

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS
MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO
FERMENTATIVO DE LOS GRANOS DE CACAO (*Theobroma
cacao*L.)**

Br. JUANA INES MACHUCA GUEVARA

TUMBES, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS
MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO
FERMENTATIVO DE LOS GRANOS DE CACAO (*Theobroma
cacao*L.)**

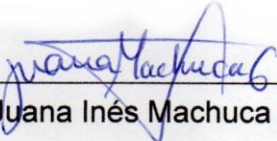
Br. JUANA INES MACHUCA GUEVARA

TUMBES, PERÚ

2019

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, JUANA INES MACHUCA GUEVARA, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada, sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también que, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo, con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y jurado calificador.


Br. Juana Inés Machuca Guevara

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

Tumbes - Perú

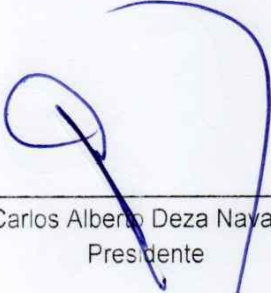
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los diecisiete días del mes de noviembre del año dos mil dieciocho, a las 17.25 horas, en LA SALA DE SESIONES DE LA ESCUELA DE POSGRADO, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 083-2018/UNTUMBES-EPG-D; Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Dr. Ramón García Seminario - Secretario; Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier, - Vocal y con Resolución Directoral N° 0172-2018/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: "Caracterización molecular de los microorganismos presentes durante el proceso fermentativo de los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*)", presentada por la egresada del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular Br. Juana Inés Machuca Guevara, asesorada por el Ph. D. Emmerik Motte Darricau.


Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 18.05 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.


Tumbes, 17 de noviembre de 2018.



Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente



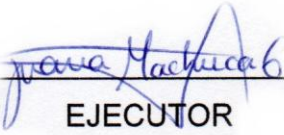
Dr. Ramón García Seminario
Secretario



Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier
Vocal


RESPONSABLES

Br. Juana Inés Machuca Guevara



EJECUTOR

Ph. D. Emmerik Motte Darricau



ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete



A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop at the top and a vertical stroke extending downwards, crossing a horizontal line.

PRESIDENTE

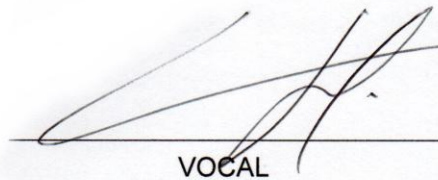
Dr. Ramón García Seminario



A complex handwritten signature in black ink with multiple overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom, crossing a horizontal line.

SECRETARIO

Ph. D. Eric Louis Mialhe Matonnier



A handwritten signature in black ink with several overlapping diagonal strokes, crossing a horizontal line.

VOCAL

AFILIACIÓN INSTITUCIONAL DE LOS AUTORES

Caracterización molecular de los microorganismos en la fermentación de los granos de cacao(*Theobromacacao* L.)

Molecular characterization of microorganisms in cocoa-bean fermentation
(*Theobroma cacao* L.)

Juana Inés Machuca-Guevara^{1,3*}, Erick Antonio Suárez-Peña², Emmerik Motte Darricau^{3, 4}, Eric Louis Mialhe-Matonnier^{3, 4}.

¹Programa de maestría de Ciencia Activa en Biotecnología Molecular. Universidad Nacional de Tumbes.

²Cooperativa de Trabajadores BIOTECOOP, Departamento de Biotecnología Agrícola.

³Empresa de investigación y servicio Incabiotec SAC. Tumbes, Tumbes.

⁴Concepto Azul. Guayaquil, Ecuador.

*Autor para correspondencia

Email Juana Inés Machuca-Guevara: juanamachucag310@gmail.com

Email Erick Antonio Suárez Peña: esupeantonio@gmail.com

Email Emmerik Motte Darricau: motte.emmerik@gmail.com

Email Eric Louis Mialhe-Matonnier:ericmialhe@yahoo.fr

Los autores declaran que no presentan conflicto de intereses.

Proyecto de investigación fue financiado por la empresa Incabiotec SAC, el programa de maestría en Biotecnología Molecular, convenio N° 000190-2015-FONDECYT DE y de la Universidad Nacional de Tumbes.

RESUMEN

La fermentación de granos de cacao es un proceso espontáneo de post cosecha muy importante para el desarrollo de aroma y sabor a chocolate el cual involucra un sin número de actividades microbianas complejas. Estudios previos, a través del análisis de secuenciamiento de ADNr 16S y la región ITS, han identificado la microbiota presente en éste proceso. Actualmente la Espectrometría de Masas MALDI-TOF ha mostrado gran interés en la identificación rápida y eficaz de microorganismos. Por lo tanto, basándonos en dichos estudios, se procedió a identificar los microorganismos presentes en granos de cacao antes, durante y después del proceso de fermentación aplicando dos métodos: mediante el análisis de secuenciamiento de ADN y a través de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF. Dentro del grupo de bacterias y levaduras predominantes identificadas por el primer método tenemos a *Lactobacillus plantarum* (29%), *L. brevis* (18%), *Bacillus cereus* (15%), *Pediococcus acidilactici* (12%),y *Pichia kudriavzevii* (100%).Asimismo se caracterizó por huella de masas las secuencias peptídicas más importantes de cada cepa identificada. Aplicando el segundo método, se identificaron 57 especies de microorganismos, siendo el 73.7% especies bacterianas y el 26.3% especies de levaduras. Adicionalmente se detectaron secuencias peptídicas de la proteína Vicilina responsable del aroma característico de los granos de cacao fermentados y a la proteína albumina de 21KDa.

Palabras clave: Granos de cacao, fermentación, microorganismos, secuenciamiento de ADN, MALDI-TOF/TOF MS.

ABSTRACT

Cocoa beans fermentation is a spontaneous process of post-harvest very important for the development of chocolate aroma and flavor, which involves a number of complex microbial activities. Previous studies, through 16S rDNA and ITS region sequencing analysis have identified the microbiota present in this process. Currently, MALDI-TOF mass spectrometry has shown great interest in the rapid and efficient identification of microorganisms. Therefore, based on these studies, we proceeded to identify the microorganisms present in cocoa beans before, during and after the fermentation process by applying two methods: through DNA sequencing analysis and through MALDI TOF / TOF mass spectrometry. Within the group of predominant bacteria and yeast identified by the first method, we have *Lactobacillus plantarum* (29%), *L. brevis* (18%), *Bacillus cereus* (15%), *Pediococcus acidilactici* (12%), and *Pichia kudriavzevii* (100%). Likewise, the most important peptide sequences of each identified strain by mass fingerprint were characterized. On the other hand, applying the second method, 51 species of microorganisms being 73.7% bacterial species and 26.3% yeast species were identified. Additionally peptide sequences responsible Vicilin protein characteristic aroma of the fermented cocoa beans and the albumin protein of 21KDa were detected.

Keywords: Cocoa beans, fermentation, microorganisms, DNA sequencing, MALDI-TOF/TOF MS.