



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

IDENTIFICACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DURANTE LA FERMENTACIÓN DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LA VARIEDAD “NACIONAL” EN FERMENTADORES TIPO HEXAGONAL, EN LA CIUDAD DE ARCHIDONA

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MASTER EN
BIOCIENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN BIODESCUBRIMIENTO**

LUIS SANTIAGO GUERRA PIEDRA

DIRECTOR: ING. JENNY RUALES Ph.D.

CO-DIRECTOR: ING. JUAN MANUEL CEVALLOS Ph.D.

Quito, septiembre 2021

DERECHOS DE AUTOR

© Escuela Politécnica Nacional (2021)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo Luis Santiago Guerra Piedra, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Luis Santiago Guerra Piedra

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Luis Santiago Guerra Piedra, bajo mi supervisión.

Ing. Jenny Rúales, Ph.D
DIRECTOR DE PROYECTO

Ing. Juan Manuel Cevallos, Ph.D
CODIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto TEAM VLIR-UOS project “A combined omics and bioinformatics research approach to improve spontaneous Ecuadorian cocoa bean fermentation processes”, que se ejecuta en el Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología.

DEDICATORIA

A Dios, por permitir que cada vez ir avanzando en diferentes ámbitos, por acompañarme en grandes situaciones con su protección.

A mis padres Luis y Elizabeth, por ser pilares fundamentales en cada aspecto de mi vida. Ellos han sido mi inspiración y mi apoyo en los momentos difíciles. Los amo mucho.

A mis hermanos Edison y Bryan por estar conmigo brindándome su apoyo, afecto, complicidad y solidaridad. Hermanos ustedes también son mi inspiración para ser valiente en cada paso que doy.

A mis amigas/os Mishu, Nathy, Carlita, Anahí, Gaby, Majo, Sandi, Juanito, Sebas, Marco, Mario, Marlon, Marco sin olvidarme a mis panas Roque, José, Alexis, Dany, Wlady y Pablo. A todos ustedes por ser la familia que escogí por su gran talento, profesionalismo y amistad. Y que cada paso que demos sea para seguir adelante.

A toda mi familia, por su apoyo incondicional y su cariño.

Este trabajo y cada paso que dé en la vida serán dedicados a ustedes porque siempre quiero contar con ustedes como una parte importante.

AGRADECIMIENTOS

En este tiempo de posgrado, he sido participe de muchos eventos de los que puedo decir gracias a todas aquellas personas que han compartido grandes experiencias conmigo. Por esta razón quiero agradecer en estas líneas.

De manera especial quiero agradecer a la Dra. Jenny Ruales por permitirme ser parte de este gran proyecto VLIR-CACAO que en verdad fue toda una aventura. Además, agradecerle por toda su paciencia, preocupación y sabiduría, para que este trabajo llegue a culminar de manera satisfactoria.

También quiero agradecer por su gran ayuda a los doctores Stefan Weckx y Juan Manuel Cevallos, por toda su confianza, conocimientos y guía.

Además, con gran aprecio quiero extender agradecimiento a la Dra. Cristina Cifuentes que me acompañó día tras día en el laboratorio. Siempre pendiente de mi persona, en cada ensayo, en cada problema y en cada nueva situación que se presentó en el transcurso de esta investigación. El brindarme sus conocimientos y su mano amiga fue un gran apoyo para que este trabajo se vea reflejado.

Agradecer también al personal técnico de los laboratorios del DECAB, Magui, Carito, Mairita, Ruth, Paty y Mayrita Anaguano. Que no solo prestaron su ayuda dentro de los laboratorios, sino que también estuvieron presentes como amigas.

Identificación de la Biodiversidad durante la Fermentación de Cacao (*Theobroma cacao L.*) de la variedad “Nacional” en Fermentadores tipo Hexagonal, en la Ciudad de Archidona.

Guerra, Luis Santiago¹

¹Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Química y Agroindustria, Quito, Ecuador

Resumen:

La fermentación de las almendras del cacao es uno de los principales procesos, relacionados con las características organolépticas, más aún, en las cualidades del chocolate. En Ecuador, el cacao es un importante producto de exportación, en especial la variedad *Nacional*. Sin embargo, el proceso de fermentación depende de las técnicas tradicionales de cada finca, por lo cual el aroma y el sabor son muy variables. El presente estudio tiene como objetivo describir la diversidad microbiana presente durante el tiempo de fermentación del cacao con el uso de dos tipos de fermentadores hexagonales, con el fin de mejorar el desarrollo de los microorganismos los cuales ayudaran a mejorar las características organolépticas finales de las almendras. Los granos de cacao se fermentaron durante 96 horas y las muestras se tomaron en diferentes momentos de la fermentación. Posteriormente, las muestras se cultivaron en medio PCA, para después, realizar la extracción y secuenciación de ADN microbiano. Los fermentadores se compararon con un DBCA tomando un 95% de confianza. En este trabajo, se encontró que no tiene efectos significativos sobre el tipo de fermentador. Mientras que, con respecto a la identificación taxonómica entre los géneros representativos están *Issatchenkia* para levaduras, *Acetobacter* para bacterias ácido acéticas y *Tatumella* y *Lactobacillus* para bacterias ácido lácticas.

Palabras clave: cacao, diversidad alfa, interacción, bioproceso, optimización, asepsia.

Identification of Biodiversity during the Cocoa Fermentation (*Theobroma cacao L.*) of the Variety “Nacional” in Hexagonal type Fermenters, at Archidona City.

Abstract:

Cocoa beans fermentation is one of the principal processes, related to the organoleptic characteristics, even more, in the final quality of chocolate. In Ecuador, cocoa is the major exportation product, especially *Nacional* variety. However, the fermentation process depends on the traditional techniques of each farm, whereby the aroma and taste are very variable. The present study aimed to describe the microbial diversity present during the time of fermentation with the use of two types of hexagonal fermenters, in order to improve the development of microorganisms which will help to improve the final organoleptic characteristics of beans. The cocoa beans were fermented for 96 hours and the samples were taken at different times of the fermentation. Posteriorly, the samples were cultivated in PCA media, for later, perform the extraction and sequencing of microbial DNA The fermenters were compared with a DBCA taking 95% confidence. This work found that there are no significant effects on the type of fermenter. While, with respect to the taxonomic identification among the representative genus are *Issatchenkia* for yeast, *Acetobacter* for acetic acid bacteria, *Tatumella* and *Lactobacillus* for lactic acid bacteria.

Keywords: cocoa, alpha biodiversity, interaction, bioprocess, optimization, asepsis.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la demanda de cacao se ha incrementado a nivel mundial. Sólo en las últimas décadas se describe un consumo de 4 millones TM por año, siendo las variedades de cacao fino de aroma las más apreciadas por los mercados

internacionales (Acebo, 2016; Wickramasuriya y Dunwell, 2018). El Ecuador al ser un productor privilegiado de cacao por su calidad, en el año 2019 exportó alrededor de 360 mil TM. A pesar de la pandemia por el COVID19 se estima que la

demanda de cacao desde el 2020, se irá incrementando en promedio un 4,8% al año (Anecacao, 2020; Banco Central del Ecuador, 2021). Dentro de las variedades de cacao fino de aroma está la variedad “Nacional” que es la de mayor importancia debido a sus características de sabor y aroma, además del valor económico e histórico que tiene esta variedad en el país (Anecacao, 2015; Díaz-Montenegro et al., 2018). Por otra parte, el cultivo de esta variedad ha demostrado tener ciertas cualidades de calidad y rendimiento. Por esta razón, en la actualidad este material genético es usado por los agricultores al ser apreciado por el mercado Europeo (Calva y Ramírez, 2016).

La elaboración de chocolate y sus derivados, se realiza con las almendras de cacao previamente fermentadas. La obtención de chocolate con propiedades organolépticas especiales e inconfundibles dependerá de los procesos postcosecha como: fermentación, secado y tostado, donde sufren una serie de reacciones bioquímicas. Los procesos de fermentación cambian según la región y las fincas. Entre los procesos de fermentación más utilizados están por montones, cajas, bandejas, barriles y plataformas. No obstante, estos procesos tradicionales presentan posibles riesgos de contaminación y por ende la variación en las características organolépticas (De Vuyst y Leroy, 2020; De Vuyst y Weckx, 2016). Por lo tanto, el perfil aromático depende del tipo y tiempo de fermentación en el que intervienen microorganismos como: levaduras, bacterias ácido acéticas y ácido lácticas, que por la acción de sus enzimas promueven la liberación de compuestos como: alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, ésteres, fenoles entre otros compuestos (Cevallos-Cevallos et al., 2018; Pérez, 2006). Las almendras de cacao al estar envueltas por una pulpa dulce y mucilaginoso, promueven el desarrollo de levaduras, que permiten el inicio del proceso de fermentación. Transformando así, los azúcares en alcoholes que servirán de sustrato para el desarrollo de bacterias ácido acéticas (AAB) y ácido lácticas (LAB). Obteniendo, diferentes perfiles aromáticos plasmados en las almendras (Cevallos-Cevallos et al., 2018; De Vuyst y Weckx, 2016).

Durante la fermentación se presentan asociaciones microbianas que cumplen diferentes roles en el proceso. Entender el funcionamiento de estas comunidades resulta complicado debido a su variabilidad en diversidad, funciones y abundancia, por lo que no se pueden controlar ciertos parámetros (Illeghems et al., 2015). Para caracterizar los microorganismos responsables de los procesos bioquímicos que ocurren en las almendras de cacao, se utilizan herramientas moleculares para ciertos dominios genéticos que permiten identificar de forma masiva a los microorganismos.

Los dominios hipervariables del gen 16s ADNr permiten perfilar comunidades bacterianas durante la fermentación. Dentro del cual, el uso del amplicón V4 brinda mayor profundidad taxonómica en las comunidades de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, por lo que en estudios anteriores de biodiversidad en la fermentación de cacao usando la sección V4, se encontró que presentaba mayor información de grupos taxonómicos para secuencias. Se utilizaron 2 tipos de fermentadores hexagonales codificados como: WA provistos con paletas internas y WB sin paletas, cada uno por duplicado. A cada uno se colocó igual

amplificadas, mientras que para levaduras y hongos se usan las regiones ITS entre los genes 18s y 26s ADNr (Bokulich et al., 2012; Camu et al., 2007; Illeghems et al., 2012). La técnica de secuenciación por síntesis (NGS, secuenciación de siguiente generación) de la empresa Illumina es una técnica que ha incrementado el tamaño de lecturas, además de permitir aumentar la profundidad de secuenciación, lo que resulta favorable al momento de ensamblar secuencias de las que no se conoce un genoma de referencia (López de Heredia, 2016). Al contar con procesos de fermentación tan diversos, en diferentes regiones, la técnica de NGS se ha convertido en un gran nexa para la identificación de la biodiversidad presente en diferentes tipos de fermentación, permitiendo así, encontrar variantes genéticas de un ecosistema complejo por descubrir, validar y cribar a estos grupos microbianos presentes en la fermentación del cacao (Mota-Gutiérrez et al., 2018; Sirén et al., 2019).

Actualmente en Ecuador, el proceso de fermentación se realiza de forma espontánea y las características de operación en pos-cosecha y la fermentación se rigen según la finca. Llegando a tener una excesiva mano de obra, riesgo de contaminación y cualidades sensoriales variables dentro del proceso (Guzmán Farfán et al., 2021). Por consiguiente, es necesario realizar estudios de las comunidades microbianas, sus relaciones dentro del proceso de fermentación de las almendras de cacao y el seguimiento de los parámetros claves como la temperatura y el pH para monitorear de manera precisa, que las prácticas de operación en pos-cosecha de cacao sean uniformes en cada finca, sin importar la época del año a fin de lograr que los granos de cacao alcancen sus características organolépticas y de calidad (Papalexandratou, Camu, Falony, y De Vuyst, 2011).

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la biodiversidad presente en el proceso de fermentación de cacao de la variedad “Nacional” en fermentadores tipo hexagonal. Y relacionar con los grupos taxonómicos más representativos que se encuentran durante los diferentes tiempos de fermentación.

2. METODOLOGÍA

2.1 Lugar de estudio

La fermentación espontánea de las almendras de cacao de la variedad “Nacional” se realizó en las instalaciones de la Asociación Wiñak, localizada en la ciudad de Archidona, Provincia del Napo-Ecuador. Las mazorcas de cacao fueron cosechadas de fincas de pequeños agricultores miembros de la Asociación Wiñak. Las mazorcas de cacao se abrieron de forma manual y se extrajo la placenta. Además, se retiraron las mazorcas que presentaban infección por hongos e insectos. Posteriormente, las almendras fueron separadas de la placenta, retirando aquellas almendras que mostraron indicios de germinación. Las almendras de cacao frescas se colocaron de forma aleatoria en cada uno de los fermentadores hexagonales (Figura 1; diseño libre propiedad de la Escuela Politécnica Nacional), hasta alcanzar los 105 kg.

cantidad en peso de almendras de cacao “Nacional”. Durante el muestreo, se recolectó las muestras de las almendras de cada

fermentador a diferentes tiempos (horas) mientras transcurrió el proceso de fermentación, como se detalla a continuación.

A) WA: Con paletas internas

B) WB: Sin paletas internas

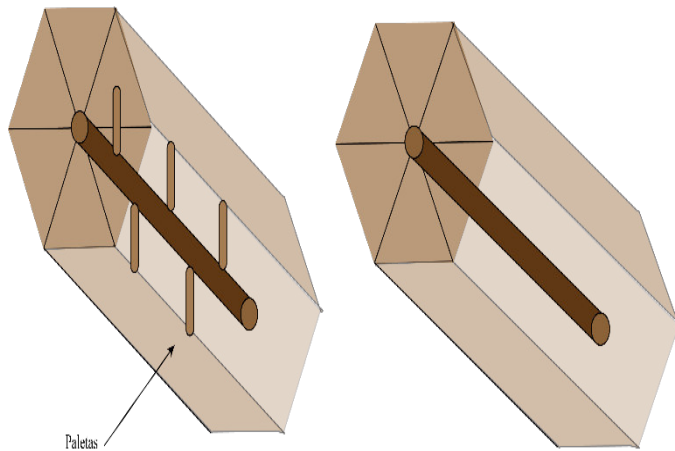


Figura 1. Diseño de los fermentadores tipo hexagonal.

2.2 Ensayo en campo

Se colocó un sensor digital pH 340i (WTW GmbH, Weilheim, Alemania) dentro de cada uno de los fermentadores para obtener los datos de los parámetros de pH y temperatura interna. Por otro lado, también se registró la temperatura ambiental y el % de humedad relativa. Además, se removió las almendras de cacao cada 24 horas por medio de la rotación de los fermentadores. Todos los datos se tomaron en cada tiempo de muestreo. Por otra parte, la recolección de las muestras fue aproximadamente 25 g de almendras, a las 0 (inicial), 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas (Papalexandratou et al., 2013; Papalexandratou, Vrancken, De Bruyne, Vandamme, y De Vuyst, 2011).

2.3 Siembra de microorganismos

Las almendras de cacao recolectadas de la fermentación, se lavaron con solución salina 0,9%. Adicionalmente, se realizó diluciones seriadas hasta 1E-07 de los lavados de las almendras, para sembrar en un medio enriquecido general. La siembra se realizó en medio de cultivo plate count agar (PCA, TN media) de cada tiempo de fermentación y dilución.

Los cultivos microbiológicos fueron incubados a 30 °C por 168 horas. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Posterior al tiempo de incubación, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) por cada g de almendra de cacao fermentado. Se procedió a seleccionar la caja de cultivo contable que tenga colonias entre 30 a 300 UFC.

2.4 Extracción de material genético de las comunidades microbianas

Las cajas de cultivo seleccionadas fueron lavadas con 10 mL de solución salina al 0,9% y se recuperó en tubos Falcon de 15 mL. Estas muestras se centrifugaron a 5 635 x g por 25 min a ACCTGCGGARGGATCA-3') y B58S3(5'-GAGATCCRTTGYTRAAAGTT-3'). Los productos de PCR

4 °C (Hettich, Universal 16). Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 5 mL de solución salina 0,9% y se almacenó a -20 °C hasta la extracción de ADN ambiental. Posteriormente, para el proceso extracción se inició con la lisis celular de las comunidades microbianas, se centrifugó a 6 000 x g por 10 min (Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific) y se descartó el sobrenadante. Después, se añadieron 100 µL de solución de chitinasa por muestra y se incubó por 1 hora a 37 °C. Además, se realizó una homogenización de las muestras con vortex cada 20 min. Al terminar, las muestras fueron centrifugadas a 6 000 x g por 10 min y se descartó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 600 µL de Buffer lisis A (buffer sorbitol, pH 7,5; Liticasa, Sigma-Aldrich; Zimoliasa, G Biosciences) y se incubó por 1 hora a 30 °C y se homogenizó cada 20 min. Se centrifugó por 10 min a 6 000 x g, se descartó el sobrenadante. Para la lisis de paredes celulares de bacterias, se resuspendió el pellet en 400 µL de buffer lisis B (buffer STET, pH 8,0; lisozima, Merck; mutanolizina, Sigma-Aldrich), se incubó a 37 °C por 1 hora y se homogenizó en periodos de 20 min. Se colocaron 40 µL de solución SDS al 20% por muestra. Se añadieron perlas de vidrio (Sigma-Aldrich) y se agitó en un vórtex por 2 min. Posteriormente se añadieron 50 µL de solución de Proteinasa K (Merck) por muestra. Se incubó a 56 °C por 1 hora y se homogenizó de forma suave. Para remover proteínas, se colocaron 600 µL de cloroformo: fenol: alcohol isoamílico en proporción 49,5: 49,5: 1, por muestra de ADN. Se agitó vigorosamente por 5 min y se centrifugó a 18 000 x g por 5 min (Medifuge, Thermo Fisher Scientific). Se recolectó la fase superior formada en un nuevo tubo y se colocó 13 µL de RNasa, se mezcló y se incubó a 37 °C por 10 min. Posteriormente, se utilizó el QIAamp genomic DNA Kits con algunas modificaciones para la extracción de ADN de las comunidades microbianas. Se añadieron 600 µL buffer AL, y se añadieron 600 µL de etanol y se mezcló con vórtex, se colocó el volumen total en una columna de afinidad para ADN y se centrifugó a 6 000 x g por 1 min. Se descartó el fluido y se usó un nuevo tubo de recolección, a continuación, se añadieron 500 µL del buffer AW1, se centrifugó a 6 000 x g por 1 min. Posteriormente, se descartó el fluido y se pasó la columna a un nuevo tubo de recolección, se colocó 500 µL de buffer AW2, se centrifugó a 20 000 x g por 3 min y se colocó la columna en un tubo eppendorf limpio. Se añadió 100 µL de agua libre de nucleasas, se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, para recolectar el material genético se centrifugó a 6 000 x g por 1 min y se midió la concentración y calidad de la extracción de ADN por espectrofotometría (nanoDrop 2000; marca: Thermo Fischer Scientific) para cada muestra.

2.5 Amplificación y secuenciación de las comunidades microbianas

El ADN obtenido de las comunidades microbianas fue amplificado por PCR con primers específicos de la región 16S para las secciones V4 en bacterias F515 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y R806 (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'). Por otra parte, para la región ITS para hongos y levaduras los primers BITS (5'- se corrieron en gel de agarosa bajo condiciones estándar. A continuación, se realizó una limpieza de los productos de PCR

retenidos en el gel utilizando el Kit Wizard SV gel and PCR clean-up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una preparación de tamaño de secuencias (bibliotecas genómicas) usando Agencourt AMPure XP PCR para purificación con perlas magnéticas (Beckman Coulter), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, purificados los productos de PCR >100 pb, se midió la concentración y calidad de ADN por fluorescencia (Qubit 2.0; Thermo Fisher Scientific). Los tubos obtenidos de la amplificación de ADN de las comunidades microbianas se procedieron a secuenciar por síntesis usando la plataforma de Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, California, USA) por medio del convenio interuniversitario VUB-ULB (Bruselas, Bélgica). Los resultados se obtuvieron en formato FASTQ para los análisis con herramientas bioinformáticas.

2.6 Análisis de secuencias y asignación taxonómica

Las secuencias obtenidas de la NGS fueron sometidas a una depuración de la calidad con el paquete DADA2 versión 1.6 (Callahan et al., 2016; Comasio, 2019) y un ordenamiento y alineación de las secuencias para los análisis con leguaje R, versión 3.6.3.

Las secuencias obtenidas por Illumina para bacterias fueron comparadas con las bases de datos 16s rARN SILVA (<http://www.Arb-silva.de>; versión 128). Por otra parte, para las secuencias amplificadas con el primer BITS debido a su longitud, se realizó un filtrado de calidad menos exigente y estas secuencias únicas fueron clasificadas taxonómicamente con la base de datos UNITE (<http://www.unite.ut.ee>; versión 8, sh 99, Abarenkov et al., 2020).

2.7 Análisis de la biodiversidad

Para el análisis de biodiversidad se utilizó un objeto phyloseq conformado por los siguientes archivos: asignación taxonómica, contador de secuencia y características del ensayo. Después, se procedió a agrupar las secuencias por unidades taxonómicas operativa (OTU) basándose en el género. A continuación, se filtró de acuerdo a un umbral de número medio de conteo de lecturas $1E-05$. Posteriormente, se determinó la profundidad de secuenciación. A partir de este punto se procedió a encontrar la diversidad alfa y diversidad beta.

2.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño por bloques completamente al azar (DBCA), con los 2 tipos de fermentadores hexagonales codificados como: WA con paletas internas y WB sin paletas (cada uno con dos replicas biológicas WA01, WA02, WB01, WB02), se tomaron muestras por duplicado. El manejo de datos, estadísticos descriptivos y pruebas de hipótesis se realizó con lenguaje R, versión 3.6.3. Las pruebas estadísticas fueron consideradas como valores significativos $p < 0,05$. Además, se realizó un test de PERMANOVA para la comparación de la biodiversidad entre los dos tipos de fermentadores hexagonales. Finalmente, para observar la relación entre OTUs y los factores físico-químicos, se analizó con correlación Pearson las variables de temperatura y pH con respecto a las levaduras y bacterias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros fisicoquímicos

Se evaluaron los parámetros de pH y temperatura en los diferentes tiempos de fermentación de las almendras del cacao (Figura 2). Papalexandratou et al. (2011) menciona que la medición de las condiciones físico-químicas son necesarias, como parte del desarrollo de los microorganismos debido a que están ligados directamente al desarrollo de precursores del sabor.

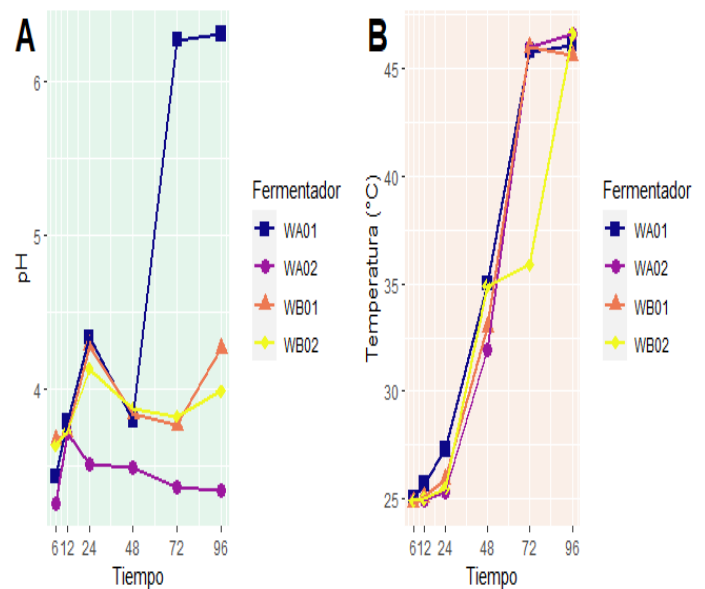


Figura 2. Parámetros fisicoquímicos en diferentes tiempos de fermentación para A) pH y B) temperatura, con respecto a cada fermentador.

En las primeras horas de muestreo (6 horas) de la fermentación todos los fermentadores se encontraron con un pH alrededor de 3,50 en promedio. Conforme a lo esperado, a medida que avanzó el proceso de fermentación se obtuvo un incremento en sus parámetros de pH. Siendo así, el fermentador WA01 a las 96 horas presentó un valor final de pH 6,30. Por otro lado los fermentadores WB01 y WB02 mantuvo valores semejantes durante todo el proceso llegando a las 96 horas con valores finales de pH 4,26 y 3,98 respectivamente (Figura 2.A). Mientras que, el fermentador WA02 tuvo valores bajos con relación a los demás, llegando a un pH final de 3,35. Por otra parte, la temperatura interna a las 6 horas en todos fermentadores se encontró a 24,9 °C en promedio. No obstante, este parámetro se incrementó en los dos tipos de fermentador hexagonal a medida que avanzó la fermentación, llegando a una temperatura final a las 96 horas de 46,22 °C (Figura 2.B). De Vuyst y Weckx (2016) mencionan que los parámetros físico-químicos varían debido a la carga microbiana y que está ligada directamente a la diversidad de especies que consumen diferentes sustratos presentes en el mucílago de las almendras del cacao. Sin embargo, es importante mencionar que algunas bacterias crecen por debajo del pH 4. Teniendo en cuenta esto, al evaluar ciertas cepas presentes en la fermentación natural del cacao, Ouattara et al. (2017) encontraron que la actividad bioquímica significativa de ciertas bacterias se encontraron dentro del rango de pH 3,5 a 6,0 y a temperaturas entre los 30 °C y 45 °C. En comparación con estos rangos físico-químicos,

se observó que el ensayo está dentro estas condiciones descritas.

3.2 Profundidad de muestreo

Se identificó si el muestreo dentro de los fermentadores fue representativo para lo cual se observó la riqueza de especies en los diferentes tiempos de fermentación.

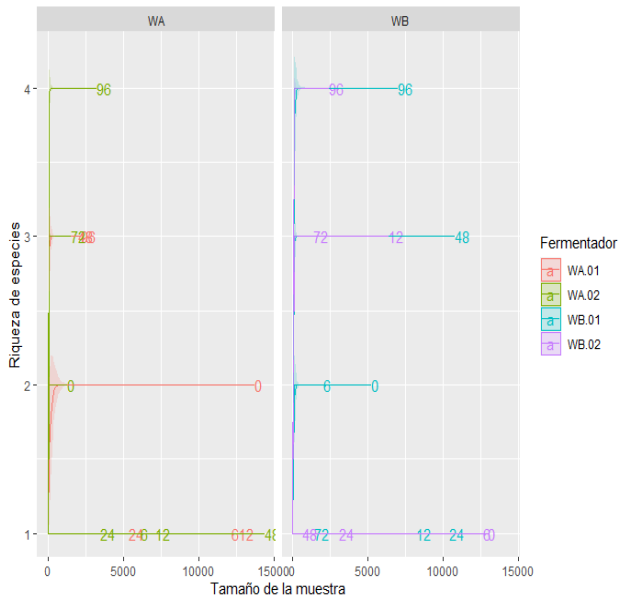


Figura 3. Curvas de rarefacción para riqueza fúngica por tipo de fermentador. WA con paletas internas y WB sin paletas.

Las curvas de rarefacción permitieron tener una idea intuitiva de la profundidad de la secuenciación en una comunidad. Willis en (2019) menciona que las estimaciones de diversidad alfa pueden distorsionar la verdadera riqueza del micro mundo, por ende, no se puede hacer una comparación de grupos utilizando datos sin procesar. Por lo tanto, la rarefacción es un método que permitió señalar si se ha realizado un muestreo representativo del hábitat de estudio. Para la identificación de levaduras (**Figura 3**) y bacterias (**Figura 4**), se observó que durante el proceso de la fermentación del cacao los dos tipos fermentadores hexagonales presentaron un comportamiento semejante en riqueza de especies. Esto se debió a que el muestreo de las almendras de cacao durante los tiempos de fermentación se realizó lo más equitativo posible.

En estudios similares, Bortolini et al. (2016) concluye que el uso de las regiones V3-V4 para bacterias y la región ITS para levaduras permiten acceder a una gran cantidad de información para la identificación de microorganismos. Siendo así, dentro del muestreo y la secuenciación se pudo obtener una amplia perspectiva inicial de las comunidades microbianas que estuvieron involucradas durante todo el proceso de fermentación. Por otra parte, en base al contexto de los datos obtenidos durante el muestreo, se observó que para levaduras existe una misma cantidad de secuencias de ADN en los primeros tiempos de fermentación y va aumentando a medida que el proceso llegó a las 96 horas. Mientras que para bacterias se observó que la profundidad de muestreo en la cantidad de secuencias ADN fue variable durante todo el

proceso. Serra et al. (2019) mencionan que dentro de la aproximación encontrada en las curvas de rarefacción, se logró observar que la variación de una muestra con respecto otra puede deberse o a la presencia de una o varias especies. Al identificar el comportamiento de los resultados obtenidos, se pudo describir que, en levaduras durante los primeros tiempos de fermentación, estuvieron los mismos OTUs y que a medida que avanzó el proceso se desarrollaron otros microorganismos. En cambio, para el caso de bacterias debido a la variabilidad de las condiciones físico-químicas, además de la liberación de sustratos, los OTUs de bacterias cambiaron constantemente hasta las 96 horas, incluso cuando alcanzó a un grupo específico de OTUs.

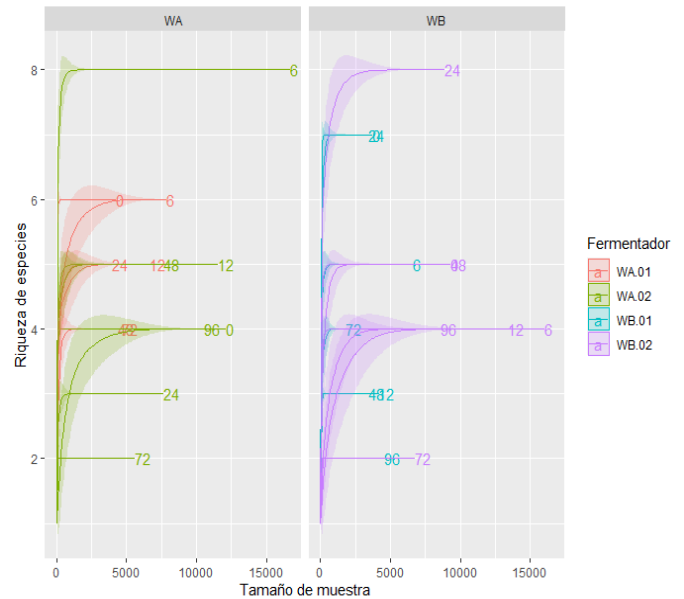


Figura 4. Curvas de rarefacción para Riqueza bacteriana por tipo de fermentador. WA con paletas internas y WB sin paletas.

Con respecto a la riqueza se obtuvo en levaduras (**Figura 3**) se pudo apreciar una semejanza en la abundancia de secuenciación en los dos tipos de fermentadores. Sin embargo, las curvas rarefacción en los primeros tiempos de muestreo fueron bajas. Según De Vuyst y Weckx (2016), mencionan que los primeros microorganismos en consumir los carbohidratos son las levaduras y que poco a poco van cambiando las condiciones y el sustrato. Así mismo, de forma complementaria a la etapa de fermentación alcohólica. Existen bacterias capaces de consumir citrato desde el inicio de la fermentación y que de modo progresivo van cambiando las condiciones internas, favoreciendo el desarrollo posterior de otras bacterias. Además, Hamdouche et al. (2015), reportó la dominancia poblacional de las Enterobacterias debido a que tienen un crecimiento relativamente mayor al compararlas con las levaduras y otras bacterias. Al analizar las curvas de rarefacción (**Figura 3** y **Figura 4**) se verificó que en las etapas iniciales de la fermentación existió mayor riqueza bacteriana. Por otra parte, en estudios relacionados a la fermentación del café por De Bruyn et al. (2016) y Pothakos et al. (2020), reportan una alta incidencia de la familia *Enterobacteriaceae* desde etapas tempranas de la fermentación, sugiriendo que estos microorganismos ya crecieron desde la cosecha y que posteriormente continuaron desarrollándose. Por otra parte, en la riqueza bacteriana (**Figura 4**) se encontró que la mayor

abundancia estuvo en las primeras etapas de la fermentación. Según Kouamé et al. (2021) al estudiar los factores de la fermentación de cacao mencionó que la fase oxidativa influye en la capacidad metabólica para obtener energía desde el sustrato disponible. Además, Papalexandratou et al. (2011) mencionan que, dentro de la diversidad de bacterias, algunos géneros bacterianos son inhibidos según las condiciones de pH, temperatura, oxígeno y el desarrollo poblacional de algunos géneros bacterianos más predominantes.

3.3 Diversidad alfa

Se evaluó la diversidad filogenética con el uso de índices ecológicos que permiten caracterizar las comunidades microbianas dentro de los fermentadores (Figura 5).

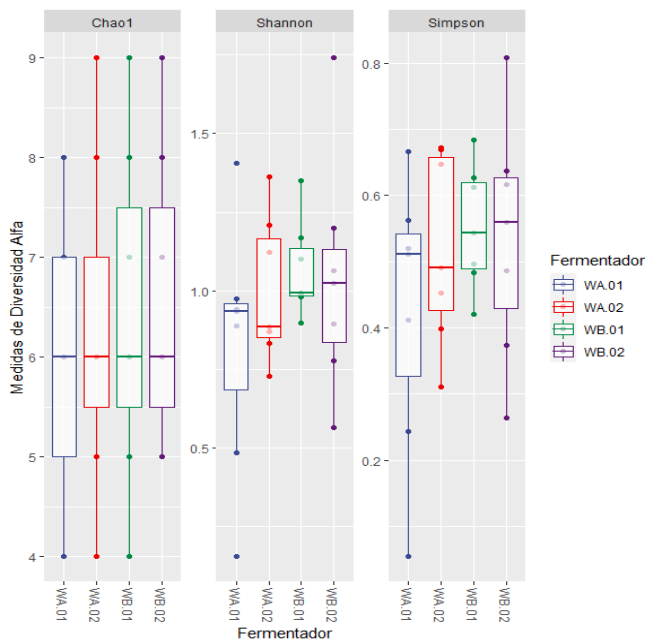


Figura 5. Índices de diversidad alfa para cada fermentador; WA01 y WA02 con paletas internas, además, WB.01 y WB.02 sin paletas internas.

Mediante los índices de Chao1, Shannon y Simpson, que permitieron medir la diversidad de una comunidad. El índice de Simpson (1-D), determina que valores cercanos a 1, tienen mayor diversidad. Por ende, mayor estabilidad ecológica. Los valores obtenidos para el índice de Simpson, se pudo observar que tienen una media entre 0,5. Por lo tanto, los fermentadores tuvieron una microbiota relativamente diversa (Figura 5). Almeida et al. (2020), en su investigación menciona que muestrear en diferentes tiempos de la fermentación puede describir aproximadamente toda la diversidad. Al tener en cuenta la curva de rarefacción (Figura 3 y 4) con respecto a la secuenciación, existieron muestras que no alcanzaron una meseta alta. Llegando a influir directamente a los índices de diversidad.

Para el índice de Shannon en la comparación entre los fermentadores, se obtuvieron niveles de significancia mayores al alfa 5% según el test de Levene para las comparaciones de la varianza. Siendo así, que, para la diversidad alfa de los microorganismos presentes entre las réplicas biológicas, no existieron diferencias significativas con un 95% de confianza. Según Agyirifo et al. (2019) hacen referencia a la diversidad

alfa como el número de especies presentes en una muestra homogénea, entre las que son comunes. Debido a su capacidad de adaptación a las condiciones y sustratos. En estudios similares se observó poca variación con respecto a los índices de alfa diversidad (Mota-Gutierrez et al., 2018). En la comparación entre cada uno de los fermentadores, se encontró $p > 0.05$ (Figura 6). Además, en el análisis de DBCA con T-test y la comparación con la prueba LSD, presentó que entre los dos tipos de fermentadores no existió variación significativa en el número de especies.

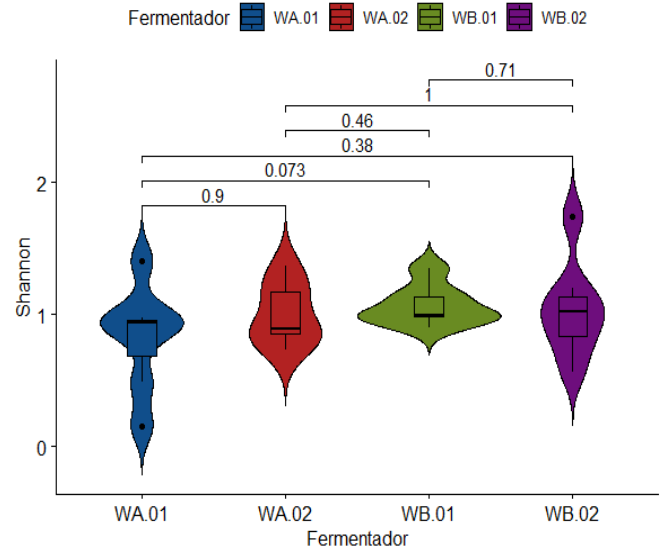


Figura 6. Comparación de la diversidad entre fermentadores

3.4 Diversidad beta

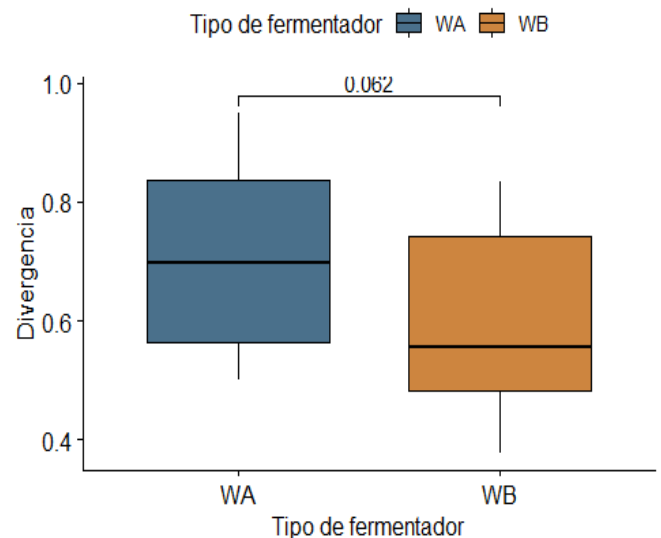


Figura 7. Comparación de la diversidad entre fermentadores. WA con paletas internas y WB sin paletas internas.

Al tener una riqueza biológica semejante. Se observó la divergencia ecológica entre los tipos fermentadores (Figura 7), para diferenciar si existió adaptación de alguno de los taxones en relación al tipo de agitación interna que tenían los fermentadores. Con el que se obtuvo un $p > 0.05$ para el test de Levene demostrando que no existió diferencias

significativas en el cambio de especies presentes de un fermentador con paletas internas frente al otro sin paletas internas. Con el análisis de diversidad beta y en conjunto con los parámetros físico-químicos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de PERMANOVA basados en diferencias Bray-Curtis de las abundancias microbianas en los fermentadores

Variables	Pr(>F)	
	Levaduras	Bacterias
pH	0,422	0,002*
Tiempo	0,233	0,001*
Temperatura	0,001*	0,001*
Fermentador	0,852	0,028*

* Nivel de significancia ($p < 0.05$)

Anderson (2017), detalla que PERMANOVA es una herramienta útil para el análisis de datos multivariados en diseños experimentales. Siendo, riguroso en las relaciones de distancias euclidianas y no euclidianas con respecto a divergencia ecológica, incluso frente a variables con comportamiento anormal. En el caso de levaduras, los patrones comunitarios no estuvieron asociados con en el pH, fermentador y el tiempo, siendo así que no influyó en el comportamiento y desarrollo de las levaduras. Mientras que, para la variable temperatura se confirmó que existió efectos significativos. Por otra parte, para bacterias los patrones comunitarios estuvieron asociados con cambios en la temperatura, pH, tiempo y fermentador. Según el análisis de PERMANOVA bacteriano, existió efectos significativos para todas las variables consideradas. Al analizar la beta diversidad, se pudo calcular las similitudes que se encontraron en las muestras y la divergencia entre fermentadores (Guehi et al., 2010). Finalmente, en la comparación de la diversidad beta entre los fermentadores con presencia o usencia de paletas internas, en las pruebas estadísticas en levaduras no se encontraron diferencias significativas en su desarrollo mientras que para bacterias si se encontró cambios en un intervalo de confianza 95%. Esto podría deberse a que existieron microorganismos aerobios facultativos y anaerobios estrictos (Serra et al., 2019). En consecuencia, se propone que indistintamente de la oxigenación obtenida por las paletas, las bacterias se desarrollaron según la disponibilidad del sustrato liberado.

3.5 Diversidad de microorganismos

La Abundancia relativa permitió encontrar la distribución y prevalencia de un género en cada muestra. Siendo así, que en los resultados obtenidos entre los taxones bacterianos con mayor prevalencia en el tiempo están *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Fructobacillus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Tatumella*, entre otros (**Figura 8**). Consecuentemente, se observó que dentro de las primeras etapas de la fermentación existió la presencia de bacterias de la familia *Enterobacteria* (*Citrobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Raoultella* y *Tatumella*) como había reportado Pothakos et al. (2020). Por lo tanto, los géneros que pertenecen AAB como productoras de ácido acético, se encontraron al final de la fermentación. Debido a que necesitan etanol como sustrato para su desarrollo. Papalexandratou,

Camu, et al. (2011), describe que dentro las AAB, *Acetobacter pasteurianus* fue la especie con mayor predominancia en fermentaciones anteriores del cacao. Por otra parte, Ouattara et al. (2017), describe que entre los géneros de LAB y que al ser comparados con resultados obtenidos, se puede describir las siguientes especies más dominantes como *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* y en menor presencia a *Lactobacillus curieae*, *Enterococcus faecium*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Lactobacillus casei*, *Weissella paramesenteroides* y *Weissella cibaria*. Cabe mencionar que uno de los puntos cruciales en la fermentación es el consumo de ácido cítrico, donde el OTU *Tatumella* fue responsable en gran proporción de este proceso. Y que, en relación a los otros géneros de este ensayo, fue la que mayor dominancia tuvo en todo el proceso de fermentación. Papalexandratou, Falony, et al. (2011), describe a las especies con mayor relevancia dentro de este género en el proceso de fermentación del cacao a *Tatumella saanichensis*, *Tatumella punctata*, *Tatumella terreus*, y *Tatumella morbiroisei*. Por otra parte, De Bruyn et al. (2016) menciona que los OTUs de bacterias asociadas al suelo que se encuentran durante el proceso de fermentación, están *Dyella* como contaminación de la superficie al inicio de la fermentación. Además, de *Acinetobacter*, *Janthinobacterium*, y *Cellulosimicrobium* que tienen un aumento en la abundancia relativa mientras la fermentación alcanza al tiempo final del proceso. En el estudio realizado no se encontró el taxón *Dyella*. Mientras que, durante el proceso entre las 24 horas, se encontró *Acinetobacter* y *Cellulosimicrobium* que, debido al procesamiento de los fermentadores y la asepsia, no se observó mayor desarrollo de estos taxones en el tiempo. Además, Salter et al. (2014) ha reportado que para el taxón *Cellulosimicrobium* podría incluirse como un posible contaminante durante el proceso de extracción de ADN en las muestras. En base a este contexto, se pudo comprender la mínima presencia de este OTU en el proceso. Siendo así, que se tuvo un proceso completamente aséptico, por contaminación de microorganismos provenientes del suelo. Entre los taxones de levaduras estuvieron *Candida*, *Ceriporia*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kurtzmaniella*, *Pichia*, entre otras. Papalexandratou y De Vuyst, (2011), a diferencia de nuestros resultados, encontró en gran abundancia *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo que, este género, pudo haber sido afectado directamente por algún factor dentro de los fermentadores. Puesto que, es un género bastante dominante en los procesos de fermentación. De acuerdo con Kouamé et al. (2021) al analizar los parámetros intrínsecos y extrínsecos, encontró que *S. cerevisiae* tiene una T_{opt} de 33,5 °C y es termotolerante hasta T_{max} de 45 °C. Mientras que para el pH Gálvez et al. (2007) menciona que son ácido tolerantes hasta un pH 6,5, a partir de este valor a pH más altos su crecimiento decae. Los datos obtenidos de los parámetros físico-químicos durante la fermentación en los fermentadores hexagonales se encontraron que se encuentran dentro de los rangos presentados en estudios anteriores. Sin embargo, durante la fase de latencia de *S. cerevisiae* pudo existir una cantidad inicial menor al $1E+04$ UFC/g que no permitió un correcto desarrollo para alcanzar las siguientes fases de crecimiento poblacional durante todo el proceso de fermentación. Estos resultados han sido reportados por algunos investigadores incluyendo Kouamé et al. (2021) y Mota-Gutierrez et al. (2018).

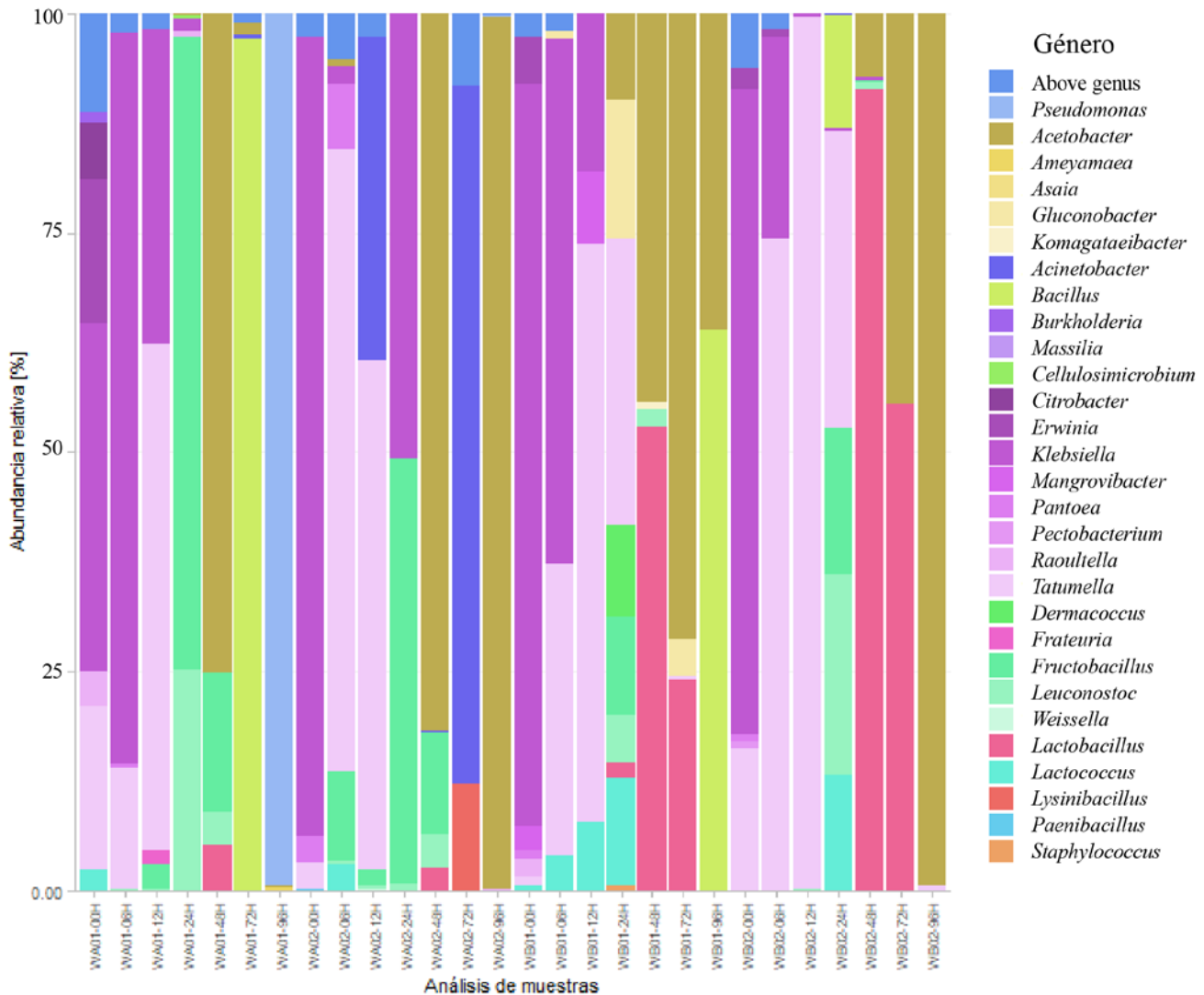


Figura 8. Abundancia relativa de bacterias presentes en la fermentación.

Dentro desarrollo de diversidad en levaduras durante el proceso, se observó que el género *Hanseniaspora* fue el de mayor prevalencia. En base a los estudios de Wang et al. (2015), menciona que los metabolitos producidos por *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica influye de forma negativa en el desarrollo de *Hanseniaspora uvarum*. Estos resultados corroboraron la alta presencia del taxón *Hanseniaspora* durante todo el proceso de fermentación de las almendras del cacao. Por otra parte, otro de los taxones con alta presencia fue *Pichia*. Con respecto a esto, Pereira et al. (2017) en su investigación menciona que las levaduras pertenecientes a este género son las más adaptadas debido a su capacidad de soportar diferentes condiciones de estrés impuestas en la fermentación del cacao. El resto de taxones estuvieron involucrados en menor proporción y dependerán del desarrollo de las levaduras más predominantes y los demás microorganismos. Con respecto a la inocuidad, es importante recalcar que no se observó en ninguno de los fermentadores la presencia de los OTUS de *Aspergillus* y *Penicillium*. Por lo tanto fue uno de los resultados más importantes ya que Maciel et al. (2018) reporta haber encontrado aflatoxina y

ocratoxina, debido a malos procesamientos postcosecha en diferentes variedades del cacao en Brasil. Cabe mencionar que la presencia de estos mohos aumenta debido a malos procesos de secado (de Magalhães et al., 2011). En los resultados obtenidos a las 96 horas (Figura 9) no se encontró a ninguno de estos taxones. Siendo así, que durante la fermentación se pudo asegurar de que no existió desarrollo de mohos peligrosos.

3.6 Interacción de las levaduras y bacterias con los parámetros fisicoquímicos.

Las levaduras al ser los primeros microorganismos que interactúan con las almendras del cacao, degradando carbohidratos y otros sustratos. Se realizó el análisis de correlación de Pearson (Figura 10), donde se puede apreciar si existió relación con los parámetros de pH y temperatura con respecto a las taxonomías encontradas. Los resultados obtenidos permitieron encontrar relaciones positivas o negativas entre taxones, además de la influencia que existió con respecto a dichos factores físico-químicos.

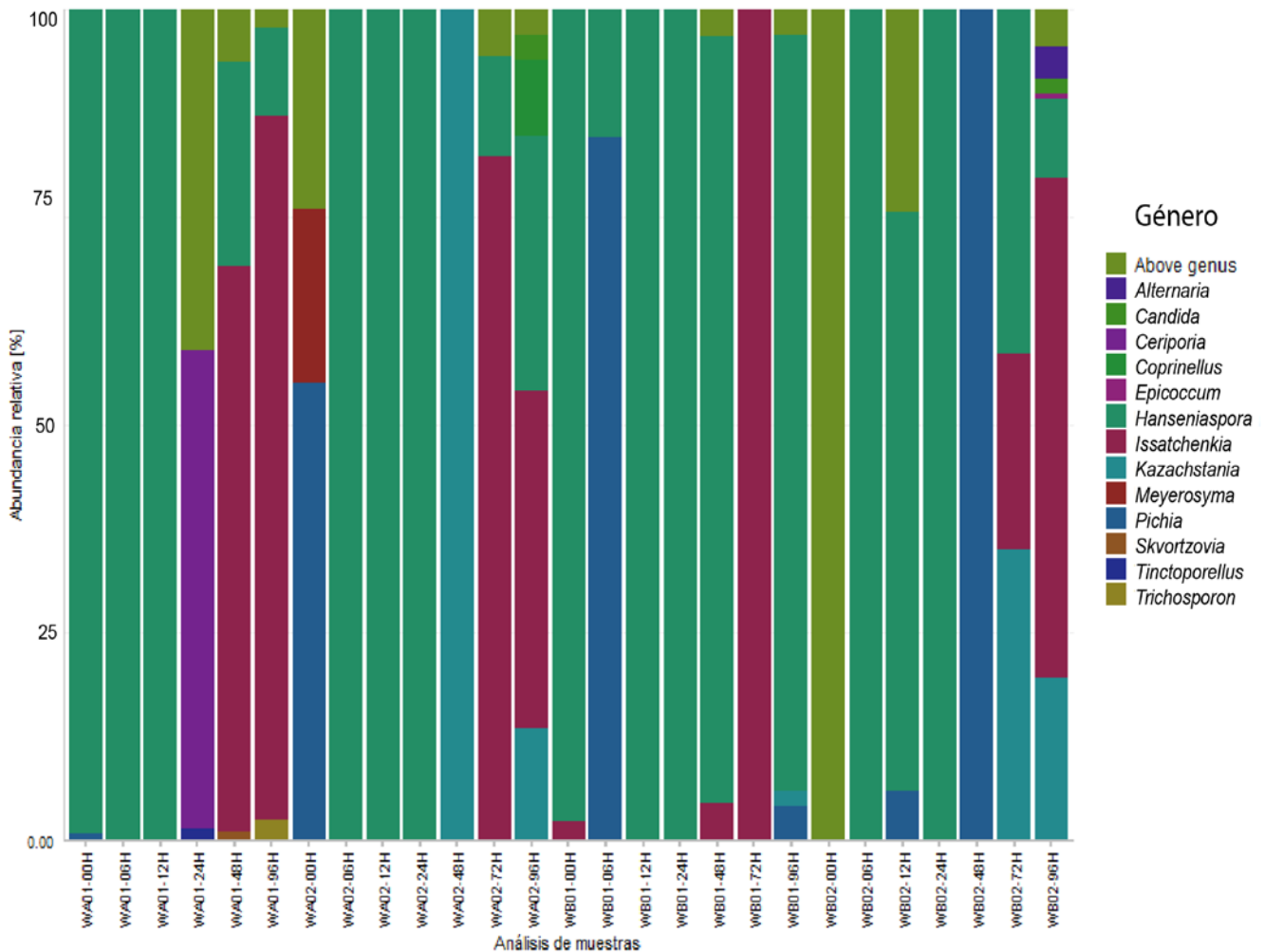


Figura 9. Abundancia relativa de levaduras presentes en la fermentación

Se obtuvo que existió relación positiva entre el pH y los géneros *Trichosporon* y *Issatchenkia*. Según Papalexandratou y De Vuyst (2011) menciona que el incremento de pH se debe a la degradación de azúcares, mientras también es consumido el ácido cítrico. Al mismo tiempo, que las bacterias ácido lácticas comienzan a intervenir en la pulpa debido a la alimentación cruzada. Por otra parte, la temperatura aumentó en el tiempo y tiene relación positiva con los OTUs *Issatchenkia*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Candida* y *Coprinellus*. también, se encontró una relación negativa bien marcada con respecto a *Hanseniaspora*. Por ende, al notar la presencia de *Hanseniaspora* en el tiempo (Figura 9) se pudo relacionar que desde las 72 a las 96 horas el porcentaje de abundancia disminuye notablemente.

Con respecto a las bacterias (Figura 11), se encontró que el pH se relacionó positivamente con el taxón *Pseudomonas*. Mientras que para la temperatura se pudo correlacionar de forma positiva con los taxones *Acetobacter* y *Lysinibacillus* De acuerdo con Almeida et al. (2020), la fermentación puede aumentar hasta los 50 °C, favoreciendo el desarrollo de AAB y la presencia de nuevos compuestos que alteran los cotiledones de las almendras. Siendo así, que de forma general la abundancia algunas levaduras disminuyeron en el tiempo y las poblaciones bacterianas se distribuyeron durante todo el proceso.

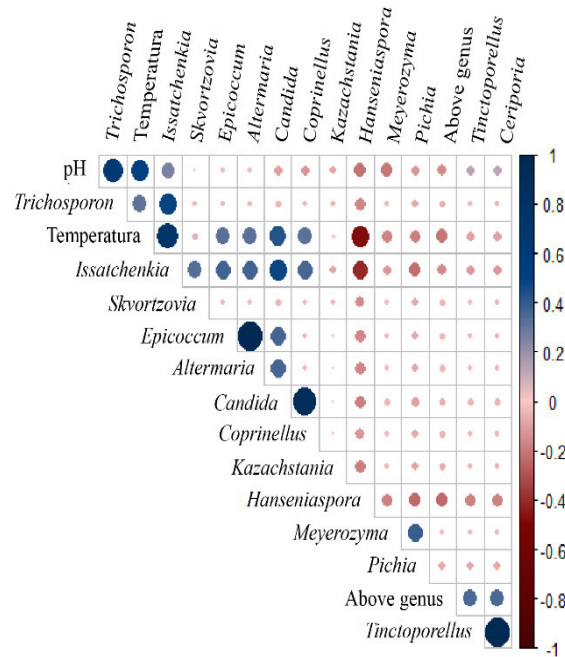


Figura 10. Análisis de correlación de Pearson entre diferentes géneros de levaduras y los factores fisicoquímicos.

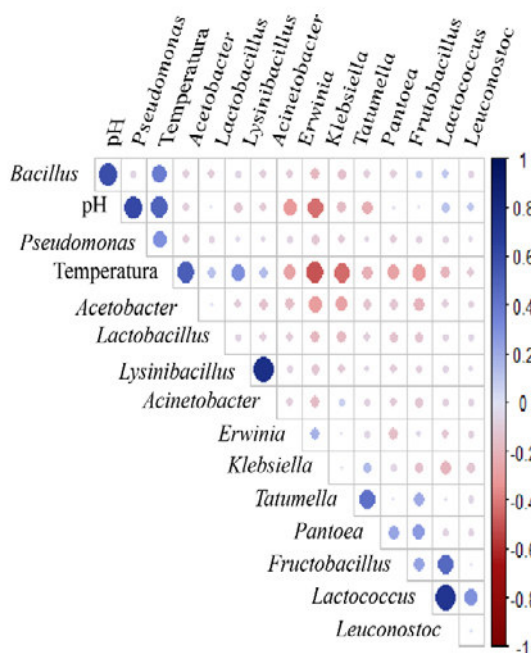


Figura 11. Análisis de correlación de Pearson entre diferentes géneros de bacterias y los factores fisicoquímicos.

3.7 Interacción de los grupos taxonómicos con posibles metabolitos liberados durante la fermentación.

En relación al proceso de fermentación todas las características organolépticas, derivan de la producción de metabolitos primarios como etanol, ácido láctico y ácido acético. Sin embargo, los compuestos complementarios son una amplia gama de metabolitos secundarios que le proporcionan valor agregado a un buen proceso de fermentación (Ho et al., 2015). Para las levaduras, Moreira et al. (2017) menciona que su principal producto es el etanol, pero por medio de otras rutas metabólicas o sustratos en menor proporción generan diferentes alcoholes que serán precursores más adelante de otros compuestos volátiles.

En estudios similares Agyirifo et al. (2019) encontró una alta presencia de *Lactobacillus plantarum* que está relacionada con respuestas del estrés osmótico, oxidativo, cambios bruscos de temperatura y desintoxicación, que serían características representativas de le género *Lactobacillus*. Por otra parte, dentro del perfil organoléptico del producto final de las almendras del cacao, existen ciertos metabolitos que pueden ser asociados a la presencia de distintos grupos microbianos. Para el grupo de bacterias ácido acéticas, se encontró los géneros *Acetobacter* y *Acinetobacter*. Según Cevallos-Cevallos et al. (2018), describe los metabolitos identificados, que debido a una reacción de esterificación entre los alcoholes y el ácido acético, se encontrarían el acetato de isopentilo (fruta, plátano), acetato de octilo (frutas, naranja) y 2- heptanol acetato. Mientras que, para bacterias ácido lácticas encontramos que el principal producto es el ácido láctico. Papalexandratou, Camu, et al. (2011) describe que la mayor concentración de ácido láctico se encuentra en las primeras 60 a 66 horas de fermentación. El ácido láctico, tiene la propiedad de acidulante, neutralizante del pH, además, tiene propiedad inhibitoria para algunas bacterias. Por esta razón, es que interactúa como mediador de otras reacciones metabólicas. En la investigación metabólica realizada por Cevallos-

Cevallos et al. (2018) describe que durante la fermentación de cacao de distintas variedades, se encontraron los siguientes metabolitos 2-nonano, 3-octen-1-ol, 2-undecano, valenceno, aromadendreno, Benzanoato de pentilo. Además, estos metabolitos y la presencia de diacetil y acetoin que son generados por bacterias ácido lácticas se reportan en diferentes fermentaciones como la realizada por Comasio (2019) para masas madre y Ho et al. (2015) para cacao. Entre los grupos con mayor predominancia bacteriana está *Tatumella*. En estudios similares por Papalexandratou, Falony, et al. (2011), menciona que este género consume especialmente citrato y produce ácido glucónico. Y que estaría relacionados como precursor de algunos aminoácidos.

Por esta razón, comprender la dinámica poblacional de las comunidades microbianas durante el proceso de fermentación es un punto crucial para el mejoramiento del rendimiento y la calidad los productos finales del cacao.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La diversidad de microorganismos que participan en la fermentación del cacao cambia durante el tiempo del proceso de fermentación del cacao, modificando las condiciones de temperatura y pH. Siendo así, que permite un desarrollo paulatino de las bacterias ácido acéticas que aprovechan los compuestos producidos por las levaduras para transformarlos en ácido acético. Por lo tanto, las almendras de cacao adquieren cuerpo, sabor y aroma para ser usadas como materia prima en la elaboración de chocolate y sus derivados.

Dentro de los grupos microbianos encontrados en los fermentadores tipo hexagonal con la técnica NGS, están *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Tatumella*, *Klebsiella*, *Issatchenikia*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Alternaria*, *Candida*, entre otras; los cuales son grupos bastante comunes en este proceso fermentativo. Por ende, en futuras investigaciones, se podrían aislar levaduras y bacterias específicas que podrían servir como cultivos iniciadores y que teniendo en cuenta las condiciones intrínsecas y extrínsecas; Se alcance a mejorar los tiempos de desarrollo estos microorganismos fermentativos, que intervienen directamente a las almendras del cacao. Por otra parte, es importante dar seguimiento a los procesos fermentativos espontáneos para controlar el desarrollo de mohos que pueden producir toxinas peligrosas para la salud de humana.

La fermentación de las almendras de cacao con los fermentadores hexagonales presento una diversidad abundante con respecto a los microorganismos esperados que promueven las características organolépticas del producto final. Además, los fermentadores hexagonales favorecieron la optimización el proceso, mejorando la asepsia y la recolección del producto final. Por otra parte, la presencia o ausencia de paletas internas no influye directamente el proceso microbiano, obteniendo índices de diversidad semejantes. Es recomendable para tener un análisis completo, tomar en cuenta tanto los microorganismos como los metabolitos producidos durante el proceso. Para lo cual, vincular el uso técnicas cromatográficas que permitan identificar y cuantificar la variación de la concentración de los metabolitos producidos. Este análisis adicional podría incidir en la elección del tipo de fermentador hexagonal.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es parte del proyecto "Un enfoque combinado de investigación ómica y bioinformática para mejorar los procesos espontáneos de la fermentación de granos de cacao ecuatoriano." En cooperación Bélgica – Ecuador que fue financiado por VLIR-UOS. Agradecemos a la Asociación Wiñak por la apertura de sus instalaciones en la realización del proceso de fermentación.

REFERENCIAS

- Acebo, M. (2016). *Estudios industriales orientación estratégica para la toma de decisiones; Industria del Cacao*. <http://www.espae.espol.edu.ec/wp-content/uploads/2016/12/industriacacao.pdf>
- Agyirifo, D. S., Wamalwa, M., Otwe, E. P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., & Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Heliyon*, 5(7), e02170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170>
- Almeida, O. G. G., Pinto, U. M., Matos, C. B., Frazilio, D. A., Braga, V. F., von 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, 109034. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109034>
- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–15). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Anecacao. (2015). *Cacao Nacional; Un producto emblemático del Ecuador*. <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
- Anecacao. (2020, September). Anecacao; tradición e innovación. *Exportación de Cacao- Primer Semestre 2020*, 2. <http://www.anecacao.com/index.php/es/revista.html>
- Banco Central del Ecuador. (2021). *La economía ecuatoriana inicia la recuperación económica con una expansión del 2,8% en 2021*. <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/1431-la-economia-ecuatoriana-inicia-la-recuperacion-economica-con-una-expansion-del-2-8-en-2021>
- Bokulich, N. A., Joseph, C. M. L., Allen, G., Benson, A. K., & Mills, D. A. (2012). Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLOS ONE*, 7(5), e36357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036357>
- Bortolini, C., Patrone, V., Puglisi, E., & Morelli, L. (2016). Detailed analyses of the bacterial populations in processed cocoa beans of different geographic origin, subject to varied fermentation conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 98–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.004>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Calva, A., & Ramirez, P. (2016). *GUÍA TÉCNICA PARA EL ESTABLECIMIENTO Y MANEJO DEL CACAO SÚPER ÁRBOL*. http://www.ecoconsult.com/fileadmin/user_upload/pdf/downloads/Guia_tecnica_Cacao_10_2016.pdf
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Cevallos-Cevallos, J., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M., & Molina-Miranda, M. (2018). Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. In *Journal of Food Quality* (Vol. 2018). <https://doi.org/10.1155/2018/1758381>
- Comasio, A. (2019). *Novel Fermentation strategies and ingredients to produce innovative sourdoughs and breads*. Vrije Universiteit Brussel.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- De Bruyn, F., Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2016). Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.02398-16>
- de Magalhães, J. T., Sodr e, G. A., Viscogliosi, H., & Grenier-Loustalot, M.-F. (2011). Occurrence of Ochratoxin A in Brazilian cocoa beans. *Food Control*, 22(5), 744–748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.006>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. In *Journal of applied microbiology* (Vol. 121). <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Díaz-Montenegro, J., Varela, E., & Gil, J. M. (2018). Livelihood strategies of cacao producers in Ecuador: Effects of national policies to support cacao farmers and specialty cacao landraces. *Journal of Rural Studies*, 63, 141–156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2018.08.004>
- Guehi, T. S., Dadie, A. T., Koffi, K. P. B., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, K. D., & Nemlin, G. J. (2010). Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(12), 2508–2514.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02424.x>
- Guzmán Farfán, L., Castro Sánchez, M., Cruz Alcedo, G., & Arbulú Zuazo, A. (2021). Diseño de un fermentador cilíndrico automatizado para la fermentación de cacao criollo piurano. *REVISTA DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA PRODUCTIVA*, 1(2 SE-ARTÍCULO ORIGINAL), e002. <https://doi.org/10.54353/ritp.v1i2.e002>
- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. C. (2015). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48, 117–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.031>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Illegheems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z., & Weckx, S. (2012). Phylogenetic Analysis of a Spontaneous Cocoa Bean Fermentation Metagenome Reveals New Insights into Its Bacterial and Fungal Community Diversity. *PLoS ONE*, 7(5), e38040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038040>
- Illegheems, K., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2015). Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. In *Food Microbiology* (Vol. 50). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.005>
- Kouamé, C., Loiseau, G., Grabulos, J., Boulanger, R., & Mestres, C. (2021). Development of a model for the alcoholic fermentation of cocoa beans by a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108917>
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J.-P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- Lopez de Heredia, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. In *Munibe Ciencias Naturales* (Vol. 64). <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Maciel, L. F., Felício, A. L. de S. M., Miranda, L. C. R., Pires, T. C., Bispo, E. da S., & Hirooka, E. Y. (2018). Aflatoxins and ochratoxin A in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 134–143. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1397293>
- Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M. G., Santos, C., Lima, N., & Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050766>
- Mota-Gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Cocolin, L. (2018). Dynamics and Biodiversity of Bacterial and Yeast Communities during Fermentation of Cocoa Beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01164-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Ouattara, H. D., Ouattara, H. G., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., & Niamke, S. L. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 11–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
- 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 Microbiology*, 28(5), 964–973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.010>
- Papalexandratou, Z., & De Vuyst, L. (2011). Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. In *FEMS yeast research* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00747.x>
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H.-M., & De Vuyst, L. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7698 LP – 7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- 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 Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- Pereira, G. V. M., Góes-Neto, A., Soccol, C. R., Neto, D. P. de C., Rogez, H., Alvarez, J. P., Tanobe, V. O. A., & Soccol, V. T. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. Und] Technologie. Food Science + Technology. Science + Technologie Alimentaire*, 84, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>
- Pérez, R. (2006). Poscosecha y Beneficios. In V. Ávila (Ed.), *Programa de capacitación en la cadena del cacao; módulo Poscosecha*. (primera, p. 19). Consejo Carmen.
- Pothakos, V., De Vuyst, L., Zhang, S. J., De Bruyn, F., Verce, M., Torres, J., Callanan, M., Moccand, C., & Weckx, S. (2020). Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the

predominance of lactic acid bacteria. *Current Research in Biotechnology*, 2, 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.02.001>

Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>

Serra, J. L., Moura, F. G., Pereira, G. V. de M., Socol, C. R., Rogez, H., & Darnet, S. (2019). Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *LWT*, 106, 229–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.038>

Sirén, K., Mak, S. S. T., Melkonian, C., Carøe, C., Swiegers, J. H., Molenaar, D., Fischer, U., & Gilbert, M. T. P. (2019). Taxonomic and Functional Characterization of the Microbial Community During Spontaneous in vitro Fermentation of Riesling Must. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 697). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00697>

Wang, C., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 67–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022>

Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2018). Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/pbi.12848>

Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2407).

<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>

BIOGRAFÍA



Luis Santiago Guerra Piedra, graduado como Ingeniero en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – “ESPE”, nacido en Quito el 25 de febrero de 1992. Actualmente egresado de la Maestría en Biociencias

Aplicadas con mención en Biodescubrimiento del programa VLIR- Ecuador, sede Escuela Politécnica Nacional.

ANEXOS

ÍNDICE DE FICHAS TÉCNICAS		PÁGINA
FICHA TÉCNICA I		
Datos de físico químicos durante la fermentación		15
FICHA TÉCNICA II		
Calidad de ADN ambiental de las muestras recolectadas		17
FICHA TÉCNICA III		
Condiciones de la PCR para amplicones		18
FICHA TÉCNICA IV		
Puntuación de calidad de las secuencias para bacterias		20
FICHA TÉCNICA V		
Puntuación de calidad de las secuencias para hongos y levaduras		23
FICHA TÉCNICA VI		
Filtrado de secuencias		26
FICHA TÉCNICA VII		
Profundidad de muestreo		28
FICHA TÉCNICA VIII		
Índices de biodiversidad		29
FICHA TÉCNICA IX		
Diseño experimental		32
FICHA TÉCNICA X		
Análisis PERMANOVA		35

FICHA TÉCNICA I

DATOS DE FÍSICO QUÍMICOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

Muestra: Condiciones de fermentación durante el ensayo

Objetivo: Identificar las condiciones fisicoquímicas en el proceso de fermentación del cacao

Desarrollo:

Se obtuvo los datos de las condiciones internas y externas a la fermentación del cacao, en cada tiempo de muestreo. Los datos se obtuvieron en las instalaciones de la asociación Wiñak de la ciudad de Archidona. Los datos se presentan en la Tabla FTI1.

Tabla FTI.1. Datos obtenidos durante la fermentación del cacao “*Nacional*”

Tiempo (h)	Reactor	Ph	Temperatura (°C)	Peso1 (g)	Peso2 (g)	Temperatura ambiente (°C)	Humedad relativa %
6	WA01	3,436	25	21	222	21.5	82,00
	WB01	3,666	24,8	26	104		
	WB02	3,637	24,9	25	103		
	WA02	3,263	24,9	25	100		
12	WA01	3,792	25,7	22	101	21	81,00
	WB01	3,719	25,1	22	102		
	WB02	3,729	25	20	99		
	WA02	3,717	24,9	22	101		
24	WA01	4,337	27,3	23	116	25	71,00
	WB01	4,281	25,9	24	100		
	WB02	4,134	25,5	23	105		
	WA02	3,515	25,3	28	100		
48	WA01	3,8	35	23	128	25	72,00
	WB01	3,843	33	25	100		
	WB02	3,874	34,9	21	101		
	WA02	3,491	31,9	28	126		

Tabla FTI1. Datos obtenidos durante la fermentación del cacao “*Nacional*”
(continuación...)

Tiempo (h)	Reactor	Ph	Temperatura (°C)	Peso1 (g)	Peso2 (g)	Temperatura ambiente (°C)	Humedad relativa %
72	WA01	6,265	45,8	21	100	25,5	70,00
	WB01	3,768	46	24	104		
	WB02	3,782	32,9	20	100		
		3,865	38,8				
	WA02	3,369	46	26	108		
96	WA01	6,302	46,1	20	113	27	69,00
	WB01	4,265	45,6	23	105		
	WB02	3,987	46,6	20	105		
	WA02	3,35	46,6	22	100		

FICHA TÉCNICA II

CALIDAD DE ADN AMBIENTAL DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS

Muestra: ADN ambiental de distintos tiempos de fermentación

Objetivo: Verificar la calidad de ADN ambiental obtenido de las muestras de la fermentación del cacao.

Desarrollo:

Se realizó la extracción de ADN ambiental con un coctel de enzimas. Al finalizar la extracción a las muestras se midió la concentración y la calidad por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Fischer Scientific). Los datos se muestran el FTII.1.

Tabla FTII.1 Datos de concentración y calidad previos a la secuenciación

Tiempo (h)	Concentración ADN (ng/μl)				Calidad de ADN (A260/A280)			
	WA01	WA02	WB01	WB02	WA01	WA02	WB01	WB02
t0	639,5	178,2	567,7	369,9	1,93	1,73	1,87	1,84
t6	358,1	351	266,3	484,6	1,85	1,85	1,89	1,97
t12	195,3	220,3	188	69,6	1,8	1,86	1,87	1,81
t24	7,4	93,5	98	30,4	1,65	1,81	1,82	1,89
t48	107,1	114	22,5	33,9	1,83	1,84	1,77	1,69
t72	60,3	147,5	24,6	118,8	1,78	1,82	1,7	1,77
t96	74,3	22,8	69	35,1	1,84	1,78	1,83	1,71

Se verificó que los valores de calidad del ADN este dentro de los parámetros de pureza. Los datos se muestran en la tabla FTII.2.

Tabla FTII.2 Valores permitidos de calidad en la extracción

Referencia	Valores	Criterio
A260/A280	1,8-2	ADN de pureza optima
	1,6-1,8	ADN de pureza aceptable
	<1,6	Presencia de compuestos aromáticos
	> 2,1	Contaminación ARN

Puesto que las muestras se encuentran >1,6 se consideró con valores de calidad aceptables.

FICHA TÉCNICA III

CONDICIONES DE LA PCR PARA AMPLICONES

Muestra: ADN ambiental de diferentes tiempos de fermentación

Objetivo: Amplificar las secuencias de ADN total obtenidas de las muestras, para posteriormente ser secuenciadas por la plataforma ilumina.

Desarrollo:

Se utilizó para la región hipervariable V4 del gen bacteriano 16S ARNr los primers F515 (5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG TGC CAG CMG CCG CGG TAA -3') y R806 (5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT-3'). Las condiciones de amplificación se presentan en la Tabla FTIII.1.

Tabla FTIII.1 Condiciones para el termociclador en bacterias

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Inicial	94	180	1
Desnaturalización	94	45	35
Alineamiento	50	60	
Extensión	72	90	
Extensión final	72	600	1

Se utilizó para la región ITS1 en hongos y levaduras, los primers BITS (5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG ACC TGC GGA RGG ATC A -3') y B58S3 (5' – GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA GAT CCR TTG YTR AAA GTT -3'). Las condiciones de amplificación se presentan en la Tabla FTIII.2.

Tabla FTIII.2 Condiciones para el termociclador en hongos y levaduras

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	ciclos
Inicial	95	120	1
Desnaturalización	95	30	40
Alineamiento	50	30	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

El volumen de reacción para cada muestra se presenta en la Tabla FTIII.3.

Tabla FTIII.3 Volumen de reacción de 50 μ L

Reactivos	Volumen (μL)
Buffer de PCR 10X	6
Solución de BSA (0,1 mg/ml)	2,5
mix dNPTs (25 Mm c/u)	0,5
Taq DNA Polimerasa (5U/ μ L)	0,25
Primer forward	2
Primer reverse	2
Agua MiliQ	35,75
ADN (50 ng/ μ L)	1

FICHA TÉCNICA IV

PUNTACIÓN DE CALIDAD DE LAS SECUENCIAS PARA BACTERIAS

Muestra: Archivos FASTQ de bacterias

Objetivo: Verificar la calidad de las secuencias para la región V4

Desarrollo:

La calidad de la secuenciación fue revisada para los archivos FASTQ para las secuencias forward o reverse en bacterias. Usando lenguaje de programación R versión 3.6.3. por medio del paquete BIOCONDUCTOR versión 3.10. De acuerdo a la tabla FTIV.1, se verificaron las lecturas obtenidas de las muestras forward Figura FTIV.1 y reverse Figura FTIV.2.

Tabla FTIV.1. Relación entre la calidad de secuencias

Quality Score	Probabilidad de una base incorrecta	Precisión de llamada base inferida
10 (Q10)	1 en 10	90%
20 (Q20)	1 en 100	99%
30 (Q30)	1 en 1000	99,9%
40 (Q40)	1 en 10000	99,99%
50 (Q50)	1 en 100000	99,999%

Disponible en: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>

La tabla presenta la posibilidad de que una base nitrogenada haya sido llamada incorrectamente por el secuenciador. Q score permite evaluar cuanta información de los datos puede ser utilizada, el puntaje de la secuenciación debe ser >Q30 en todas las lecturas obtenidas.

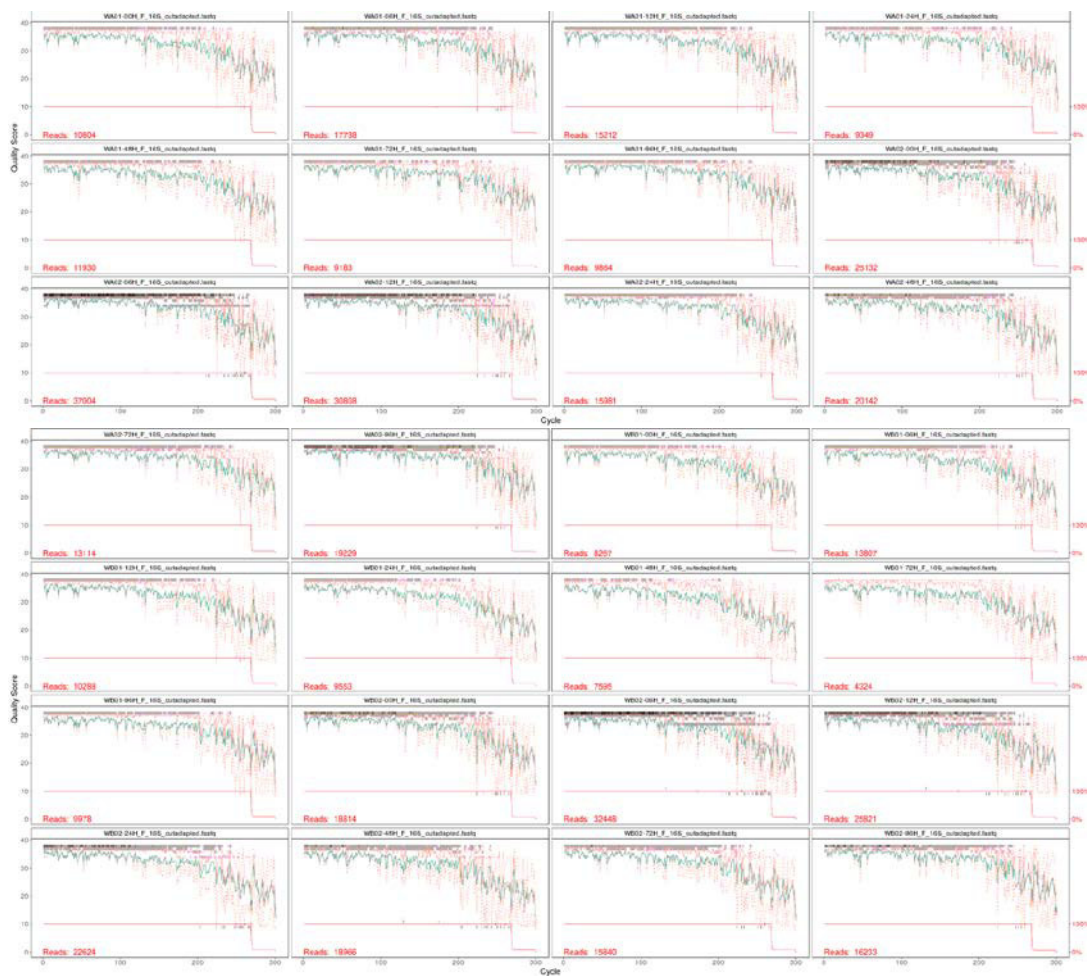


Figura FTIV.1. Calidad de secuenciación en lecturas forward

Se observó que para el set de datos forward en bacterias tiene un $>Q30$ hasta la base 210 aproximadamente, a partir de ahí la calidad de las lecturas bajó hasta un Q10.

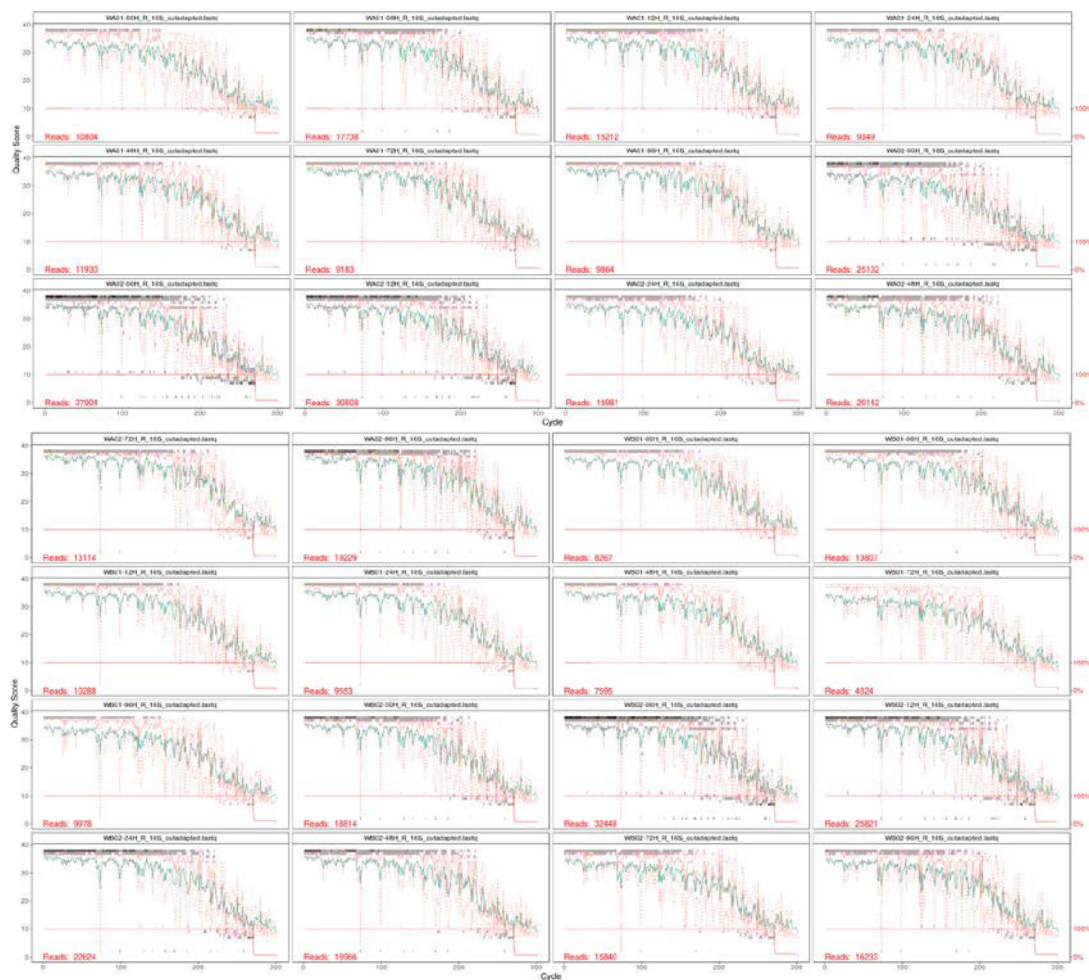


Figura FTIV.2. Calidad de secuenciación en lecturas reverse.

Se observó que para el set de datos reverse en bacterias tiene un $>Q30$ hasta la base 180 aproximadamente, a partir de ahí la calidad de las lecturas bajó hasta un $Q10$. Esta variación frente a las lecturas forward se debe al método de síntesis.

FICHA TÉCNICA V

PUNTACIÓN DE CALIDAD DE LAS SECUENCIAS PARA HONGOS Y LEVADURAS

Muestra: Archivos FASTQ de hongos y levaduras

Objetivo: Verificar la calidad de las secuencias para la región ITS

Desarrollo:

La calidad de la secuenciación fue revisada para los archivos FASTQ para las secuencias forward o reverse en hongos y levaduras. Usando lenguaje de programación R versión 3.6.3. por medio del paquete BIOCONDUCTOR versión 3.10. De acuerdo a la tabla FTIV.1, se verificaron las lecturas obtenidas de las muestras forward Figura FTV.1 y reverse Figura FTV.2

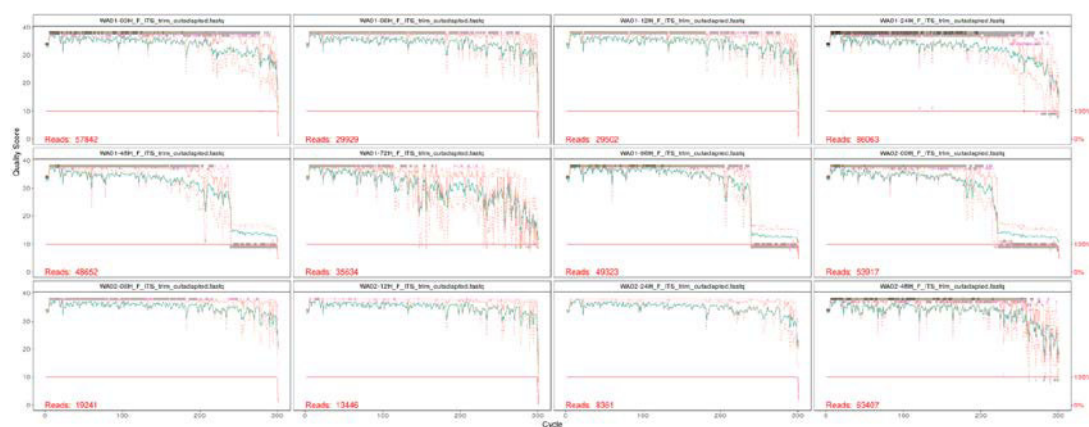


Figura FTV.1. Calidad de secuenciación en lecturas forward.

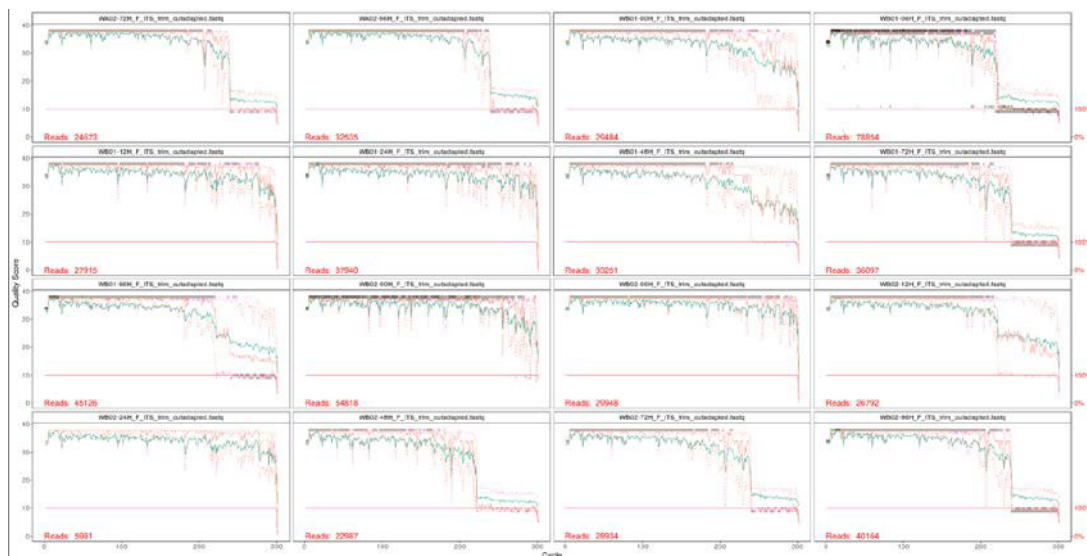


Figura FTV.1. Calidad de secuenciación en lecturas forward (**Continuación...**).

Se observó que para el set de datos forward en hongos y levaduras tiene un $>Q30$ hasta la base 200 aproximadamente, a partir de ahí la calidad de las lecturas bajó hasta un $Q10$. Para este set de datos fue necesario un filtrado menos rígido.

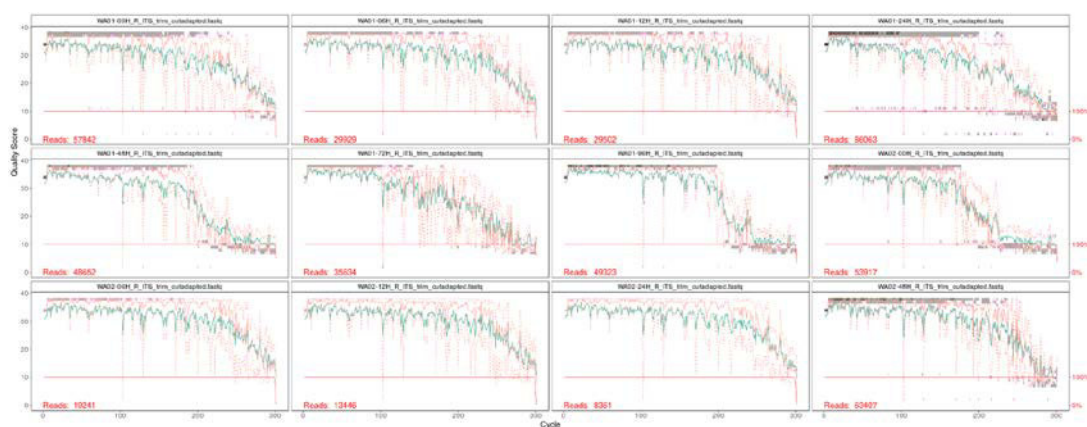


Figura FTV.1. Calidad de secuenciación en lecturas reverse.

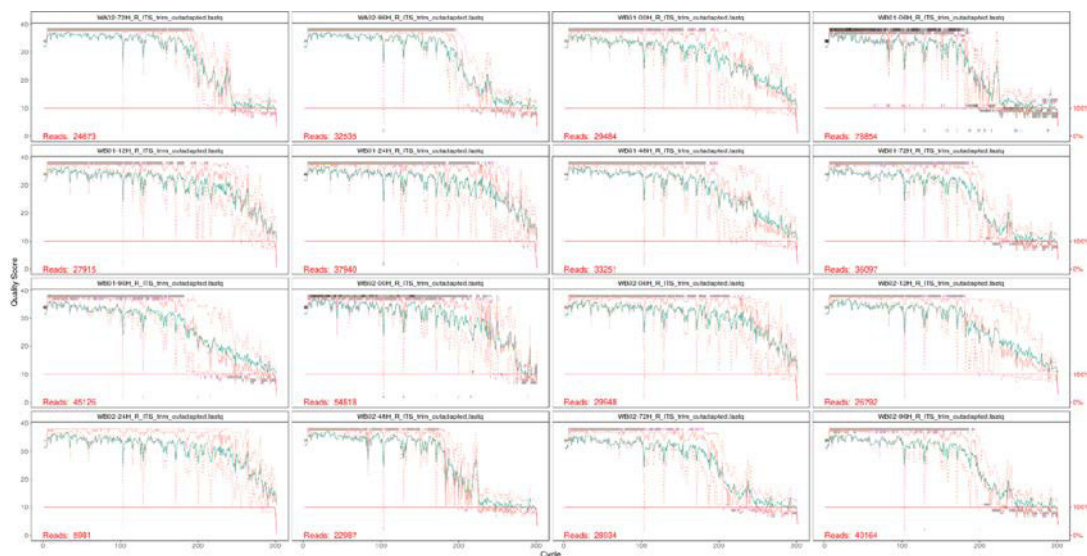


Figura FTV.1. Calidad de secuenciación en lecturas reverse (**Continuación...**).

Se observó que para el set de datos reverse en hongos y levaduras tiene un $>Q30$ hasta la base 160 aproximadamente, a partir de ahí la calidad de las lecturas bajó hasta un $Q10$. Esta variación frente a las lecturas forward se debe al método de síntesis.

FICHA TÉCNICA VI

FILTRADO DE SECUENCIAS

Muestra: Set de datos para levaduras y bacterias

Objetivo: Filtrar el número secuencias en bacterias y levaduras

Desarrollo:

A partir de los gráficos de Q score, se realizó el corte de los primer tanto forward y reverse. Además, un filtrado de las secuencias que tuvieron una puntuación menor Q30. Los resultados se presentan en la tabla FTVI.1 para bacterias y tabla FTVI.2.

Tabla FTVI.1 filtrado de lecturas en bacterias.

Muestras	Input	Filtered	Denoised	Merged	Tabled	Nonchim
WA01-00H	10804	6223	5980	5303	5024	4662
WA01-06H	17738	10187	10116	9172	8601	7961
WA01-12H	15212	8694	8610	7700	7304	6749
WA01-24H	9349	5476	5308	4841	4841	4317
WA01-48H	11930	6870	6622	6109	5898	4397
WA01-72H	9183	5322	5308	4914	4708	4708
WA01-96H	9864	5794	5758	5091	5007	5007
WA02-00H	25132	14844	14766	13643	12745	12143
WA02-06H	37004	21482	21362	20075	19124	16792
WA02-12H	30808	18017	17733	16045	15312	11591
WA02-24H	15981	9347	9252	8684	8241	7806
WA02-48H	20142	11826	11638	10457	10338	7591
WA02-72H	13114	7683	7586	7203	6984	6405
WA02-96H	19229	11276	11238	11015	10588	10588
WB01-00H	8267	4772	4595	3982	3982	3851
WB01-06H	13807	8033	7962	7280	6947	6665
WB01-12H	10288	5933	5865	5423	5169	4541
WB01-24H	9553	5481	5286	4455	4384	3931
WB01-48H	7595	4359	4212	3712	3712	3484
WB01-72H	4324	2511	2423	2045	2045	1804
WB01-96H	9978	5792	5621	4906	4773	4561

Tabla FTVI.1 filtrado de lecturas en bacterias (**Continuación...**)

Muestras	Input	Filtered	Denoised	Merged	Tabled	Nonchim
WB02-00H	18814	10852	10751	10315	9826	9411
WB02-06H	32448	18804	18700	17550	16768	16076
WB02-12H	25821	14843	14767	14337	13685	13451
WB02-24H	22624	12980	12596	11326	11165	8861
WB02-48H	18966	10927	10619	10007	9720	9331
WB02-72H	15848	9171	8982	8121	7693	6789
WB02-96H	16233	9593	9545	9142	8647	8647

Tabla FTVI.2 filtrado de lecturas en levaduras.

Muestras	Input	Filtered	Denoised	Tabled	Nonchim
WA01-00H	57842	35244	35016	33444	15546
WA01-06H	29929	20915	20821	19556	11814
WA01-12H	29502	20449	20392	19217	12129
WA01-24H	86063	42811	42534	18318	12770
WA01-48H	48652	4184	3691	2288	2035
WA01-72H	35634	11134	11098	0	0
WA01-96H	49323	3848	3437	2407	2020
WA02-00H	53917	2000	1979	1820	1714
WA02-06H	19241	14197	14120	12872	6799
WA02-12H	13446	9747	9725	9714	7179
WA02-24H	8361	6165	6139	5318	3425
WA02-48H	63407	37377	37255	20166	13700
WA02-72H	24673	2019	1921	1507	1507
WA02-96H	32535	4952	4745	3984	3921
WB01-00H	29484	14943	14793	13932	7977
WB01-06H	78854	2801	2762	2711	2079
WB01-12H	27915	19634	19545	18803	8746
WB01-24H	37940	26828	26686	25942	11629
WB01-48H	33251	14281	13935	13302	10331
WB01-72H	36097	1918	1729	1407	1407
WB01-96H	45126	13573	12817	11177	7427
WB02-00H	54818	34599	34486	18784	15315
WB02-06H	29948	21943	21807	20936	12574
WB02-12H	26792	10568	10536	9689	6574
WB02-24H	5981	4325	4311	4297	3064
WB02-48H	22987	791	772	672	672
WB02-72H	28934	2774	2550	1375	1375
WB02-96H	40164	3675	3509	2539	2456

FICHA TÉCNICA VII

PROFUNDIDAD DE MUESTREO

Muestra: Conteo de lecturas de secuenciación en las muestras obtenidas

Objetivo: Observar la distribución del número secuencias en bacterias y levaduras

Desarrollo:

El objeto phyloseq fue filtrado usando lenguaje de programación R versión 3.6.3. por medio del paquete BIOCONDUCTOR versión 3.10. De acuerdo a la calidad de las secuencias, fueron separados los primers y seleccionados según el mejor hit. Posteriormente, se realizó la Figura FTVII.1 de la distribución del conteo de lecturas para observar la profundidad de secuenciación.

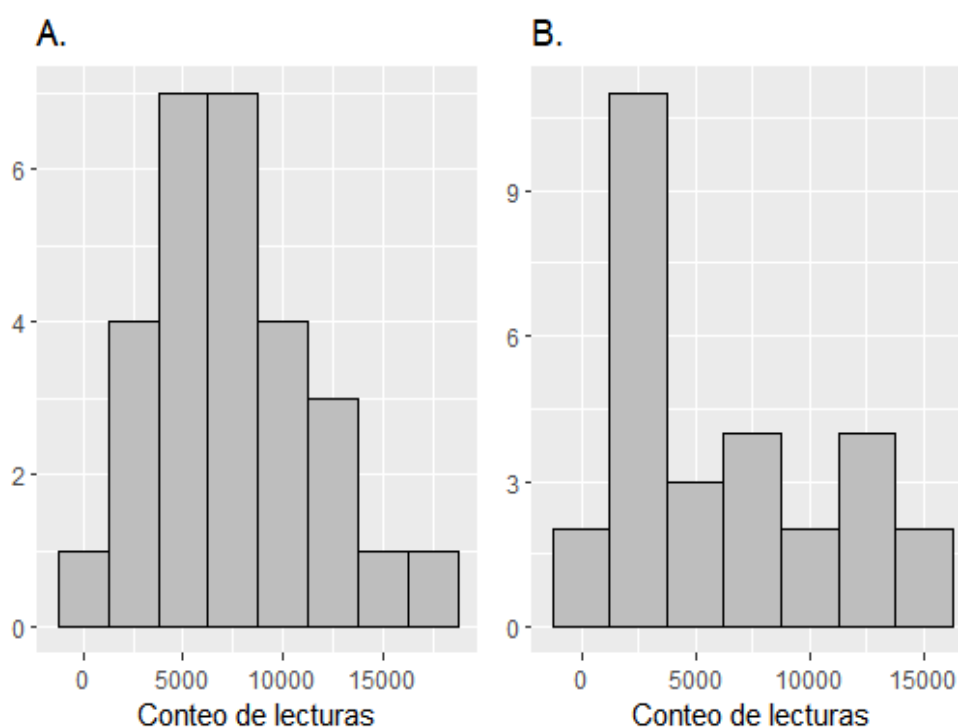


Figura FTVII.1. Distribución de la profundidad de secuenciación de las muestras a) la región V4 de bacterias. Y b) la región ITS de para hongos y levaduras.

Se observó que para bacterias el número de lecturas obtenidas con el primers para la región V4 siguió una distribución normal según el histograma A, mientras que para levaduras con el primers para la región BITS presentó una distribución del conteo lecturas de varias clases, siguiendo una aproximación sesgada hacia la izquierda.

FICHA TÉCNICA VIII

ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD

Muestras: Índices de biodiversidad alfa de las muestras obtenidas en la fermentación.

Objetivo: Determinar los índices de Chao1, Shannon y Simpson

Desarrollo:

- Chao

Es un estimador del número de especies en una comunidad basado en la probabilidad de no observar especímenes de una muestra. Se calculo mediante la ecuación FTVIII.1

$$Chao1 = S + \frac{a^2}{2b} \quad [FTVIII. 1]$$

Dónde:

S: es el número de especies en una muestra.

a: es el número de especies que se encuentran presentes solamente por un único individuo en una misma muestra.

b: es el número de especies representadas por dos individuos en la muestra.

- Shannon

Es un estimador para medir la abundancia relativa. Se calculó mediante la ecuación FTVIII.2.1 y FTVIII.2.2

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad [FTVIII. 2.1]$$

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i * \log_2 p_i) \quad [FTVIII. 2.2]$$

Dónde:

H' : índice de Shannon-Wiener

p_i: proporción de individuos de la especie *i* respecto al total de individuos

n_i: número de individuos de la especie *i*

N : número de todos los individuos de todas las especies

S: número de especies (riqueza de especies).

- Simpson

Es el indicador de 1 – la probabilidad de que observemos aleatoriamente dos individuos en una comunidad y que pertenezcan a distintas especies. Se calculó mediante la ecuación FTVIII.3

$$D = 1 - \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \quad \text{[FTVIII. 3]}$$

Dónde:

D : índice de Simpson

n : número total de organismos de una especie

N : número total de organismos de todas las especies

Estos resultados de los índices alfa, se obtuvieron mediante el paquete MICROBIOME versión 1.8.0, a través de la función global del lenguaje R. Los resultados se muestran en la Tabla FTV.1

Tabla FTVIII.1 índices de diversidad alfa

Muestras	Chao1	Shannon	Evenness Simpson	Dominance Simpson
WA01-00H	8	0,934	0,212	0,588
WA01-06H	7	0,886	0,298	0,479
WA01-12H	6	0,94	0,342	0,488
WA01-24H	6	0,975	0,382	0,437
WA01-48H	7	1,405	0,429	0,333
WA01-72H	4	0,154	0,264	0,946
WA01-96H	4	0,484	0,33	0,757
WA02-00H	6	0,728	0,242	0,689
WA02-06H	9	1,361	0,315	0,352
WA02-12H	6	1,208	0,509	0,327
WA02-24H	4	1,123	0,756	0,331
WA02-48H	6	0,87	0,328	0,509
WA02-72H	5	0,884	0,366	0,547
WA02-96H	8	0,833	0,208	0,601
WB01-00H	9	0,988	0,243	0,457
WB01-06H	7	1,35	0,452	0,316
WB01-12H	4	0,897	0,496	0,504
WB01-24H	8	0,981	0,216	0,579
WB01-48H	6	0,993	0,323	0,516
WB01-72H	5	1,101	0,537	0,372
WB01-96H	6	1,168	0,429	0,388

Tabla FTVIII.1 índices de diversidad alfa (continuación...)

Muestras	Chao1	Shannon	Evenness Simpson	Dominance Simpson
WB02-00H	6	1,022	0,379	0,44
WB02-06H	5	1,062	0,521	0,384
WB02-12H	7	0,893	0,278	0,514
WB02-24H	9	1,74	0,579	0,192
WB02-48H	6	0,564	0,226	0,737
WB02-72H	5	1,2	0,552	0,362
WB02-96H	8	0,776	0,199	0,627

FICHA TÉCNICA IX

DISEÑO EXPERIMENTAL

Muestras: Datos obtenidos posterior a la identificación taxonómica

Objetivo: Determinar el análisis estadístico de los datos obtenidos en de las muestras de la fermentación del cacao

Desarrollo:

El análisis estadístico se realizó con lenguaje de programación R versión 3.6.3. Se realizó un diseño por bloques completamente al azar (DBCA). Se comparó en 2 tipos fermentadores hexagonal codificados como: WA con paletas internas y WB sin paletas, cada uno por duplicado. A cada uno se colocó igual cantidad en peso de almendras de cacao “Nacional” y las muestras se recolectaron en diferentes tiempos (horas) de cada fermentador. Los detalles del diseño se presentan la ecuación FTIX.1 y tabla FTIX.1.

Modelo del diseño

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, b \end{cases} \quad [\text{FTIX. 1}]$$

Donde:

Y_{ij} es la medición sobre el número de tratamientos i y al bloque j

i es número de fermentadores ($i=2$)

j son los diferentes tiempos de fermentación ($j=7$)

μ es la media global poblacional

τ_i es el efecto debido al tratamiento

γ_j es el efecto debido al bloque j ,

ε_{ij} es el error aleatorio atribuible a la medición Y_{ij}

Tabla FTIX.1. Arreglo de datos para el diseño de bloques completo al azar

Fermentador		Tiempos de fermentación (horas)						
Código	Réplica	00	06	12	24	48	72	96
WA	01	YWA01.00	YWA01.06	YWA01.12	YWA01.24	YWA01.48	YWA01.72	YWA01.96
	02	YWA02.00	YWA02.06	YWA02.12	YWA02.24	YWA02.48	YWA02.72	YWA02.96
WB	01	YWB01.00	YWB01.06	YWB01.12	YWB01.24	YWB01.48	YWB01.72	YWB01.96
	02	YWB02.00	YWB02.06	YWB02.12	YWB02.24	YWB02.48	YWB02.72	YWB02.96

Prueba de t para 2 muestras independientes.

Prueba de Hipótesis

Ho: no hay diferencia o cambio en la diversidad alfa según el tipo de fermentador con paletas o sin paletas ($\mu_1=\mu_2$).

H1: hay diferencia o cambio en la diversidad alfa según el tipo de fermentador con paletas o sin paletas ($\mu_1\neq\mu_2$).

Para el análisis estadístico del diseño experimental. Se realizó la prueba de Shapiro - Wilk para la revisión de los datos siguen una distribución normal. Los valores del p-valor de las muestras se presentan Tabla FTIX.2.

Ho: El conjunto de datos obtenidos de la fermentación siguen una distribución normal.

H1: El conjunto de datos obtenidos de la fermentación no siguen una distribución normal.

Tabla FTIX.2 Prueba de normalidad

Fermentador	W	p-valor
WA01	0,917	0,45
WA02	0,921	0,479
WB01	0,903	0,352
WB02	0,939	0,63

Se observó que el p-valor de la prueba de Shapiro -Wilk (W) es mayor que 0,05, por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula de que el conjunto de datos siguió una distribución normal.

Se realizó el análisis de la varianza para las variables de respuesta. Los resultados se muestran en la Tabla FTIX.3.

Tabla FTIX.3 Prueba de ANOVA para el índice de Shannon

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr(>F)
Fermentador	1	0,136	0,136	1,502	0,235
Tiempo	6	0,549	0,091	1,011	0,446
Residuals	20	1,812	0,091		

Se observó que el p-valor de la prueba – F es mayor al 0,05. Siendo así, que no existió diferencia significativa para la variable del índice de diversidad alfa entre el nivel Fermentador (con paletas internas y sin paletas internas) y el nivel Tiempo.

Se comparó cada uno de los fermentadores del ensayo con la prueba de t para dos muestras independientes. Los resultados se muestran en la Tabla FTIX.4.

Tabla FTIX.4 Prueba de t de dos muestras

Comparación	t-test	df	p-valor
WA01-WA02	-1.006	12	0,334
WB01-WB02	0,206	12	0,84
WA01-WB01	-1.504	12	0,158
WA01-WB02	-1,024	12	0,326
WA02-WB01	-0,643	12	0,531
WA02-WB02	-0,216	12	0,832

Se observó que el p-valor de la prueba – T para dos muestras independientes es mayor al 0,05. Siendo así, que no existió diferencia significativa entre las réplicas con un intervalo de confianza de 95%.

Se verificó los resultados con la prueba de LSD de Fisher para comparar si los dos tipos de fermentadores WA con paletas internas y WB sin paletas internas son categorizados en un mismo grupo. Los resultados se muestran en la Tabla FTIX.5.

Tabla FTIX.5 Método LSD de Fisher para los dos tipos de fermentadores

Fermentador	Índice Shannon	Grupo	Min	Max
WA	0,913	a	0,154	1,405
WB	1,053	a	0,564	1,741

Se concluyó que, para los índices de diversidad alfa entre los dos tipos de fermentadores, presentaron resultados semejantes de los que con la prueba de LSD de Fisher estuvieron en un mismo grupo, con un intervalo del 95% de confianza.

FICHA TÉCNICA X

ANÁLISIS PERMANOVA

Muestras: Diversidad beta para levaduras y bacterias

Objetivo: Realizar el análisis estadístico basado en permutaciones con respecto a factores físico – químicos

Desarrollo:

El análisis estadístico se realizó con el lenguaje de programación R versión 3.6.3. Se aplicó la función “adonis” de paquete VEGAN versión.2.5-7 Los datos fueron aplicados matriz de distancia con el método de Bray Curtis que posteriormente fue comparada con los metadatos. Los resultados de PERMANOVA para levaduras se muestra en la Tabla FTX.1 y para bacterias se muestran en la Tabla FTX.2.

Tabla FTX.1 Permutaciones para la diversidad beta en levaduras

	Df	Sums of Sqs	MeansSqs	F. model	R2	Pr(>F)
pH	1	0,27	0,27025	1,03	0,033	0,422
Temperatura	1	1,637	1,637	6,245	0,204	0,001
Fermentador	1	0,123	0,123	0,471	0,015	0,852
Réplica	1	0,128	0,128	0,489	0,016	0,818
Tiempo	1	0,344	0,344	1,313	0,04	0,233
Residuales	21	5,501	0,262		0,687	
Total	26	8,012			1	

Tabla FTX.2. Permutaciones para la diversidad beta en bacterias

	Df	Sums of Sqs	MeansSqs	F. model	R2	Pr(>F)
pH	1	0,763	0,763	3,025	0,078	0,002
Temperatura	1	1,58	1,581	6,267	0,163	0,001
Fermentador	1	0,576	0,576	2,285	0,059	0,028
Réplica	1	0,204	0,204	0,801	0,021	0,601
Tiempo	1	1,019	1,019	4,039	0,105	0,001
Residuales	22	5,549	0,252		0,572	
Total	27	9,693			1	

