

Innovación tecnológica en cacao andino

Producto 5. Informe con banco de aislamientos de microorganismos asociados a procesos fermentativos de cacao

Carlos Patiño Torres Ph D
Katty Ogata Gutiérrez MsC

2021



Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Carlos Patiño Torres PhD y Katty Ogata Gutiérrez. Con la colaboración de Laura Sabrina Ortiz Galeano

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract	2
Resumen	3
Introducción	4
Objetivos	7
Metodología	8
Resultados y discusión	11
Estudio de caso: Perú.....	11
Cuantificación de poblaciones microbianas	11
Purificación y caracterización de microorganismos fermentativos	14
Estudio de caso: Colombia	27
Aislamiento y conteo de microorganismos.....	27
Purificación y caracterización de microorganismos fermentativos	31
Conclusiones	33
Referencias Bibliográficas	34
Instituciones participantes	41

Abstract

Cacao is one of the products with the highest demand in the world, either for direct consumption or as a raw material for derived products, one of the most important being chocolate. The organoleptic quality of cocoa depends on many factors, in which fermentation is perhaps the most important aspect, together with the drying treatment.

A multitude of microorganisms intervene in fermentation, in a characteristic sequence and dynamics. Normally, fermentation takes between 5 and 7 days, depending on the place r. During this time, the populations of microorganisms change, according to the biochemistry of the fermentation matrix. While yeasts are the dominant organisms in the early stages, sporulating organisms prevail in the latter stages, capable of resisting the changes in pH, temperature and oxygen availability occurring in the process. Lactic acid and acetic acid bacteria are normally more abundant in the intermediate stages of fermentation.

Knowledge of the ecology of fermentation, including aspects related to the biodiversity of fermentative microorganisms, is a basic aspect that should be studied with a view to design high-quality starter cultures that comply with health safety standards, or with in order to associate particular organoleptic characteristics with specific microbial consortia or microorganisms. This was the objective of the present component of the project. The fermentations took place in localities and research facilities in Colombia and Peru.

In the case of Peru, a total of 13 yeast strains were isolated, which according to their morphological characterization, would be presumptively related to the genera *Candida* and *Saccharomyces*. Regarding lactic acid bacteria, 14 isolates were obtained, using the sequence of the 16S rRNA gene, were found to be related to the *Lactobacillus* and *Pediococcus* genera (> 99% similarity). Among the sporogenic bacteria, 26 isolates were obtained, which were identified belonging to various species of the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Rummeliibacillus*.

In Colombia, the diversity found was more restricted. Of 80 isolates obtained in total, *Leuconostoc pseudomesentedorum* and *Lactobacillus rhamnosus* were identified as lactic acid bacteria that frequently occurred in fermentation processes. Among the acetic acid bacteria, the most frequent was *Acetobacter fabarum*. Among the sporogenic bacteria, *Bacillus species*, *B. licheniformis* and *B. zhangzhouensis*, were represented in the samples. In the case of yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces nepalensis* were identified, which have already been reported as a microbiota associated with fermentation in cocoa.

Keywords:

Fermentation, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, cocoa, postharvest, yeasts, Bacillus.

Resumen

El cacao es uno de los productos con mayor demanda mundial, bien para consumo directo o como materia prima de los productos derivados, siendo uno de los más importantes, el chocolate. La calidad organoléptica del cacao depende de muchos factores, en los que la fermentación es tal vez el aspecto más importante, junto con el tratamiento de secado.

En la fermentación intervienen multitud de microorganismos, en una secuencia y dinámica características. Normalmente, la fermentación lleva entre 5 y 7 días, dependiendo del lugar y de las costumbres del productor. Durante este tiempo, las poblaciones de microorganismos cambian, de acuerdo con la bioquímica de la matriz de fermentación. Mientras en las primeras etapas las levaduras son los organismos dominantes, en las últimas prevalecen los organismos esporulantes, capaces de resistir los cambios de pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno que van ocurriendo en el proceso. Las bacterias ácido-lácticas y ácido acéticas normalmente son más abundantes en las etapas intermedias de la fermentación.

El conocimiento de la ecología de la fermentación, incluyendo los aspectos relativos a la biodiversidad de los microorganismos fermentativos, es un aspecto básico que debe estudiarse con miras al diseño de cultivos iniciadores de alta calidad, que cumplan con estándares de seguridad en salud, o con el fin de asociar características organolépticas particulares a consorcios microbianos o microorganismos específicos. Este fue el objetivo del presente componente del proyecto. Las fermentaciones se desarrollaron en localidades e instalaciones de investigación de Colombia y Perú.

En el caso de Perú, se aislaron un total de 13 cepas de levaduras, las cuales, de acuerdo con su caracterización morfológica se encontrarían presuntivamente relacionadas a los géneros *Candida* y *Saccharomyces*. En cuanto a las bacterias del ácido láctico, se obtuvieron 14 aislamientos, los cuales de acuerdo con la secuencia del gen del ARNr 16S, se encontraron relacionados a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (similitud >99%). Entre las bacterias esporogénicas, se obtuvieron 26 aislamientos, los cuales fueron identificadas pertenecientes a diversas especies de los géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus*.

En Colombia, la diversidad encontrada fue más restringida. De 80 aislamientos obtenidos en total, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Lacticaseibacillus rhamnosus* se identificaron como las bacterias ácido-lácticas que se presentaron de forma frecuente en los procesos fermentativos. Dentro de las bacterias ácido acéticas, la más frecuente fue *Acetobacter fabarum*. Entre las bacterias esporogénicas, las especies de *Bacillus*, *B. licheniformis* y *B. zhangzhouensis*, estuvieron representadas en las muestras.

En el caso de las levaduras, se lograron identificar *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces nepalensis*, las cuales ya han sido reportadas como microbiota asociada a la fermentación en cacao.

Palabras Clave:

Fermentación, bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas, cacao, poscosecha, levaduras, *Bacillus*.

Introducción

El grano de cacao es la materia prima principal para la elaboración del chocolate. Se encuentran contenidos en bayas provenientes del árbol *Theobroma cacao*, cubiertas de una capa blanquecina mucilaginosa rica en azúcares. El grano de cacao se caracteriza por presentar un sabor astringente y amargo, debido a ello, estos deben pasar por diferentes procesos post cosecha que modifican los componentes presentes en el grano, obteniéndose así las características sensoriales propias del chocolate.

El genotipo de la planta influye mucho en el sabor y aroma del grano de cacao, sin embargo, estas características sensoriales pueden variar en función a la presencia de precursores de sabor obtenidos en procesos post cosecha tales como la fermentación microbiana, seguida de un tratamiento de secado y tostado (Lopes y Dimick, 1995).

La fermentación es una etapa clave para la obtención de diversos precursores del sabor y aroma característicos del chocolate. Durante la fermentación suceden diferentes procesos bioquímicos que permiten la modificación del grano de cacao mediándose la difusión de diversos metabolitos tales como teobromina, cafeína y polifenoles en los granos (Schwan y Wheals, 2004). La fermentación es llevada a cabo gracias a la participación de diferentes microorganismos, los cuales aprovechan los carbohidratos presentes en la pulpa entorno al grano de cacao. Los cambios que se dan durante esta fase son importantes ya que generan un impacto en el sabor y aroma del chocolate (Wacher, 2011).

Se ha descrito la presencia de diferentes géneros microbianos implicados en el proceso de fermentación, tales como las levaduras, las bacterias ácido lácticas y acéticas y también, bacterias esporogénicas (Schwan y Wheals, 2004).

La sucesión microbiana es importante para la correcta transformación de los compuestos presentes para la adquisición de precursores aromáticos y de sabor. Debido a ello, es de interés la detección e identificación de aquellas poblaciones microbianas que se encuentran presentes durante el proceso fermentativo del cacao.

El proceso de fermentación

La fermentación del grano de cacao es un procesamiento post-cosecha que condiciona especialmente la calidad del grano de cacao, y por tanto del producto final. Este proceso implica específicamente la descomposición de la pulpa mucilaginosa que rodea los granos y causa la muerte de los cotiledones. Esto contribuye a la disminución de la amargura y astringencia del grano de cacao, así como también en la obtención de los precursores aromáticos necesarios y de las características físicas, pasando del color gris hasta el marrón característico.

La fermentación del cacao es un proceso espontáneo que dura alrededor de 6 días. Tras la apertura de las vainas de la pulpa mucilaginosa ricas en azúcar que rodea el grano de cacao puede contaminarse con una variedad de microorganismos procedentes del ambiente o por manipulación de los trabajadores, o por medio de los contenedores utilizados para el transporte, los cuchillos, las superficies de la vaina, entre otros (Schwan y Wheals, 2004).

Los procesos bioquímicos que se llevan a cabo son gracias a la acción metabólica de diferentes microorganismos implicados. En general, se ha reportado que la sucesión de diferentes grupos microbianos en el proceso de fermentación y la de su actividad metabólica en la transformación del mucilago de la pulpa que rodea los granos tiene una influencia decisiva en el proceso de maduración del interior del grano y en el desarrollo del color y sabor del producto final (Nielsen *et al.*, 2008).

En una primera etapa de fermentación se da el consumo y transformación los azúcares presentes en la pulpa alrededor del grano. En esta primera etapa el pH es ácido (entre 3.3 y 4) debido a la presencia del ácido cítrico. El alto contenido de azúcares, el pH ácido en el ambiente y el bajo contenido de oxígeno (condiciones anaeróbicas) favorece al crecimiento de poblaciones de Levaduras. Esta se incrementa y presente alta actividad en las primeras 24 h. Las levaduras mediante la fermentación alcohólica transforman azúcares como la glucosa, fructosa y sacarosa en etanol y CO₂, así también metabolizan el ácido cítrico presente. El resultado de todo este proceso es el aumento de la temperatura y del pH dentro del sistema. Se ha reportado numerosas cepas de levaduras implicadas en el proceso de fermentación. Nielsen *et al.* (2008) reportaron la presencia de especies tales como *Saccharomycopsis crateagensis*, *Hanseniaspora guilliermondii* y *Pichia membranifaciens*. Por otro lado, Salazar *et al.* (2017) reportó la presencia de los géneros *Saccharomyces*, *Kloeckera* y *Candida* mediante técnicas bioquímicas, mientras que Papalexandratou *et al.* (2013) reportó a *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *P. membranifaciens* y *Saccharomyces cerevice*.

Posteriormente, en condiciones anaerobias o micro anaerobias y el aumento de la temperatura se favorece el crecimiento y actividad de las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas favorecen el proceso de fermentación de la pulpa transformando los ácidos orgánicos presentes, como el ácido cítrico de la pulpa, en ácido láctico o ácido acético. (De Vuyst y Weckx, 2015). Se ha reportado la presencia de cepas del género *Lactobacillus brevis* y *L. plantarum*, así como del género *Leuconostoc* en el proceso de fermentación de cacao Chuncho (Salazar *et al.*, 2017). *Lactobacillus* son bacterias gran positivas bacilares, mientras que *Leuconostoc* son cocobacilos, ambos géneros son anaerobias facultativas. Así también, De Bruyne *et al.* (2010) reportó la presencia de cepas de *Weissellafabaria*, en la fermentación de cacao en Ghana. Las bacterias ácido-acéticas, bacterias gram negativas, bacilares/elipsoidales y aerobias estrictas, se encargan de metabolizar el etanol producido por las levaduras convirtiéndolo en ácido acético, el cual sirve como precursor de sabor en el grano de cacao. Géneros como *Gluconobacter* y *Acetobacter* han sido detectados en fermentos de cacao (Nielsen *et al.*, 2007). Tanto el etanol y ácido acético difunden dentro del grano de cacao, lo cual promueve la muerte del embrión (Wacher, 2011).

En la última fase de fermentación, el género *Bacillus* hace su aparición. *Bacillus* es un género conocido por su habilidad de producir enzimas proteasas y lipasas. Así también, se han reportado especies productoras de enzimas pectinolíticas, sugiriendo que dichos microorganismos podrían actuar en conjunto con las levaduras en el consumo de pectina permitiendo una mejor oxidación en el proceso de fermentación (Ouattara *et al.*, 2011). Yao *et al.* (2017) reportaron la presencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad pectinolítica en fermentados de cacao. Por otro lado, catalizan reacciones cuyos productos dan al cacao sabores y olores desagradables debido a la degradación de las proteínas, pero podrían contribuir en el sabor con la producción de ácidos orgánicos y saborizantes, cepas de *Bacillus subtilis* pueden generar también diferentes compuestos durante la fermentación tales como el 2,3 butanodiol y tetrametil pirazina que son responsables de generar sabores extraños en el chocolate (Zaket *et al.*, 1972).

Objetivo

- Aislar, caracterizar morfológica y bioquímicamente, e identificar las poblaciones de microorganismos derivados de los procesos de fermentación de los granos de cacao en las condiciones de Colombia y Perú.

Metodología

En Perú, la recolección de las diferentes muestras se realizó en la Cooperativa Agroindustrial CP-Cacao Tocache Ltda., ubicada en el Nuevo horizonte, Distrito La Pólvara, provincia Tocache, departamento San Martín. El material de fermentación utilizado correspondió a la línea CCN51.

En Colombia, las muestras del material fermentado se obtuvieron en una finca localizada en la Reserva natural La Primavera, ubicada en la vereda La Helena del municipio de Ibagué, en el departamento del Tolima. El material de fermentación utilizado correspondió a la línea ICS60.

Utilizando protocolos que garantizaran la asepsia, se tomaron varias muestras de semillas de cacao CCN51 en fermentación, en bolsas de polietileno con cierre hermético. Las muestras, con aproximadamente 150 g de fermentado, se tomaron a partir de las cajas de fermentación a una profundidad correspondiente a la mitad de su altura. El muestreo se llevó a cabo en tres períodos: a las 24-36, 72 y 144 horas de iniciada la fermentación. Por cada fase se obtuvieron 4 réplicas.



Figura 1. Cuarto de producción con cajones fermentadores de granos de cacao en diferentes tiempos de fermentación. Cooperativa Agroindustrial CP-Cacao Tocache Ltda.

En Colombia, los muestreos se hicieron a las 0, 12, 36, 60, 84 y 108 horas de fermentación.

Las muestras, una vez identificadas y embaladas, se llevaron bajo condiciones de refrigeración hasta los laboratorios correspondientes en las ciudades de Lima e Ibagué, en Perú y Colombia, respectivamente.

Ya en laboratorio, se procedió de la siguiente manera: de cada muestra se tomaron, aproximadamente, 20 g de fermentado, los cuales se depositaron en 180 ml de solución salina 0.85%. La mezcla se agitó por 10 minutos y se dejó reposar. De esta primera dilución se obtuvieron diluciones sucesivas, a partir de las cuales se tomaron las alícuotas correspondientes para la caracterización microbiológica.

En los laboratorios de Colombia, se utilizó para el aislamiento preliminar de los microorganismos medio agar – pulpa de cacao 50:50, propiciando condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, según el tipo de microorganismo a aislar.

En los laboratorios peruanos, se utilizaron medios selectivos, así: para el caso de las bacterias esporogénicas, medio Triptona-Glucosa-Extracto de carne; para las bacterias ácido-lácticas, medio MRS (Man-Rogosa-Sharpe); en el caso de las levaduras se usó el medio OYG suplementado con oxitetraciclina 0.1%; para el recuento de aerobios mesófilos viables se usó agar PC; para el caso de los anaerobios, agar triptona sulfito neomicina. Por último, los coliformes totales y fecales se Caldo lauril sulfato triptona.

Los tubos que manifestaron crecimiento presuntivo en función a la presencia de gas y turbidez en el medio, se confirmaron en caldo verde brillante lactosa bilis incubados a 35°C por 24h, anotándose aquellos tubos positivos por dilución, calculando el NMP para coliformes. Para la numeración de coliformes fecales, la confirmación se realizó en caldo EC incubados a 44.5°C por 24h, anotándose los resultados positivos, calculándose el NMP para coliformes fecales. Las condiciones de incubación se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo y condiciones de incubación para la determinación de las poblaciones microbianas a analizar

Análisis	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
Bacterias esporogénicas (<i>Bacillus</i> sp.)	Agar TGE	28°C por 48 horas
Bacterias ácido lácticas	Agar MRS	35°C por 24 horas
Recuento de Levaduras	Agar OGY*	28°C por 48 horas
Aerobios mesófilos	Agar Plate Count	28°C por 48 horas
Anaerobios	Agar TSN	35°C por 24 horas
Enumeración de coliformes	Caldo Lauril	35°C por 48 horas

*Suplementado con Oxitetraciclina al 0.1%

Para el conteo de UFC se utilizaron solo aquellas placas que contuvieron entre 30 y 300 colonias.

Para proceder a la purificación de los aislamientos se utilizaron los mismos medios de cultivo que en la fase de aislamiento. Los aislamientos por purificar y multiplicar se seleccionaron por criterios morfológicos, abarcando la mayor diversidad aparente.

Los aislamientos seleccionados se caracterizaron morfológicamente, utilizando métodos estándar (Willey et al., 2008) y molecularmente, por amplificación por PCR y secuenciación del gen ARNr 16S, en el caso de las bacterias, y del segmento ITS en el caso de las levaduras.

Previamente, el ADN genómico fue obtenido utilizando el kit Genejet Genomic DNA Purification (Thermo Fisher, UK), en el caso de las muestras peruanas, y el método fenol-cloroformo, en el caso de los laboratorios colombianos. La integridad del ADN genómico se verificó en gel de agarosa y la cuantificación se hizo por espectrofotometría.

Los productos PCR purificados fueron secuenciados por la empresa Macrogen Inc. (Seoul, Corea) de acuerdo con las especificaciones de la compañía. Los resultados de las secuencias fueron examinados y editados con el programa de alineamiento de secuencias BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente, se identificó las cepas más relacionadas y con mayor porcentaje de similitud de la base de datos del GeneBank utilizando la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Tool for nucleotides*) de la base de datos pública del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Una vez purificados, los diversos aislamientos se criopreservaron en glicerol al 30% y -80°C.

Resultados y discusión

Estudio de caso: Perú

Los granos de cacao se caracterizan por estar envueltos por una cubierta mucilaginosa blanca rica en azúcares. Las cajas en tiempo 24-36 horas (T1) se caracterizaron por presentar una alta cantidad de mucílago presente, en contraste al contenido de las cajas de 3 días de fermentación (72 horas, T2). El mucílago es consumido casi en su totalidad a los 5-6 días (144 horas, T3), periodo en el cual el nivel de fermentación del grano de dicho grano de cacao se encuentra entre un 85-100% (Fig. 2).



Figura 2. Cajas de madera conteniendo granos de cacao en diferentes tiempos de fermentación (horas)

Se monitorearon parámetros fisicoquímicos tales como temperatura (°C) y pH en los sistemas de fermentación muestreados (Tabla 1). A medida que se da el proceso de fermentación, la temperatura en los sistemas se incrementa, observándose que al inicio del proceso (T1) fueron alrededor de los 31°C, aumentado a valores alrededor de los 47°C al final del proceso (T3). Así también, se obtuvo que la temperatura ambiental era 29.5°C. Por otro lado, los valores de iniciales de pH eran más ácidos en comparación a los registrados al final del proceso (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros físicos presente en las diferentes fases de fermentación.

FASE	Tiempo de fermentación	pH	T (°C)
T1	24-36 horas	3.61 ± 0.08	31.33 ± 0.21
T2	3 días	4.33 ± 0.03	45.03 ± 1.11
T3	6 días	4.18 ± 0.04	47.18 ± 1.25

\pm SD: desviación estándar en base a cuatro repeticiones.

Cuantificación de poblaciones microbianas

Se realizó la cuantificación de las poblaciones microbianas presentes en los fermentos muestreados en los diferentes tiempos (Fig.3).

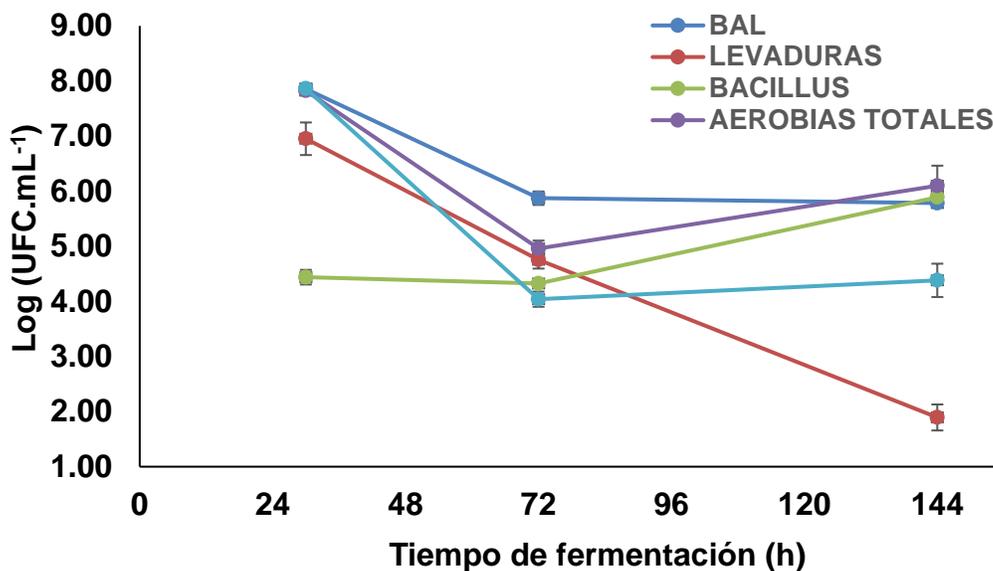


Figura 3. Dinámica poblacional microbiana del proceso de fermentación espontanea de granos de cacao.

De acuerdo con los resultados, el nivel poblacional de levaduras en las muestras T1 se encontraba en 10^7 UFC.mL⁻¹, observándose que dicho valor va disminuyendo a medida que se da la fermentación hasta valores alrededor de los 10^2 UFC.mL⁻¹ casi al final del proceso. La fermentación se inicia con la conversión de los azúcares presentes en la pulpa que cubre el grano de cacao a monómeros tales como glucosa y fructosa, los cuales son transformados a etanol bajo condiciones de anaerobiosis. Dicha transformación se da principalmente por acción de las levaduras en las primeras horas del proceso.

En cuanto a las poblaciones bacterianas estudiadas, exceptuando al grupo de las bacterias esporogénicas, estas se encontraron en alrededor de 10^8 UFC.g⁻¹ en las muestras de la T1. Tanto el nivel población de aerobios como de anaerobios mostraron un declive a medida que se da la fermentación, siendo más marcado en la población de microorganismos anaerobios en el tiempo. La fermentación del cacao se inicia con una fase anaeróbica en la cual se promueve la conversión de los azúcares presente en la pulpa a etanol. A medida que se da esta conversión, los cambios fisicoquímicos que se producen en el sistema, así como la aplicación de aeración mediante mezclas mecánicas esporádicas de los granos dentro de la caja de fermentación, generan las condiciones de un sistema aerobio, promoviendo la sucesión bacteriana, proceso necesario para que la conversión de los diferentes compuestos presentes en la pulpa continúe.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) presentaron sus mayores valores poblacionales en las primeras horas del proceso de fermentación (10^7 UFC.mL⁻¹). Se ha reportado que el pico poblacional de las BAL se da durante la T1, esto es debido a que el entorno cambia a un sistema de microaerobiosis por efectos del consumo de azúcares y aumento del pH y

temperatura producto del metabolismo de las levaduras, promoviendo así el crecimiento de las BAL. Sin embargo, ciertas especies de BAL pueden estar presentes junto con las levaduras desde etapas muy tempranas de la fermentación, principalmente aquellas del género *Lactobacillus* (Schwan & Wheals, 2004). Posteriormente, se observó un descenso en las siguientes 48 h, hasta valores alrededor de 10^6 UFC.mL⁻¹, manteniéndose dicho nivel hasta los 5 días. Esta La disminución del nivel poblacional está atribuido principalmente a los cambios que se dan en el sistema debido a la alta presencia de etanol y el incremento de la temperatura (De Vuyst & Weckx, 2016), así como al aumento de la presencia de oxígeno en el sistema (Passos *et al.*, 1984).

Por otro lado, el nivel poblacional de las bacterias esporogénicas fue detectado en las tres fases de fermentación evaluados. En el presente estudio se observó que el mayor pico poblacional se dio en la última fase de fermentación, con un nivel poblacional de 10^6 UFC.mL⁻¹, así también durante este periodo la temperatura del sistema fue la más elevada (alrededor de las 47 °C) en contraste a la inicial (31°C). Las bacterias del género *Bacillus* pueden estar presentes en todas las fases de la fermentación, sin embargo su crecimiento se manifiesta a partir de las 72h (Sarbu & Csutak, 2019). Factores como el aumento de temperatura y pH hacen que las bacterias de este género se reproduzcan tardíamente. Estos cambios en las condiciones fisicoquímicas del sistema de fermentación pudieron haber favorecido la proliferación de este género bacteriano.

Finalmente, se realizó el recuento de coliformes totales y fecales. De acuerdo a los resultados, no se detectó la presencia de coliformes en los diferentes fermentos analizados (< 3 NMP.mL⁻¹). Estos resultados fueron similares a los reportados por Ostovar & Keeney (1973) en los que indica que dicho grupo microbiano se encuentra presente en utensilios de trabajo, así también existe una cierta carga originaria de la manipulación de los mismos trabajadores, sin embargo su presencia no es detectada en pods de fermentación. Así también, Da Silva do Nascimento *et al.* (2010) reportó que la ausencia de coliformes y *E. coli* en granos de cacao previa a la fermentación, mientras que existe una ligera carga microbiana (alrededor de 1.5log UFC.mL⁻¹ de *E. coli* y 1.7 log UFC.mL⁻¹ de coliformes) en granos de cacao en fermentación, sin embargo dicho recuento observado lo atribuyen a una contaminación de las semillas durante la manipulación de los sistemas de fermentación más no al producto de una multiplicación de alguna carga inicial propio del cacao. El no haberse detectado cantidades significantes de coliformes en las diferentes fases analizadas podría indicar una reducida carga existente propia de las técnicas artesanales de manufactura existente en la planta. Por otro lado, el pH de los diferentes fermentos evaluados estuvo entre los 3.5 y 4. Las condiciones exigentes del sistema de fermentación tales como pH ácidos al inicio del proceso y aumento de la temperatura producto del metabolismo microbiano a medida que pasa el proceso fermentación pudieron restringir la proliferación de estos microorganismos patógenos dentro de los sistemas de fermentación. Así también, la presencia en el sistema de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno o bacteriocinas producto de la actividad de las BAL pudieron generar una inhibición del crecimiento de microorganismos asociados al proceso de putrefacción del cacao tales como *E. coli* (Saltini *et al.*, 2013).

Purificación y caracterización de microorganismos fermentativos

Se realizó la caracterización de microorganismos pertenecientes a grupo de las levaduras, bacteria ácido lácticas y bacterias esporogénicas, los cuales se reportan implicados en el proceso de fermentación de granos de cacao.

Los diferentes aislamientos fueron obtenidos de los ensayos de recuento para cada grupo microbiano.

Levaduras

Se aislaron un total de 13 cepas de levaduras de las muestras de fermentos T1, T2 y T3, de las cuales el 46 % fueron obtenidos de los fermentos de la T1, 30.8 % de la T2 y 23.2 % de la T3. Todas las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente (Tabla 2), detectándose una mayor diversidad morfológica en la T1. Según varios autores, la población de levaduras es alta en las primeras horas de fermentación. Diferentes géneros como *Candida*, *Saccharomyces* y *Pichia* (Nielsen *et al.* 2008), así también de *Kloeckera* (Salazar *et al.*, 2017) han sido reportados participes en diferentes estudios. La diversidad de especies es amplia, siendo difícil de determinar si la diferencias en la diversidad de estos microorganismos presentes en diferentes estudios es debido a la localización geográfica o las prácticas de fermentación empleadas en el proceso (Schwan & Wheals, 2004).

Por otro lado, se observó que la forma predominante en todas las fases analizadas fue de aquellas cepas cuya forma celular se caracterizó por ser del tipo ovoide. Géneros de levaduras como *Saccharomyces* y *Candida* se caracterizan por presentar una morfología celular del tipo ovoide. Especies de ambos géneros han sido reportados en diferentes estudios como principales participes del proceso de fermentación en etapas tempranas. *S. cerevisiae* es una de las especies dominantes durante la fase de fermentación alcohólica, capaz de sobrevivir durante todo el proceso de fermentación (Ardhana & Fleet, 2003), esto probablemente a su rápido crecimiento y tolerancia al etanol en comparación a otras especies de como *Kloeckera* o *Kluyveromyces*. Por otro lado, *Candida spp.* también es capaz de crecer en las primeras 24 horas y es una de los géneros predominantes en el proceso de fermentación, especies como *C. rugosa* puede soportar temperaturas alrededor de los 50°C, condición característica de la última fase de fermentación (Schwan & Wheals, 2004). De acuerdo con lo anterior, existen indicios que las cepas detectadas estén relacionados a dichos géneros microbianos *Candida* y *Saccharomyces*, en función a su característica morfológica y presencia en las diferentes fases analizadas.

Tabla 2. Caracterización fenotípica de las cepas de levaduras aisladas de fermentos de cacao.

CEPAS	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA						CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA	
	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR	TEXTURA	TAMAÑO (mm)	FORMA CELULAR	TIPO DE GEMACIÓN
LEV.T1.1	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Cremosa	2	Elipsoide	bipolar
LEV.T1.2	Ovada	Dentada	Convexa	Blanco hueso	Seca	1.5	Ovoide	polar
LEV.T1.5	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Cremosa	1.2	Alargado	polar
LEV.T1.12	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Cremosa	1.2	Ovoide	polar
LEV.T1.14	Ovada	Dentada	Plana	Blanca	Seca	2	Elipsoide	polar
LEV.T1.26	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Seca	1.3	Ovoide	polar
LEV.T2.3	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Seca	1.5	Ovoide	
LEV.T2.5	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Seca	1.8	Ovoide	polar
LEV.T2.6	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Seca	1.8	Ovoide	polar
LEV.T2.10	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Seca	1.5	Ovoide	polar
LEV.T3.1	Puntiforme	ND	ND	Blanco transparente	Seca	< 0.5	Elipsoide pequeño	polar
LEV.T3.2	Puntiforme	ND	ND	Blanco transparente	Seca	< 0.5	Elipsoide	
LEV.T3.3	Circular	Completa	Convexa	Blanco hueso	Seca	2	Ovoide	polar

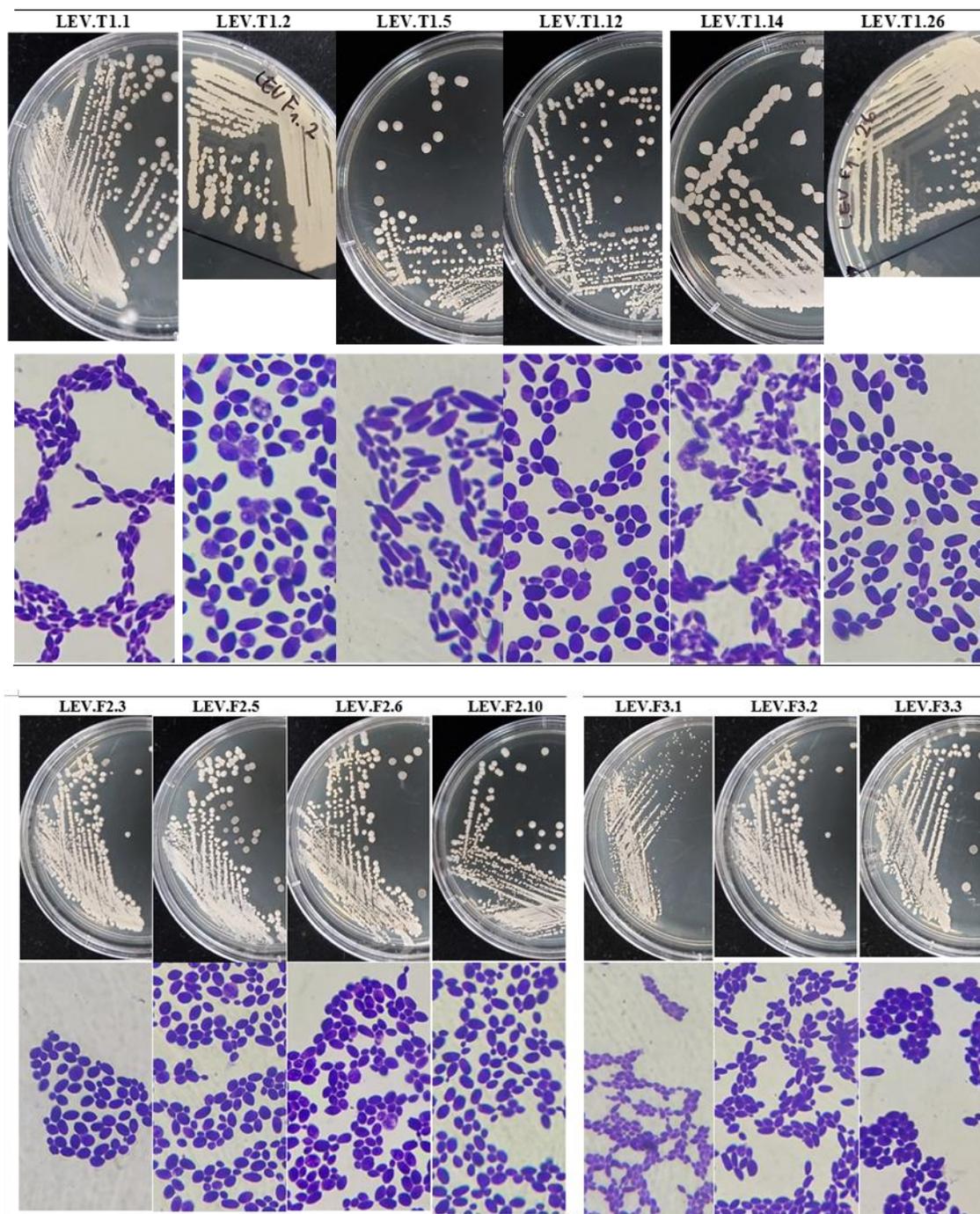


Figura 4. Morfotipos de cepas de levaduras aisladas de los diferentes fermentos de granos de cacao de la zona de Tocache.

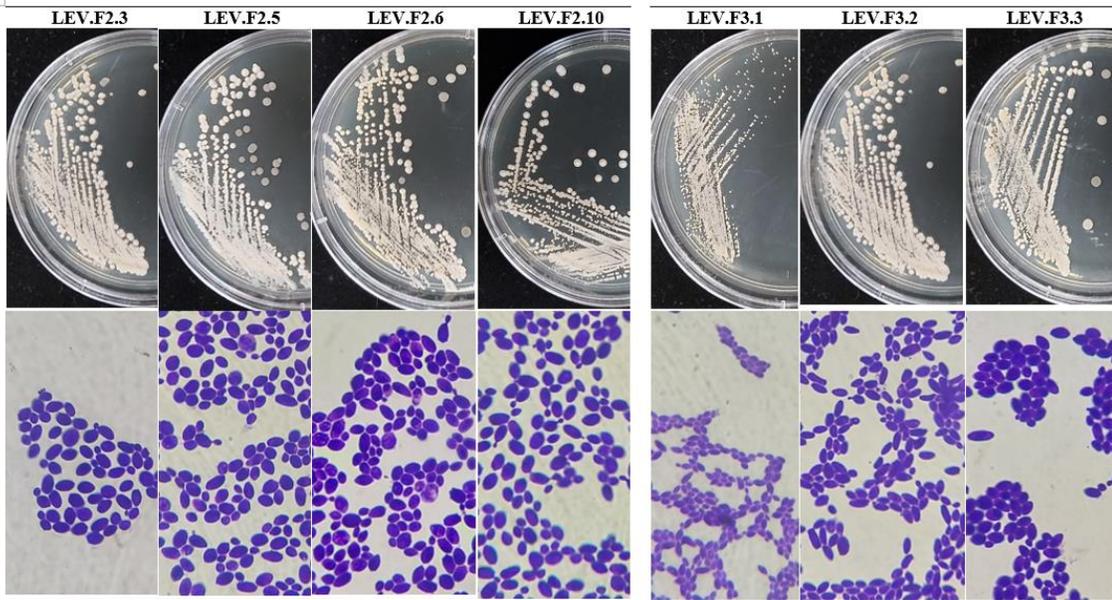


Figura 4. Continuación.

Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Se aisló un total de 14 cepas bacterianas concerniente al grupo de las BAL en medio MRS (gram positivas y catalasa negativa), de los cuales el 57 % del total fueron obtenidos de la T1, 28.7 % de la T2 y 14.3 % de la T3. El morfotipo predominante en las muestras T1 se caracterizaban por presentar colonias blancas, circulares y cuya forma celular era del tipo cocabacilar, mientras que la forma predominante en la T2 fue de aquellas con colonias circulares, blancas y pequeñas, y forma celular del tipo bacilar (tabla 3, Fig. 5).

Las BAL, al igual que las levaduras, son responsables de la degradación de la pulpa entorno al grano de cacao. Las especies de BAL que más comúnmente han sido reportados en diferentes estudios pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella* (Sarbu y Csutak, 2019).

Durante las primeras horas, las condiciones del sistema promueven el crecimiento de especies microaerófilas, etanol-tolerantes, ácido tolerante y fructofílicos (De Vuyst & Weckx, 2016). Las BAL heterofermentativas dominan la fermentación al transformar la glucosa y fructosa a ácido láctico, ácido acético, etanol, manitol y CO₂. Mientras que las especies homofermentativas producen ácido láctico como producto principal (Schwan, 1998).

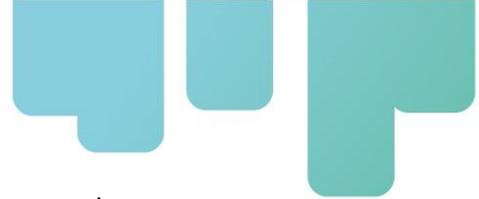


Tabla 3. Caracterización fenotípica de las cepas BAL aisladas de fermentos de cacao.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS				
	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR	TEXTURA
LAC.F1.3	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso
LAC.F1.6	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso
LAC.F1.7	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso
LAC.F1.15	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso
LAC.F1.22	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso
LAC.F1.24	Puntiforme	ND	ND	Blanco claro	Seco
LAC.F1.27	Puntiforme	ND	ND	Blanco claro	Seco
LAC.F1.32	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso
LAC.F2.1	Circular	Entera	Convexa	Blanco humo	Cre moso
LAC.F2*.3	Puntiforme	Entera	Convexa	Blanco humo	Seca
LAC.F2*.4	Puntiforme	Entera	Convexa	Blanco humo	Cre moso
LAC.F2*.12	Circular	Entera	Convexa	Blanco humo	Cre moso
LAC.F3.2	Puntiforme	ND	ND	Beige	Cre moso
LAC.F3.5	Circular	entera	Convexa	Blanco	Cre moso

El análisis filogenético en base a la secuencia del gen del ARNr16S permitió la identificación de los géneros *Lactobacillus* (93 % del total) y *Pediococcus* en las muestras de fermentos de cacao con valores de similitud >99% (tabla 4). Se pudo detectar diversidad de especies de *Lactobacillus* presente en el proceso de fermentación del cacao.

Dentro del grupo de las *Lactobacillus*, *L. plantarum* y *L. brevis* fueron identificadas presentes en la T1, siendo *L. plantarum* la especie predominante, observándose posteriormente una sucesión de su dominancia por *L. fermentum*, la cual fue predominante en la T2.

La diversidad de especies de las BAL en la fermentación es limitada. Tanto *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. fermentum* son especies que han sido identificados como principales participantes en la fermentación en diferentes estudios (Meersman *et al.*, 2013; De Bruyne *et al.*, 2010; Kostinek *et al.*, 2008). El éxito y dominancia de *L. plantarum* y *L. fermentum* se puede deber a la gran capacidad metabólica que poseen. De acuerdo con lo reportado, *L. plantarum* participan principalmente al inicio del proceso de fermentación convirtiendo la glucosa e incluso al ácido cítrico en ácido láctico, ácido acético y etanol. Posteriormente es seguida por la especie heterofermentativa *L. fermentum*, la cual persiste en fases más tardías del proceso (Ardhana y Fleet, 2003). Al igual que *L. plantarum*, *L. fermentum* es capaz de metabolizar el ácido cítrico presente en los fermentos de cacao, dicho proceso es importante dado que da lugar a la adquisición de compuestos de sabor y aroma. Las BAL pueden transformar el ácido cítrico por la vía del oxalacetato obteniéndose finalmente ácido láctico, ácido acético y etanol; así también, mediante la ruta del ácido cítrico, pueden producir acetoin y 2,3 butanodiol, los cuales dan lugar al sabor característico de diversos productos derivados del cacao (Lefeber *et al.* 2011).

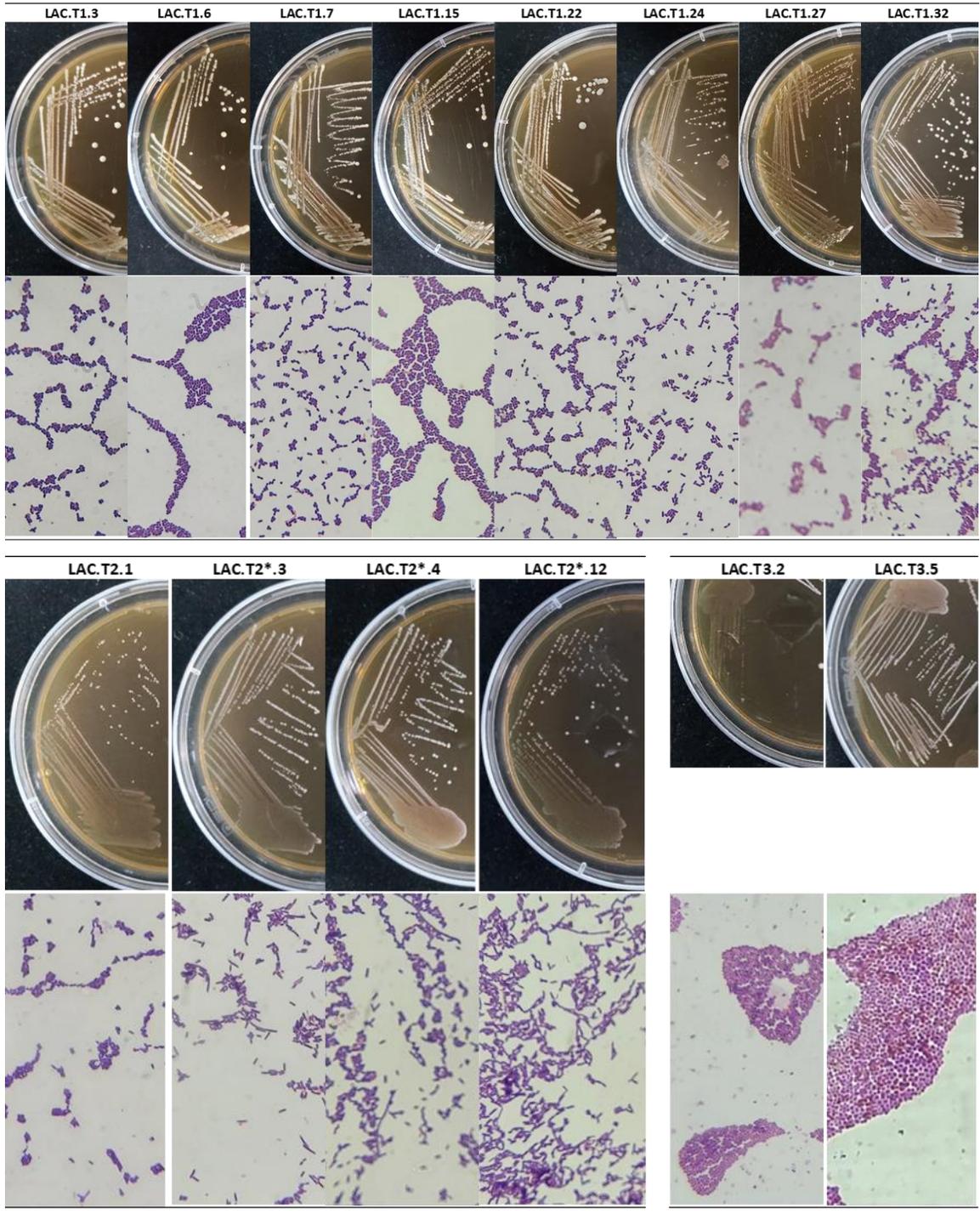


Figura 5. Morfotipos de cepas BAL aisladas de los diferentes fermentos de granos de cacao de la zona de Tocache.

Tabla 4. Identificación taxonómica de las cepas BAL aisladas de muestras de fermentos de granos de cacao.

Cepa	Cepa con mayor similitud (Genbank)	Accesión	Similitud
LAC.T1-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	NR_115605.1	100.00%
LAC.T1-6	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	NR_115605.1	99.86%
LAC.T1-7	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	NR_115605.1	99%
LAC.T1-15	<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM 1149	NR_115605.1	100.00%
LAC.T1-22	<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151	NR_104573.1	99.81%
LAC.T1-24	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	NR_044704.2	99.53%
LAC.T1-27	<i>Lactobacillus plantarum</i> CIP 103151	NR_104573.1	99.93%
LAC.T1-32	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891	NR_113338.1	99.93%
LAC.T2-1	<i>Lactobacillus fermentum</i> CIP 102980	NR_104927.1	99.93%
LAC.F*-3	<i>Lactobacillus fermentum</i> CIP 102980	NR_104927.1	99.86%
LAC.F*-4	<i>Lactobacillus fermentum</i> CIP 102980	NR_104927.1	99.93%
LAC.F*-12	<i>Lactobacillus fermentum</i> CIP 102980	NR_104927.1	99.80%
LAC.T3-2	<i>Lactobacillus farraginis</i> NRIC 0676	NR_041467.1	99.80%
LAC.T3-5	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	NR_042057.1	99.73%

La dominancia de estas dos especies de BAL también puede ser explicada a nivel genético, ya que ambas poseen a nivel de su genoma diversos genes involucrados en procesos de adaptación a condiciones de estrés, en el caso de *L. fermentum* presenta genes de producción de exopolisacáridos y ornitina ciclodeaminasa, mientras que *L. plantarum* posee genes de respuesta al estrés oxidativo y de degradación de proteínas (Illeghems *et al.*, 2015).

En cuanto a *L. brevis*, dicha especie también ha sido identificado anteriormente (Camu *et al.*, 2007), sin embargo, a diferencia de *L. plantarum*, su presencia es limitada. Douglas (2009) menciona que, debido al bajo nivel poblacional de esta especie, probablemente no contribuya significativamente en la adquisición de sabores y calidad de granos de cacao.

Se detectó también, aunque en menor cantidad, especies como *L. farraginis* y *Pediococcus acidilactici* en las muestras T3. La presencia de *P. acidilactici* ha sido reportada anteriormente (Miguel *et al.*, 2017). Su presencia limitada y crecimiento en la T3 pudo haberse debido al efecto de las condiciones propias del proceso de fermentación como es lo es la presencia más frecuente de oxígeno dentro del sistema. Durante la fermentación, se realizan mezclas en las cuales se promueve el ingreso del oxígeno al sistema, afectando el crecimiento de las BAL. Tanto *Pediococcus* como *Lactobacillus* son sensibles al oxígeno. (Douglas, 2009).

Finalmente, *L. farraginis* no ha sido antes reportada presente en la fermentación del cacao, por lo contrario, si lo ha sido en otros procesos fermentativos espontáneos (Aldrete-Tapia *et al.* 2019). Sin embargo, estos últimos consideran a dicha especie un tipo de contaminante durante la fermentación alcohólica del agave debido justamente a la capacidad de

producción de ácido láctico en lugar de etanol, siendo por tanto uno de los principales causantes de la baja producción de etanol en la elaboración de tequila. Por otro lado, *L. farraginis* se encuentra altamente relacionado a la especie *L. hilgardii*, especie identificada presente en el proceso de fermentación la cual es etanol tolerante y que es capaz de tolerar altas concentraciones de etanol (Ardhana y Fleet, 2003).

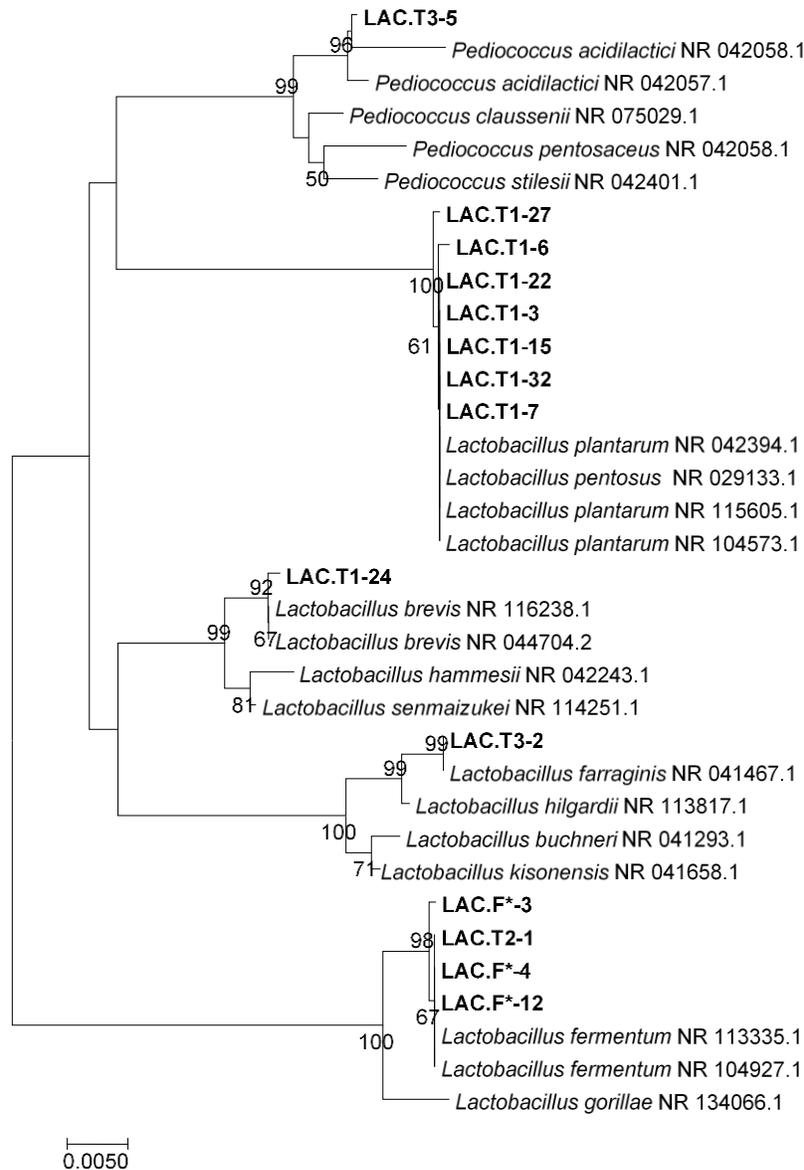


Figura 6. Árbol filogenético en base a las secuencias del gen el ARNr 16S de cepas BAL aisladas del proceso de fermentación de granos de cacao de la región TOCACHE (San Martín, Perú). La distribución evolutiva fue inferida con el método de Neighbor-joining construido con el modelo Kimura-2-parámetros. Los valores bootstrap en base a 1000 réplicas que fueron mayores a 60% fueron mostrados.

Bacterias esporogénicas

Se aislaron un total de 26 cepas del tipo esporogénicas (gran positivas, catalasa positiva) (tabla 5, Fig. 7). El 12 % del total de las cepas provinieron de las muestras T1, 30.8 % de las muestras de la T2 y finalmente, el 57.2 % del total fueron aisladas de las muestras T3.

Tabla 5. Caracterización fenotípica de las bacterias esporogénicas aisladas de fermentos de granos de cacao.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS						CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR	TEXTURA	TAMAÑO (mm)	
BAC.T1.7 *	Irregular	lobulada	Plana	Blanco claro	Cre moso	1.5	bacilar
BAC.T1.8 *	Circular	aserrada	Papilado	Amarillo claro	Cre moso	1.2	bacilar
BAC.T1.10 *	Irregular	Ondulado	Plana	Blanco	Cre moso	1.5	bacilar
BAC.T2.2 *	Irregular	Espiculada	Plana	Blanco	Cre moso	< 1	bacilar
BAC.T2.3 *	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	1.7	bacilar
BAC.T2.6	Irregular	Espiculada	Plana	Blanco	Cre moso	1.8	bacilar
BAC.T2.9	Irregular	Espiculada	Plana	Blanco	Cre moso	4	bacilar
BAC.T2.13	Circular	aserrada	Papilado	Amarillo claro	Cre moso	1.8	bacilar
BAC.T2.21	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso	1	bacilar
BAC.T2.23 *	Circular	Entera	Convexa	Blanco	Cre moso	1	bacilar
BAC.T2.24 *	Ovada	Irregular	plana	Blanco crema	Cre moso	1	bacilar
BAC.T2.43 *	Circular	Entero	plano	Blanco crema	Cre moso	3	bacilar
BAC.T3.2	Circular	Entero	Convexo	Blanco hueso	Cre moso	< 1	bacilar
BAC.T3.5 *	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	4.5	bacilar
BAC.T3.8	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	2.5	bacilar
BAC.T3.11 *	Circular	Entero	Convexo	Blanco hueso	Cre moso	< 1	bacilar
BAC.T3.16	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	1.8	bacilar
BAC.T3.18 *	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	3.8	bacilar
BAC.T3.21 *	Irregular	Ondulado	Plano	Blanco	Cre moso	2	bacilar
BAC.T3.30	Circular	Entero	Plano	Amarillo claro	Cre moso	1.8	bacilar
BAC.T3.35	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	2	bacilar
BAC.T3.36	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	2	bacilar
BAC.T3.37 *	Circular	Entero	Plano	Amarillo claro	Cre moso	2.5	bacilar
BAC.T3.40	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	1	bacilar
BAC.T3.41	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	2.5	bacilar
BAC.T3.45	Irregular	Ondulado	Plano	Beige claro	Seco	1.5	bacilar

Las bacterias esporogénicas participan durante la fermentación del cacao al ser capaces de producir una variedad de compuestos químicos que contribuyen en el grado de acidez de los granos de cacao durante el proceso (Schwan & Wheals, 2004).

En el presente estudio, el máximo nivel poblacional de las bacterias esporogénicas se observó en los fermentos de la T3. El máximo nivel poblacional de este grupo microbiano se da en las fases más tardías de la fermentación (alrededor de los 5-8 días), en las que condiciones como pH (entre 4-5), temperatura (por encima de los 45°C) y nivel de oxigenación alcanzan valores óptimos para su crecimiento (Schwan *et al.*, 1986). Sin embargo, pueden estar también presentes en etapa más tempranas de proceso (Sarbu & Csutak, 2019).

Los fermentos analizados en el presente estudio mostraron una amplia diversidad morfológica de este grupo microbiano, al poder detectarse colonias de diferentes tamaños, formas y coloración (Tabla 5, Fig. 7). En función a dicha diversidad, se seleccionó una cepa

representante de los diferentes morfotipos detectados para la correspondiente identificación taxonómica mediante el secuenciamiento del gen del ARNr 16S.

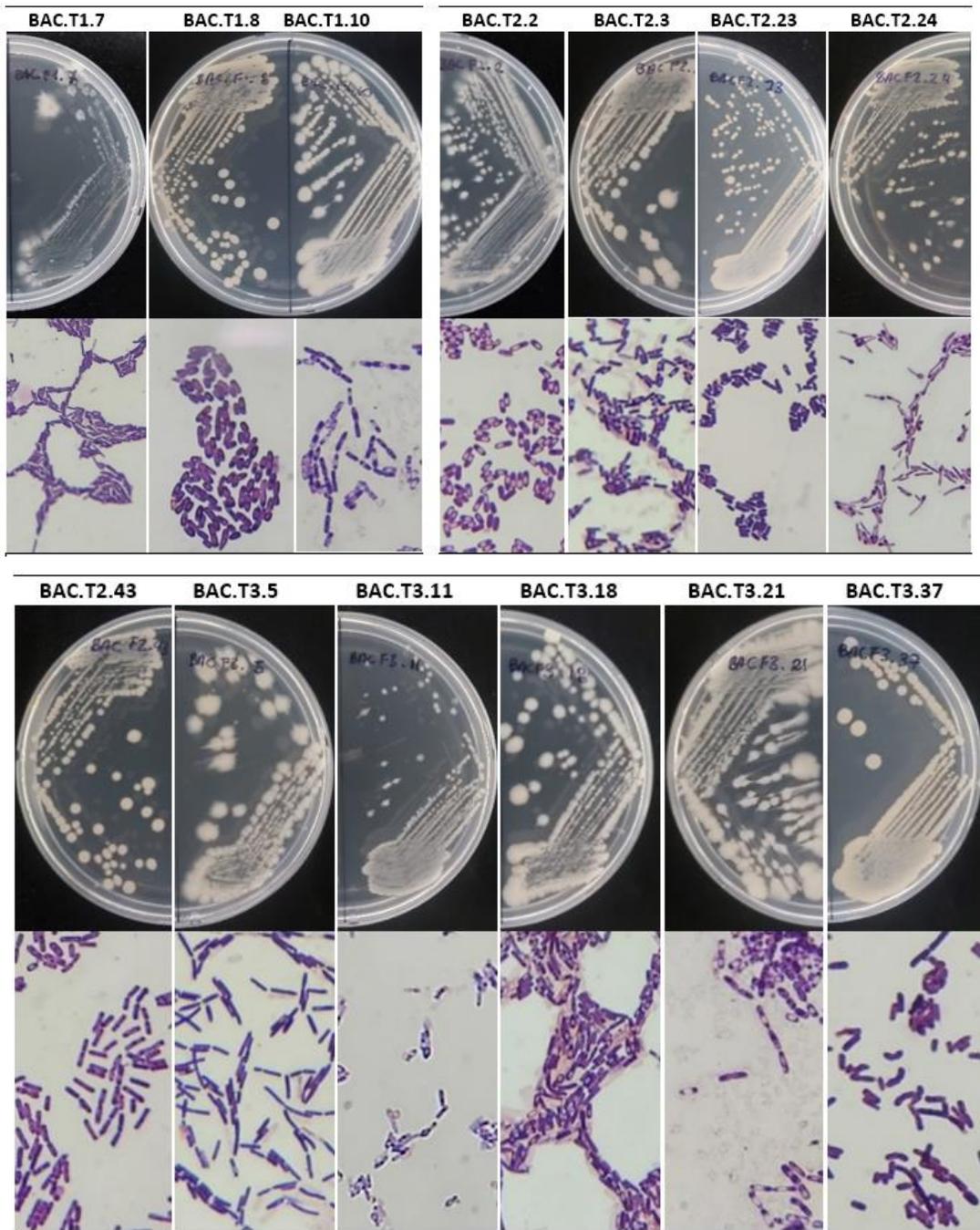


Figura 7. Morfotipos de cepas esporogénicas aislados de los diferentes fermentos de granos de cacao de la zona de Tocache.

De acuerdo con el análisis taxonómico (tabla 6), se pudo identificar la presencia de diferentes especies del género *Bacillus* presentes en las diferentes muestras de fermentos de cacao. Así también, se pudo identificar cepas que se encontraban relacionadas a los géneros *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus*.

Tabla 6. Identificación taxonómica de las cepas de bacterias esporogénicas aisladas de muestras de fermentos de granos de cacao.

N° de Cepa cepas por representante morfortipo	Cepa	Cepa con mayor similitud (Genbank)	Accesión	Similitud
1	BAC.T1-7	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513	NR_104566.1	99.93%
1	BAC.T1-8	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	NR_115953.1	100.00%
1	BAC.T1-10	<i>Bacillus paramycoides</i> MCCC 1A04098	NR_157734.1	100.00%
3	BAC.T2-2	<i>Bacillus wudalianchiensis</i> FJAT-27215	NR_157742.1	99.24%
1	BAC.T2-3	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	NR_027552.1	100.00%
2	BAC.T2-23	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i> NBRC 104870	NR_114270.1	99.93%
1	BAC.T2-24	<i>Lysinibacillus telephonicus</i> S5H2222	NR_157637.1	99.52%
1	BAC.T2-43	<i>Bacillus albus</i> MCCC 1A02146	NR_157729.1	98.48%
5	BAC.T3-5	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	NR_027552.1	99.87%
2	BAC.T3-11	<i>Lysinibacillus macroides</i> LMG 18474	NR_114920.1	100.00%
5	BAC.T3-18	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	NR_027552.1	100.00%
1	BAC.T3-21	<i>Bacillus paramycoides</i> MCCC 1A04098	NR_157734.1	100.00%
2	BAC.T3-37	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	NR_117473.1	99.46%

Dentro del género *Bacillus*, las cepas mostraron estar relacionadas filogenéticamente a las especies *B. circulans*, *B. aryabhatai*, *B. paramycoides*, *B. albus*, *B. wudalianchiensis*, *B. subtilis* y *B. megaterium*.

La presencia de este género bacteriano en la fermentación ha sido ampliamente descrita y reportada. Su máximo nivel poblacional se da en fases tardías de la fermentación, en la cual la principal actividad metabólica es producir proteínas proteolíticas cuya acción proporciona al grano de cacao sabores y olores desagradables, pero que podrían aportar en el sabor con la producción de compuestos saborizantes tales como 2,3-butanodiol y ácidos orgánicos (Ardhana y Fleet, 2003).

En el caso particular de *B. circulans* es una especie que ha sido aislada de granos de cacao en Trinidad (Ostovar y Keeney, 1973). De acuerdo con Schwan *et al.* (1986), es una de las especies, junto con *B. subtilis*, de las más frecuentes durante el proceso de fermentación, y es capaz de tolerar procesos como la desecación y así como las altas temperaturas por su habilidad de producir endoesporas (Barrile *et al.*, 1971).



B. aryabhatai ha sido aislado por primera vez de muestras de aire sobre atmosférico en criotubos de colección, y se encuentra filogenéticamente relacionado a *B. megaterium* (Shivaji *et al.*, 2009). Ha sido aislado de diferentes ambientes, tales como suelo y rizósfera (Pailan *et al.*, 2015; Mesa *et al.*, 2015). Dicha especie poseen una gran capacidad metabólica al ser reportadas como promotoras de crecimiento de plantas (Park *et al.*, 2017). Así también, se ha reportado que una cepa de dicha especie es capaz de producir compuestos aromáticos de manera natural tales como la vainilla y 4-vinylguaiacol, y de presentar actividad celulasa, laccasa, lipasa y pectinasa (Paz *et al.*, 2016), haciendo de esta especie relevante a nivel biotecnológico.

B. paramycooides y *B. albus* son especies capaces de crecer a temperaturas alrededor de los 40 °C, y que a nivel taxonómico pertenecen al grupo de *Bacillus cereus* (Liu *et al.*, 2017), siendo reportado este último participe en el proceso de fermentación del cacao junto con *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus* (Ardhana y Fleet, 2003; Nielsen *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2012).

Por otro lado, *B. subtilis* ha sido identificado presente en sistemas de fermentación en Ghana y Malasia (Carr *et al.*, 1979; Carr y Davies, 1980). Junto con *B. megaterium* y *B. cereus* estudios realizados por Lopez y Quesbel (1971) han sugerido su posible participación en la adquisición de olores desagradables en el chocolate durante la fase aeróbica del proceso. Así también, dichas especies son capaces de generar otros compuestos tales como 2,3-butanodiol, ácido láctico, ácido acético y tetrametil pirazina, los cuales pueden tener un impacto en el aroma del grano de cacao. (Lopez y Quesbel, 1971; Zak *et al.*, 1972). En particular, se ha reportado que la producción de 2,3, 5, 6 tetrametil pirazina por parte de *Bacillus* es uno de los mayores componentes aportantes de aroma del cacao (Serra, 2005). Así también, la importancia del género *Bacillus* radica en su acción complementaria de despectinización de la pulpa en fases más tardías del proceso fermentativo (Ouattara, Reverchon, Niamke, y Nasser, 2011).

B. wudalianchiensis, aislada por primera vez por Li *et al.* (2017) a partir de muestras de grass, y actualmente reclasificada como *Pseudobacillus wudalianchiensis*, es una especie capaz de crecer entre los 10 y 60°C (Verma *et al.*, 2019). Dichos valores aluden a la capacidad de dicha especie de estar presente en el proceso de fermentación del cacao, el cual se caracterizó, de acuerdo al registro, de encontrarse entre los 45 y 49 °C. Sin embargo, aún no se tiene información o reporte de la participación de esta especie en el proceso de la fermentación del cacao.

Se identificó también la presencia de cepas de los géneros *Lysinibacillus*. El género *Lysinibacillus* han sido identificado en diferentes procesos de fermentación (Chettri y Tamang, 2015; Chakrabarty *et al.*, 2014). *L. telephonicus* se encuentra filogenéticamente emparentada a la especie *L. sphaericus* (Fig. 8). En el caso particular del cacao, dicha especie ha sido reportada en diferentes estudios en Brasil, Ghana, Malasia, Trinidad, Indonesia y República Dominicana (Ardhana y Fleet 2003; Schwan y Wheals 2004; Camu *et al.* 2007; Lagunes Gálvez *et al.* 2007; Nielsen *et al.* 2007; Daniel *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2013).

Algunas cepas de este género han sido detectadas como endógenas de la planta de cacao, y que presentan una acción antagonista frente a fitopatógenos tales como *Phytophthora capsici*, *Moniliophthora roreri*, y *M. perniciosa* (Melnick *et al.*, 2011). Por otro todo, *L. macroides* se encontró cercanamente emparentada a *L. boronitolerans* (fig. 8), la cual ha sido originariamente aislada de productos fermentados de soya en Korea (Nam *et al.*, 2012).

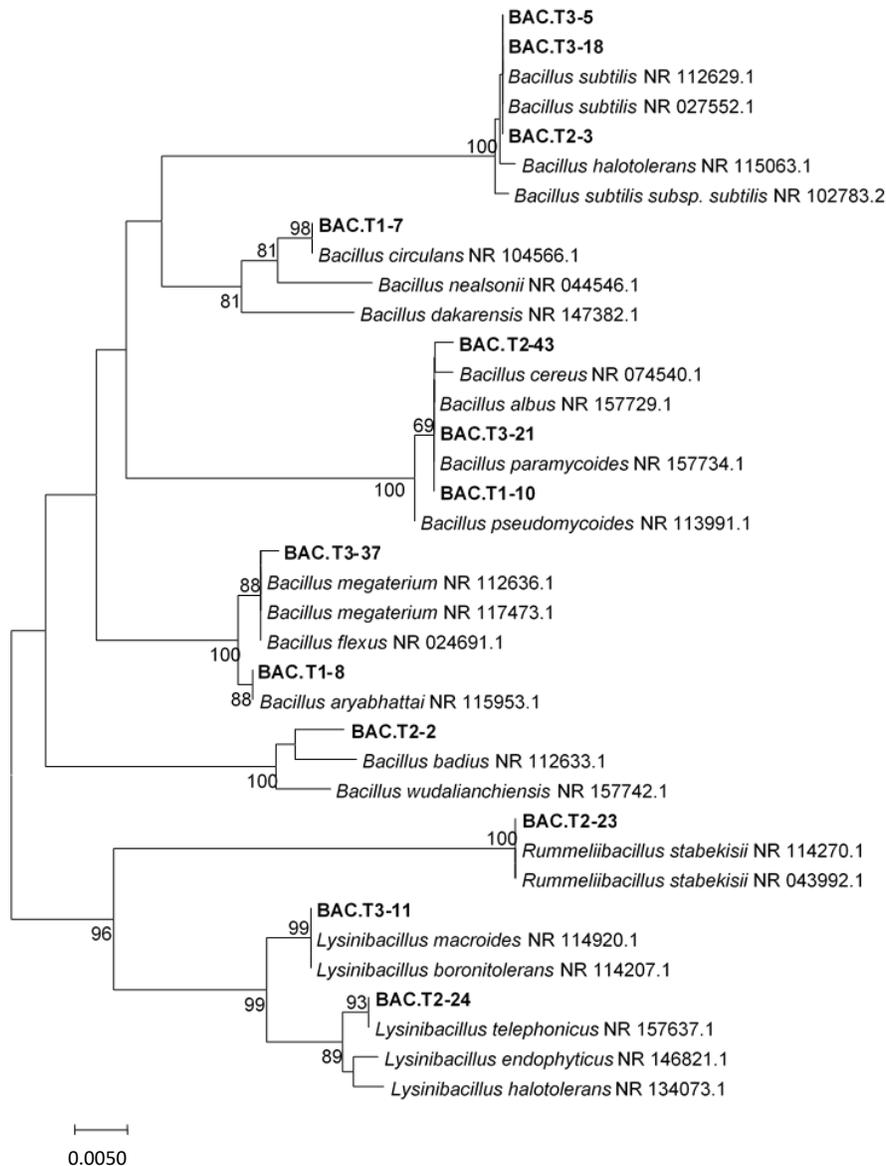


Figura 8. Árbol filogenético en base a las secuencias del gen el ARNr 16S de cepas de bacterias esporogénicas aisladas del proceso de fermentación de granos de cacao de la región TOCACHE (San Martín, Perú). La distribución evolutiva fue inferida con el método de Neighbor-joining construido con el modelo Kimura -2- parámetros. Los valores bootstrap en base a 1000 réplicas que fueron mayores a 60% fueron mostrados.

Actualmente no hay información específica acerca de la participación de *Rummeliibacillus stabekisii* en el proceso de fermentación del grano de cacao. Lima *et al.* (2012) reportaron la presencia de la especie *R. stabekisii* en muestras provenientes de la cadena productiva de derivados del cacao.

Estudio de caso: Colombia

Aislamiento y conteo de microorganismos

Para el momento cero del muestreo, es decir, cuando apenas se colocaron las semillas a fermentar, no se presentó presencia de colonias en los medios de cultivo, de acuerdo con lo expresado por Vuyst & Weckx (2016), quienes afirman que mientras los frutos de cacao no tengan ninguna entrada o apertura, la pulpa permanece libre de microorganismos.

A las doce horas de iniciada la fermentación se obtuvieron conteos de 8 log UFC/g de cacao en el caso de los cultivos incubados en condiciones aeróbicas. Un valor cercano se obtuvo para la microbiota almacenada en las mismas condiciones de temperatura, pero bajo condiciones mínimas de disponibilidad de oxígeno (anaerobiosis). Los valores de los conteos se presentan en la figura 9.

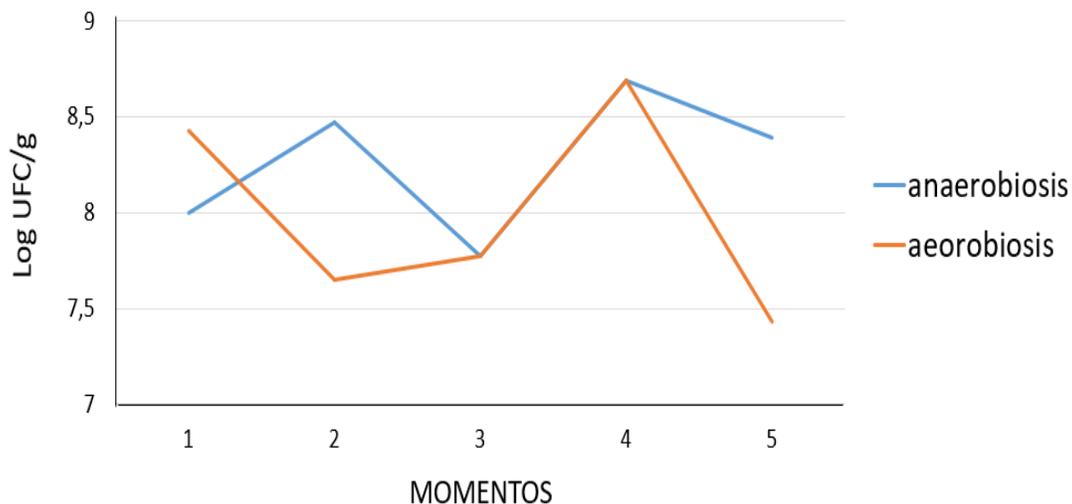


Figura 9. Conteo de UFC en medios incubados en anaerobiosis y aerobiosis.

Durante todo el tiempo de fermentación se lograron aislar y discriminar de acuerdo con criterios morfológicos y pruebas bioquímicas, un total de 80 aislamientos, cinco de los cuales fueron catalasa negativos. Cuando se cuantificaron por tipo de microorganismo, las poblaciones presentaron tendencias típicas de acuerdo con la etapa de la fermentación. Este comportamiento se puede apreciar en la figura 10.

Los microorganismos dominantes durante los dos primeros días de fermentación fueron las levaduras. A partir de las doce horas empezaron a crecer bacterias ácido acéticas (BAA), llegando a su mayor número a los 4 días. En este período, los granos de cacao liberaron olores desagradables. Las bacterias ácido-lácticas solo se obtuvieron al final del proceso fermentativo. Todos los aislamientos fueron crioconservados a -80°C con glicerol al 30%.

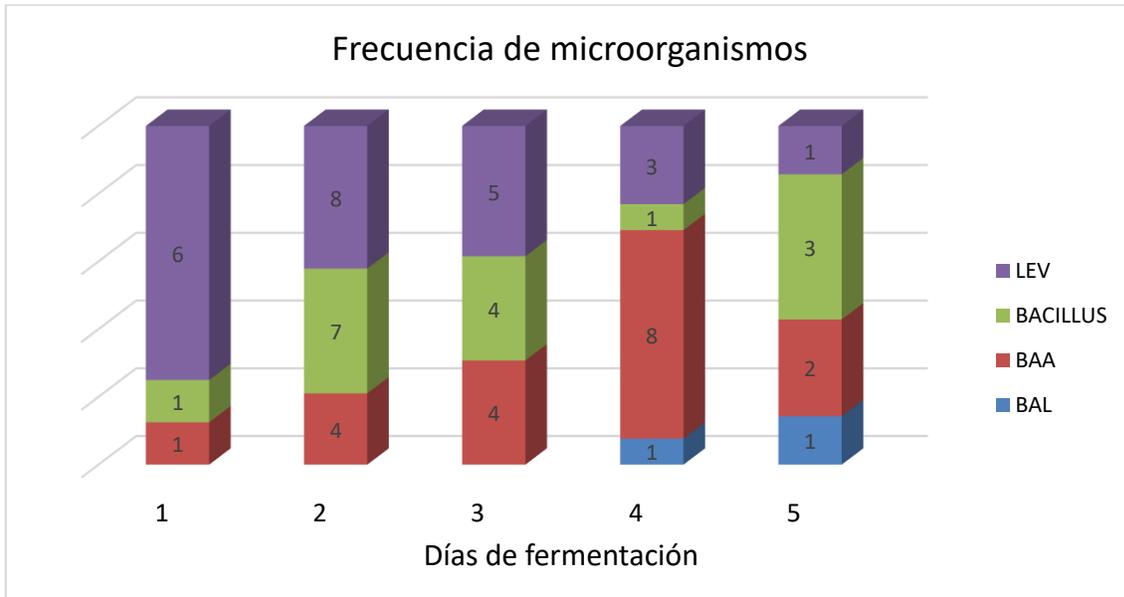


Figura 10. Frecuencia de aislamientos microbianos de acuerdo con la etapa de fermentación.

Pruebas Bioquímicas

Los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en la tabla 7. La actividad de la citrato permeasa solo se evidenció en los aislamientos A58, A27 y A45, los dos primeros corresponden a levaduras y el tercero a una bacteria. En cuanto a la producción de pectinasas, solo se presentó respuesta positiva en el caso del aislamiento A36, la cual presumiblemente es una bacteria ácido acética.

La mayoría de las bacterias formadoras de endosporas se aislaron al final del proceso fermentativo.



Tabla 7. Caracterización bioquímica de los aislamientos obtenidos de la fermentación del cacao.

Código	Disponibilidad de oxígeno	Oxidasa	KOH	Catalasa	Gram	Citrato
A1	1 Aero.	-	-	+	Lev	-
A2	1 Aero.	-	-	+	Lev	-
A3	1 Aero.	-	-	+	Lev	-
A5	1 Aero.	-	-	+	+	-
A6	1 Aero.	-	-	+	Lev	-
A7	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A8	1Aero.	-	-	+	Lev	-
A9	2Aero.	-	-	+	+	-
A10	2Aero.	-	+	+	- **	-
A11	2 Aero.	-	-	+	+	-
A12	2 Aero.	-	-	+	+	-
A13	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A14	1 Aero.	-	-	+	Lev	-
A15	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A16	2Anaero.	-	-	+	+	-
A 17	2Anaero.	-	+	+	-	-
A18	2Anaero.	-	-	+	+	-
A19	2Anaero.	-	-	+	+	-
A20	2Anaero.	-	+	+	-	-
A21	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A23	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A24	3Anaero.	-	-	+	Lev	-
A25	3Anaero.	-	-	+	Lev	-
A26	2Anaero.	-	+	+	-	-
A27	2Anaero.	-	-	+	Lev	+
A28	2Anaero.	-	-	+	+	-
A29	2Anaero.	-	-	+	+	-
A30	3 Aero.	-	-	+	+**	-
A31	3 Aero.	-	-	+	+	-
A32	4Anaero.	-	-	+	+	-
A35	4 Aero.	-	-	+	Lev	-
A36	4 Aero	-	+	+	-	-
A37.1(a)	4 Aero	-	+	+	-	-
A37.2(b)	4 Aero	-	+	+	-	-
A37.(L)	4 Aero	+	+	+	-	-
A38	4 Aero	-	+	+	-	-
A 39	4Anaero.	-	+	+	-	-
A40	4 Aero	-	+	+	-	-

A41	4 Aero	-	-	+	Lev	-
A42	4 Aero	-	-	-	+	-
A43	4Anaero.	-	+	+	-	-
A44	4Anaero.	-	-	+	Lev	-
A45	3Anaero.	-	-	+	+	+
A46	3Anaero.	-	-	+	Lev	-
A47	3Anaero.	-	-	+	Lev	-
A48	3Anaero.	-	+	+	-	-
A49	3Anaero.	-	-	+	+	-
A50	3Anaero.	-	+	+	-	-
A51	3Anaero.	-	-	+	+	-
A53	3Anaero.	-	+	+	-	-
A54	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A55	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A57	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A58	2Anaero.	-	-	+	Lev	+
A59	2Anaero.	-	-	+	Lev	-
A60	1Anaero.	-	+	+	-	N.R.
A61	1Anaero.	-	-	+	+	N.R
A62	5Anaero.	-	-	-	+	N.R
A65	5Anaero.	-	+	+	-	N.R
A66	4Anaero.	-	+	+	-	N.R.
A67	4Anaero.	-	+	+	-	N.R
A68	5 Aero.	-	+	+	-	N.R
A69	5Aero.	+	+	+	-	N.R
A70	5 Aero.	-	-	+	Lev	N.R.
A71	5 Aero.	-	-	-	+**	N.R
A72	5 Aero.	-	-	+	+**	N.R
A73	5 Aero.	-	+	+	-**	N.R
A74	5 Aero.	+	-	-	+**	N.R.
A75	5 Aero.	-	-	+	-	N.R
A76	5 Aero.	-	-	-	+**	N.R
A78	5 Aero.	-	-	+	+	N.R
A79	5 Aero.	-	-	+	+	N.R.
A80	5 Aero.	-	+	+	-	N.R

NR: prueba no realizada; **: bacterias con formación de endosporas.

El medio de Citrato de Simmons es un medio diferencial ya que su lectura se basa en el cambio del color inicial verde a un azul si hay actividad del citrato permeasa como se aprecia en la Figura 11.

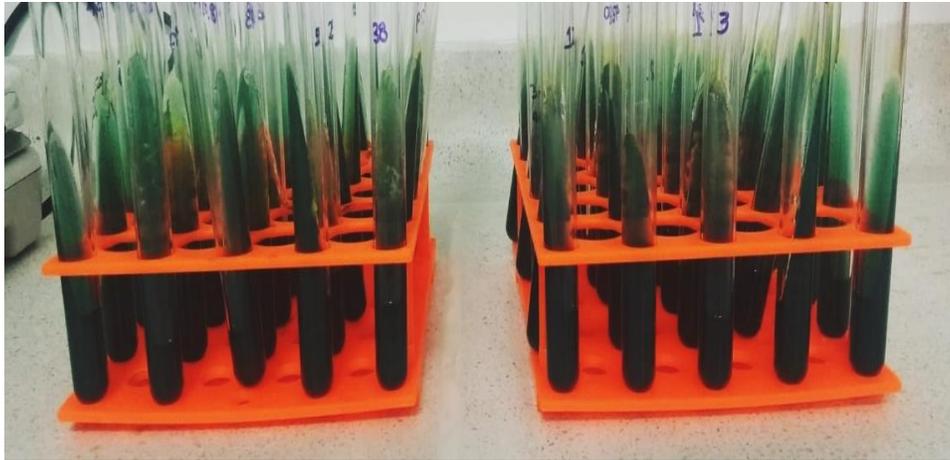


Figura 11. Microorganismos sembrados en medio de cultivo Citrato de Simmons.

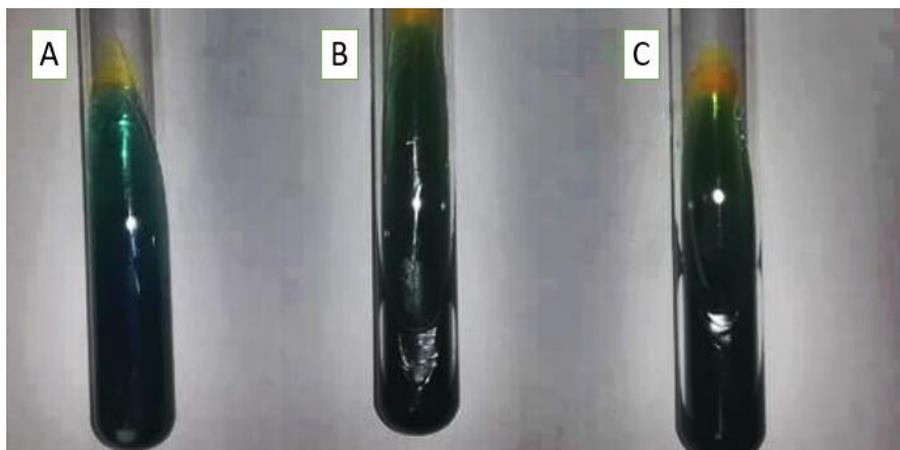


Figura 12. citrato positiva; B: citrato negativo; C: Control sin siembra.

Purificación y caracterización de microorganismos fermentativos

Los microorganismos se purificaron para proceder al aislamiento del ADN genómico y posterior amplificación del gene ADNr 16S. Desafortunadamente varias de las amplificaciones, especialmente en el caso de las levaduras no produjeron ADN genómico de suficiente calidad para poder ser utilizadas en la clonación de la región ITS.

Los resultados demostraron una relativa baja diversidad de los microorganismos asociados a cada una de las etapas fermentativas. En general, los microorganismos aislados se pueden incluir dentro de alguna de las siguientes categorías: bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido acéticas, bacterias esporogénicas o levaduras.

La tabla 8 registra, en el caso de los aislamientos bacterianos, la identificación lograda con la secuenciación del gen ARNr 16S. La tabla 9, la correspondiente en el caso de las levaduras.

Tabla 8. Resultados Blast para los aislamientos bacterianos presentes en la matriz de fermentación del cacao, en condiciones de Colombia.

AISLAMIENTO	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aislamiento 1	<i>Acetobacter fabarum</i>	2451	2451	99%	0.0	99.63%	1372	KU686732.1
Aislamiento 2	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1871	1871	100%	0.0	97.70%	1395	MF354169.1
Aislamiento 3	<i>Acetobacter fabarum</i>	702	702	79%	0.0	97.56%	1389	MT611597.1
Aislamiento 4	<i>Acetobacter fabarum</i>	2440	2440	99%	0.0	99.55%	1372	KU686732.1
Aislamiento 5	<i>Acetobacter fabarum</i>	1225	1225	87%	0.0	95.81%	1380	MH633719.1
Aislamiento 6	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	784	784	56%	0.0	98.86%	1460	MT597672.1
Aislamiento 7	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	2663	2663	99%	0.0	99.93%	1502	LC223100.1
Aislamiento 9	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	2645	2645	99%	0.0	99.65%	1502	LC223100.1
Aislamiento 12	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2606	2606	98%	0.0	99.58%	1487	MT072161.1
Aislamiento 13	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2556	2556	100%	0.0	99.71%	1487	MT072161.1
Aislamiento 16	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2619	15620	100%	0.0	99.86%	2639876	CP054831.1
Aislamiento 17	<i>Bacillus licheniformis</i>	2614	2614	100%	0.0	99.31%	1455	JN366781.1
Aislamiento 18	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2632	2632	100%	0.0	99.79%	1438	MK026832.1
Aislamiento 20	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	2351	2351	100%	0.0	99.92%	1498	MN826587.1
Aislamiento 25	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2641	13186	100%	0.0	100.00%	3022021	CP044228.1
Aislamiento 26	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2643	13196	100%	0.0	99.79%	3022021	CP044228.1

Tabla 9. Identificación taxonómica de las levaduras aisladas de muestras de fermentos de granos de cacao, a partir de las secuencias ITS.

AISLAMIENTO	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aislamiento 30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1262	1262	100%	0.0	99.15%	722	MT641207.1
Aislamiento 31	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	1109	1109	100%	0.0	99.83%	611	MT584873.1

Leuconostoc pseudomesenteroides y *Lacticaseibacillus rhamnosus* son bacterias ácido-lácticas que se presentan de forma frecuente en los procesos fermentativos, incluyendo la fermentación del cacao. *Acetobacter fabarum* es una representante de las bacterias ácido acéticas, también reportada reiterativamente en la fermentación del cacao. Las especies de *Bacillus*, *B. licheniformis* y *B. zhangzhouensis*, también han sido encontradas en la matrices de fermentación de mora, de grasa de cerdo o en el caso de la soya, sin embargo, no se encontraron reportes de su presencia en fermentaciones de cacao.

En el caso de las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces nepalensis*, las dos también han sido reportadas como microbiota asociada a la fermentación en cacao.



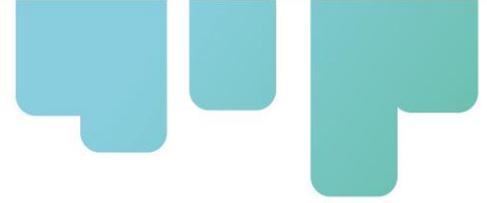
Conclusiones

El proceso de fermentación es un sistema dinámico en donde la conversión de diferentes sustratos se realiza constante producto de la actividad microbiana, dicha actividad hace que cambios en las condiciones fisicoquímicos se den en el sistema, lo cual promueve a su vez la sucesión microbiana de determinados géneros bacterianos en particular.

El presente trabajo permitió el estudio de la dinámica poblacional microbiana participe en el proceso de fermentación de granos de cacao, observándose una predominancia en diversidad del grupo de levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) en los primeros días del proceso, mientras que en las fases más tardías la predominancia perteneció al grupo de bacterias esporogénicas.

Así también, la cuantificación de poblaciones microbianas permitió el aislamiento de diferentes cepas de levaduras, BAL y bacterias esporogénicas, todas ellas participes en el proceso de fermentación, obteniéndose información acerca de la diversidad fenotípica presente en cada grupo microbiano en estudio, detectándose en el caso de las levaduras cepas morfológicamente similares a los géneros *Candida* y *Saccharomyces*. Por otro lado, a nivel molecular, se pudo identificar la presencia de diferentes géneros microbianos relevantes tales como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Rummeliibacillus* en las diferentes muestras de fermentos de granos de cacao, los cuales participan activamente en la fermentación y transformación de la química del grano de cacao de la zona de Tocache.

La presente información resulta relevante para el entendimiento de la microbiología del proceso de fermentación del cacao de la zona de Tocache - San Martín, así también el estudio de la diversidad taxonómica permitió identificar los principales géneros microbianos que se encuentren implicados a nivel microbiológico y bioquímico, así como la posibilidad de encontrar especies nuevas potenciales que puedan estar implicadas en el proceso.



Referencias Bibliográficas

- Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, M. P., Martínez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2019). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 103339. doi:10.1016/j.fm.2019.103339
- Almeida, O.G.G.; Pinto, U.M.; Matos, C.B.; Frazilio, D.A.; Braga, V.F; Zeska-Kress, M.R. & De Martinis. E.C.P. (2020). Does Quorum Sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An in-silico perspective. *Food Research International*, 131 (1), 1–12.
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Barrile, J.C., Ostovar, K., and Keeney, P.G. 1971. Microflora of cocoa beans before and after roasting at 150°C. *J. Milk Food Technol.*, 34:369– 371.
- Camu, N., DeWinter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M. and De Vuyst, L. (2007) Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Env. Microbiol.* 73,1809-1824.
- Cardona, L, M. (2016) Influencia del proceso de fermentación sobre las Características de calidad del grano de cacao (Theobroma cacao). (Tesis de maestría), Facultad de Ciencias Agrarias: Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Carr JG, Davies PA, Dougan J. (1979). Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia. London: Tropical Products Institute; 1979.
- Carr JG, Davies PA. (1980). Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia (part 2): further microbiological methods and results. Bristol: Long Ashton Research Station; 1980
- Castro, E.; Idrogo, G.; Siche, R. & Cardenas, F. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. (2018). *Helyion*, 5 (1), 1-29.
- Chakrabarty, J.; Sharma, G. D.; Tamang, J. P. (2014). Traditional technology and product characterization of some lesser-known ethnic fermented foods and beverages of



- North Cachar Hills District of Assam. *Indian J. Tradit. Know.* 2014, 13, 706–715.
- Chettri, R.; Tamang, J. P. (2015). *Bacillus* species isolated from tungrymbai and be kang, naturally fermented soybean foods of India. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 197, 72–76.
- Da Silva do Nascimento, M., da Silva, N., da Silva, I. F., da Silva, J. de C., Marques, É. R., & Barbosa Santos, A. R. (2010). Enteropathogens in cocoa pre-processing. *Food Control*, 21(4), 408–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.015>
- Daniel, H.-M., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P. and De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.* 9, 774– 783.
- De Bruyne K, Camu N, De Vuyst L, Vandamme P. (2010). *Weissellafabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Sep;60(Pt 9):1999-2005. doi: 10.1099/ijs.0.019323-0.
- De Vuyst L, Weckx S. (2015). The Functional Role of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Bean Fermentation. *Biotechnol Lact Acid Bact Nov Appl.* 2th Ed. pp 248–78.
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Doster N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. (2011). Cacao *Theobroma cacao* L. *Hoja botánica.* 2011;19 p. 4-21.
- Douglas Dircks, H. (2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. Tesis para obtener grado de Doctor of Philosophy. University of New South Wales, School of Chemical Sciences and Engineering, Sydney, Australia. Pp 402. Revisado en: <http://unsworks.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsworks:8348/SOURCE01>
- FAO. CACAO: Operaciones Poscosecha. Disponible online en: <http://www.fao.org/3/a-au995s.pdf>
- Figueroa, H.; Mota, J.; Ferrocino, I.; Hernández, Z.; Gonzales, O.; Cocolin, L. & Suarez, M. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301 (1), 41–50.
- Figueroa, H.; Mota, J.; Ferrocino, I.; Hernández, Z.; Gonzales, O.; Cocolin, L. & Suarez, M. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for



- fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301 (1), 41–50.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- ICMSF. (2002). *Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Illegghems, K., De Vuyst, L., Weckx, S., (2015). Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes. *BMC Genomics* 16, 766–779.
- Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. (2013). Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *J Appl Bot FoodQual*. 2013; 86:90–8. 55.
- Kadow D, Niemenak N, Rohn S, Lieberei R. (2015). Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;62 (1):357– 61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee,K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. (2012). Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:716–721.
- Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., *et al.*, (2008). Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with co- coa fermentation in Nigeria. *Curr. Microbiol*. 56 (4), 306–314.
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M. and Guiraud, J.-P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int. J. Food Microbiol*. **114**, 124– 130.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Foodmicrobiology*, 28(3), 457-464.
- Lima, L. J., van der Velpen, V., Wolkers-Rooijackers, J., Kamphuis, H. J., Zwietering, M. H., & Nout, M. R. (2012). Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder. *Appl. Environ*.



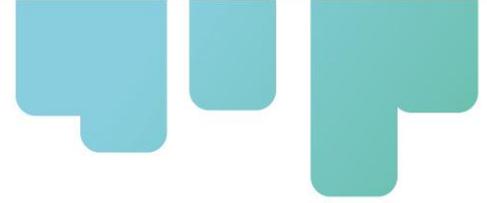
Microbiol., 78(8), 2904-2913.

- Liu, B., Liu, G.H., Sengonca, C., Schumann, P., Wang, J.P., Zhu, Y.J., Zhang, H.F. (2017) *Bacillus wudalianchiensis* sp. nov. isolated from grass soils of the Wudalianchi scenic area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2897–2902
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2499–2508. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>
- Lopes, A.S. and Dimick, P.S. (1995). Cocoa fermentation. In *Biotechnology: A comprehensive treatise*, vol. 9, pp. 563–577. Reed, G. and Nagodawithana, T.W., Eds. (2nd ed.), Enzymes, Food and Feed. Weinheim: VCH.
- Lopez, A. and Quesnel, V.C. (1971). An assessment of some claims relating to the production and composition of chocolate aroma. *Intern. Chocolate Rev.*, 26:19–24.
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P.-J., Saels, V., Struyf, N., *et al.*, (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS One* 8 (12), e81559.
- Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57(3), 236–245. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.03.005
- Mesa J., Mateos-Naranjo E., Caviedes M. A., Redondo-Gomez S., Pajuelo E., Rodriguez-Llorente I. D. (2015). Scouting contaminated estuaries: heavy metal resistant and plant growth promoting rhizobacteria in the native metal rhizo accumulator *Spartina maritima*. *Mar. Pollut. Bull.* 90 150–159. 10.1016/j.marpolbul.2014.11.002
- Miguel, M. G. da C. P., Reis, L. V. de C., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT*, 77, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076>
- MINCETUR. (2016). NOTICIAS: Productos orgánicos del Perú deslumbran en feria más importante del mundo del sector. Disponible online: <https://www.mincetur.gob.pe/productos-organicos-del-peru-deslumbran-en-feria-mas-importante-del-mundo-del-sector/>
- Ministerio de Agricultura. (2011). Cacao: Un campo fértil para sus inversiones y el desarrollo de sus exportaciones; Available from:



http://www.salondelcacaoychocolate.pe/2012/archivos/ficha_cacao.pdf

- Misnawi, Jinap S, Jamilah B, Nazamid S. (2005) Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *J Sci Food Agric.* 2005;85(6):917–24
- Nam, Y.-D., Seo, M.-J., Lim, S.-I., & Lee, S.-Y. (2012). Genome Sequence of *Lysinibacillus boronitolerans* F1182, Isolated from a Traditional Korean Fermented Soybean Product. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5988–5988. doi:10.1128/jb.01485-12
- Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH.2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol*;114(2):168–86.
- Nielsen, D.S., Snitkjaer, P and Van den Berg N. 2008. Investigating the fermentation of cocoa by correlating Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles and Near Infrared spectra. *International Journal of Food Microbiology* 125 133-140
- Ostovar, K., & Keeney, P. G. (1973). Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of trinidad's cacao beans. *Journal of Food Science*, 38(4), 611–617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02826.x>
- Ouattara, H. G., Reverchon, S., Niamke, S. L., & Nasser, W. (2011). Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 28(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.020>
- Pailan S., Gupta D., Apte S., Krishnamurthi S., Saha P. (2015). Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 103 191–195. 10.1016/j.ibiod.2015.05.006
- Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. *Food Microbiol.* ;35(2):73–85.
- Park Y-G, Mun B-G, Kang S-M, Hussain A, Shahzad R, Seo C-W, *et al.* (2017) *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE* 12(3): e0173203. doi:10.1371/journal.pone.0173203
- Passos, F.M.L., Silva, D.O., Lopez, A., Ferreira, L.F., Guimarães, W.V. 1984. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 49, 205-208.



- Paz, A., Carballo, J., Pérez, M. J., & Domínguez, J. M. (2016). *Bacillus aryabhatai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10). doi:10.1007/s11274-016-2113-5
- Pereira, G.V.M., Magalhães, K.T., Almeida, E.G., Coelho, I.S.C. and Schwan, R.F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. *Int. J. Food Microbiol.* **161**, 121– 133.
- Saltini, R., Akkerman, R., Frosch, S., (2013). Optimizing chocolate production through traceability: a review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control* 29, 167–187.
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The Microbiology of Cocoa Fermentation. In *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (2019 th ed., pp. 423–446). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- SCHWAN, R. F., VANETTI, M. C. D., SILVA, D. O., LOPEZ, A., & MORAES, C. A. (1986). Characterization and Distribution of Aerobic, Spore-Forming Bacteria from Cacao Fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, 51(6), 1583–1584. doi:10.1111/j.1365-2621.1986.tb13872.x
- Schwan, R.F., (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1477–1483.
- Serra, B.J., (2005). Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *Eur. Food Res. Technol.* 221, 19e29
- Shivaji S., Chaturvedi P., Begum Z., Pindi P. K., Manorama R., Padmanaban D. A., *et al.* (2009). *Janibacterhoyleisp nov., Bacillus isronensis spnov and Bacillus aryabhatai sp nov.*, isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 2977–2986. 10.1099/ij.s.0.002527-0
- Verma, A., Pal, Y., Ojha, A. K., Kumari, M., Khatri, I., Rameshkumar, N., ... & Krishnamurthi, S. (2019). Taxonomic insights into the phylogeny of *Bacillus badius* and proposal for its reclassification to the genus *Pseudobacillus* as *Pseudobacillus badius* comb. nov. and reclassification of *Bacillus wudalianchiensis* Liu *et al.*, 2017 as *Pseudobacillus wudalianchiensis* comb. nov. *Systematic and applied*



microbiology, 42(3), 360-372.

- Wacher R. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*. 12(4): ISSN: 1067-6079. disponible online: <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num4/art42/art42.pdf>
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Willey, J. M., L.M. Sherwood and Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology*, NY, McGraw Hill, 7th Ed.
- YAO W., Doue G., Goualie B., Koua G., Nlamke S. (2017). Selection of potential *Bacillus* starters for cocoa beans fermentation improvement. *Food Technology*, 41(1): 131-146
- Zak, D.L., Ostovar, K., and Keeney, P.G. (1972). Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cacao beans. *J. Food Sci.*, 37:967–968.

Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org