

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS DE LA FERMENTACIÓN
ESPONTÁNEA DEL CACAO FINO DE AROMA
(*Theobroma cacao* L.) EN AMAZONAS**

Autora:

Bach. Miguelina Zayda Silva Zuta

Asesor:

Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo

Coasesor:

Dra. Luz Azucena Torres García

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2021

DEDICATORIA

Dedico esta investigación al divino redentor por haberme bendecido y darme las fuerzas para cumplir mis sueños anhelados, a mi madre Zayda Miguelina Zuta Villanueva por haberme dado la vida, salud, fuerza de voluntad y por brindarme su apoyo incondicional.

A mi hija Ligia Zamira y mi pareja Marvin por sus palabras, confianza, su amor y consejos que contribuyeron con la cosecución de mis metas y objetivos.

Miguelina Zayda Silva Zuta

AGRADECIMIENTO

Un eterno agradecimiento a mi madre, padre y hermanos por su apoyo, confianza, amor y paciencia. Por impulsarme a ser cada día mejor, porque creyeron en mí y me impulsaron a lograr llegar a la meta trazada.

A mi Alma Máter la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas y en especial a la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias por permitirme formarme profesionalmente.

A los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por sus enseñanzas, valores y experiencias transmitidas que contribuyeron en mi formación profesional.

Al Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo y la Dra. Luz Azucena Torres García por la información brindada, su apoyo y dedicación incondicional para hacer posible la realización de nuestro trabajo de investigación.

A los trabajadores y socios de la Cooperativa de servicios múltiples APROCAM por las facilidades otorgadas para el desarrollo del presente trabajo.

Al Ms. Sc. Armstrong Barnard Fernández Jerí y al Ing. Guillermo Idrogo Vásquez quienes me consideraron para desarrollar el presente trabajo en el marco del proyecto “Desarrollo de un Cultivo Inicial para Incrementar la Eficiencia en el Proceso de Fermentación de Cacao Criollo Nativo (*Theobroma cacao* L.) en la Asociación de Productores Cafetaleros y Cacaoteros APROCAM de Amazonas”, financiado por el Programa Nacional de Innovación Agraria.

A mis amigos quienes me apoyaron durante todo este proceso y que han sido parte del desarrollo del presente trabajo de investigación.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. Policarpio Chauca Valqui

Rector

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón

Vicerrector Académico

Dra. Flor de Teresa García Huamán

Vicerrectora de Investigación

Dr. Erick Aldo Auquiñivín Silva

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) en Amazonas" del egresado Miguelina Bayda; Silva Berta de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 10 de febrero de 2020


Firma y nombre completo del Asesor
Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo

VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (X), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) en Amazonas" del egresado Miguelino Zayda, Silva Zarta de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 10 de febrero de 2020

Firma y nombre completo del Asesor
Dra. Luz Azucena Torres Garcia

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Ms. Sc. Armstrong Barnard Fernández Jerí
Presidente



Ms. Segundo Grimaldo Chávez Quintana
Secretario



Mg. Robert Javier Cruzalegui Fernández
Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-0

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Identificación y Cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.) en Amazonas

presentada por el estudiante ()/egresado (x) Miguelina Bayda Silva Zota

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

con correo electrónico institucional miguelina.silva@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

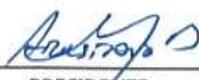
- a) La citada Tesis tiene 19 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 07 de diciembre del 2020


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 28 de febrero del año 2020 siendo las 12:00 horas, el aspirante: Magistra Sayda Silvia Zuta defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao L.*) en amazonas, teniendo como asesor a Msc. Efraín Manuelito Castro Alayo, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Ing. Mg. Sc. Armstrong Bernard Ferrandiz Jari

Secretario: Ing. Mg. Segundo Gerardo Chavez Quiribana

Vocal: Ing. Mg. Robert Javier Cruzalequi Fernandez



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado ()

Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 13:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....

CONTENIDO GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS	v
VISTO BUENO DEL COASESOR DE LA TESIS	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	ix
CONTENIDO GENERAL	x
ÍNDICE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Ubicación	18
2.2. Muestra.....	18
2.3. Materiales y equipos	19
2.4. Metodología	20
2.5. Análisis de datos	23
III. RESULTADOS	24
3.1. Identificación y cuantificación de microorganismos en la fermentación espontánea de cacao en el distrito de La Peca.....	24
3.2. Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea de cacao en el Distrito de Copallín.....	26
3.3. Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea de cacao en el Distrito de Aramango.....	28

IV. DISCUSIÓN	31
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES	35
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	43
Anexo A. Método para tinción.....	43
Anexo B. Galería fotográfica	43

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos identificados en la fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de La Peca.....	24
Tabla 2. Recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de La Peca.	24
Tabla 3. Microorganismos identificados en la fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Copallín.....	26
Tabla 4. Recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Copallín.	27
Tabla 5. Microorganismos identificados en la fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Aramango.....	28
Tabla 6. Recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Aramango	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del área de recolección de muestras: distrito de Aramango, la Peca y Copallín, provincia de Bagua, región de Amazonas.	18
Figura 2. Cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao (distrito La Peca)	25
Figura 3. Cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao (distrito de Copallín).	28
Figura 4. Cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao (distrito de Aramango)	30

RESUMEN

En la presente tesis se identificó y cuantificó microscópicamente los microorganismos que fueron aislados de 144 muestras extraídas cada 12 horas producto de la fermentación espontánea del cacao criollo (*T. cacao* L.) en cajas fermentadoras de 600Kg. Para ello, se utilizaron técnicas microbiológicas para el aislamiento y recuento de cada muestra, utilizando AGAR SABORAUD, para el aislamiento de las levaduras, medios YPD y YGC para las BAA y MRS para las BAL. En consecuencia, después de realizadas las técnicas microbiológicas se logró identificar microscópicamente a las siguientes levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora uvarum*); así como bacterias ácido acéticas (*Acetobacter aceti*); y bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*); fueron identificadas por su morfología y coloración GRAM. En conclusión, mediante técnicas microbiológicas, se identificaron a las Bacterias Acido Lácticas (BAL), Bacterias Acido Acéticas (BAA) y levaduras siendo *S. cerevisiae*, *H. uvarum* predominante en la fermentación espontánea del cacao criollo.

Palabras clave: Identificación, microorganismos, fermentación, cacao

ABSTRACT

In this thesis, the microorganisms that were isolated from 144 samples extracted every 12 hours as a result of the spontaneous fermentation of creole cocoa (*T. cacao* L.) in 600Kg fermentation boxes were identified and microscopically quantified. For this, microbiological techniques were used for the isolation and counting of each sample, using AGAR SABORAUD, for the isolation of yeasts, YPD and YGC media for BAA and MRS for BAL. Consequently, after performing the microbiological techniques, it was possible to identify microscopically the following yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum*); as well as acetic acid bacteria (*Acetobacter aceti*); and lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*); they were identified by their morphology and GRAM staining. In conclusion, using microbiological techniques, Lactic Acid Bacteria (LAB), Acetic Acid Bacteria (BAA) and yeasts were identified, being *S. cerevisiae*, *H. uvarum* predominant in the spontaneous fermentation of Creole cocoa.

Keywords: Identification, microorganisms, fermentation, cocoa

I. INTRODUCCIÓN

Según Indecopi, 2015, el Perú es considerado uno de los principales centros de origen del cacao, esto debido a la alta variabilidad genética y gran diversidad verificable en los diferentes ecotipos, razas nativas y/o diferentes poblaciones de cacao existentes en el país (Indecopi,2015).

La Cooperativa Central de Productores Agrarios de Amazonas (CEPROA) de la región Amazonas, en el año 2016, fue acreedora del Certificado de Registro de la Décima Denominación de Origen, esta distinción fue otorgada mediante el Indecopi, con la finalidad de distinguir su producción de cacao nativo, en lo concerniente al grano seco fermentado de la variedad *Theobroma cacao* L, conocido entre la población como cacao nativo.

El Ministerio de Agricultura (MINAGRI, 2015) indica que el cacao criollo nativo, recurso natural de potencial desarrollo en la Región Amazonas, en su composición presenta componentes que promueven la formación de grupos fenólicos; así como microorganismos que influyen en la formación de los compuestos sensoriales, debido a estas características productores perteneciente a esta zona geográfica pueden utilizar esta denominación de origen para diferenciar su producto de otros semejantes, confiriéndoles una ventaja competitiva frente a otros productos existentes en el mercado, ya que esta denominación convierte al cacao producido por la Cooperativa Central de Productores Agrarios de Amazonas (CEPROA), en un producto con mayor atracción para los consumidores.

Estudios realizados acerca de la diversidad microbiana que participa activamente en la fermentación de los granos del cacao, la sucesión microbiana y las principales funciones que cumplen en la mejora de la fermentación del cacao, indican que principalmente la diversidad microbiana presente se debe a la microflora natural generada en las diferentes etapas de la cadena de valor tales como la manipulación, el transporte, las cajas de fermentación, los materiales para tapar los contenedores de fermentación, tales como los costales, entre otros (Sandhya, Yallappa, Varadaraj, Puranaik, Ljaganmohan et. al., 2015).

La microbiota presente en la fermentación espontánea del cacao está conformada por levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), esenciales para el éxito en la fermentación de la pulpa del cacao. En el proceso de fermentación, la levadura fermenta los carbohidratos contenidos en la pulpa mucilaginosa del cacao transformándola en

etanol y CO₂ (dióxido de carbono), las bacterias ácido lácticas convierten el ácido cítrico y otros carbohidratos presentes en la pulpa del cacao en ácido láctico, produciéndose un ligero aumento del pH y las bacterias ácido acéticas oxidan el etanol y el ácido láctico producido por las levaduras y las bacterias ácido lácticas respectivamente originando ácido acético.

Durante el proceso de fermentación producido dentro de las cajas de fermentación, se identifica un proceso clave que se produce cuando se da un aumento de la temperatura dentro de los granos de cacao, esto debido al metabolismo oxidativo microbiano del etanol hacia ácido acético, causando la muerte del embrión de los granos, desintegrando las membranas celulares y desarrollando conversiones enzimáticas de sustratos en el cotiledón de los granos de cacao. Todos estos procesos enzimáticos microbianos son los precursores de las características organolépticas, tales como sabor y color, de la fermentación completa del cacao (Thompson, Miller, López y Camu, 2013).

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general identificar y cuantificar los microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma *Theobroma cacao* L., en la Región Amazonas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en la Región Amazonas, en la Provincia de Bagua y en los distritos de Copallín, Aramango y La Peca. Del mismo modo, para efectuar el estudio se trabajó de la mano con los socios de la cooperativa APROCAM.

Las muestras de cacao nativo (*T. cacao* L.), fueron recolectadas entre los meses de enero a mayo de 2019.

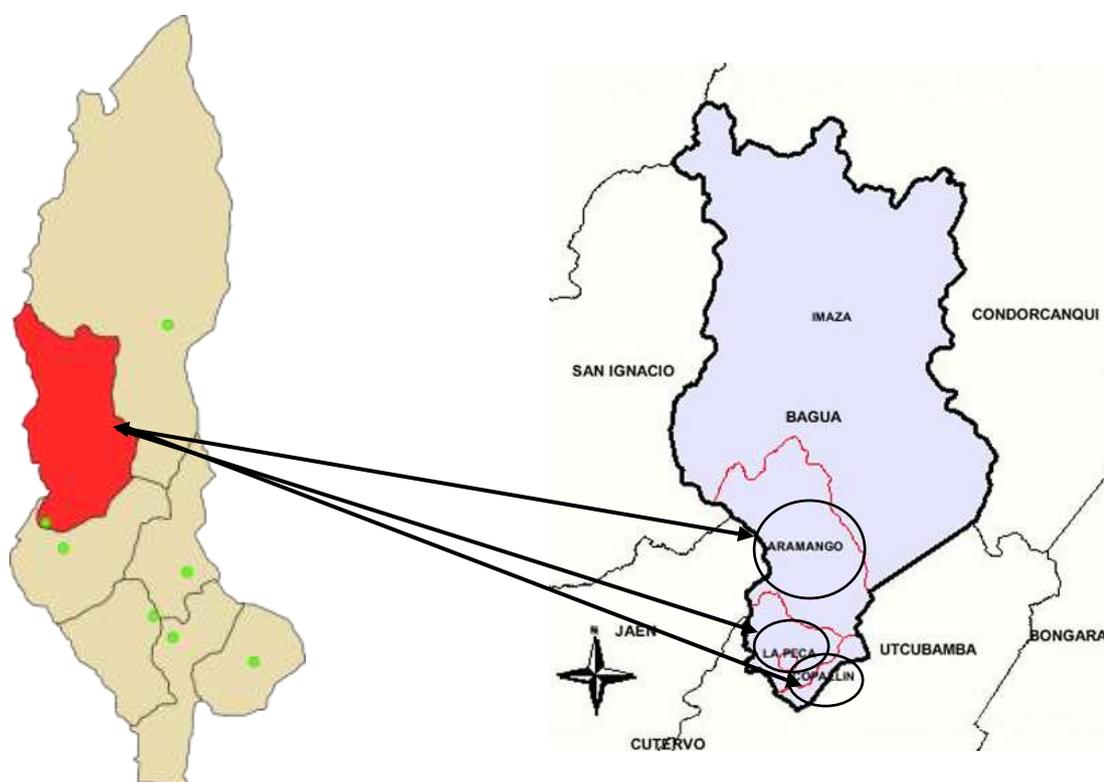


Figura 1. Ubicación geográfica del área de recolección de muestras: distrito de Aramango, la Peca y Copallín, provincia de Bagua, región de Amazonas.

2.2. Muestra

Inicialmente se trabajó con granos de cacao criollo provenientes de Copallín, La Peca y Aramango, cosechadas y procesadas en el Centro de Beneficiado de APROCAM, entre enero y mayo del 2019, los cuales fueron colocados en cajas de fermentación de 600 kg. De ahí se obtuvo muestras de cacao de aproximadamente 100 gramos y que fueron

colocados cuidadosamente en bolsas de primer uso con cierre hermético para luego ser colocadas en nitrógeno líquido para su conservación y transporte hasta el Laboratorio de la UNTRM en la ciudad de Chachapoyas.

2.3. Materiales y equipos

Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitado de vidrio borosilicato clase A de 50 y 100 mL.
- Pipetas serológicas graduadas de vidrio borosilicato clase A de 2, 5 y 10 mL.
- Micropipetas graduadas de 100 a 1000 uL (BOECO)
- Probetas graduadas de vidrio borosilicato clase A de 100 mL.
- Matraces de Erlenmeyer de vidrio borosilicato clase A de 500 mL.
- Matraces de Erlenmeyer de vidrio borosilicato clase A de 1000 mL.
- Balones de fondo plano de vidrio borosilicato clase A de 500 mL
- Balones de fondo plano de vidrio borosilicato clase A de 1000 mL
- Frascos de 500 ml Balones de fondo plano de vidrio borosilicato clase A de boca ancha tapa rosca celeste.
- Espátula tipo cuchara de acero inoxidable
- Gradillas para tubos de ensayo de 16 x160 mm
- Tubos de ensayos de vidrio borosilicato clase A de 16 x 160 mm
- Láminas para cámara de Neubauer milimetradas.
- Asa de Kolle con aro de nicrón
- Viales de vidrio para conservación de cepas o viales de polipropileno autoclavables.
- Bolsas de primer uso con cierre hermético
- Bagueta de vidrio para agitación.
- Bombilla o succionador de pipetas
- Mechero de vidrio.
- Algodón

Medios de Cultivo

- Caldo Sabouraud (MERCK)
- Agar Cuenta Gérmenes o Plate Count Agar (MERCK).

- Agua peptonada 0.10% (MERCK).
- Agar CYG (Medio carbonato-extracto de levadura-glucosa) (MERCK).
- Caldo Acetobacter (MERCK)
- Caldo MRS (MERCK)
- Caldo YG (extracto de levadura-glucosa) (MERCK)

Equipos

- Incubadora ICULLE.
- Estufa de convección forzada MEMMERT.
- Microscopio óptico DM 500 LEICA.
- Balanza de precisión SARTORIUS de 2100 g.
- Multiparámetro: T°, pH y oxígeno disuelto
- Autoclave digital de 20 litros
- Agitador vórtex
- Congeladora (-20°C)
- Tanque de nitrógeno líquido
- Cámara fotográfica digital

Reactivos

- Agua destilada.
- Aceite de inmersión.
- Set de coloración GRAM.
- Alcohol yodado.
- Ron de quemar

2.4. Metodología

En el presente estudio se usó métodos y técnicas microbiológica para aislar y cuantificar a los microorganismos presentes en la fermentación espontánea del cacao criollo (*T. cacao*). Las técnicas empleadas para la siguiente investigación fueron:

- a) Aislamiento de la microbiota presente en la fermentación del cacao criollo (*T. cacao*) fino de aroma.

- b) Caracterización macroscópica y microscópica de la microbiota presente en la fermentación espontánea del cacao criollo.
- c) Recuento de la microbiota presente en la fermentación espontánea del cacao criollo.

El procedimiento seguido para el desarrollo de la presente investigación según las técnicas microbiológicas empleadas fue el siguiente:

Recolección de la muestra:

Se recolectaron alrededor de 100 gramos de pulpa de cacao en baba cada doce (12) horas, posteriormente se extrajo los granos de cacao y se inició con la fermentación espontánea desde un tiempo cero hasta el séptimo día de duración del proceso, donde se obtuvo en total 15 muestras de cacao.

Para la toma de muestra de los granos de cacao, se abrió el fruto de forma manual y en estrictas medidas de asepsia se extrajeron los granos de cacao en baba y se colocaron en un frasco estéril. Luego se consideró como tiempo cero el inicio del proceso de fermentación en las cajas ubicadas en el Centro de Beneficio de APROCAM.

Para la recolección de muestras durante la fermentación desde la segunda toma de muestra a las 12 horas hasta el séptimo día, se realizaron con la ayuda de un cucharón de mango largo de fácil limpieza y desinfección, se recolectaron las muestras en la superficie y a 25 cm de profundidad de la masa de fermentación en cinco puntos diferentes del cajón.

Las muestras se colocaron en bolsas de plástico resistentes y con cierre hermético y se transportaron en nitrógeno líquido hasta el laboratorio para su análisis microbiológico.

Posteriormente las muestras en el laboratorio se sometieron a siembra y aislamiento de la carga microbiana.

Aislamiento de microorganismo:

Se preparó la muestra, pesando asépticamente 20 gramos de pulpa de cacao que fueron lavados en 90 ml de agua peptonada al 0.1% mezclados manualmente por un minuto.

Enriquecimiento de la muestra en caldos de cultivo selectivos: Se tomaron 10 ml de la muestra preparada y se sembró en 90 ml de caldo papa dextrosa (para levaduras), caldo

acetobacter y caldo YG (para BAA) y caldo MRS y caldo M17 (para BAL). Se incubaron los frascos a una temperatura de 30 °C por 2 a 7 días. Se tendrá en cuenta que para la incubación de BAL se debe considerar un ambiente microaerófilico.

Identificación y selección de las colonias microbianas: Se realizaron una coloración GRAM a las colonias que presentaron diferentes características fenotípicas, identificándose Bacilos GRAM positivos, Bacilos GRAM negativos y células ovoides típicas de levaduras. Finalmente, se verificó la pureza de los cultivos (cultivos axénicos), sembrándose nuevamente las colonias identificadas al microscopio en medios de cultivo selectivos y diferenciales para luego ser seleccionadas y conservadas en nitrógeno líquido en viales con medios de cultivo Agar Sabouraud (levaduras) y Agar extracto de levadura (bacilos bacterianos). Luego de ello se reactivaron todas las cepas seleccionadas para la identificación bioquímica.

Recuento de microorganismo:

Para el recuento se pesó 20 gramos de pulpa de cacao y se lavaron en 90 ml de agua peptonada al 0.1%, mezclando manualmente por un minuto. Luego se tomó 1 ml de la mezcla y se agregó 9 ml de diluyente agua peptonada al 0.1% hasta obtener la dilución 10⁻², continuándose con las demás diluciones seriadas.

Posteriormente se sembró por duplicado 1ml de cada una de las muestras diluidas por la técnica de siembra por incorporación y 0,1 ml para la siembra en superficie en los medios de cultivo de Agar Sabouraud (para levaduras), Agar MRS y ROGOSA (para BAL) y Agar CYG, RAE, DMS y MEP (para BAA). Se tuvo en cuenta el pH comprendido entre 4 a 5.6 de los medios utilizados. Las placas fueron incubadas por 2 a 7 días a temperaturas de 28 a 30°C, según la técnica de recuento de Romero et al. (2012) y Sengun et al. (2009). Para la incubación y aislamiento de los BAL, se deberá considerar en condiciones de microaerofilia.

Recuento en placa de los microorganismos aislados: Luego, se realizó el recuento de las placas donde hubo crecimiento microbiano, identificando tanto levaduras como bacterias en los diferentes días de fermentación. Se realizó una coloración GRAM a las colonias que presentaron diferentes características fenotípicas, identificándose Bacilos GRAM positivos, Bacilos GRAM negativos y células ovoides típicas de levaduras. Se reportó el

recuento de microorganismos en unidades formadoras de colonia (UFC/ml o g). Finalmente, se verificó la pureza de los cultivos, sembrándose nuevamente las colonias identificadas al microscopio en medios de cultivo selectivos y diferenciales para luego ser seleccionadas y conservadas en nitrógeno líquido en viales con medios de cultivo Agar Sabouraud (levaduras) y Agar extracto de levadura (bacilos bacterianos).

2.5. Análisis de datos

Para realizar el análisis de datos, en la presente investigación, se aplicó estadística descriptiva con la finalidad de caracterizar las variables de estudio, así mismo se construyeron tablas y figuras para ilustrar los datos.

III. RESULTADOS

3.1. Identificación y cuantificación de microorganismos en la fermentación espontánea de cacao en el distrito de La Peca

Tabla 1. Microorganismos identificados en la fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de La Peca.

Bacilos ácido-acéticos	Bacilos ácido-lácticos	Levaduras
<i>Acetobacter sp.</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
<i>Gluconobacter sp.</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Pichia sp.</i>
		<i>Candida sp.</i>
		<i>Hanseniaspora sp.</i>

Después del aislamiento de los microorganismos en el distrito de La Peca en el medio Sabouraud a levaduras, MRS para las bacterias ácido acéticas y YGC para bacterias ácido acéticas logrando identificar según la morfología de los microorganismos; en la tabla 01 se observa que en el cacao en baba durante el proceso de fermentación se presentaron a las Bacterias Acido Acéticas de los siguientes géneros; *Acetobacter sp.* y *Gluconobacter sp.* a las bacterias ácido lácticas; *Leuconostoc sp.* y *Lactobacillus sp.* y las levaduras *Saccharomyces sp.*; *Pichia sp.*; *Candida sp.*; *Hanseniaspora sp.*

Tabla 2. Recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de La Peca.

Día	Tiempo (h)	Bacilos ácido-acéticos	Bacilos ácido-lácticos	Levaduras
0	0	1.37E+04	1.67E+02	0
1	12	3.97E+03	3.30E+00	2.20E+03
1	24	1.95E+04	7.63E+04	1.76E+04
2	36	6.98E+04	3.07E+05	2.30E+04
2	48	1.67E+05	3.67E+05	1.30E+06
3	60	1.73E+07	4.87E+08	6.60E+07
3	72	3.55E+07	6.70E+03	8.00E+06
4	84	7.82E+03	3.30E+02	1.41E+05
4	96	1.70E+04	3.30E+04	3.00E+04

5	108	6.99E+04	1.67E+04	2.00E+05
5	120	1.97E+05	3.30E+04	3.70E+05
6	132	2.15E+05	1.00E+04	6.00E+06
6	144	1.99E+05	8.00E+05	8.00E+07
7	156	4.00E+07	1.67E+05	0
7	168	3.43E+08	0	0
8	180	In	6.70E+07	3.00E+07

En la tabla 2 y figura 2 se muestra el recuento de microorganismos aislados en el proceso de fermentación del cacao criollo donde se observó la variación en las cargas microbianas durante el proceso. Estas variaciones están representadas mediante el crecimiento en los medios de cultivos para levaduras, BAA y BAL.

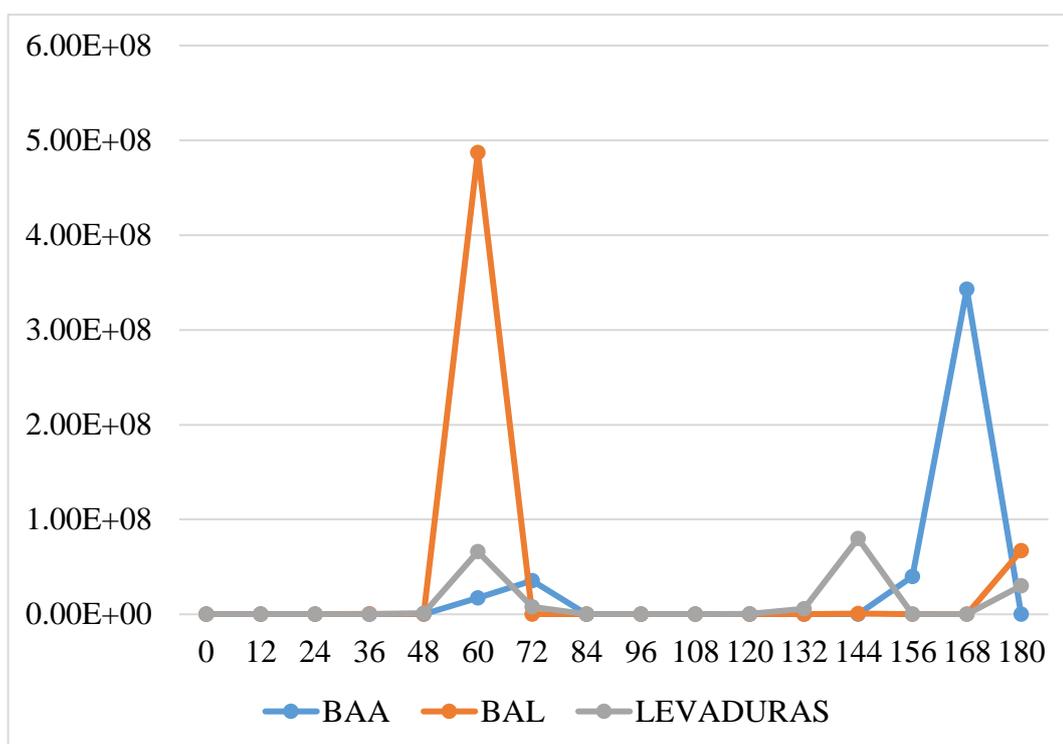


Figura 2. Cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao (distrito La Peca)

El día 0, tiempo 0 corresponde a la presencia de microorganismos del cacao en baba al momento del ingreso al cajón fermentador, en donde se observa la presencia de bacterias ácido lácticas, y bacterias ácido acéticas. A partir del día 1, tiempo 12 hasta el día 6 tiempo 144, existe la presencia de levaduras, mismas que, junto a la presencia de bacterias ácido lácticas, y bacterias ácido acéticas muestran una dinámica propia de crecimiento.

Para los días 7, tiempo 156 y día 7 a las 168 horas transcurridos el proceso de fermentación, se observa que las levaduras y las bacterias ácido lácticas desaparecen, no así bacterias ácido acéticas aumentan de forma exponencial. El día 8, está relacionado a los datos de presencia de microorganismos encontrados al inicio del proceso de secado.

3.2. Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea de cacao en el Distrito de Copallín

Tabla 3. Microorganismos identificados en la fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Copallín.

Bacilos ácido-acéticos	Bacilos ácido-lácticos	Levaduras
<i>Acetobacter sp.</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
<i>Gluconobacter sp.</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Pichia sp.</i>
		<i>Candida sp.</i>
		<i>Hanseniaspora sp.</i>

Se identificaron según la morfología de los microorganismos a las Bacterias Acido Acéticas; *Acetobacter sp.* y *Gluconobacter sp.* a las bacterias acido lácticas; *Leuconostoc sp.* y *Lactobacillus sp.* y por último a las levaduras *Saccharomyces sp.*; *Pichia sp.*; *Candida sp.*; *Hanseniaspora sp.*

Se muestra el recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo provenientes de Copallín, donde es reporta la variación en las cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao. Estas variaciones están representadas mediante el crecimiento en agar Sabouraud para levaduras, agar MRS para bacterias ácido lácticas; y agar YGC para bacterias ácido acéticas.

Tabla 4. Recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Copallín.

Día	Tiempo (h)	Bacilos ácido-acéticos	Bacilos ácido-lácticos	Levaduras
1	12	3.97E+03	3.20E+00	2.20E+03
1	24	1.85E+04	7.63E+04	1.76E+04
2	36	6.78E+04	3.07E+05	2.30E+04
2	48	1.57E+05	3.87E+05	1.30E+06
3	60	1.73E+07	4.97E+08	6.60E+07
3	72	3.35E+07	6.70E+03	8.00E+06
4	84	7.82E+03	3.30E+02	1.41E+05
4	96	1.70E+04	3.30E+04	3.00E+04
5	108	6.89E+04	1.67E+04	2.00E+05
5	120	1.97E+05	3.30E+04	3.70E+05
6	132	2.25E+05	1.00E+04	7.00E+06
6	144	1.99E+05	8.00E+05	9.00E+07
7	156	4.00E+07	1.67E+05	0
7	168	3.33E+08	0	0

El día 0, tiempo 0 corresponde a la presencia de microorganismos del cacao en baba al momento del ingreso al cajón fermentador, en donde se observa la presencia de bacterias ácido lácticas, y bacterias ácido acéticas (ver fig. 3). A partir del día 1, tiempo 12 hasta el día 6 tiempo 144, existe la presencia de levaduras, mismas que, junto a la presencia de bacterias ácido lácticas, y bacterias ácido acéticas muestran una dinámica propia de crecimiento. Para los días 7, tiempo 156 y día 7 a las 168 horas transcurridos el proceso de fermentación, se observa que las levaduras y las bacterias ácido lácticas desaparecen, no así bacterias ácido acéticas aumentan de forma exponencial. El día 8, está relacionado a los datos de presencia de microorganismos encontrados al inicio del proceso de secado.

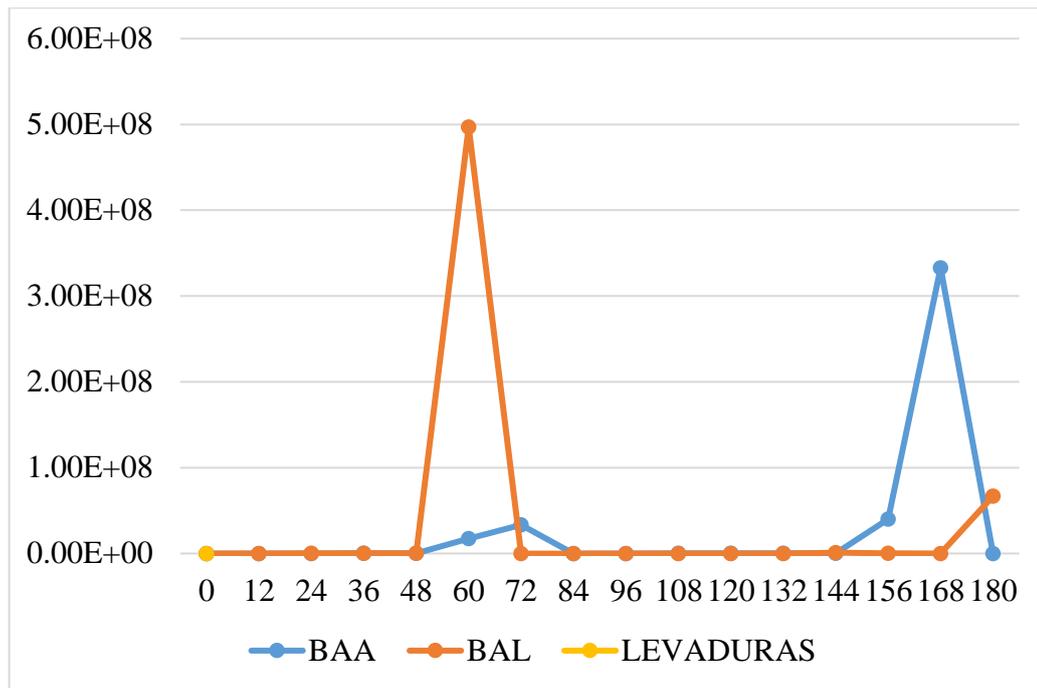


Figura 3. Cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao (distrito de Copallín).

3.3. Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea de cacao en el Distrito de Aramango

Tabla 5. Microorganismos identificados en la fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Aramango.

Bacilos ácido-acéticos	Bacilos ácido-lácticos	Levaduras
<i>Acetobacter sp.</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>
		<i>Hanseniaspora sp.</i>

Se identificó según la morfología de los microorganismos a las Bacterias Acido Acéticas; *A. aceti* a las bacterias acido lácticas; *L. plantarum* y por último a las levaduras *S. cerevisiae*, *H. uvarum*.

Tabla 6. Recuento de microorganismos aislados del proceso de fermentación espontánea del cacao criollo del distrito de Aramango

Día	Tiempo (h)	Bacilos ácido-acéticos	Bacilos ácido-lácticos	Levaduras
0	0	8.00E+00	2.70E+02	3.10E+04
1	12	9.00E+00	2.80E+02	3.10E+04
1	24	9.00E+00	2.80E+02	3.00E+04
2	36	9.00E+00	3.00E+02	3.20E+04
2	48	1.60E+01	3.30E+02	4.20E+05
3	60	1.80E+01	4.10E+02	5.60E+05
3	72	2.50E+02	4.70E+03	7.00E+06
4	84	2.60E+02	4.70E+03	7.80E+06
4	96	2.80E+02	4.70E+04	8.00E+06
5	120	1.90E+03	3.60E+05	2.50E+04
5	132	2.50E+04	4.00E+04	5.00E+04
6	144	2.40E+04	4.10E+04	6.00E+04
6	150	1.90E+06	8.00E+04	8.00E+03
7	156	4.00E+07	6.70E+03	7.00E+03
7	168	5.00E+07	5.70E+03	5.00E+03
8	180	4.40E+08	5.70E+02	3.20E+03
8	192	3.90E+08	5.00E+02	5.00E+02

Se observa el recuento de microorganismos la variación en las cargas microbianas durante el proceso de fermentación de cacao. Estas variaciones están representadas mediante el crecimiento de levaduras en agar Sabouraud, bacterias ácido lácticas en agar MRS; y bacterias ácido acéticas en agar YGC.

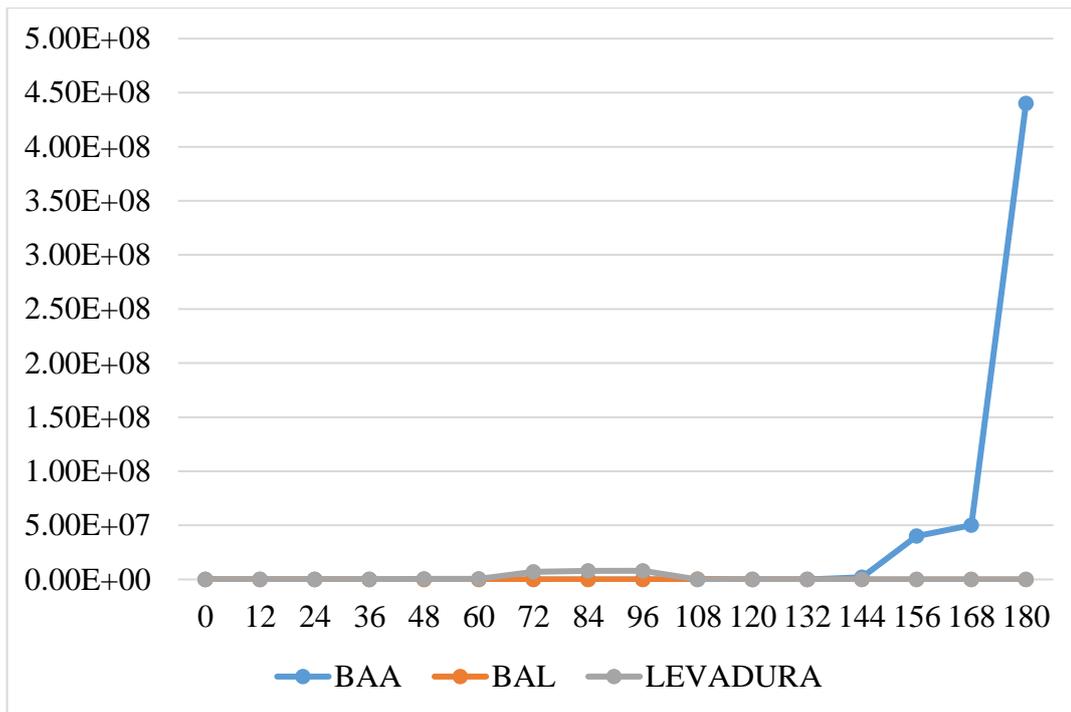


Figura 4. Cargas microbianas en el proceso de fermentación de cacao (distrito de Aramango)

El día 0, tiempo 0 corresponde a la presencia de microorganismos del cacao en baba al momento del ingreso al cajón fermentador, en donde se observa la presencia de bacterias ácido lácticas, y bacterias ácido acéticas. A partir del día 1, tiempo 12 hasta el día 6 tiempo 144, existe la presencia de levaduras, mismas que, junto a la presencia de bacterias ácido lácticas, y bacterias ácido acéticas muestran una dinámica propia de crecimiento. Para los días 7, tiempo 156 y día 7 a las 168 horas transcurridos el proceso de fermentación, se observa que las levaduras y las bacterias ácido lácticas desaparecen, no así bacterias ácido acéticas aumentan de forma exponencial. El día 8, está relacionado a los datos de presencia de microorganismos encontrados al inicio del proceso de secado.

En la tabla 6 se muestra la variación de las cargas microbianas durante el proceso de fermentación de cacao. Estas variaciones están representadas mediante el crecimiento de levaduras en agar Sabouraud, bacterias ácido lácticas en agar MRS; y bacterias ácido acéticas en agar YGC. Durante el análisis microbiológico se observó que el crecimiento de los microorganismos no se evidencia salvo en el tiempo 156, 168 y 180 el crecimiento bacterias ácido acéticas.

IV. DISCUSIÓN

Se determinó la presencia y cuantificación de muestras de cacao procedentes de tres distritos de la provincia de Bagua donde mediante técnicas microbiológicas se aislaron y cuantificaron a los microorganismos tomados cada 12 horas durante el proceso fermentativo. De tal manera los resultados obtenidos son objeto de discusión en comparación a los trabajos de investigación que se muestran a continuación:

Pese a que, investigaciones como las de Cleenwerck et al., (2008) realizadas en Ghana, identificó en la fermentación espontánea de cacao en la presencia de los siguientes grupos de bacterias: BAA y BAL; en la presente investigación se identificaron también: BAA y BAL, para los 3 distritos, mostrándose así que, en cacao en baba la fermentación está influenciada por al menos los grupos de bacterias BAA y BAL.

Respecto a la presencia de bacilos ácido acéticos, identificados en la fermentación espontánea en cacao de baba en Ghana (Cleenwerck et al., 2008), guarda una mayor relación con la presente investigación por la coincidencia en la presencia de *Acetobacter sp.*, así también, coincide por lo mencionado por Ardhana y Fleet (2003), para quienes *Acetobacter* y *Gluconobacter* se encuentran comúnmente en la fermentación de granos de cacao.

En los microorganismos identificados como BAL los lactobacilos denominados con *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactococcus* en la presente investigación. Ardhana, (2003) estudió la ecología microbiana de la fermentación del grano (cultivares Forastero y Trinitario) en tres fermentadores comerciales en Java Oriental, Indonesia, en intervalos de 12 horas durante todo el proceso, concluyendo que los primeros 2-3 días de fermentación se caracterizan por el crecimiento sucesional de varias especies de hongos filamentosos, levaduras, bacterias de ácido láctico y bacterias de ácido acético. Las principales especies encontradas fueron *P. citrinum*, *K. apis*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* y *A. pasteurianus*. Mientras que las últimas etapas de la fermentación estuvieron dominadas por la presencia de especies de *Bacillus*, en su mayoría *B. pumilus* y *B. licheniformis*, géneros coincidentes con la presente investigación.

En el grupo de las levaduras se identificó *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *Saccharomyces* sp, *Pichia* sp, *Candida* sp, *Hanseniaspora* sp., datos coincidentes con los encontrados por Nielsen et al. (2007), quien identificó durante las primeras 24 horas los mismos géneros mencionados. La *Hanseniaspora* sólo se le encuentra ocasionalmente en las fases posteriores, al igual que la presente investigación.

Nielsen et al. (2007), identificó también las levaduras *C. zemplinina*, *C. silvae*, *C. zemplinina*, reportada en un tiempo entre 36 a 38 horas y a *S. cerevisiae* y *P. membranaefaciens*, dominando al final de la fermentación; géneros de levaduras coincidentes con la presente investigación, a nivel de *Candida* y *Saccharomyces*. El género *Pichia* sp. No se presentó en ninguno de los lugares ni en ninguno de los tiempos de fermentado de baba de cacao en la presente investigación.

Miescher (2016), examinó la biodiversidad microbiana de la fermentación de granos de cacao por aislamiento de microorganismos en regiones productoras de cacao, seguido por MALDI-TOF MS en Suiza provenientes de Brasil, identificó *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*; géneros presentes también en la presente investigación para las 3 zonas de estudio: La Peca, Copallín y Aramango.

Pereira et al. (2012), realizaron una investigación de fermentaciones espontáneas de cacao en grano en recipientes de plástico y de acero inoxidable, informando que el BAL y las levaduras se desarrollaron simultáneamente, al igual que lo sucedido en esta investigación para el caso de los 3 distritos.

Así también Pereira et al. (2012) menciona que las BAL alcanzaron una población máxima de 8 log UFC g⁻¹ después de 12 h de fermentación; mientras que en esta investigación alcanzaron un promedio de 9 log UFC g⁻¹ en promedio después de 12 horas de transcurrida la fermentación.

Respecto a la cuantificación de BAA, mientras que en la investigación de Pereira et al. (2012), la población de BAA comenzó a desarrollarse después de 12 h con 5.20 log UFCg⁻¹ en depósitos cónicos y 6.36 log UFC g⁻¹ de acero inoxidable, en la presente investigación se desarrolló AAB a las 48 horas con 5 log UFC g⁻¹ en cajas fermentadoras de madera.

Papalexandratou et al. (2011), mencionaron que los recuentos de levadura y BAL se mantiene en niveles altos a lo largo de las fermentaciones de la plataforma, al igual que en esta investigación donde a los 7 días se obtuvieron valores de hasta $3.20E+03$ y $4.40E+08$ de levadura y BAL respectivamente.

Así mismo, Camu et al., (2007), identificaron la dinámica del crecimiento de, BAL BAA y Levaduras, en donde, el recuento muestra un mayor crecimiento para BAL, no así para BAA y Levaduras donde la población disminuye ligeramente con la fermentación prolongada y a veces se estabiliza, tal como se muestra en los resultados provenientes de la fermentación espontánea en cajones de madera realizados en el presente estudio.

V. CONCLUSIONES

En el grupo de las levaduras durante el proceso de la fermentación se identificó los géneros *Saccharomyces sp*, *Hanseniaspora sp*, *Saccharomyces sp*, *Pichia sp*, *Candida sp*, *Hanseniaspora sp*.

En el caso de las bacterias ácido lácticas aisladas se identificaron los géneros *Lactobacillus sp*, *Leuconostoc sp*. *Lactobacillus sp*.

En cuando a las bacterias ácido acéticas aisladas los microorganismos identificados pertenecían a los géneros *Acetobacter sp* y *Gluconobacter sp*.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar la identificación molecular de las cepas aisladas.

Identificar las actividades bioquímicas de cada especie dentro del proceso de fermentación y su importancia en la generación de sabor y aroma del chocolate.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardhana, M. (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)
- Batista, L. (2009). *El cultivo del cacao (Primera)*. Santo Domingo, República Dominicana.
- Bortolini, C. (2017). *Characterization of microbial biodiversity in fermented cocoa beans (Tesis Doctoral)*. Università Cattolica Del Sacro Cuore.
- Cleenwerck, I., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2008). *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2180-2185. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65778-0>
- FAO. (2013). *Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s17.pdf>
- Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. (s. f.). 8.
- INDECOPI. (2015). *Cacao: Theobroma cacao*. Gobierno del Perú.
- Marcano, L. Eduardo. (2016). *Aislamiento y Caracterización de Bacterias Ácido Acéticas presentes en la Fermentación de Cacao variedad Carenero*. Universidad Simon Bolivar.
- MINAGRI-DGPA-DEEIA, C. (2015). *Estudio del cacao en el Perú y en el mundo Un análisis de la producción y e comercio (Primera)*. Lima, Perú: Ministerio de Agricultura.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International*

Journal of Food Microbiology, 114(2), 168-186.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>

Sengun, I. Y., Nielsen, D. S., Karapinar, M., & Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 105-111.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.033>

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J. A., Uzel, N. G., & Goodson, J. M. (2004). Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(6), 352-362. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x>

Teneda, W. F. (2016). *Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao*. Ecuador: Universidad Nacional de Andalucía.

Angarita, M., Torres, M. & Díaz, K. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. *Revisión de la literatura. Haban cienc méd* (16) 5.

González, D., Sueros, S., Vegas, C. & Zavaleta, A. (2016). Caracterización molecular de los microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají “Charapita” (*Capsicum frutescens*). *Agronomía Colombiana* (34).

Afoakwa, E.O. (2010). *Chocolate science and technology*. Willey-Blackwell. Oxford, United Kingdom.

Aikpokpodion PE, Dongo LN. Effects of Fermentation Intensity on Polyphenols and Antioxidant Capacity. *Int J Sustain Crop Prod*. 2010;5(4):66–70.

Barel, M. (1997). La fermentation du cacao: le moyen de l’apprécier et de la maîtriser. *Ind. Alim. Agr.* 114, 211-214.

Barrientos Felipa, P. (2015). La cadena de valor del cacao en Perú y su oportunidad en el mercado mundial. *Semestre Económico*, 18(37), 129-156.

Bergey DH, Holt JG. *Bergey’s* (2002). *Manual of determinative bacteriology*. 9 ed.

Williams & Wilkins; 2000. 787 p.

Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, et al. (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 Environ Microbiol.* 3(6):1809–24.

Camu, N. González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K. y De Vuyst, I. (2008). Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of population of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean box heap fermentation in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 86-98.

Cleenwerck, I.; Camu, N.; Engelbeen, K.; Winter, T.; Vandemeuleboecke, K.; De Vos, P., & De Vuyst, L. (2007) *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *Int J Sys Evol Microbiol* (57) 1647–1652.

Da Veiga Moreira I, da Cruz M, Miguel P, Ferreira W, Ribeiro D, Freitas R. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *FRIN* [Internet]. 54(1):9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>.

De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume three (the Firmicutes). 2009. 1450 p.

García-Alamilla, P., Salvador, B. A., Ramos, T.W., Bautista, E., Sol. S. S. Urrieta-Saltijeral, J. M. y García-Alvarado M. A. (2002). Cinética de acidez volátil a través del proceso de fermentación y secado de cacao. *Memorias in extenso del III Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI2002*. Querétaro, Qro. p 107-116.

Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). *J Appl Bot Food Qual.* 2013; 86:90–8.

- Kadow D, Niemenak N, Rohn S, Lieberei R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2015;62(1):357–Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>.
- Kongor JE, Hinneh M, Walle D Van De, Afoakwa O, Boeckx P, Dewettinck K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review. *FRIN* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>.
- Kurtzman CP, Fell J., Boekhout T. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 2011.537 p.
- Ministerio de Agricultura (MINAGRI). Estudio del CACAO en el Perú y en el Mundo [Internet]. (2015). p. 90. Available from: agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/.../estudio_cacao_para_iica.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*. Volumen: 85(6):917–24.
- Morales, O., Borda, A., Argandoña, A., Farach, R., García, L. & Lazo, K. (2015). *La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva del cacao fino de aroma*. Lima. ESAN.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzappel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture- dependent and culture-independent methods. *International Journal Food Microbiology*, (114) 168-186.
- Ouattara H, Ouattara H, Droux M, Reverchon S, Nasser W, Niamke SL. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *Int J Food Microbiol* [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>.
- Ouattara D, Ouattara H, Adom J, Goualié B, Koua G, Doué G, et al. (2016). Screening

of Lactic Acid Bacteria Capable to Breakdown Citric Acid during Ivorian Cocoa Fermentation and Response of Bacterial Strains to Fermentative Conditions. *Br Biotechnol J* [Internet].;10(3):1–10. Available from: <http://sciencedomain.org/abstract/11816>.

Papalexandratou Z, Camu N, Falony G, De Vuyst L. (2011). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiol* [Internet]; 28(5):964–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.010>.

Papalexandratou Z, Vrancken G, de Bruyne K, Vandamme P, de Vuyst L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiol* [Internet].;28(7):1326–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>.

Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J.C., Amores, F., Daniel, H.M. y De Vuyst, L. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7698-7714.

Schwan, R. F. y Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 44, 205-221.

Pereira GV de M, Socol VT, Socol CR. (2016) Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Curr Opin Food Sci.* 7:50–7.

Perú 21 (2017). 36% de la producción mundial de cacao se concentra en territorio nacional. *Diario Periodístico*. Lima.

Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(4):238-45.

Romero, T.; Robles, V., Rodriguez, G. & Ramírez, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *Afr J Microbiol*

Res 6(2):339-347.

- Rojas R. (2015). Estudio del proceso postcosecha y caracterización morfológica sensorial-molecular de 3 variedades de cacao nativos de Cusco, Junín y Piura. Lima. 82 p.
- Sengun, I. & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*. (22):647-656.
- Schwan RF, Wheals AE (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44(4):205–21.
- Sengun, I., Nielsen, S., Karapinar, M., & Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal Food Microbiology*, (135).
- Tonouchi N. *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. 2016. 299-320 p.
- Yamada, Y., Yukpan, P., Vu, H.; Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasapuwat, S. & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). *J Gen Appl Microbiol* (58). 397-404.
- Barrientos Felipa, P. (2015). La cadena de valor del cacao en Perú y su oportunidad en el mercado mundial. *Semestre Económico*, 18(37), 129-156.
- Cleenwerck, I.; Camu, N.; Engelbeen, K.; Winter, T.; Vandemeuleboecke, K.; De Vos, P., & De Vuyst, L. (2007) *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *Int J Sys Evol Microbiol* (57) 1647–1652.
- Morales, O., Borda, A., Argandoña, A., Farach, R., García, L. & Lazo, K. (2015). *La Alianza Cacao Perú y la cadena productiva del cacao fino de aroma*. Lima. ESAN.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel,

W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture- dependent and culture-independent methods. *International Journal Food Microbiology*, (114) 168-186.

Perú 21 (2017). 36% de la producción mundial de cacao se concentra en territorio nacional. *Diario Periodístico*. Lima.

Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(4):238-45.

Romero, T.; Robles, V., Rodriguez, G. & Ramírez, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *Afr J Microbiol Res* 6(2):339-347.

Sengun, I. & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*. (22):647-656.

ANEXOS

Anexo A. Método para tinción

Tinción Gram:

Para lograr la tinción Gram, primero se agrega el cristal violeta, de tal manera que se cubra el extendido bacteriano a su totalidad, luego se deja actuar por 60 segundos. Seguidamente se agrega el Lugol, solo la cantidad suficiente y se deja actuar por 60 segundos, a continuación, se enjuaga con agua y se agrega una o dos gotas de alcohol-acetona e inmediatamente se enjuaga con agua corriente. Posteriormente se agrega Safranina, solo la suficiente, y se deja actuar durante 60 segundos, luego se enjuaga con agua y se deja secar a temperatura ambiente, para finalmente observar en un microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.

Anexo B. Galería fotográfica



Fotografía 1. Toma de muestra de cacao en fermentación



Fotografía 2. Muestras de cacao fermentado en bolsas de primer uso cada 12 horas



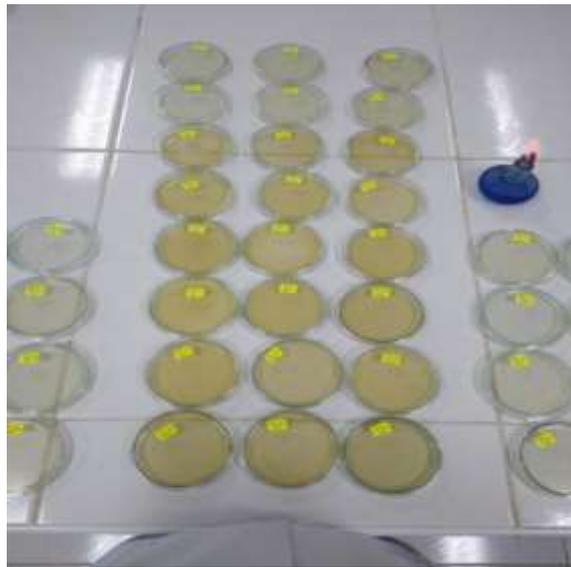
Fotografía 3. Preparación de materiales y medios de cultivo



Fotografía 4. Procesamiento de las muestras de cacao recolectadas de las cajas de fermentación en APROCAM



Fotografía 5. Proceso de reactivación de los cultivos microbianos seleccionados



Fotografía 6. Recuento de colonias de microorganismos de granos de cacao fermentado



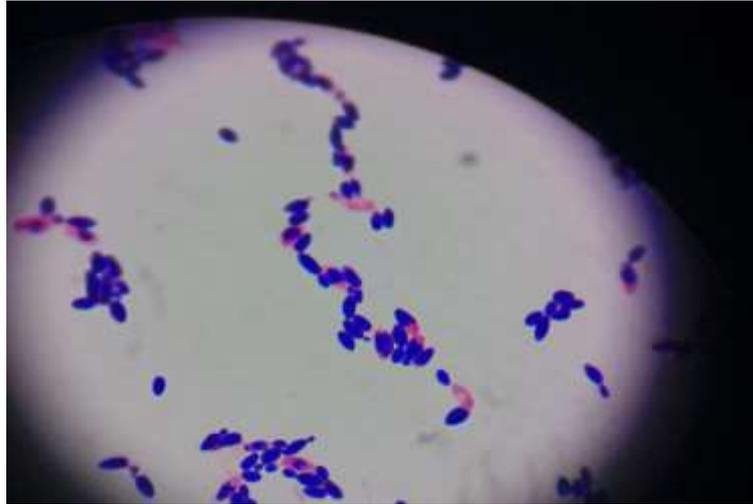
Fotografía 7. Medios de cultivo líquidos para la reactivación de las cepas aisladas y seleccionadas para el cultivo iniciador



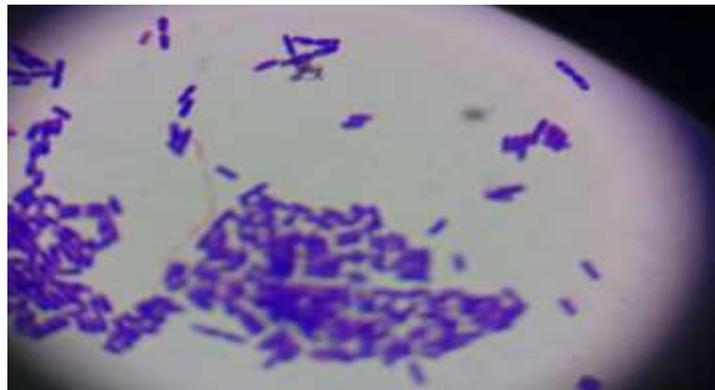
Fotografía 8. Observación de las características culturales de las colonias y recuento de levaduras



Fotografía 9. Observación de las características culturales de las colonias y recuento de bacterias



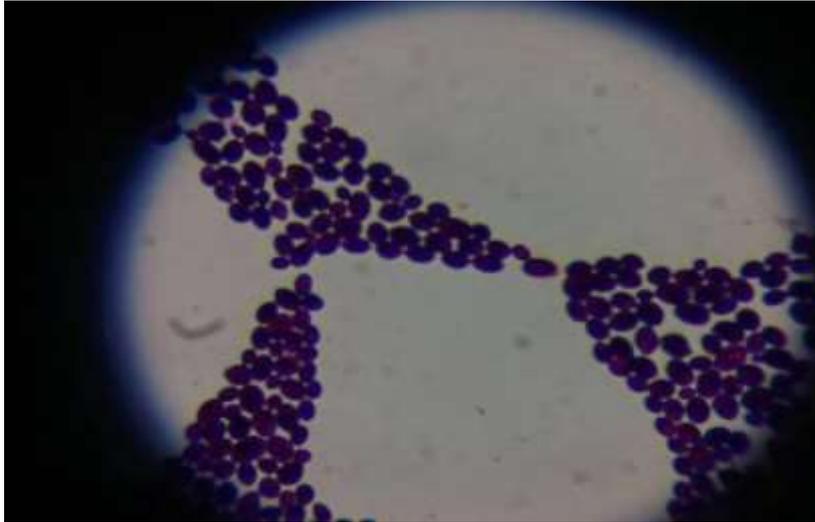
Fotografía 10. Observación microscópica de levaduras seleccionadas como cepas puras



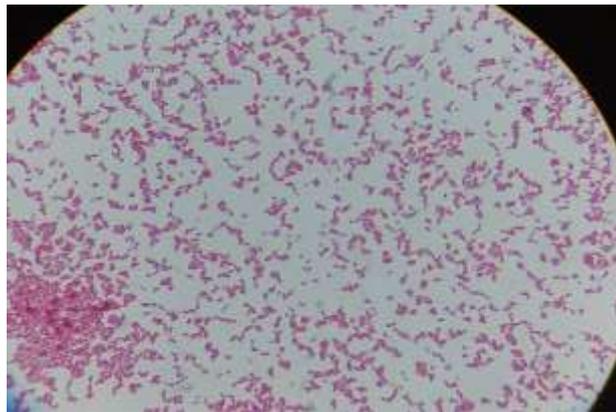
Fotografía 11. Observación microscópica de bacterias seleccionadas como cepas puras
(BAL)



Fotografía 12. Observación microscópica de bacterias seleccionadas como cepas puras
(BAA)



Fotografía 13. Observación microscópica de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, células grandes, ovaladas, algunas en gemación



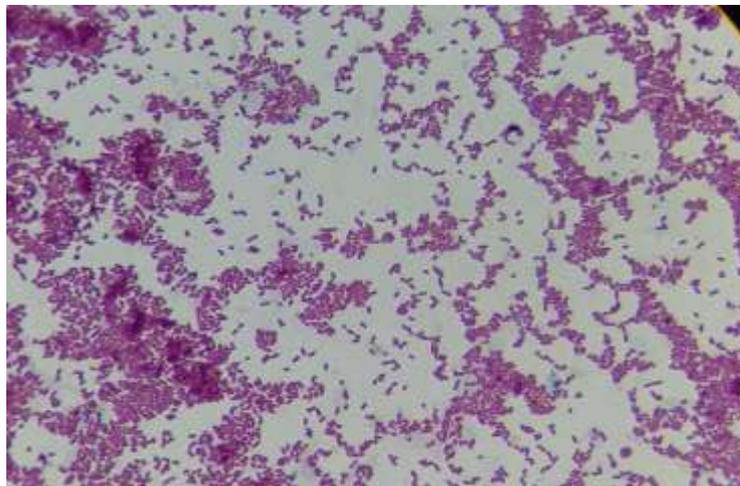
Fotografía 14. Observación microscópica de bacilos Gram negativos, bacilos cortos y pequeños



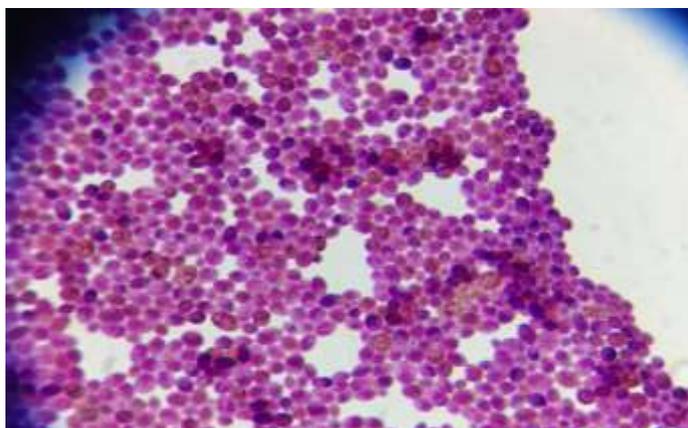
Fotografía 15. Observación microscópica de cocos Gram positivos, forma de agrupación diplococo y tétrada. También se observan células aisladas.



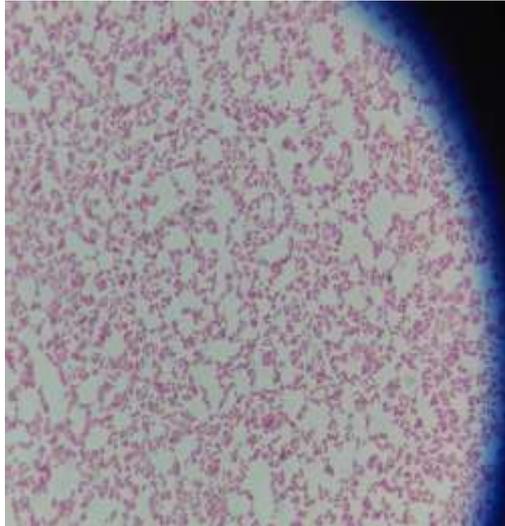
Fotografía 16. Observación microscópica de cocobacilos Gram positiva



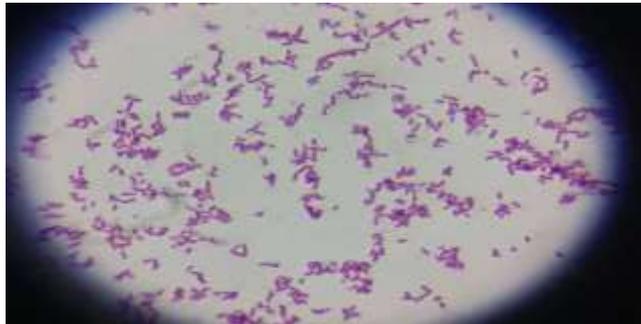
Fotografía 17. Observación microscópica de bacilos Gram positivos, se observan células individuales y en cadenas



Fotografía 18. Observación microscópica de levaduras, formas ovoides y grandes



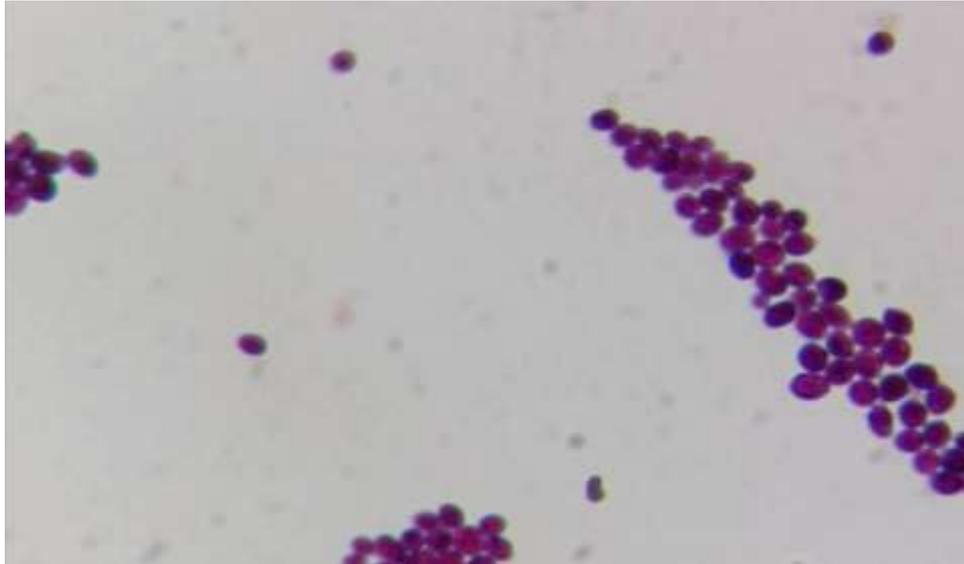
Fotografía 19. Observación microscópica de bacilos pequeños Gram negativos



Fotografía 20. Observación microscópica de bacilos cortos y gruesos Gram positivos,



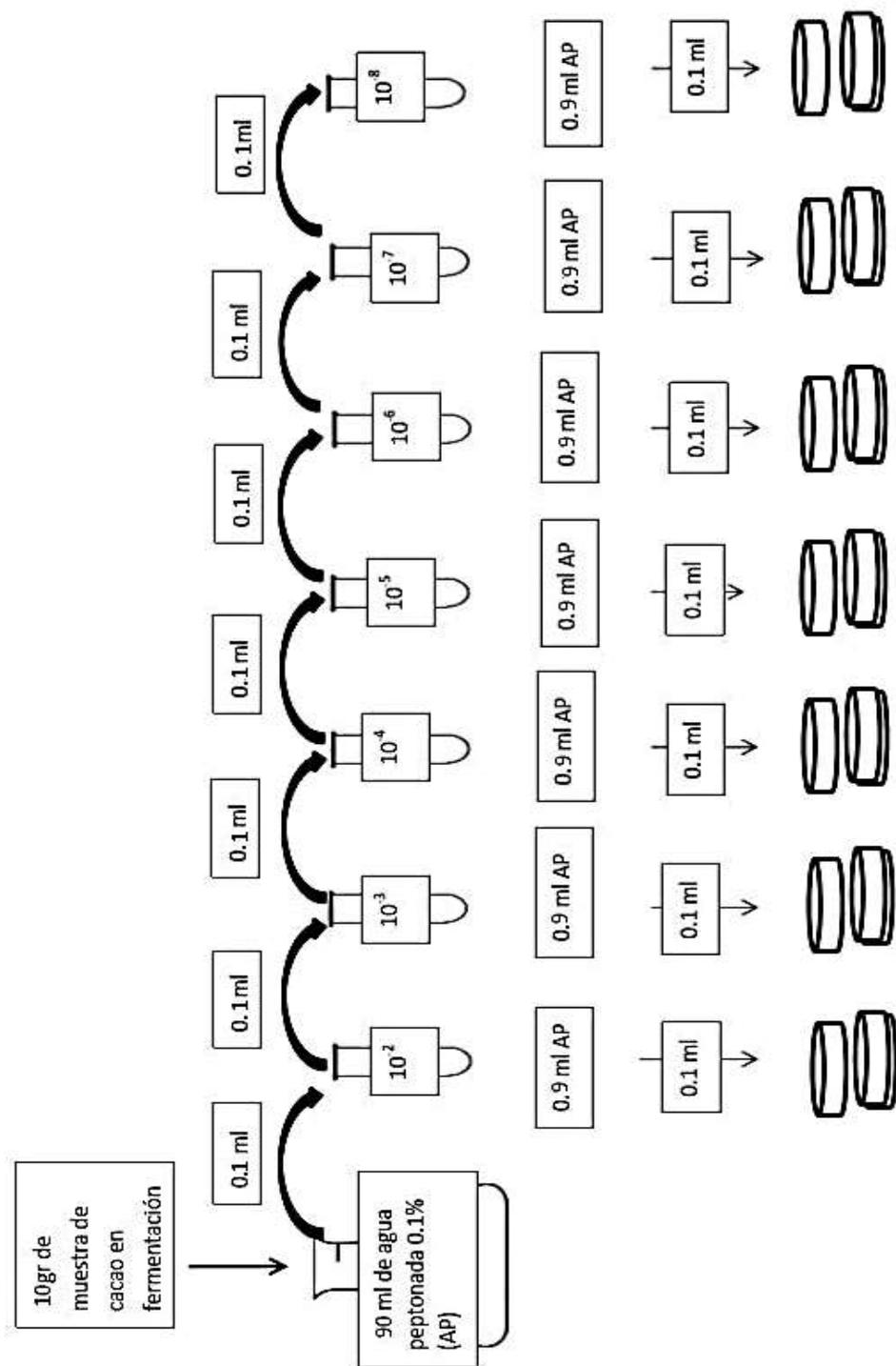
Fotografía 21. Observación microscópica de bacilos pequeños Gram positivos



Fotografía 22. Observación microscópica de levaduras, células ovoides y medianas



Fotografía 23. Conservación de microorganismos seleccionados para el cultivo iniciador



Fotografía 24. Diagrama de la metodología utilizada para realizar las diluciones para la siembra en los 3 medios de cultivo diferenciales (Siembra por triplicado)