Los compuestos volátiles son moléculas orgánicas que contribuyen significativamente a las características sensoriales y aromáticas de diversos productos, como vinos, cervezas y alimentos fermentados. (Montserrat Riu et al., 2005)

Las levaduras nativas, al crecer en diferentes medios, pueden modificar la composición y la cantidad de compuestos volátiles que producen, lo que influye directamente en la calidad y el perfil sensorial de los productos finales. (González-Leos et al., 2017)

Los medios de cultivos comerciales son medios sintéticos que se caracterizan por presentar una fuente de carbono a una concentración determinada y de fácil preparación que proporcionan condiciones óptimas para el crecimiento de diversos microorganismos, tales como las levaduras. Entre ellos se encuentra, el caldo Sabouraud, el cual tiene glucosa como fuente de carbono y energía a una concentración de 20 g/L. Por otro lado, como una alternativa para mejorar la diversidad de sus componentes y simular un ambiente más cercano al encontrado en la naturaleza se encuentran los medios de cultivo naturales, los cuales pueden ser formulados usando residuos agroindustriales, como el lixiviado de mucílago de cacao. Este residuo se caracteriza por presentar azúcares fermentables, glucosa, fructosa y sacarosa. (Britania Lab, 2020; Estela-Escalante et al., 2013)

En este estudio, se planteó utilizar el lixiviado de mucílago de cacao con la misma concentración de azúcares que el medio de cultivo comercial, dado que, al ser un medio natural, puede ser una fuente de nutrientes rica y variada que favorezca el crecimiento de las levaduras y proporcione condiciones más cercanas a las que se encuentran en un entorno natural. Este es un subproducto líquido resultante del proceso de fermentación del cacao donde el mucílago se

descompone parcialmente y libera líquidos que contienen nutrientes, azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos bioactivos, el cual se obtiene cuando se deja escurrir el mucílago, una pulpa viscosa y rica en azúcares que rodea a los granos de cacao.

Además, es un subproducto que no es aprovechado en las fincas cacao cultoras lo cual se puede evidenciar en el estudio realizado por Diana Olaya en Ecuador, en el que se determinó que el 81 % de los agricultores del sector cacaotero no potencializan el desarrollo técnico en la cadena de valor de este producto, presentándose un desperdicio del mucílago de cacao del orden del 72 % por desinterés en la innovación. (Sánchez-Olaya et al., 2019)

Investigaciones previamente realizadas en el grupo de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA), mostraron que las levaduras producen compuestos aromáticos, que pueden mejorar los procesos de fermentación. Es por ello, que resulta interesante conocer el perfil metabólico que producen las levaduras usando un medio de cultivo natural. (Sandoval-Lozano et al., 2022)

Por lo anterior, se formuló la siguiente pregunta: ¿Un cambio en la fuente de carbono, de glucosa a lixiviados de cacao, puede modificar el perfil de metabolitos volátiles producidos por las levaduras?

## **1. Objetivos**

### **1.1. Objetivo General**

Evaluar el impacto que tiene un medio de crecimiento en la producción de compuestos volátiles producidos por levaduras nativas.

### **1.2. Objetivos Específicos**

Cuantificar los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas de Santander usando lixiviado de cacao como medio de crecimiento.

Identificar los posibles cambios en los perfiles de los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas al usar distintos medios de crecimiento.

Determinar los rendimientos a las 5 levaduras con mejor desempeño en la producción de compuestos volátiles.

## 2. Estado del Arte

Conocer el impacto de un medio de cultivo sobre los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas es un campo de investigación importante debido a su relevancia en la fermentación de alimentos y bebidas. Según Alcázar Valle *et al.* (Alcázar Valle et al., 2016), en los últimos años se ha presentado un creciente interés por conocer la influencia que tiene un medio de cultivo sobre la producción de compuestos volátiles usando microorganismos.

Las levaduras producen una amplia variedad de compuestos volátiles durante la fermentación, incluyendo alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y ácidos. Estos compuestos contribuyen con los perfiles de sabor y aroma de los productos finales obtenidos de diferentes procesos de fermentación. Además de la percepción sensorial generada por dichos compuestos, también es posible determinar su identidad y concentración usando la técnica de micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza, asociada con cromatografía gaseosas acoplada a espectrometría de masas (SPME-HS-GS-MS).

Por ejemplo, Sandoval-Lozano *et al.* (2022), aislaron levaduras nativas de la fermentación de granos de cacao y analizaron su perfil de compuestos volátiles. Ellos lograron identificar 36 compuestos volátiles distribuidos en las siguientes familias ésteres, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas y pirazinas. Además, propusieron una metodología para priorizar las cepas que exhiben las mayores probabilidades de producir compuestos volátiles cuyas concentraciones superan el valor umbral de olor (OTV). La metodología propuesta por Sandoval-Lozano *et al.* (2022), también permitió clasificar las levaduras según su tendencia a producir compuestos con características florales, como las levaduras Y195 e Y246, o aquellas levaduras que producen compuestos volátiles con un perfil mixto floral/frutal, como Y200. Esta información es clave para

el desarrollo de cultivos iniciadores que pueden ser usados para mejorar las características sensoriales de los licores de cacao y productos de chocolaterías que serán elaborados a partir de cacaos procedentes de una fermentación específica.

De igual manera, en un estudio llevado a cabo por Checa Tapia & García Esparza (2020), se examinaron los impactos generados por distintas cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *No-Saccharomyces* en los perfiles aromáticos de vinos elaborados a partir de las cepas Merlot, Garnacha y Cabernet Sauvignon. Se identificaron un total de 32 compuestos volátiles distribuidos en las siguientes familias: aldehídos, ésteres, ácidos, alcoholes y lactonas. El propósito de la investigación fue el de analizar el efecto de diferentes métodos de elaboración, concluyendo que la variedad de uva ejerce una influencia en el desarrollo de dos levaduras inoculadas, *S. Cerevisiae 22H* y *T. Delbruekii 58E*, modificando así el perfil aromático del vino. Los resultados indican la existencia de un impacto significativo de la levadura en las concentraciones de la mayoría de los compuestos volátiles evaluados, y este efecto varía según la variedad de uva empleada.

Por su parte Alarcón Heredia (2016) llevó a cabo la caracterización de los vinos de Fondillón disponibles en el mercado, centrándose en su composición aromática, se identificaron 39 compuestos volátiles (CV) que exhiben un perfil aromático diverso, con coeficientes de variación elevados en muchos de los compuestos analizados. Esto sugiere una considerable variabilidad en sus concentraciones, especialmente en sustancias como dimetilsulfuro, diacetal, acetato de etilo, hexanoato de etilo y ácido isopentanoico, entre otros. A través del análisis del valor de actividad de olor (OAV), concluyeron que la familia de los ésteres (aromas frutales) predomina en el aroma de estos vinos, destacando el octanoato de etilo como el compuesto con los valores más elevados de OAV.

Así mismo Zamudio-Palacios *et al.* (2021) en su estudio de un consorcio de levaduras durante la fermentación de cacao y su efecto en la generación de compuestos aromáticos señalaron que, durante las fermentaciones de cacao criollo, *Saccharomyces cerevisiae* fue la cepa dominante, tanto en cultivos puros (CP) como en cultivos mixtos (CM). La fermentación, llevada a cabo por el consorcio conformado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniospora opuntiae*, todas aisladas de fermentaciones espontáneas, tuvo un impacto notable en la producción de 26 compuestos volátiles (CV) precursores de aroma. Estos compuestos fueron agrupados en seis categorías: ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos, cetonas y pirazinas. Los compuestos precursores de aroma (CPA) más destacados fueron la tetrametilpirazina (con notas de chocolate), el alcohol fenil-etílico (con características de miel), el 3-metil-butanal (con notas de chocolate), el 1-propanol (con matices de caramelo) y la acetofenona (con un perfil floral).

También Cancino Laguado *et al* (2021) emplearon el lixiviado de guanábana como fuente de carbono, variando la concentración inicial de azúcares fermentables con el propósito de evaluar la producción de etanol mediante el uso de levaduras nativas de Santander. Durante su investigación, identificaron la presencia de cenizas y carbohidratos, destacando estos últimos por su composición de azúcares fermentables, como glucosa, fructosa y sacarosa, con concentraciones totales que oscilaron entre 100 g/L y 120 g/L. Los resultados revelaron que los componentes caracterizados del lixiviado poseen beneficios para el proceso de fermentación con levaduras. Se identificaron macronutrientes y micronutrientes, proporcionando un contenido nutricional óptimo para el metabolismo celular de las levaduras durante la fermentación.

La diversidad en la composición aromática, destacada por diversos estudios, revela la complejidad y la variabilidad de estos procesos, tanto por los cambios de las levaduras como en los perfiles y concentraciones de las fuentes de carbono en las que están creciendo. Estos avances,

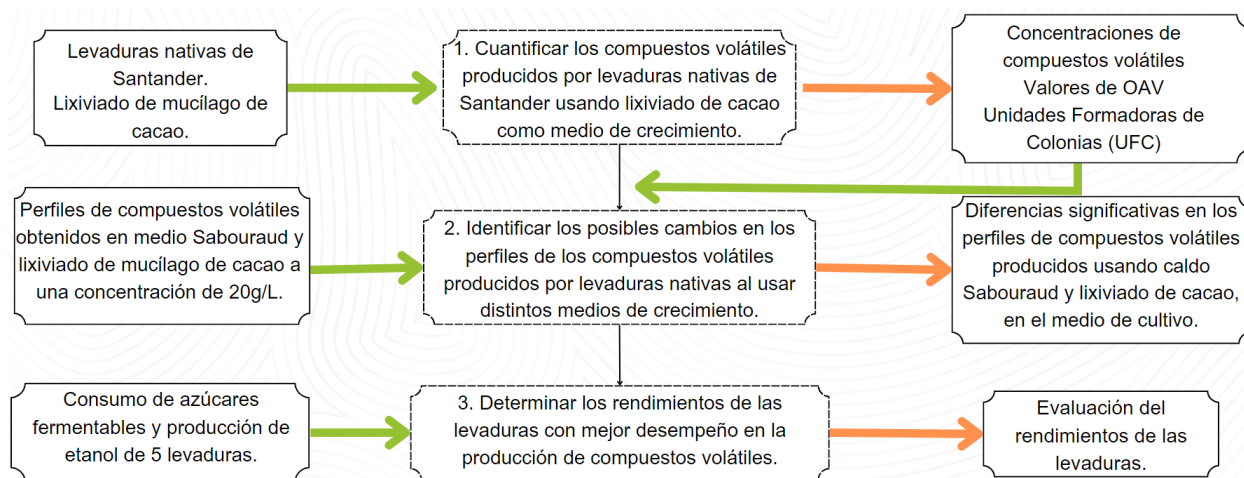
junto con la búsqueda de medios de cultivo más naturales, como el lixiviado de mucílago de cacao propuesto, prometen contribuir significativamente al desarrollo de cultivos iniciadores que mejoren las características sensoriales de productos como licores y chocolates, resaltando la importancia de comprender y optimizar la interacción entre levaduras, medios de cultivo y perfiles de compuestos volátiles. (Rodríguez Sáenz et al., 2022)

### 3. Metodología

A continuación, se describen las actividades para cada etapa metodológica:

**Figura 1.**

*Diagrama metodológico.*



#### 3.1. Cuantificar los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas de Santander usando lixiviado de cacao como medio de crecimiento.

Se realizó el crecimiento de 17 levaduras nativas procedentes de procesos de fermentación de cacao del municipio de San Vicente de Chucurí, Santander. Para todas las levaduras se desarrolló el siguiente proceso:

##### 3.1.1. Medio de crecimiento

Se usó como medio de cultivo, lixiviado de mucílago de cacao CCN51 estéril, a una concentración de 20 g/L de azúcares fermentables más 0.1 g/L de peptona como fuente de nitrógeno de acuerdo con las condiciones descritas por Ríos Giraldo & Saravia Santamaria (2018). El medio de crecimiento se trabajó en lotes semanales de 100 mL de medio, donde para cada preparación se tomaron 5.74 mL de lixiviado y se le agregó 94.26 mL de agua destilada con 0.1 g/L de peptona como fuente de nitrógeno.

### ***3.1.2. Preparación de la muestra***

Cada levadura se sembró por el método de agotamiento en agar Dextrosa Sabouraud al 4% y se incubó durante 48 h a 30 °C. En un vial estéril con agitador magnético se colocaron 3 mL del medio de crecimiento e inmediatamente, se tomó 1 colonia de la levadura con un asa metálica estéril y se depositó en el vial, el cual se selló usando una tapa de silicona con agrafe de aluminio. El vial se incubó en Shaker (Quimicompany Being Shaker) durante 12 horas a 30 °C y 150 rpm. Transcurridas 12 horas de crecimiento, los viales fueron dejados en refrigeración a 4°C hasta el momento de ser procesados.

### ***3.1.3. Determinación de la concentración celular***

Se extrajo 1 mL del medio del vial y se depositó en tubos con 9 mL de agua peptonada, posteriormente se realizaron diluciones seriadas entre  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$ , para luego sembrar las últimas dos diluciones en cajas Petri con agar Sabouraud mediante el método de extensión con asa de vidrio Drigalski. Las cajas se dejaron en incubadora a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se realizó un conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para determinar la concentración de la levadura para cada muestra.

### ***3.1.4. Extracción de compuestos volátiles***

Se realizó la extracción de los compuestos volátiles producidos por la levadura usando el método propuesto por Sandoval-Lozano *et al.* (2022), donde se colocó el vial en un baño de aceite a 60°C y 170 rpm por 15 min. Después, se expuso la fibra (Supelco SPME 50/30 µm, DVB/CAR/PDMS) en el vial a 60°C y 170 rpm durante 40 min.

### **3.1.5. Recuperación de compuestos volátiles**

Los compuestos volátiles fueron analizados usando un GC Hewlett-Packard 7890a con un detector selectivo de masas (MSD) HP 5972, Agilent Technologies. La fibra fue expuesta en el puerto de inyección durante 7 min. Los gradientes de temperatura dentro de la columna para el método usado fueron: 30 °C (0–10 min), 3 °C/min hasta 60 °C, 10 °C/min hasta 150 °C, 4 °C/min hasta 200 °C, 4 °C/min hasta 250 °C y finalmente 250 °C (5 min). La separación se realizó en una columna HP-5 (30 m 0.25 mm id. 0.25 m film thickness) usando nitrógeno como gas de arrastre con una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. La energía de ionización de impacto electrónico fue de 70 eV y una temperatura de fuente de 230 °C.

La identificación de los compuestos fue corroborada realizando una integración a los picos del área relativa, descartando aquellos compuestos con áreas relativas menores al 0.5%. Posteriormente se buscaron los tiempos de retención obtenidos en la integración y se compararon con los tiempos de retención reportados por Akoa *et al.* (2023), Escobar *et al.* (2021), Kishimoto *et al.*(2018), Lukić *et al.*(2017), Wang *et al.* (2017) y Sandoval-Lozano *et al.* (2022) para compuestos volátiles producidos por levaduras propias del cacao.

### **3.1.6. Cuantificación de compuestos volátiles**

Se usó un estándar de tolueno/metanol a una concentración de 4200 mg/L en cada muestra y se encontró la concentración de los compuestos usando la fórmula:

$$[CV] = \frac{RF * \text{Área}_{CV} * [SI]}{\text{Área}_{SI} * DF} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde, [CV] es la concentración del compuesto,  $\text{Área}_{CV}$  es el área relativa del compuesto,  $\text{Área}_{SI}$  es el área del estándar interno, [SI] es la concentración del estándar interno, DF es el factor de dilución y RF es el factor de respuesta de la familia. (Sandoval-Lozano et al., 2022)

### ***3.1.7. Análisis de datos***

El anterior procedimiento fue realizado para cada levadura, por triplicado y los resultados fueron expresados como un promedio. A todas las concentraciones de compuestos volátiles obtenidos se les restó la concentración producida por el blanco. Después fueron identificados sus valores límite de olor (OTVs) y se calculó el valor de actividad de olor (OAV) para identificar aquellos compuestos volátiles (CVs) con OAVs mayores a 1 y que por lo tanto serán más relevantes en el perfil de aromas producido por las levaduras.

Posteriormente se usó el análisis de componentes principales (PCA) para clasificar las levaduras según el tipo de compuestos volátiles producidos y para ello la matriz de las concentraciones de compuestos volátiles se transformó usando Z-scores. También se realizó un análisis jerárquico de conglomerados (HCA) utilizando el método de varianza mínima de Ward y distancias euclidianas. El software estadístico empleado fue “The Unscrambler X 10.5”.

## **3.2. Identificar los posibles cambios en los perfiles de los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas al usar distintos medios de crecimiento.**

Se compararon los perfiles de los compuestos volátiles obtenidos en la etapa anterior con los reportados por Sandoval-Lozano (2022) para así identificar los posibles cambios obtenidos al usar lixiviado de cacao vs caldo Sabouraud. Para esto, se realizó un análisis en 2 partes: primero, se realizó una prueba de normalidad con el software Statística para comparar las concentraciones de los compuestos volátiles en ambos medios. (Guadalupe Medina & Agosin Trumper, 2008)

Después, se usó la prueba U de Mann-Whitney para evaluar si hay diferencias significativas en los perfiles de compuestos volátiles. (Bastos et al., 2019)

### **3.3. Determinar los rendimientos a las 5 levaduras con mejor desempeño en la producción de compuestos volátiles.**

Un parámetro importante que puede ayudar a entender mejor el comportamiento de las levaduras es el rendimiento del sustrato respecto a un determinado compuesto. Para tal fin se analizaron las 5 levaduras con la mayor capacidad de producir compuestos volátiles. Para biomasa se determinó la densidad óptica al momento de la siembra y después de la fermentación. Por otro lado, para sustrato y producto se realizó un estudio por medio de cromatografía líquida de alta eficacia para cuantificar las cantidades de azúcares consumidos y el etanol producido durante el proceso. Luego se determinaron los rendimientos principales con el fin de identificar las que producen mayor cantidad de compuestos volátiles, y las que tienen mayor capacidad de producir biomasa por gramo de sustrato. Este es un indicador de que la levadura tendrá mayor probabilidad de crecer cuando sea empleada como cultivo iniciador y; consecuentemente, de producir los compuestos volátiles de interés, además, se podría estimar la cantidad de volátiles esperados y que tan eficiente es para aprovechar los azúcares disponibles en el medio para generar los compuestos deseados.

## **4. Resultados**

### **4.1. Cuantificar los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas de Santander usando lixiviado de mucílago de cacao como medio de crecimiento.**

Todas las levaduras crecieron en el medio de fermentación y alcanzaron una concentración entre  $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml, a las 12 horas de crecimiento en vial, ver

**Tabla 1.** El crecimiento observado concuerda con lo esperado, dado que el lixiviado de cacao está compuesto por una notable cantidad de azúcares fermentables, los cuales son utilizados por las levaduras como fuente de carbono y energía durante su crecimiento. Esta información concuerda con la reportada por González-Leos *et al.* (2017), quienes al realizar el crecimiento de sus levaduras nativas encontraron valores del orden de  $10^8$  UFC/mL, por lo cual también se decidió unificar el orden en  $10^8$  para todas las levaduras, convirtiendo el orden de los valores obtenidos en  $10^7$  a  $10^8$ .

En este estudio se obtuvo un medio con una concentración de azúcares fermentables de 138 g/L, distribuidos en 47.21 g/L de glucosa, 64 g/L de fructosa y 26.81 g/L de sacarosa. Según la investigación realizada por Luna Calderón (2018), el lixiviado de cacao contiene una concentración significativa de estos azúcares fermentables. Específicamente, encontró 62.52 g/L de glucosa, 63.47 g/L de fructosa y 45.89 g/L de sacarosa, destacándose como los principales componentes, lo que se asemeja a la proporción de cada azúcar en el medio preparado en este estudio. Además, identificó la presencia de 1.52 g/L de celobiosa, otro azúcar fermentable. Estos hallazgos subrayan la riqueza de nutrientes disponibles en el lixiviado de cacao que sustentan el crecimiento de las levaduras.

Adicionalmente, es importante destacar que el mucílago de cacao, la pulpa blanca que rodea los granos, también contribuye significativamente al contenido de azúcares. Según Piracoca Robles (2022), el lixiviado contiene aproximadamente un 14% de azúcares, junto con un 1.5% de pectina. Estos componentes adicionales refuerzan aún más la capacidad del lixiviado de cacao para

ser metabolizado por las levaduras durante su crecimiento de las levaduras durante la fermentación.

**Tabla 1.**

*Concentración de las levaduras en el medio de fermentación.*

<b>Levadura</b>	<b>Factor [UFC/mL]</b>
1a	$5 \times 10^7$
4	$1 \times 10^9$
12	$8 \times 10^8$
13a	$4 \times 10^8$
17	$3 \times 10^8$
19	$2 \times 10^8$
29a	$1 \times 10^8$
33	$5 \times 10^7$
85	$1 \times 10^8$
97	$8 \times 10^8$
110mrs	$3 \times 10^8$
133	$1 \times 10^8$
195	$2 \times 10^8$
200	$8 \times 10^8$
218	$4 \times 10^7$
233	$2 \times 10^8$
244	$4 \times 10^7$

Para las 17 levaduras evaluadas se identificaron 27 compuestos volátiles agrupados en 6 familias: ácidos (n=2), alcoholes (n=4), aldehídos (n=4), ésteres (n=13), cetonas (n=2) y pirazinas (n=2), ver **Apéndice A**. Para calcular la concentración de cada compuesto se evaluaron los compuestos volátiles producidos por el medio de fermentación (blanco). Se encontraron 10 compuestos endógenos: benzaldehído (0.06 mg/kg), 3-metilbutanal (0.056 mg/kg), dodecanoato de etilo (0.166 mg/kg), 3-fenil-2-propenoato de etilo (0.075 mg/kg), 3-fenil-2-propenoato de 3-

propenilo (0.636 mg/kg), acetato de 2-feniletilo (0.439 mg/kg), 2-fenilacetato de metilo (0.060 mg/kg), 1-feniletanona (0.004 mg/kg), 2,3,5,6-tetrametilpirazina (0.039 mg/kg) y 2,3,5-trimetilpirazina (0.039 mg/kg). La concentración de los compuestos identificados en esta muestra fue restada a la concentración calculada de cada levadura para así eliminar la producción de volátiles propios del lixiviado. Los compuestos dodecanoato de etilo (presente en todas las levaduras a excepción de L13a, L17, L97 y L200) y acetato de 2-feniletilo (presente en todas las levaduras a excepción de L85, L110mrs, L218 y L244), fueron los más predominantes, como indican sus apariciones en un amplio rango de levaduras. Por el contrario, el benzaldehído, no fue encontrado en ninguna de las levaduras durante el proceso de fermentación, lo que sugiere que es un compuesto propio del medio de cultivo y no contribuyó al perfil aromático de las levaduras presentadas. Este compuesto ha sido identificado por Alvarado *et al.* (2022) quienes realizaron un estudio, donde se enfocaron en investigar las sustancias aromáticas presentes en cacao cultivado en la región de Río Anus, Municipio Sucre, Estado Portuguesa, Venezuela. Sus hallazgos revelaron la identificación de 93 compuestos volátiles divididos en 12 familias donde se destacó el predominio de los compuestos de las familias de aldehídos, seguidos de las cetonas, alcoholes y ésteres.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis del Valor de Actividad de Olor (OAV) para cada compuesto en cada levadura. Se eliminaron aquellos compuestos que en ninguna levadura superaran la unidad (mayores a 1), siguiendo la metodología empleada por Belloch Romero (2022), ya que esto indica una contribución insignificante al perfil aromático; de la misma forma se eliminaron las levaduras en las que ningún compuesto superó el valor de la unidad en el OAV.

Los compuestos eliminados fueron: ácido 2-metil propanoico, alfa-terpineol, 2-pentanol, 2-fenil-2-butenal, benzaldehído, acetato de bencilo, acetato de 2-metilpropilo, 1-feniletanona,

2,3,5,6-tetrametilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina y 2-fenil-2-butenal, junto con las levaduras 17 y 97. Las relaciones más altas de concentración sobre OTV se observaron en L1a con 3-fenil-2-propenoato de etilo (348.33), L110mrs con 3-metilbutanal (348.38) y L218 con 3-fenil-2-propenoato de etilo (2849.63) y 3-fenil propionato de etilo (1595.75), ver **Apéndice B**.

**Tabla 2.**

*Ejemplo de screening de la levadura L33.*

Nº	Familia	Compuesto	L33 [mg/kg]
C1	Ácido	Ácido decanoico	1,175
C2	Alcohol	Etanol	55,948
C3		3-metil-2-butanol	4,898
C4	Aldehído	4-metil-2-fenil-2-pental	0,000
C5		3-metilbutanal	0,000
C6	Ester	Dodecanoato de etilo	3,695
C7		3-fenil-2-propenoato de etilo	0,000
C8		Benzoato de 2-metil propilo	5,611
C9		3-fenil-2-propenoato de 3-propenilo	3,188
C10		3-fenil propionato de etilo	0,000
C11		Decanoato de etilo	0,000
C12		Acetato de 2-feniletilo	1,615
C13		Octanoato de etilo	0,000
C14		2-fenilacetato de metilo	2,295
C15		Acetato de etilo	1,758
C16		Acetato de 3-metilbutilo	0,000
C17	Cetona	2,3-butanodiona	0,000

Como resultado del screening por OAV, se agruparon 15 cepas de levadura y 17 compuestos, divididos en 5 familias distintas. Cabe resaltar que el screening eliminó las pirazinas. A continuación, se presenta un ejemplo con los compuestos que quedaron tras el screening y las concentraciones para la levadura L33 en donde se puede observar que finalmente permanecen: un ácido (ácido decanoico), dos alcoholes (etanol, 3-metil-2-butanol), dos aldehídos (4-metil-2-fenil-2-pental, 3-metilbutanal), once ésteres (dodecanoato de etilo, 3-fenil-2-propenoato de etilo,

benzoato de 2-metil propilo, 3-fenil-2-propenoato de 3-propenilo, 3-fenil propionato de etilo, decanoato de etilo, acetato de 2-feniletilo, octanoato de etilo, 2-fenilacetato de metilo, acetato de etilo, acetato de 3-metilbutilo) y una cetona (2,3-butanodiona).

Las concentraciones obtenidas de los compuestos en cada muestra se transformaron a Z-scores restando a cada dato la media y dividiéndolo entre la desviación por columnas para estandarizar los datos y facilitar su análisis con herramientas estadísticas de distribución normal al eliminar los valores nulos dentro de la tabla y ajustar la media y desviación del análisis. Después, se realizó un análisis PCA para visualizar la relación entre las levaduras y los compuestos volátiles, en este se trabajó con los datos ajustados a media 0 y varianza 1 para ayudar en la comparación entre grupos y de disminuir el impacto de valores atípicos, además de que las pruebas estadísticas usadas requerían cumplir el supuesto de normalidad, también, se buscó que los primeros dos componentes representaran más de la mitad de la varianza. Se observó que los primeros dos componentes principales representaron el 63% de la varianza total. Para el análisis se dividieron en tres grupos principales de levaduras y compuestos volátiles, ver **En la** región positiva de PC-1 quedaron distribuidos los compuestos C7 (3-fenil-2-propenoato de etilo), C10 (3-fenil propionato de etilo) y C11 (decanoato de etilo), agrupados con la cepa L218.

La cepa L33 se ubicó en la región negativa de PC2 y se destacó debido a su perfil aromático dominado por la familia de ésteres, así como por la concentración de C8 (benzoato de 2-metil propilo, 5.611 mg/kg), y por la producción de dodecanoato de etilo (C6), reconocido por sus notas frutales y florales, también se encuentran agrupadas en esta región las cepas L1a y L244 que presentan los compuestos C1 (ácido decanoico), C15 (acetato de etilo) y C12 (acetato de 2-feniletilo).

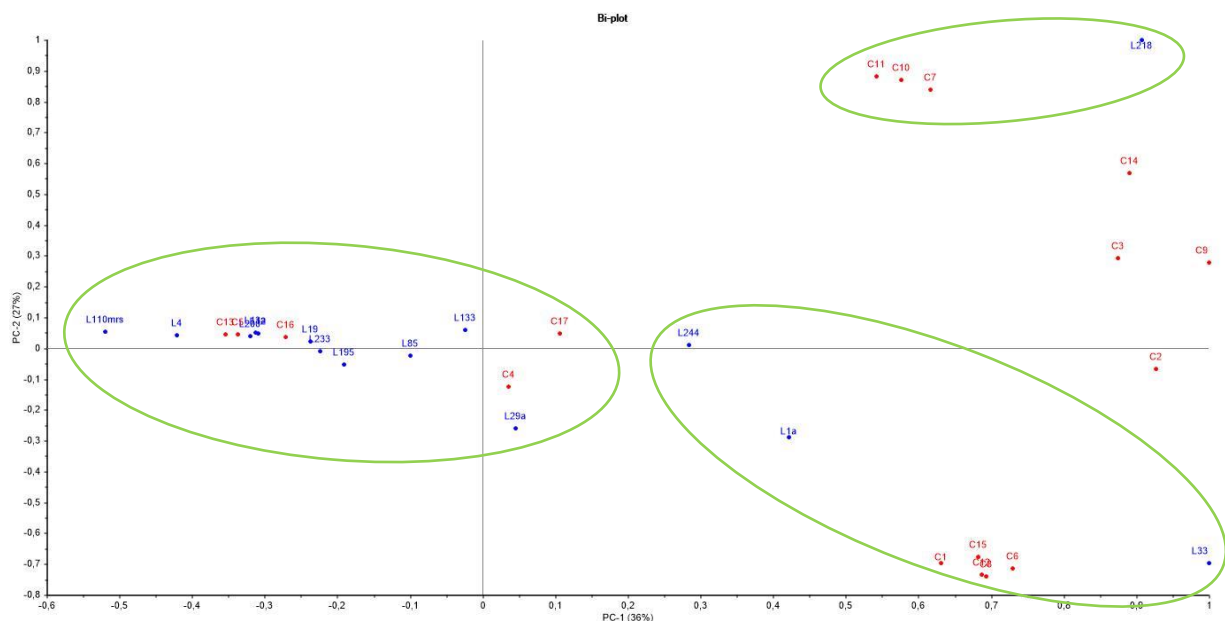
**Figura 2.**

En la región positiva de PC-1 quedaron distribuidos los compuestos C7 (3-fenil-2-propenoato de etilo), C10 (3-fenil propionato de etilo) y C11 (decanoato de etilo), agrupados con la cepa L218.

La cepa L33 se ubicó en la región negativa de PC2 y se destacó debido a su perfil aromático dominado por la familia de ésteres, así como por la concentración de C8 (benzoato de 2-metil propilo, 5.611 mg/kg), y por la producción de dodecanoato de etilo (C6), reconocido por sus notas frutales y florales, también se encuentran agrupadas en esta región las cepas L1a y L244 que presentan los compuestos C1 (ácido decanoico), C15 (acetato de etilo) y C12 (acetato de 2-feniletilo).

**Figura 2.**

*Biplot PCA de las levaduras y los CVs identificados.*



Los compuestos C13 (octanoato de etilo), C16 (acetato de 3-metilbutilo) y C5 (3-metilbutanal), que aportan notas florales, frutales y chocolatasas se asociaron con las cepas L110mrs, L4, L200, L19, L233, L195 y L133a en la región negativa de PC-1. Además, en esta misma zona, los compuestos C4 (4-metil-2-fenil-2-pental) y C17 (2,3-butanodiona) se vincularon con las cepas L29a, L85 y L133.

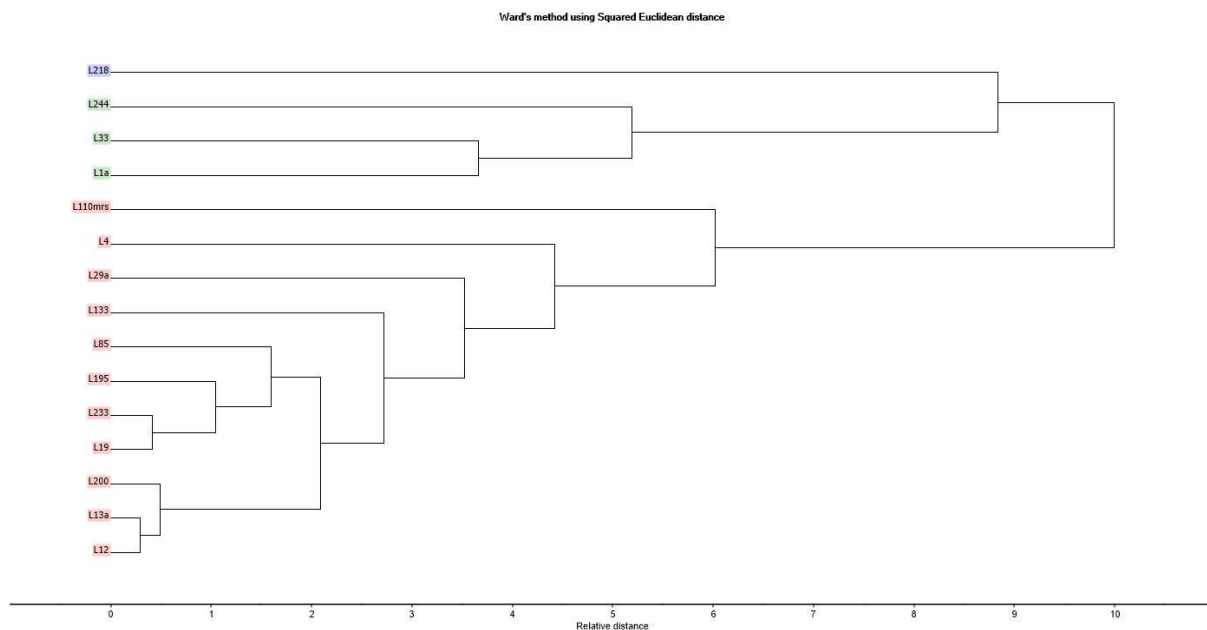
Finalmente, se identificaron los compuestos C2 (etanol), C3 (3-metil-2-butanol), C9 (3-fenil-2-propenoato de 3-propenilo) y C14 (2-fenilacetato de metilo) de la familia de alcoholes y ésteres. Estos compuestos no están relacionados con levaduras específicas ya que al ser un proceso fermentativo los alcoholes son producidos por la mayoría de las levaduras y el grupo de ésteres fue el más repetido entre las cepas.

Para el análisis de conglomerados se usó el método del codo, ver **Apéndice C**, para identificar el número adecuado de clústeres para agrupar las levaduras, el cual dio como resultado tres grupos principales.

En el primer grupo se encuentra la cepa L218 que destaca por su alta producción de C10 (7.657 mg/kg) teniendo un perfil de aroma floral y afrutado, el segundo tiene a las cepas L244, L33 y L1a que resaltan por su concentración de C3 presentando un aroma leve a alcohol con notas dulces y frutales como frutas fermentadas. Por último, el tercer grupo engloba a la mayoría y las demás levaduras restantes: L110mrs, L4, L29a, L133, L85, L195, L233, L19, L200, L13a y L12.

### Figura 3.

*Análisis de conglomerados de las levaduras agrupadas por su producción de CVs.*



Las cepas L29a, L33, L218 y L244 se distinguen por su alta producción de etanol (45.356 mg/kg, 55.948 mg/kg, 50.482 mg/kg, 59.731 mg/kg) lo cual está en consonancia con los hallazgos de un estudio reciente realizado por Tuárez Párraga (2020) quienes evaluaron tres tipos de levaduras comerciales (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* y *Candida utilis*) para la producción de etanol a partir de la melaza de caña de azúcar. Dicho estudio encontró que no existen diferencias significativas entre los tipos de levaduras utilizadas en el experimento, sin embargo, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son las mayores productoras de etanol, esto se debe a que esta levadura tiene alto potencial metabólico, respaldando así la capacidad de las

levaduras nativas de nuestra investigación para producir etanol. Adicionalmente la cepa L33 demostró una notable producción de ésteres (C6 3.695 mg/kg, C8 5.611 mg/kg, C9 3.188 mg/kg, C12 1.615 mg/kg, C14 2.295 mg/kg y C15 1.758 mg/kg), los cuales frecuentemente se asocian con percepciones frutales.

De acuerdo con Escobar *et al.* (2021) ciertos compuestos volátiles se consideran biomarcadores aromáticos debido a su papel esencial en la formación del aroma característico a chocolate. Entre estos compuestos, el 3-metilbutanal (C5) destaca por sus notas mantecosas con percepciones sensoriales a malta y cacao. Este compuesto estuvo presente con una gran concentración (76.32 µg/g) al séptimo día de fermentación en todas las muestras de cacao de un estudio realizado por Trigosso Rojas *et al.* (2022) quienes planteaban identificar biomarcadores aromáticos en el proceso de fermentación espontánea (FE) y fermentación con cultivo iniciador (FC) usando *Saccharomyces cerevisiae* en cacao nativo orgánico, procedente de tres localidades de la región Amazonas; sin embargo en nuestro estudio C5 solo estuvo presente en L110mrs (4.529 mg/kg) y L195 (0.068 mg/kg). Es por esto por lo que el hecho de que aparezca tanto en la fermentación espontánea como en la fermentación con iniciador en el estudio de Trigosso sugiere que C5 se produce como resultado de una interacción compleja entre las levaduras y el medio. Por lo tanto, parece que el medio juega un papel importante, pero la presencia de levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, podría potenciar la producción de este compuesto, evidenciando una posible acción sinérgica. Para fomentar la aparición de C5 en un medio como el lixiviado de mucílago de cacao, donde la composición es diferente y podría no favorecer tanto la producción de este compuesto sería clave ajustar la composición del medio, inocular con una mezcla optimizada de microorganismos, y optimizar las condiciones de fermentación, como el pH, la oxigenación y el tiempo.

#### **4.2. Identificar los posibles cambios en los perfiles de los compuestos volátiles producidos por levaduras nativas al usar distintos medios de crecimiento.**

Se realizó una comparación de los perfiles de los compuestos determinados usando las concentraciones de compuestos volátiles obtenidas en el primer objetivo empleando lixiviado de mucílago de cacao a 20 g/L y las concentraciones reportadas por Sandoval-Lozano *et al.* (2022) quienes usaron caldo Sabouraud a una concentración de glucosa de 20g/L en el medio de cultivo.

Debido a que el equipo destinado para hacer la identificación requirió de mantenimiento y, además, no se vislumbra que este se va a desarrollar en un periodo corto, solo se realizó el análisis con los compuestos identificados en el primer objetivo. Sin embargo, es importante enfatizar que en 11 de las levaduras analizadas los picos desconocidos representan entre el 20% y 40% del área relativa total del cromatograma y en 2 de las cepas el área relativa total desconocida equivale a más del 65%.

En el medio lixiviado fueron identificados 27 compuestos volátiles de los cuales el ácido 2-metil propanoico, ácido decanoico, 3-metil-2-butanol, 4-metil-2-fenil-2-pental, 2,3-butanodiona, 2-fenilacetato de metilo y benzoato de 2-metil propilo, no estuvieron presentes en el medio Sabouraud. En el medio Sabouraud reportado por Sandoval-Lozano *et al.* (2022) fueron identificados 36 compuestos volátiles, de los cuales el ácido 3-metilbutanoico, ácido acético, 2-feniletanol, 3-metilbutanol, alfa-terpineol, fenilacetaldehído, acetato de metilpropilo y benzoato de etilo no fueron encontrados en el Lixiviado, ver **Tabla 4**.

Tras realizar el screening por OAV se mantuvieron 19 compuestos en caldo Sabouraud y 17 compuestos en lixiviado de los cuales 10 estuvieron presentes en ambos medios. Sobre el conjunto de datos en común se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos a tratar, ver

**Apéndice D.** Para los compuestos C5, C6 y C7 se concluyó que hay menos de 5% de probabilidad que los datos sigan una distribución normal.

Por el contrario, los compuestos C2, C10 y C11 presentaron un p-valor mayor a 0.05 por lo que se consideraría pasan la prueba. Sin embargo, los compuestos C12 y C15 presentan distribuciones diferentes en ambos medios por lo que, para unificar el método de análisis de varianza y dado que cada compuesto, en cada medio, tiene una cantidad diferente de datos y diferente varianza se trataron todos los datos como de una distribución no normal, ver **Tabla 3**.

Además, debido a la insuficiente cantidad de datos para C16 por parte del lixiviado se excluyó del análisis. Se realizó una ANOVA sobre los datos junto a la prueba de Tukey como se planteó inicialmente; sin embargo, por la distribución de los datos el programa arrojó resultados incoherentes dado que el software considera una distribución normal y una varianza homogénea para esas pruebas, por lo cual, se decidió trabajar con la prueba para datos no paramétricos U de Mann-Whitney, ver **Apéndice E**.

**Tabla 3.**

*P-Valor prueba U de Mann-Whitney para cada compuesto.*

<b>Compuestos</b>	C2	C5	C6	C7	C10	C11	C12	C13	C15
<b>P-Valor</b>	0.001	0.773	0.460	0.312	0.045	0.034	0.004	0.455	0.010

Se encontró que para los compuestos C5, C6, C7 y C13 el valor p fue mayor a 0.05 y por tanto se acepta la hipótesis nula mostrando que no hay evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas entre las distribuciones de estos compuestos entre los medios de cultivo. Para los compuestos C2, C10, C11, C12, y C15 su valor p fue menor a 0.05 y por tanto se rechaza la hipótesis nula, por lo cual hay evidencia estadística para decir que hay una diferencia

significativa entre las distribuciones de las dos muestras analizadas por lo cual estadísticamente el cambio de medio si afecta a la producción de estos CVs.

Dado que se trata de un proceso fermentativo, el etanol estuvo presente en todas las levaduras y su concentración fue notablemente más alta en el medio Sabouraud (1623.689 mg/L) en comparación con el lixiviado (355.289 mg/L). Esto sugiere que las levaduras pueden ser más eficientes en la fermentación de glucosa pura que en la mezcla de azúcares presentes en el lixiviado, lo que se puede explicar por el hecho de que las levaduras pueden utilizar la glucosa de manera más eficiente cuando está disponible en forma pura, puesto que, las levaduras tienen una alta afinidad y capacidad para metabolizar la glucosa ya que esta puede ser utilizada directamente en la glucólisis sin necesidad de pasos adicionales de conversión, lo que la convierte en una fuente de carbono más eficiente para la fermentación.

De igual manera, se observó una disminución significativa en las concentraciones de compuestos volátiles cuyo medio fue el lixiviado en comparación con el medio Sabouraud, excepto en los casos de L1a, L133 y L244, donde las concentraciones en ambos medios son similares.

**Tabla 4.**

*Concentración (mg/kg) de compuestos volátiles producidos por levaduras nativas en medio de cultivo Sabouraud y en lixiviado de mucílago de cacao a 20 g/L.*

Familia	Medio	Compuesto	1a	4	12	13a	19	29a	33	85	110mrs	133	195	200	218	233	244	
Ácido	Lixiviado	Ácido 2-metil propanoico	0,673	0,018	0,053	0,076	0,498	1,548	-	1,731	0,129	0,447	-	0,065	4,909	0,935	2,031	
	Sabouraud	Ácido 3-metil butanoico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,276	
	Sabouraud	Ácido Acetico	-	-	-	-	-	-	-	-	16,319	-	-	-	-	-	-	
	Lixiviado	Ácido decanoico	0,188	-	-	-	0,038	0,517	1,175	0,343	0,016	0,267	-	-	-	0,033	-	
Alcohol	Sabouraud	2-fenil etanol	3,123	7,621	0,801	1,075	2,987	1,494	4,664	6,879	0,220	0,471	51,451	32,603	0,721	0,585	8,438	
	Lixiviado	3-metil-2-butanol	4,865	0,209	0,361	0,590	-	-	4,898	-	0,048	3,795	-	0,522	1,622	-	8,286	
	Sabouraud	3-metilbutanol	5,456	6,651	1,381	-	5,401	-	8,859	11,55 6	0,395	-	65,427	-	0,330	1,913	5,392	
	Sabouraud	Alpha-terpineol	-	0,252	-	0,084	-	-	-	-	0,003	0,083	-	-	-	0,405	0,407	
	Sabouraud	2-pentanol	-	-	-	2,727	-	-	-	-	-	1,008	-	10,29	4,0749	-	-	
	Lixiviado	Etanol	28,59 7	1,385	8,254	6,467	11,68 8	45,356	55,948	22,27 9	6,340	27,670	12,880	4,290	55,007	9,396	59,73 1	
	Sabouraud	Etanol	28,16 3	59,49 3	41,19 9	61,35 0	33,57 7	105,47 2	119,70 6	44,07 9	25,315	31,688	607,89 0	164,65 0	197,99 2	54,31 0	48,80 5	
	Aldehido	Lixiviado	4-metil-2-fenil-2-pental	-	-	-	-	0,248	0,804	-	0,358	0,089	0,329	0,487	-	1,763	0,307	1,238
		Sabouraud	Fenilacetaldehido	-	0,456	-	-	-	-	-	0,268	-	-	12,219	-	-	-	-
		Sabouraud	3-metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,253	3,947	-	-	-	1,154
Lixiviado		3-metilbutanal	-	-	-	-	-	-	-	-	4,529	-	0,068	-	-	-	-	
Cetona	Lixiviado	2,3-butanodiona	-	-	0,006	0,012	-	-	-	-	-	0,038	-	-	-	-	0,066	
Ester	Lixiviado	2-fenilacetato de metilo	1,070	-	0,119	-	0,574	-	2,295	0,963	-	0,931	-	0,041	-	0,549	1,475	
	Sabouraud	Acetato de metil propilo	-	-	-	-	-	-	0,768	-	-	-	-	25,161	-	0,207	10,76 9	
	Lixiviado	Benzoato de 2-metil propilo	2,576	0,111	-	-	-	2,337	5,611	1,135	-	-	-	-	-	-	-	

Sabouraud	Benzoato de etilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,610	1,511	-	-	0,064
Lixiviado	3-fenil propionato de etilo	-	-	0,144	0,148	-	-	-	-	-	-	-	0,136	4,063	-	-
Sabouraud	3-fenil propionato de etilo	2,015	-	3,238	1,307	5,716	5,344	5,488	5,878	1,960	1,479	-	-	3,889	1,723	1,957
Lixiviado	3-fenil-2-propenoato de etilo	0,557	-	-	-	0,050	-	-	-	-	-	-	-	-	0,084	-
Sabouraud	3-fenil-2-propenoato de etilo	-	-	-	-	6,602	0,000	6,984	-	-	-	3,992	4,778	-	-	-
Sabouraud	Acetato de 2-feniletilo	40,11	2,264	15,38	9,845	0,608	1,820	0,797	0,988	218,029	82,067	25,170	-	276,79	0,237	-
Lixiviado	Acetato de 2-feniletilo	6	-	7	-	0,180	0,453	1,615	-	-	0,031	0,235	-	7	0,171	-
Sabouraud	Acetato de 3-metilbutilo	14,57	8,905	4,376	-	0,766	1,560	0,766	1,260	317,185	106,22	55,069	-	248,36	0,441	-
Lixiviado	Acetato de 3-metilbutilo	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	1	-	-
Lixiviado	Acetato de etilo	-	0,785	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lixiviado	Acetato de etilo	1,211	-	-	-	-	-	1,758	-	-	-	0,230	0,059	2,953	0,238	-
Sabouraud	Acetato de etilo	56,39	18,04	22,09	15,31	1,276	1,457	0,681	0,718	102,074	28,819	8,466	-	49,330	-	1,898
Lixiviado	Decanoato de etilo	2	1	3	8	-	-	0,708	-	0,476	-	0,057	2,490	0,191	-	-
Sabouraud	Decanoato de etilo	-	0,322	3,408	0,266	1,952	-	6,924	1,460	6,183	0,041	2,783	-	0,618	0,560	0,821
Lixiviado	Dodecanoato de etilo	2,100	-	-	-	0,396	1,398	3,695	0,659	-	0,331	0,862	-	-	0,493	2,411
Sabouraud	Dodecanoato de etilo	-	-	1,882	-	0,000	0,693	-	-	-	-	-	-	-	-	3,261
Sabouraud	Octanoato de etilo	-	-	0,698	-	12,99	10,557	11,195	11,09	-	-	-	-	2,808	-	-
Lixiviado	Octanoato de etilo	-	0,702	-	-	6	-	-	8	23,443	-	1,632	0,036	-	-	-

**Nota.** En sombreado se resaltan los compuestos que no están presentes en ambos medios, aparecen primero en cada familia.

Los compuestos de la familia de ésteres, como C10, C11, C12, C13 y C15 mostraron una mayor presencia en las levaduras cultivadas en el medio Sabouraud. En contraste, el compuesto C6 (floral, frutal) de la familia de ésteres cultivado en el medio de lixiviado se presentó en un mayor número de levaduras y en mayor concentración total en comparación con el medio Sabouraud; por lo que, aunque la diferencia entre las medias no sea significativamente distinta, el medio lixiviado plantea un mejor ambiente para la producción de este compuesto ya que la mezcla de azúcares en el lixiviado podría favorecer su producción y en particular la fructosa puede ser metabolizada de manera diferente por las levaduras, generando compuestos que no se producen en medios con glucosa pura al introducir variaciones los intermediarios metabólicos y, por ende, en la producción de compuestos volátiles como puede ser en este caso que al incrementar la producción de ciertos ácidos grasos y su esterificación altera el perfil de ésteres producido, además, el perfil aromático podría ser más favorable en un entorno donde hay una mayor diversidad de azúcares disponibles para la fermentación.

Por otro lado, para los demás compuestos el medio Sabouraud plantea ser la mejor opción exceptuando al compuesto C5 (chocolate, malta) que es la única que muestra un mejor promedio en el medio de lixiviado y en general mostró concentraciones muy similares en ambos medios de cultivo, lo que sugiere que su producción es menos dependiente de las condiciones del medio; esto podría deberse a su estabilidad química que podría permitir que se mantenga en concentraciones similares independientemente del sustrato utilizado; además, podría estar relacionada con rutas metabólicas específicas que no dependen de la fuente de carbono sino que pueden ser propios de las levaduras nativas.

La presencia de una mezcla de glucosa, fructosa y sacarosa en el medio de fermentación puede alterar las rutas metabólicas por la interacción de múltiples sustratos empleados en la

degradación de los azúcares complejos. (Acosta Romero, 2012). También, los efectos sinérgicos de los azúcares pueden afectar la regulación de la producción de compuestos volátiles puesto que, aunque la glucosa es el azúcar más metabolizable por las levaduras, en realidad generalmente manifiesta efectos de inhibición y de represión en la asimilación de otros azúcares, lo que puede resultar en menores concentraciones de estos compuestos en comparación con la fermentación utilizando solo glucosa. (Díaz Nava et al., 2018)(Grijalva Vallejos et al., 2019)

#### **4.3. Determinar los rendimientos a las 5 levaduras con mejor desempeño en la producción de compuestos volátiles.**

Las levaduras fueron seleccionadas bajo los siguientes criterios: i) Producción de dodecanoato de etilo (C6) en medio lixiviado: se seleccionaron las levaduras L1a (2.0996 mg/kg), L29a (1.3982mg/kg), L33 (3.6949mg/kg) por su aporte al perfil aromático frutal y floral y ii) producción de 3-metilbutanal (C5) en medio lixiviado: las levaduras L110mrs y L195 por aportar un aroma a malta, chocolate, cacao.

Para calcular los rendimientos se requieren 3 datos: la biomasa producida, el producto generado y el sustrato consumido. Para esto se realizaron dos estudios sobre las muestras. Para la biomasa se determinó la densidad óptica al momento de la siembra y después de la fermentación, luego para convertir los resultados a concentración se usó una curva de calibración con relación densidad/biomasa. Para el sustrato y producto se realizó un estudio por medio de cromatografía líquida de alta eficacia donde se cuantificaron las cantidades de azúcares consumidos y el etanol producido durante el proceso usando el área bajo la curva de los picos obtenidos en los cromatogramas para cada compuesto, luego para convertir las áreas a concentración se realizaron las respectivas curvas de calibración para los 3 azúcares y el etanol. Finalmente, para obtener el

sustrato consumido se restó la cantidad total de azúcares encontrados al final de la fermentación de la concentración inicial para obtener los azúcares consumidos durante el proceso.

**Tabla 5.**

*Resultados densidad óptica y biomasa.*

Levadura	D.O. [600 nm]		Biomasa [g/L]	
	Pre	Post	Pre	Post
1a	0.103	1.183	0.372	3.794
29a	0.207	1.340	0.701	4.291
33	0.128	1.227	0.450	3.933
110	0.097	1.008	0.351	3.238
195	0.105	1.467	0.379	4.694

Los resultados de la densidad óptica (D.O.) y la biomasa indican un aumento significativo en ambos parámetros de las levaduras desde el estado inicial (pre) hasta el final (post) del proceso de fermentación. La levadura 195 mostró la mayor D.O. post-fermentación (1.467), lo que sugiere un crecimiento celular robusto, seguido de cerca por la levadura 29a (1.340). En términos de biomasa, la levadura 195 también lidera con 4.694 g/L, lo que indica una alta capacidad de proliferación y, potencialmente, una mayor producción de compuestos volátiles.

**Tabla 6.***Concentración de azúcares consumidos y etanol producido.*

<b>Levadura</b>	<b>Azúcares [g/L]</b>	<b>Etanol [g/L]</b>
1a	17.482 ± 0.37	8.710 ± 0.52
29a	17.470 ± 0.36	8.674 ± 0.49
33	18.186 ± 0.01	8.312 ± 0.01
110mrs	17.984 ± 0.08	8.293 ± 0.01
195	17.556 ± 0.43	8.628 ± 0.65

La concentración de azúcares consumidos por las levaduras fue bastante homogénea, oscilando entre 17.470 g/L y 18.186 g/L. Sin embargo, la producción de etanol varió, siendo la levadura 1a la que generó la mayor cantidad de etanol (8.710 g/L), lo que refleja su eficiencia en la conversión de azúcares a etanol. Esta eficiencia es crucial, ya que el etanol es un indicador clave de la actividad fermentativa de las levaduras.

**Tabla 7.***Rendimientos de las levaduras.*

<b>Levadura</b>	<b>Yp/s</b>	<b>Yx/s</b>	<b>Yp/x</b>
1a	0.498	0.196	2.546
29a	0.496	0.206	2.416
33	0.457	0.192	2.386
110mrs	0.461	0.160	2.873
195	0.491	0.246	2.000

**Nota.** Se reportan los rendimientos en g/g para las levaduras en  $Y_p/s$  (etanol producido por azúcares consumidos),  $Y_x/s$  (biomasa producida por azúcares consumidos) y  $Y_p/x$  (etanol producido por biomasa producida).

Las levaduras muestran ser eficientes en la conversión de azúcares a etanol con rendimientos  $Y_p/s$  relativamente similares que oscilan entre 0.457 g/g (L33) y 0.498 g/g (L1a). De igual manera, el rendimiento  $Y_x/s$  varía entre 0.160 g/g (L110mrs) y 0.246 g/g (L195). Para el rendimiento  $Y_p/x$  la levadura L110mrs presenta el valor más alto (2.873), lo que sugiere que produce más etanol por unidad de biomasa en comparación con las otras cepas, siendo potencialmente la más eficiente. La variabilidad en los rendimientos de las levaduras puede atribuirse a factores como la genética de las cepas, las condiciones de fermentación y la disponibilidad de nutrientes.

Se destacan 3 levaduras: L1a presenta un buen equilibrio entre producción de etanol y biomasa, lo que podría hacerla atractiva para procesos donde se busca maximizar tanto el rendimiento como la producción de biomasa. L195, aunque tiene un rendimiento moderado en etanol, muestra una buena producción de biomasa, lo que podría ser ventajoso si se busca un equilibrio entre ambos productos. L110mrs, a pesar de tener un rendimiento moderado en  $Y_p/s$ , destaca por su alta relación  $Y_p/x$ , lo que la convierte en una opción atractiva si el objetivo principal es maximizar la producción de etanol a partir de biomasa.

También, se realizó un análisis estadístico con ANOVA y la prueba T-Student para determinar si existen diferencias significativas entre los parámetros de concentración evaluados en el rendimiento para cada levadura. De este se concluye que dado que en todos los casos los valores P obtenidos superan en gran medida el valor de significancia se acepta que no existen diferencias

significativas entre las concentraciones reportadas y, por lo tanto, aunque algunas levaduras presentan mejores resultados no son tan diferentes para descartar las demás.

Según la literatura sobre procesos fermentativos con levaduras (Durango Londoño et al., 2007; González-Leos et al., 2017) todos los rendimientos se encuentran dentro de los rangos normales trabajados, destacando el Yp/s que se encuentra cerca del teórico 0.51 g/g. Sin embargo, según Grijalva Vallejos *et al.* (2019) a nivel industrial se trabaja con rendimientos menores a 5.11% de etanol producido respecto a glucosa consumida (< 90% del rendimiento teórico) por lo que, aunque estos rendimientos son consecuencia de un ambiente controlado se trabajó con un medio de cultivo no estándar y aun así generan rendimientos acordes a la industria demostrando que son levaduras con buenos rendimientos y que incluso podrían destacar en procesos específicos.

## 5. Conclusiones

La utilización del lixiviado de cacao como medio de fermentación demostró ser efectiva para el crecimiento de levaduras nativas de Santander, gracias a su abundancia en azúcares fermentables, especialmente glucosa, fructosa y sacarosa, lo que con su interacción puede influir en la regulación de la producción de los compuestos volátiles. Esto es crucial porque una mayor diversidad puede enriquecer las características sensoriales del cacao, lo cual puede convertirse en una alternativa viable a los medios sintéticos en aplicaciones industriales al mejorar las características sensoriales y reduciendo costos en la producción. Además, esto puede contribuir a un enfoque más sostenible al utilizar residuos agroindustriales.

Los análisis comparativos entre el lixiviado de cacao y el caldo Sabouraud revelan que la composición del medio de fermentación tiene un impacto significativo en la producción de compuestos volátiles. Se observa una tendencia general de disminución en las concentraciones de compuestos en el medio de lixiviado de cacao, particularmente en ésteres, en comparación con el medio Sabouraud. Sin embargo, se evidenció un aumento en la diversidad en los perfiles aromáticos de las levaduras.

El análisis de concentraciones g/L muestran que todas las levaduras presentan valores similares, sin embargo, basado en los rendimientos calculados, se puede seleccionar la levadura más adecuada para maximizar algún objetivo como lo son: L1a y L29a las mejores opciones en la producción de etanol; L110mrs es la más adecuada en la eficiencia de etanol por biomasa; L195 es claramente superior en términos de producción de biomasa.

## **6. Recomendaciones**

Estos resultados destacan la importancia de considerar el medio de fermentación en el diseño y control de procesos de fermentación, ya que puede influir significativamente en los perfiles aromáticos de los productos finales. Además, proporcionan información valiosa para la selección y optimización de levaduras en la industria alimentaria y de bebidas, con el objetivo de obtener productos con perfiles sensoriales deseados y consistentes. Es por lo anterior que recomendamos continuar investigando otros residuos agroindustriales y sus efectos en diferentes cepas para maximizar la producción y mejorar las características sensoriales. También sería interesante realizar estudios sobre otros parámetros que puedan

influir en la producción de volátiles y resaltar la importancia de explorar alternativas naturales en procesos fermentativos.

Como complemento y para tener un entendimiento completo se recomienda realizar una identificación total de los picos desconocidos para la identificación completa del perfil producido con el medio de lixiviado.

También realizar estudios sobre el comportamiento de casos destacados como con la cepa 195 para entender los factores que contribuyen a su alto desempeño, el compuesto C6 (dodecanoato de etilo) ya que es el único que parece ser favorecido en el medio de lixiviado de mucílago de cacao, y el compuesto C5 (3-metilbutanal) ya que es el único que parece no verse afectado por el cambio en la composición del medio.

**Referencias Bibliográficas**

- Acosta Romero, C. (2012). *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel*. Universidad Nacional de Colombia.
- Akoa, S. P., Boulanger, R., Effa Onomo, P., Lebrun, M., Ondobo, M. L., Lahon, M. C., Ntyam Mendo, S. A., Niemenak, N., & Djocgoue, P. F. (2023). Sugar profile and volatile aroma composition in fermented dried beans and roasted nibs from six controlled pollinated Cameroonian fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Bioscience*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102603>
- Alarcón Heredia, R., & García Esparza, J. (2016). *Caracterización Aromática de Vinos de Fondillón de la D.O. Alicante*. Universitat Politècnica de Valencia.
- Alcázar Valle, E. M., Gschaedler Mathis, A. C., & Arellano Plaza, M. (2016). Capacidades Fermentativas y Generación de Volátiles de Cepas de Levaduras Aisladas en Diferentes Estados Productores de Mezcal. *CIATEJ*.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03736-3>
- Britania Lab. (2020). *Sabouraud Glucosado Caldo*. Laboratorios Britania s.a.
- Cancino Laguado, K. D., Agudelo Forero, J. S., Guerrero Amaya, H., López Giraldo, L. J., Sandoval Lozano, C. J., & Niño Sánchez, M. L. (2021). *Evaluación de la Producción de Etanol Usando Levaduras Nativas de Santander a Partir de Lixiviado de Guanábana*. 5(5), 6–8. [www.unab.edu.co](http://www.unab.edu.co)

- Checa Tapia, J., & García Esparza, J. (2020). *Estudio del Perfil Aromático de Vinos Obtenidos con Levaduras Seleccionadas Saccharomyces y No-Saccharomyces*. Universitat Politècnica de València.
- Díaz Nava, L. E., Aguilar Uscanga, M. G., Montes García, N., & Mendoza García, P. G. (2018). *Caracterización Metabólica y Cinética de la Levadura Autóctona Pichia kudriavzevii ITV-S42*. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Durango Londoño, L. P., Villegas, V., & Carvajal, F. O. (2007). *Evaluación y Escalamiento de la Producción de Levaduras Nativas Tipo Saccharomyces spp. a Nivel de Laboratorio*. Universidad EAFIT.
- Escobar, S., Santander, M., Zuluaga, M., Chacón, I., Rodríguez, J., & Vaillant, F. (2021). Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation. *Food Chemistry*, 365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130627>
- Estela-Escalante, W. D., Rychtera, M., Melzoch, K., Torres-Ibáñez, F., Calixto-Cotos, R., Bravo-Araníbar, N., Memenza-Zegarra, M. E., & Chávez-Guzmán, Y. M. (2013). Efecto de la Aireación en la Producción de Compuestos Volátiles por Cultivo Mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* Durante la Fermentación de Sidra. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17, 5–14.
- González-Leos, A., Del Angel-Del Angel, J. A., González-Castillo, J. L., Rodríguez-Durán, N., & Bustos-Vázquez, G. (2017). Evaluación de Levaduras Nativas Productoras de Etanol Presentes en el Bagazo de Caña de Azúcar. *CienciaUAT*, 11(2), 80–92.

- Grijalva Vallejos, N. J., Matallana Redondo, E., & Aranda Fernández, A. (2019). *Caracterización Bioquímica y Tecnológica de Levaduras Aisladas en Bebidas Fermentadas*. Universitat de València.
- Guadalupe Medina, V. G., & Agosin Trumper, E. (2008). *Comparación de la Producción de Compuestos Aromáticos por Cepas de Levaduras Vínicas Comerciales*. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Kishimoto, T., Noba, S., Yako, N., Kobayashi, M., & Watanabe, T. (2018). Simulation of Pilsner-type Beer Aroma Using 76 Odor Active Compounds. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.015>
- Lukić, I., Budić-Leto, I., Bubola, M., Damijanić, K., & Staver, M. (2017). Pre-Fermentative Cold Maceration, Saignée, and Various Thermal Treatments as Options for Modulating Volatile Aroma and Phenol Profiles of Red Wine. *Food Chemistry*, 224, 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.077>
- Luna Calderón, T. A., & Ayala Armijos, J. H. (2018). Producción de Etanol a Partir de Mucílago de Cacao (*Theobroma cacao*) Mediante Fermentación Alcohólica. In *UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS*. Universidad Técnica de Machala.
- Montserrat Riu, A., Buxaderas Sánchez, S., & López Tamames, E. (2005). *Caracterización de Compuestos Volátiles en Bebidas Derivadas de Fruta*. Universitat de Barcelona.
- Piracoca Robles, M. J., & Palomeque Forero, L. A. (2022). Caracterización del Mucílago de Cacao (*Theobroma Cacao* L., clon TSH 565) como Fuente de Pectina y Azúcares para el Aprovechamiento en la Industria de Alimentos. In *Universidad Nacional de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.

- Rios Giraldo, D., Saravia Santamaría, S., López Giraldo, L. J., & Sandoval Lozano, C. J. (2018). *Determinación de las Condiciones para la Producción Vía Fermentativa de Saccharomyces cerevisiae Usando como Fuente de Carbono Lixiviados del Proceso de Fermentación del Cacao*. Universidad Industrial de Santander.
- Rodríguez Sáenz, C. A., Acevedo Benavides, C. P., Sánchez Cruz, L. M., & Gelvez Torres, C. J. (2022). *Evaluación de la Utilización del Mucílago de Cacao (Theobroma Cacao) para la Elaboración de Mermelada, Dulce y Caramelo en el Municipio de Barbosa, Santander*.
- Sánchez-Olaya, D. M., Rodríguez Pérez, W., Castro Rojas, D. F., & Trujillo Trujillo, E. (2019). Respuesta Agronómica de Mucilago de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en Cultivo de Maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia En Desarrollo*, 10(2), 43–58. <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.7958>
- Sandoval-Lozano, C. J., Caballero-Torres, D., & López-Giraldo, L. J. (2022). Screening Wild Yeast Isolated from Cocoa Bean Fermentation Using Volatile Compounds Profile. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27030902>
- Trigoso Rojas, D. F., Castro Alayo, E. M., & García Alamilla, P. (2022). *Identificación de Biomarcadores Aromáticos del Proceso de Fermentación Espontánea y con Cultivo Iniciador en Cacao Nativo Orgánico*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
- Tuárez Párraga, M. A., Leonela, M., Mero, L., Judith, S., Ochoa, B., Geovanny, E., & Campozano, D. (2020). Evaluación de Levaduras en la Producción de Etanol a Partir de Melaza de Caña de Azúcar. *Espamciencia*, 11(2), 115–119. <https://doi.org/10.51>

- Wang, X. jie, Tao, Y. sheng, Wu, Y., An, R. yan, & Yue, Z. ya. (2017). Aroma Compounds and Characteristics of Noble-rot Wines of Chardonnay grapes Artificially Botrytized in the Vineyard. *Food Chemistry*, 226, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.007>
- Zamudio-Palacios, B., Ayora-Talavera, T., Lugo-Cervantes, E., Gastélum-Martínez, E., & Taillandier, P. (2021). *Estudio de un Consorcio de Levaduras Durante la Fermentación de Cacao y su Efecto en la Generación de Compuestos Aromáticos*. 6, 62–74.

## Apéndices

## Apéndice A.

Concentración de compuestos volátiles (mg/kg) producidos por levaduras en medio con lixiviado de mucílago de cacao a 20g/L.

N°	Familia	Compuesto	RT	Blanco	1a	4	12	13a	17	19	29a	33	85	97	110mrs	133	195	200	218	233	244
1	Ácido	Ácido decanoico	43.022	0,188 ± 0	0	0	0	0	0,038 ± 0,009	0,517 ± 0,02	1,175 ± 0,45	0,343 ± 0,069	0,024 ± 0,004	0,016 ± 0,004	0,267 ± 0,102	0	0	0	0,033 ± 0,005	0	0,188 ± 0
2		Ácido 2-metilpropanoico	13.593	0,673 ± 0	0,018 ± 0,017	0,053 ± 0,012	0,076 ± 0,007	0	0,498 ± 0,102	1,548 ± 0,148	0	1,731 ± 0,295	0	0,129 ± 0,018	0,447 ± 0,267	0	0,065 ± 0	0	0,935 ± 0,096	2,031 ± 2,358	0,673 ± 0
3		Alfa-terpineol	39.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,047 ± 0,007	0	0	0	0	0	0	0
4	Alcohol	2-pentanol	13.807	0	0	0	0	0	0,387 ± 0,051	1,374 ± 0,148	0	1,201 ± 0,178	0	0,179 ± 0,012	0	0,35 ± 0,09	0	0	0	0	0
5		Etanol	4.956	28,597 ± 0	1,385 ± 0,108	8,254 ± 7,859	6,467 ± 2,524	3,11 ± 1,736	11,688 ± 9,916	45,356 ± 3,367	55,948 ± 6,709	22,279 ± 5,229	7,422 ± 4,553	6,34 ± 0,506	27,67 ± 8,238	12,88 ± 5,508	4,29 ± 0	50,428 ± 5,682	9,396 ± 1,681	59,731 ± 30,857	28,597 ± 0
6		3-metil-2-butanol	13.4	4,865 ± 0	0,209 ± 0,009	0,361 ± 0,082	0,59 ± 0,107	0	0	0	4,898 ± 4,311	0	0	0,048 ± 0,006	3,795 ± 1,172	0	0,522 ± 0	8,474 ± 0,521	0	8,286 ± 1,007	4,865 ± 0
7		4-metil-2-fenil-2-pentenal	45.035	0	0	0	0	0	0,248 ± 0,104	0,804 ± 0,611	0	0,358 ± 0,106	0	0,089 ± 0,019	0,329 ± 0,295	0,487 ± 0,205	0	0	0,307 ± 0,377	1,238 ± 0,238	0
8	Aldehído	2-fenil-2-butenal	41.727	0,21 ± 0	0	0	0	0	0	0,279 ± 0,121	0	0,279 ± 0,136	0,037 ± 0,01	0,098 ± 0,024	0,202 ± 0,071	0	0	0	0	0,862 ± 0,274	0,21 ± 0
9		Benzaldehído	33.116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10		3-metilbutanal	7.224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,529 ± 0,756	0	0,068 ± 0,018	0	0	0	0	0
11	Éster	Dodecanoato de etilo	48.95	2,1 ± 0	0	0	0	0	0,396 ± 0,043	1,398 ± 1,081	3,695 ± 1,843	0,659 ± 0,321	0	0	0,331 ± 0,304	0,862 ± 0,761	0	0	0,493 ± 0,038	2,411 ± 0,206	2,1 ± 0

Nº	Familia	Compuesto	RT	Blanco	1a	4	12	13a	17	19	29a	33	85	97	110mrs	133	195	200	218	233	244
12		3-fenil-2-propenoato de etilo	47.109	0,557 ± 0	0	0	0	0	0,05 ± 0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	4,559 ± 2,248	0,084 ± 0,01	0	0,557 ± 0
13		Benzoato de 2-metilpropilo	45.21	2,576 ± 0	0,111 ± 0,004	0	0	0	0	2,337 ± 0,694	5,611 ± 0,252	1,135 ± 0,193	0,067 ± 0,022	0	0	0	0	0	0	0	2,576 ± 0
14		3-fenil-2-propenoato de 3-propenilo	45.193	2,038 ± 0	0	0	0	0	0	0	3,188 ± 1,523	0,009 ± 0,007	0	0	0,737 ± 0,428	0,903 ± 0,546	0	4,523 ± 4,34	0	1,558 ± 0,282	2,038 ± 0
15		3-fenil propionato de etilo	43.255	0	0	0,144 ± 0,027	0,148 ± 0,023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,136 ± 0	7,657 ± 7,029	0	0	0
16		Decanoato de etilo	41.849	0	0	0,084 ± 0,021	0,102 ± 0,01	0	0,298 ± 0,09	0	0	0,708 ± 0,061	0,058 ± 0,021	0	0,476 ± 0,025	0	0,057 ± 0	3,561 ± 2,833	0,191 ± 0,113	0	0
17		Acetato de 2-feniletilo	41.71	1,117 ± 0	0	0	0	0	0,18 ± 0,014	0,453 ± 0,345	1,615 ± 0,454	0	0	0	0,031 ± 0,028	0,235 ± 0,201	0	0	0,171 ± 0,03	0	1,117 ± 0
18		Octanoato de etilo	40.97	0	0,702 ± 0,111	0	0	0	0	0	0	0	0	23,443 ± 2,903	0	1,632 ± 0,426	0,036 ± 0	0	0	0	0
19		2-fenilacetato de metilo	39.478	1,07 ± 0	0	0,119 ± 0,06	0	0	0,574 ± 0,14	0	2,295 ± 0,542	0,963 ± 0,143	0,006 ± 0,004	0	0,931 ± 0,195	0	0,041 ± 0	5,534 ± 0,403	0,549 ± 0,078	1,475 ± 0,926	1,07 ± 0
20		Acetato de bencilo	39.323	0	0	0	0,391 ± 0,102	0	0,635 ± 0,19	0	1,316 ± 0,481	0	0	0	0	0	0	0	0,634 ± 0,052	1,525 ± 0,578	0
21		Acetato de etilo	7.867	1,211 ± 0	0	0	0	0,247 ± 0,162	0	0	1,758 ± 0,369	0	0	0	0	0,23 ± 0,183	0,059 ± 0	0	0,238 ± 0,035	0	1,211 ± 0
22		Acetato de 3-metilbutilo	22.95	0	0,785 ± 0,046	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23		Acetato de 2-metilpropilo	38.017	0	0	0	0	0	0	0	5,844 ± 1,076	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Cetona	1-feniletanona	37.851	0,204 ± 0	0	0,013 ± 0,004	0	0	0,018 ± 0,003	0	0	0	0,015 ± 0,004	0	0	0	0,035 ± 0	0,689 ± 0,04	0,059 ± 0,012	0,249 ± 0,02	0,204 ± 0
25		2,3-butanodiona	7.473	0	0	0,006 ± 0,002	0,012 ± 0,005	0	0	0	0	0	0	0	0,038 ± 0,01	0	0	0	0	0,066 ± 0,023	0

Nº	Familia	Compuesto	RT	Blanco	1a	4	12	13a	17	19	29a	33	85	97	110mrs	133	195	200	218	233	244	
26		2,3,5,6-tetrametilpirazina	38.52	0,034 ± 0	0	0	0	0	0	0,03 ± 0,005	0,096 ± 0,025	0,024 ± 0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,034 ± 0
	<b>Pirazina</b>																					
27		2,3,5-trimetilpirazina	35.72	0,07 ± 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,054 ± 0,012	0,07 ± 0

**Nota.** Concentración reportada en mg/kg. Los números identifican las levaduras con las que se trabajó.

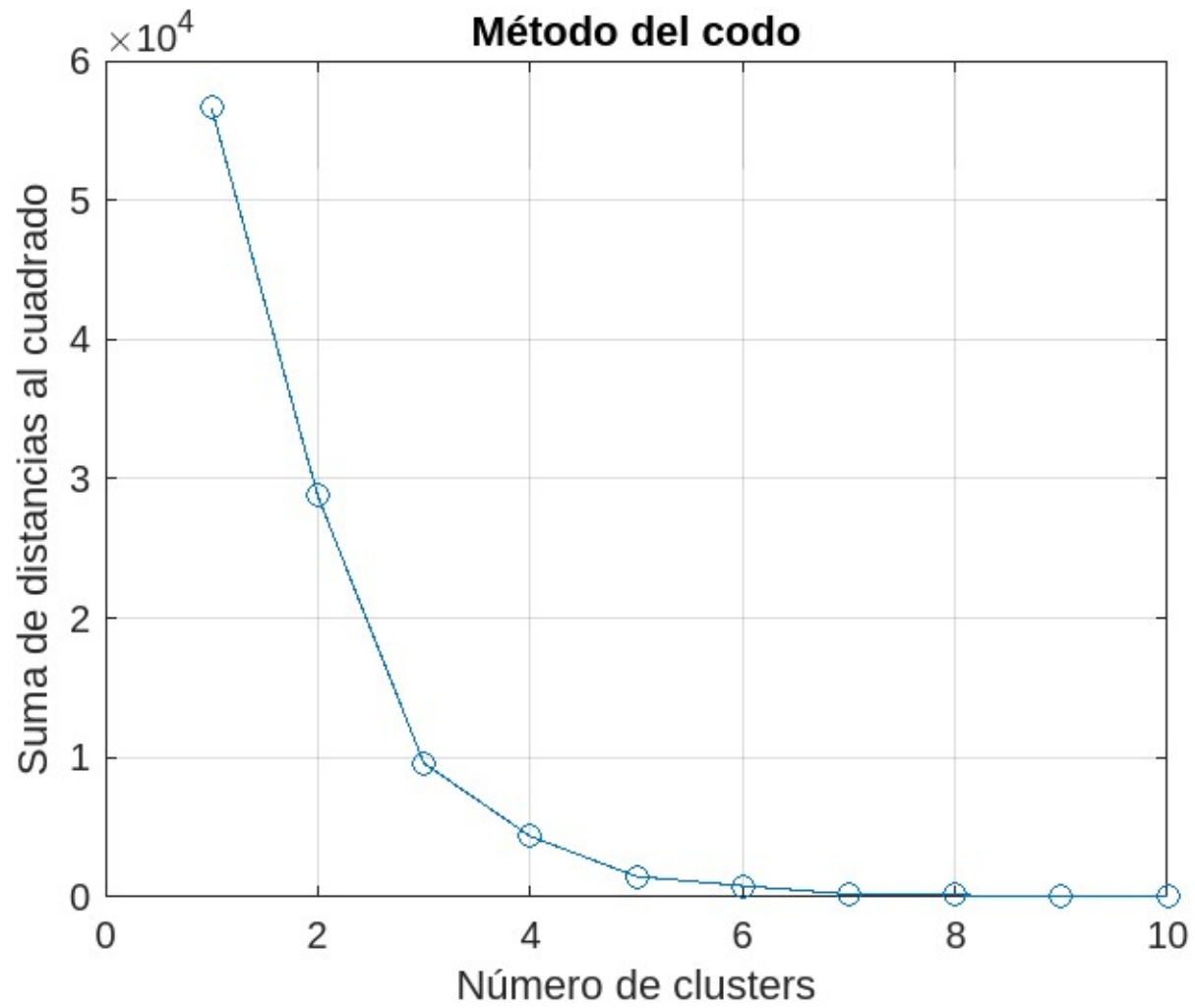
## Apéndice B.

Tabla OTV por compuesto y screening OAV.

Nº	Familia	Compuesto	OTV	1a	4	12	13a	17	19	29a	33	85	97	110mrs	133	195	200	218	233	244	
1	Ácido	Ácido decanoico	1,120	0,168	0,000	10,716	0,000	0,000	0,034	0,462	1,049	0,306	0,021	0,014	0,239	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	
2		Ácido 2-metil propanoico	2,371	0,284	0,008	0,000	0,032	0,000	0,210	0,653	0,000	0,730	0,000	0,054	0,188	0,000	0,028	0,000	0,394	0,857	
3	Alcohol	Alfa-terpineol	0,33	0,000	0,000	0,161	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,141	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
4		2-pentanol	3,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,129	0,458	0,000	0,400	0,000	0,060	0,000	0,117	0,000	0,000	0,000	0,000	
5		Etanol	30,000	0,953	0,046	0,000	0,216	0,104	0,390	1,512	1,865	0,743	0,247	0,211	0,922	0,429	0,143	1,681	0,313	1,991	
6		3-metil-2-butanol	3	1,622	0,070	2,751	0,197	0,000	0,000	0,000	1,633	0,000	0,000	0,016	1,265	0,000	0,174	2,825	0,000	2,762	
7	Aldehido	4-metil-2-fenil-2-pentenal		# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	
8		2-fenil-2-butenal	1,700	0,123	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,164	0,000	0,164	0,022	0,058	0,119	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,507
9		Benzaldehido	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10		3-metilbutanal	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	348,379	0,000	5,267	0,000	0,000	0,000	0,000
11		Dodecanoato de etilo	1,500	1,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,264	0,932	2,463	0,439	0,000	0,000	0,220	0,574	0,000	0,000	0,329	1,608	
12		3-fenil-2-propenoato de etilo	0,002	348,331	0,000	0,000	0,000	0,000	31,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2849,631	52,581	0,000
13		Benzoato de 2-metil propilo		# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!
14	Éster	3-fenil-2-propenoato de 3-propenilo		# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	# <sub>i</sub> DIV/0!	
15		3-fenil propionato de etilo	0,005	0,000	0,000	0,000	30,882	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	28,249	1595,749	0,000	0,000	
16		Decanoato de etilo	0,20	0,000	0,000	0,721	0,508	0,000	1,490	0,000	0,000	3,538	0,290	0,000	2,378	0,000	0,283	17,804	0,957	0,000	
17		Acetato de 2-feniletilo	0,233	4,794	0,000	0,359	0,000	0,000	0,773	1,945	6,933	0,000	0,000	0,000	0,134	1,007	0,000	0,000	0,733	0,000	

18	Octanoato de etilo	0,58	0,000	1,210	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	40,420	0,000	2,813	0,062	0,000	0,000	0,000
19	2-fenilacetato de metilo		#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!
20	Acetato de bencilo	124,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,000	0,005	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,012
21	Acetato de etilo	0,940	1,289	0,000	0,000	0,000	0,263	0,000	0,000	1,870	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,245	0,063	0,000	0,253	0,000
22	Acetato de 3-metilbutilo	0,16	0,000	4,907	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	Acetato de 2-metilpropilo	1854,642	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	1-feniletanona	5,629	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,006	0,122	0,010	0,044	
25	Cetona 2,3-butanodiona	0,005	0,000	0,000	2,886	2,771	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	8,384	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	14,618
26	Pirazina 2,3,5,6-tetrametilpirazina	38,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	2,3,5-trimetilpirazina	0,290	0,240	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,186

**Nota.** En la tabla se muestran #DIV/0! Para los compuestos que no se determinó su OTV.

**Apéndice C.***Prueba del codo.*

**Apéndice D.**

*Prueba de normalidad Shapiro-Wilk.*

	C2	C2	C5	C5	C6	C6	C7	C7	C10	C10
	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado
Test for normal distribution										
Shapiro-Wilk test										
W	0,5672	0,7693	0,9196	0,8638	0,9981	0,89	0,901	0,8004	0,8361	0,6324
P value	<0,0001	0,0015	0,4511	0,0644	0,9178	0,1694	0,4361	0,1156	0,0249	0,0014
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
P value summary	****	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**
	C11	C11	C12	C12	C13	C13	C15	C15	C16	C16
	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado	Sabouraud	Lixiviado
Test for normal distribution										
Shapiro-Wilk test										
W	0,8129	0,6523	0,6346	0,8143	0,8096	0,6831	0,7837	0,8737	0,6543	N too small
P value	0,0132	0,0006	0,0001	0,0566	0,0716	0,0073	0,0044	0,2414	0,0003	
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No	
P value summary	*	***	***	ns	ns	**	**	ns	***	

**Apéndice E.**

*Prueba U de Mann-Whitney.*

variable	Mann-Whitney U Test (w/ continuity correction) (Concentraciones)									
	Rank Sum Sabouraud	Rank Sum Lixiviado	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N Sabouraud	Valid N Lixiviado	2*1sided exact p
C2	311,0000	154,0000	34,00000	3,235289	0,001215	3,235289	0,001215	15	15	0,000696
C5	9,0000	6,0000	3,00000	-0,288675	0,772830	-0,288675	0,772830	3	2	1,000000
C6	24,0000	54,0000	9,00000	0,739600	0,459543	0,739600	0,459543	3	9	0,481818
C7	22,0000	14,0000	4,00000	1,010363	0,312322	1,010363	0,312322	4	4	0,342857
C10	119,0000	17,0000	7,00000	2,000919	0,045402	2,000919	0,045402	12	4	0,041758
C11	154,0000	56,0000	20,00000	2,121671	0,033866	2,121671	0,033866	12	8	0,031420
C12	173,0000	37,0000	9,00000	2,852744	0,004335	2,852744	0,004335	13	7	0,002425
C13	37,0000	18,0000	8,00000	0,746203	0,455546	0,746203	0,455546	6	4	0,476190
C15	150,0000	21,0000	6,00000	2,562893	0,010381	2,562893	0,010381	13	5	0,006769
C16			0,00000	0,000000	1,000000	0,000000	1,000000	12	1	0,000000