Artículo original producto de la investigación

Caracterización molecular de microorganismos silvestres asociados a fermentaciones artesanales de cacao en el municipio de Los Andes, Nariño, Colombia

Molecular Characterization of Wild Microorganisms Associated with Artisanal Cacao Fermentations in the Municipality of Los Andes, Nariño, Colombia

Pablo Fernández Izquierdo[1], Julián Felipe Martínez Muñoz[2], Kevin Mauricio Miramag Yaqueno[3], Fedra Ortiz Benavides[4]

Resumen

El presente estudio se centra en la caracterización molecular de los microorganismos asociados a la fermentación de cacao en el departamento de Nariño, Colombia. A través del análisis de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y D1/D2 ARNr (26S) para levaduras, y 16S ARNr para bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), se identificaron diversos microorganismos involucrados en la fermentación del cacao. Además, se aplicó la técnica *in-silico* de RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) para resolver las relaciones intraespecíficas y establecer patrones moleculares diferenciados. Se identificaron aislados de *Saccharomyces cerevisiae, Pichia kudriavzevii, Candida tropicalis, Candida glabrata, Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Acetobacter fabarum, Acetobacter okinawensis* y *Acetobacter tropicalis*. El uso de enzimas de restricción como *AluI, MseI, HinfI, HhaI, HaeIII* fueron clave para discriminar entre especies y resolver relaciones intraespecíficas en los clados. Estos resultados proporcionan una base sólida para caracterizar mejor la diversidad microbiana en la fermentación del cacao en esta región.

Palabras clave: Análisis de secuencias de ARN, Microbiota, Fermentación, Cacao, RFLP.

1. Grupo de Investigacion Biotecnologia Microbiana, Universidad de Nariño. País Colombia.
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0158-8398
Google académico: https://scholar.google.es/citations?hl=es&user=_8qlUXgAAAAJ

2.Grupo de Investigacion Biotecnologia Microbiana, Universidad de Nariño. País Colombia.
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2279-3972
Google académico: https://scholar.google.com/citations?hl=es&user=FrqXoXAAAAAJ

3. Grupo de Investigacion Biotecnologia Microbiana, Universidad de Nariño. País Colombia.
ORCID: https://orcid.org/0009-0005-0040-1079
Google académico: https://scholar.google.com/citations?user=6OXu-UcAAAAJ&hl=es

4. Grupo de Investigacion BIOTICS, Universidad Nacional Abierta y a Distancia. País Colombia.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5042-4499
Google académico: https://scholar.google.es/citations?user=lDny4UgAAAAJ&hl=es

Correspondencia: julian.felipe.mm@gmail.com

https://doi.org/10.22490/24629448.9986

Recibido: 13/01/2025
Aceptado: 10/04/2025

Abstract

This study focuses on the molecular characterization of microorganisms associated with cacao fermentation in the department of Nariño, Colombia. Through the analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 and D1/D2 rRNA (26S) regions for yeasts, and 16S rRNA for lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB), various microorganisms involved in cacao fermentation were identified. Additionally, the in-silico RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique was applied to resolve intraspecific relationships and establish differentiated molecular patterns. Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter okinawensis*, and *Acetobacter tropicalis* were identified. The use of restriction enzymes such as *AluI*, *MseI*, *HinfI*, *HhaI*, and *HaeIII* was key to discriminating between species and resolving intraspecific relationships in the clades. These results provide a solid foundation for better characterizing the microbial diversity in cacao fermentation in this region.

Keywords: RNA Sequence Analyses, Microbiota, Fermentation, Cocoa, RFLP.

Introducción

Theobroma cacao L., probablemente originario de áreas neotropicales (1,2), presenta una amplia diversidad genética entre las fronteras de Brasil, Perú, Ecuador y Colombia (3)the Criollo population, underwent strong domestication ~3600 years ago (95% CI: 2481–13,806 years ago. Su cultivo se extiende a lo largo de diversas zonas tropicales y representa un componente fundamental de la economía global, principalmente por el valor de sus semillas (4,5)quality control is achieved by visual inspection (e.g.; \"cut test\". Las características organolépticas de estas semillas son esenciales para su comercialización, y la fermentación desempeña un papel crucial en el desarrollo de estas propiedades sensoriales (6).

La fermentación del cacao es un proceso complejo, influenciado principalmente por la acción de comunidades microbianas diversas. Estas comunidades, compuestas por levaduras, bacterias ácido lácticas (LAB) y bacterias ácido acéticas (AAB), participan en una serie de reacciones metabólicas que afectan el perfil químico y sensorial del cacao fermentado (7,8). Durante este proceso, la caracterización de los microorganismos involucrados se ha convertido en un aspecto clave para comprender mejor cómo

sus interacciones y dinámicas afectan la calidad final del producto (9,10).

En los últimos años, los avances en las técnicas de biología molecular han permitido una caracterización más precisa de los microorganismos. Métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación de ADN y el análisis de la diversidad genética microbiana mediante técnicas como el perfilado a partir de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), han proporcionado nuevas herramientas para identificar y caracterizar de manera eficiente los microorganismos presentes durante la fermentación del cacao (11). Estas tecnologías moleculares no solo permiten una identificación taxonómica precisa, sino que también representan una base sólida para la exploración de información sobre las funciones metabólicas específicas de los microorganismos, lo que resulta crucial para entender su papel durante la fermentación de cacao y su aporte en las características organolépticas de los productos derivados del proceso (12,13).

Aunque se ha realizado diferentes estudios sobre la diversidad microbiana en procesos de fermentación de cacao en diversas regiones del mundo, en Colombia, particularmente en el departamento de Nariño, aún existe una carencia de estudios que caractericen molecularmente a los microorganismos involucrados en este proceso (14,15). Dada la influencia de las condiciones ecológicas y geográficas en las comunidades microbianas, una caracterización molecular en esta región es crucial para caracterizar los microorganismos asociados a los procesos de fermentación de cacao en Nariño.

Bajo este contexto, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar molecularmente los microorganismos asociados a la fermentación de cacao. Los resultados obtenidos representan información relevante sobre la diversidad microbiana y las características moleculares de los aislados en esta región, se espera que los resultados puedan contribuir en el desarrollo de otras investigaciones y en la formulación de estrategias que mejoren los procesos de fermentación de cacao y la calidad del producto final.

Materiales y metodos

Lugar de muestreo

Las muestras de cacao de la variedad ICS 95 se colectaron en la vereda El Placer del municipio de los Andes-Sotomayor (1°32'50.5"N - 77°28'0.055"W). Este municipio está ubicado en la región andina del departamento de Nariño, cuenta con una temperatura promedio anual de 25 °C y un nivel de humedad relativa de 36% aproximadamente. El muestreo se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas de fermentación, en cada etapa se colectaron por triplicado muestras de 500 g de semillas fermentadas, las cua-

les estaban compuestas por submuestras de 100 g colectadas a diferentes puntos de profundidad de los cajones de fermentación (10, 20, 30 40 y 50 cm) (16).

Aislamiento y conservación de microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron 20 g de semillas trituradas de cada muestra y se mezclaron con 180 mL de agua estéril con un homogenizador *Scilogex* D160 a 8000 rpm por 5 min. De las soluciones resultantes se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-6} en agua estéril y a partir de cada dilución se inocularon 100 en medios de cultivo selectivos a través del método de siembra en superficie con perlas de vidrio. Para el aislamiento de levaduras se utilizó agar YGC, para BAL agar MRS y para BAA agar DMS suplementado con 0.5% etanol y 0.3% ácido acético.

Para la obtención de cultivos axénicos se empleó la técnica de siembra en estría cruzada, el tiempo de incubación se estableció de 48 a 72 h dependiendo el tipo de microorganismo y se mantuvo una temperatura constante de 30 °C. Adicionalmente, para los aislados bacterianos se realizaron tinciones de Gram y prueba de catalasa. Por último, los cultivos axénicos fueron conservados en glicerol con una proporción 1:1 y se almacenaron a -20°C.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de levaduras se realizó con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) y la extracción de ADN bacteriano con el *Kit GenElute™ Bacterial Genomic* (Sigma) siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes.

Reacciones de PCR y secuenciación

Para levaduras se amplificó la región que comprende los espaciadores transcritos internos del gen ribosomal 5.8S (ITS1-5.8S ARNr-ITS2) con los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), bajo las siguientes condiciones de termociclado: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 2 min, anillamiento a 60 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2,5 min; extensión final a 72 ° C durante 7 min; y refrigeración a 4 °C . Además, se amplificó el dominio D1/D2 de la subunidad ribosomal 26S (D1/D2 ARNr 26S) con los cebadores NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3 ') y NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'), bajo la siguiente configuración de termociclado: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 2 min, anillamiento a 52 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C durante 7 min; y refrigeración a 4 °C (7).

Para las bacterias se amplificó el gen 16S ARNr con los cebadores respectivos para cada grupo bacteriano. Para BAL se utilizaron los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'), bajo las siguientes condiciones de termociclado: desnaturalización inicial a 94 ºC durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 ºC por 1 min, anillamiento a 58 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C durante 10 min; y refrigeración a 4 °C (17). Para BAA se utilizaron los cebadores 16Sd (5'-GCTGGCGGCATGCTTAACACAT-3') y 16Sr (5'-GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT-3'), bajo el siguiente programa de termociclado: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, anillamiento a 51 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C durante 5 min; y refrigeración a 4 °C (18).

Las reacciones de PCR se utilizo PCR convencional (19) se realizaron con el kit *GoTaq G2 Green Master Mix 1X* (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Los amplicones se enviaron para purificación y secuenciación por el método *Sanger*.

Condiciones de electroforesis

La extracción de ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa a 1%. Las condiciones de corrida se ajustaron a 100V durante 1 h y se utilizó la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* como referencia de tamaño molecular. Para el caso de las PCR se utilizó la escalera *Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*. Los geles de electroforesis se visualizaron en un transiluminador UV (Fisher Scientific) a 320 nm.

Identificación de los microorganismos

Las secuencias se editaron en *Chromas Pro V.2.01*, en caso de ser necesario se eliminaron las regiones de baja calidad determinadas por el programa. Con las secuencias editadas se identificaron los diferentes aislados microbianos utilizando la herramienta de búsqueda básica de alineación local (BLAST) del NCBI (Fecha de acceso: 08/11/2021). Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: porcentaje de identidad, valor E, cobertura de alineamiento y puntaje máximo. Por último, las secuencias fueron registradas en la base de datos del NCBI para la obtención de los códigos de acceso respectivos.

Análisis filogenético

El alineamiento de las secuencias para cada grupo microbiano se realizó en el programa *BioEdit* V.7.2.5. Los árboles filogenéticos se construyeron bajo el método de *Neighbor-joining* con los siguientes parámetros en el software PAUP: *Distance measure: Maximum-likelihood*; *Resampling method:*

Bootstrap 1000 reps (Swofford, 2015). Los modelos de sustitución nucleotídica se determinaron según el criterio de información bayesiana (BIC) en el software JModelTest V.2.1.10 (20). Adicionalmente, se utilizaron secuencias de referencia de la base de datos del *GenBank* del NCBI para establecer las raíces internas y externas en cada análisis. Para las levaduras se construyeron dos árboles filogenéticos, uno con respecto a la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y otro para el dominio D1/D2 ARNr (26S). En el caso de las BAL y BAA, se construyó un árbol para cada grupo bacteriano de acuerdo con las secuencias del gen 16S ARNr.

Análisis in-silico con cortes con enzimas de restricción

Los análisis *in-silico* de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se realizaron en el software *ApE- A plasmid Editor* V3.1.3 (21). Para cada análisis se seleccionaron 5 enzimas de restricción de acuerdo con los siguientes criterios: que generen más de un corte y que dichos cortes se presenten en la totalidad de las secuencias (22,23). . El número de cortes y el tamaño de los fragmentos generados se verificaron en geles de agarosa *in-silico* con la siguiente configuración: Gel %: 2.5;Min bp:25; DNA MWMarker: Invitrogen 50pb DNA Ladder. Con los patrones de bandas de RFLP se realizó una matriz de presencia-ausencia con respecto al tamaño de los fragmentos formados por las diferentes enzimas de restricción para cada análisis. Posteriormente, se realizó un análisis de agrupamiento según el coeficiente de *Sorensen-Dice* en el software *RStudio* V.1.4.1106 (24).

Analisis y resultados

Aislamiento de microorganismos

Se obtuvieron un total de 129 aislados microbianos, de los cuales, 20 corresponden a levaduras, 10 a BAL y 10 a BAA, según la caracterización fenotípica. Las levaduras y BAL se aislaron principalmente de las muestras colectadas a las 24 y 48 h de fermentación, y las BAA corresponden en su mayoría a las muestras con 72 y 92 h de fermentación.

Caracterización molecular de los microorganismos

Levaduras

Según la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 se identificaron las siguientes levaduras: 11 aislados de *Saccharomyces cerevisiae*, 3 aislados de *Pichia kudriavzevii*, 4 aislados de *Candida glabrata* y 2 aislados de *Candida tropicalis*. Los porcentajes de identidad estuvieron en un rango de 97.32 hasta 100 % (Tabla 1). De igual manera, con la región del dominio D1/D2 ARNr (26S) se corroboró la identificación de las levaduras con porcentajes de identidad que oscilaron entre

97 hasta 100%, y porcentajes de cobertura superiores a 97 %. (Tabla 2). Los valores E de 0.00 confirmaron una alta coincidencia nucleotídica en el análisis por BLAST para todos los casos.

Tabla 1. Identificación molecular de las levaduras de acuerdo con la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2.

Cód. levaduras	Nombre científico	Tamaño secuencia	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
L09	*C. glabrata*	1058	96%	100.00%	KX450858.1	ON112282
L10	*C. tropicalis*	1035	92%	100.00%	KU962005.1	ON262405
L20	*S. cerevisiae*	1048	74%	97.82%	MN796513.1	ON262406
L27	*C. tropicalis*	1016	94%	100.00%	KP131819.1	ON262407
L28	*C. glabrata*	1057	78%	100.00%	MF187258.1	ON262408
L32	*S. cerevisiae*	1040	94%	98.97%	KP204935.1	ON262409
L33	*S. cerevisiae*	1057	73%	98.97%	KP204935.1	ON262410
L34	*S. cerevisiae*	799	97%	100.00%	MF944081.1	ON262411
L35	*S. cerevisiae*	1006	77%	99.87%	MF944081.1	ON262412
L36	*S. cerevisiae*	1021	96%	100.00%	KF728774.1	ON262413
L37	*C. glabrata*	1009	97%	100.00%	KX450858.1	ON262414
L44	*S. cerevisiae*	1026	76%	100.00%	KC544501.1	ON262415
L51	*P. kudriavzevii*	461	99%	99.57%	MW621910.1	ON262416
L58	*S. cerevisiae*	1017	94%	100.00%	MG734857.1	ON262417
L64	*P. kudriavzevii*	1024	43%	99.78%	MW621910.1	ON262418
L67	*S. cerevisiae*	999	95%	100.00%	MF944081.1	ON262419
L68	*P. kudriavzevii*	1002	95%	99.78%	MK748988.1	ON262420
L69	*C. glabrata*	1225	67%	99.76%	KP780450.1	ON262421
L73	*S. cerevisiae*	1116	69%	97.32%	KC544490.1	ON262422
L79	*S. cerevisiae*	1017	76%	100.00%	MG734853.1	ON262423

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

Tabla 2. Identificación molecular de levaduras aisladas de cacao de acuerdo con el dominio D1/D2 ARNr (26S).

Cód. levaduras	Nombre científico	Tamaño secuencia	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
L09	*C. glabrata*	570	98%	99.82%	MW349784.1	ON239710
L10	*C. tropicalis*	552	100%	99.28%	KJ794665.1	ON239711
L20	*S. cerevisiae*	559	99%	99.64%	JQ824869.1	ON239712
L27	*C. tropicalis*	567	100%	97.00%	KJ794662.1	ON239713

Cód. levaduras	Nombre científico	Tamaño secuencia	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
L28	*C. glabrata*	563	100%	99.29%	MH481612.1	ON239714
L32	*S. cerevisiae*	567	99%	100.00%	MK908002.1	ON239715
L33	*S. cerevisiae*	564	99%	98.75%	JX129896.1	ON239716
L34	*S. cerevisiae*	566	98%	98.57%	JQ824869.1	ON239717
L35	*S. cerevisiae*	571	99%	98.24%	MG017586.1	ON239718
L36	*S. cerevisiae*	559	100%	99.11%	MG017586.1	ON239719
L37	*C. glabrata*	586	95%	99.64%	MZ055423.1	ON239720
L44	*S. cerevisiae*	565	98%	99.46%	KT945088.1	ON239721
L51	*P. kudriavzevii*	550	100%	100.00%	MN648835.1	ON239722
L58	*S. cerevisiae*	563	98%	99.64%	JQ824869.1	ON239723
L64	*P. kudriavzevii*	557	98%	99.64%	KX197411.1	ON239724
L67	*S. cerevisiae*	551	100%	99.82%	LC336450.1	ON239725
L68	*P. kudriavzevii*	556	100%	98.57%	KY108834.1	ON239726
L69	*C. glabrata*	591	97%	98.43%	KF214417.1	ON239727
L73	*S. cerevisiae*	594	97%	97.57%	JX129896.1	ON239728
L79	*S. cerevisiae*	567	98%	98.57%	JQ824869.1	ON239729

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

BAL y BAA

De las 10 BAL, se identificaron 4 aislados de *Levilactobacillus brevis* y 6 aislados de *Lactiplantibacillus plantarum*; y para AAB, 3 aislados de *Acetobacter fabarum,* 3 aislados de *Acetobacter okinawensis* y 4 aislados de *Acetobacter tropicalis*. Para todos los aislados bacterianos se registraron porcentajes de identidad por encima de 95%, alineamientos superiores a 90 % y valores E de 0.00 (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Identificación molecular de las LAB de acuerdo con la región 16S ARNr.

Cód. LAB	Nombre científico	Tamaño secuencia	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
BL02	*L. brevis*	1045	90%	97.45%	MT538890.1	ON245476
BL06	*L. brevis*	1010	98%	99.45%	MH899279.1	ON245477
BL09	*L. plantarum*	1092	99%	99.08%	MH899278.1	ON245478
BL11	*L. plantarum*	1088	98%	99.26%	MH899287.1	ON245479
BL12	*L. plantarum*	1096	98%	98.89%	MH899278.1	ON245480
BL14	*L. plantarum*	1096	98%	98.89%	MH899278.1	ON245485

Cód. LAB	Nombre científico	Tamaño secuencia	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
BL17	*L. plantarum*	1102	98%	98.43%	MH899285.1	ON245481
BL19	*L. brevis*	1073	99%	98.69%	KJ994382.1	ON245482
BL20	*L. plantarum*	996	100%	95.75%	MG646872.1	ON245483
BL23	*L. brevis*	1073	98%	98.77%	KJ994478.1	ON245484

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

Tabla 4. Identificación molecular de las AAB de acuerdo con la región 16S ARNr.

Cód. AAB	Nombre científico	Tamaño secuencia	% Cobertura alineamiento	% Identidad	Ref GenBank	Código de acceso GenBank
BA02	*A. fabarum*	1157	96%	98.21%	MT611597.1	ON239762
BA10	*A. okinawensis*	1158	96%	97.51%	KX214639.1	ON239763
BA11	*A. okinawensis*	1135	98%	96.89%	KX214639.1	ON239764
BA12	*A. fabarum*	1100	100%	98.82%	MT611597.1	ON239765
BA13	*A. tropicalis*	1098	100%	98.82%	MF191596.1	ON239766
BA14	*A. fabarum*	1106	99%	98.73%	MT611597.1	ON239767
BA15	*A. tropicalis*	1113	100%	98.65%	MF191596.1	ON239768
BA17	*A. tropicalis*	1122	99%	97.68%	MH424822.1	ON239769
BA18	*A. tropicalis*	1122	100%	98.13%	MH424822.1	ON239770
BA19	*A. okinawensis*	1109	100%	98.83%	KX214639.1	ON239771

*Valor E: 0.0 para todas las secuencias

Análisis filogenéticos

Levaduras

Los anteriores resultados se relacionan con los análisis de distancias por *Neighbor-joining* tanto para la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 como el dominio D1/D2 ARNr (26S). Para ambas regiones se obtuvieron 4 clados correspondientes a cada una de las especies identificadas, soportados con valores bootstrap superiores a 84.2. Además, se observó que los aislados de *S. cerevisiae* mantienen una relación más cercana con los aislados de *C. glabrata*, mientras que *C. tropicalis* y *P. kudriavzevii* se ubicaron en clados diferentes (Figura 1 y 2). Cabe resaltar que las relaciones dentro de los clados presentan una topología diferente al analizar cada región por separado. Específicamente en el árbol del dominio D1/D2 ARNr (26S), se evidenciaron politomías tanto en el clado de *S. cerevisiae* como en *P. kudriavzevii*, esto probablemente debido a las bajas distancias genéticas que dificultaron resolver las relaciones intraespecíficas (*S. cerevisiae*: 0.000 - 0.021; *P. kudriavzevii*: 0.000 - 0.016).

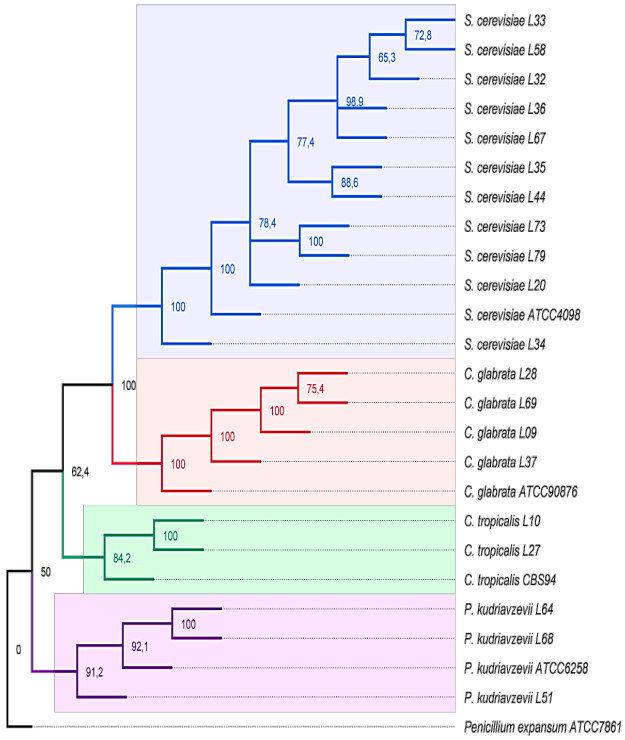


Figura 1. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las levaduras identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap: Modelo evolutivo: HKY85 + G (*gama shape*= 0.895; *p-invar*= 0.00)

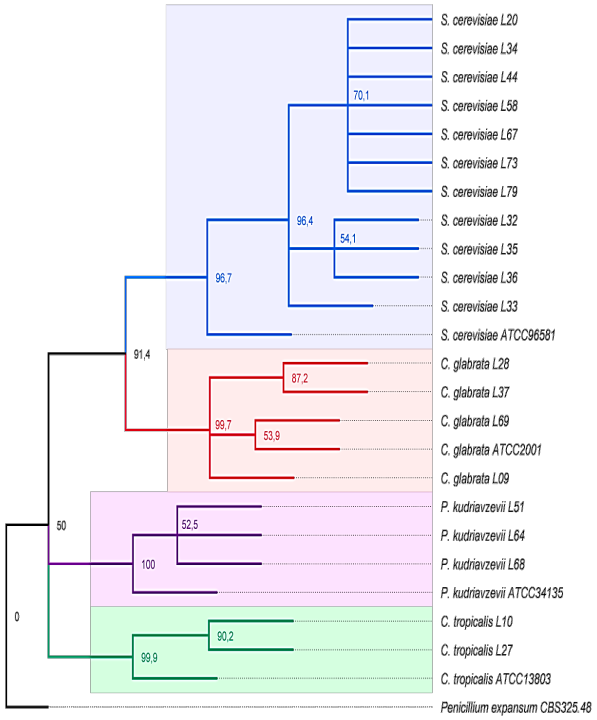


Figura 2. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes al dominio D1/D2 ARNr (26S) de las levaduras identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap; Modelo evolutivo: TIM3 + G (*gama shape*= 0.440; *p-invar*= 0.00)

BAL y BAA

En el árbol filogenético de BAL se observaron 2 clados, uno para *L. brevis* y el otro para *L. plantarum* soportados con valores bootstrap de 100. Para *L. plantarum*, se resalta la relación entre los aislados BL12 - BL14 como un posible estado clonal, registrando una distancia genética de 0.00 y un valor bootstrap de 100 (Figura 3).

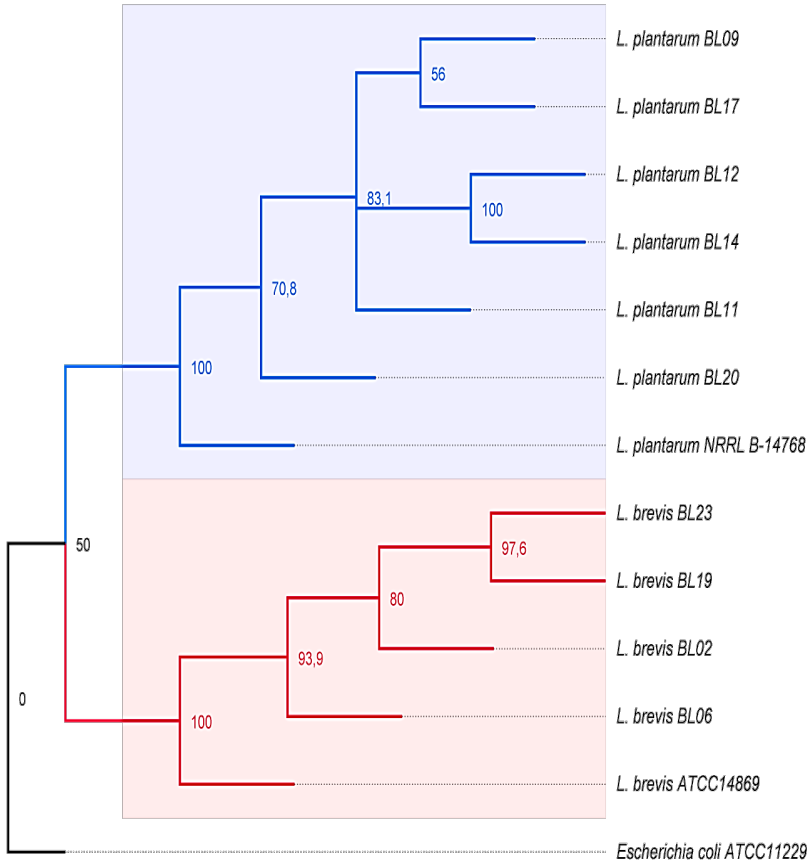


Figura 3. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región 16S ARNr de las LAB identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap; Modelo evolutivo: HKY85 + G (*gama shape*= 0.271; *p-invar*=0.00).

Con respecto al árbol de BAA, el clado de *A. tropicalis* estuvo soportado con un valor bootstrap de 99.3, sin embargo, las relaciones intraespecíficas no se resolvieron y se registró la formación de una politomía. Por otra parte, la cercanía entre los clados de *A. fabarum* y *A. okinawensis* sugieren una relación entre estas especies, lo cual se corresponde con la cercanía entre las raíces internas utilizadas para estos dos grupos (Bootstrap: 99.8; Distancia genética: 0.006). Cabe señalar que, si bien el aislado BA11 se encuentra fuera de su clado, mantiene la relación más estrecha con los ais-

lados de *A. okinawensis* con una distancia genética promedio de 0,038, siendo el valor más bajo en comparación con las distancias cuantificadas con respecto a los clados de *A. fabarum* y *A. tropicalis*, 0.039 y 0.049 respectivamente (Figura 4).

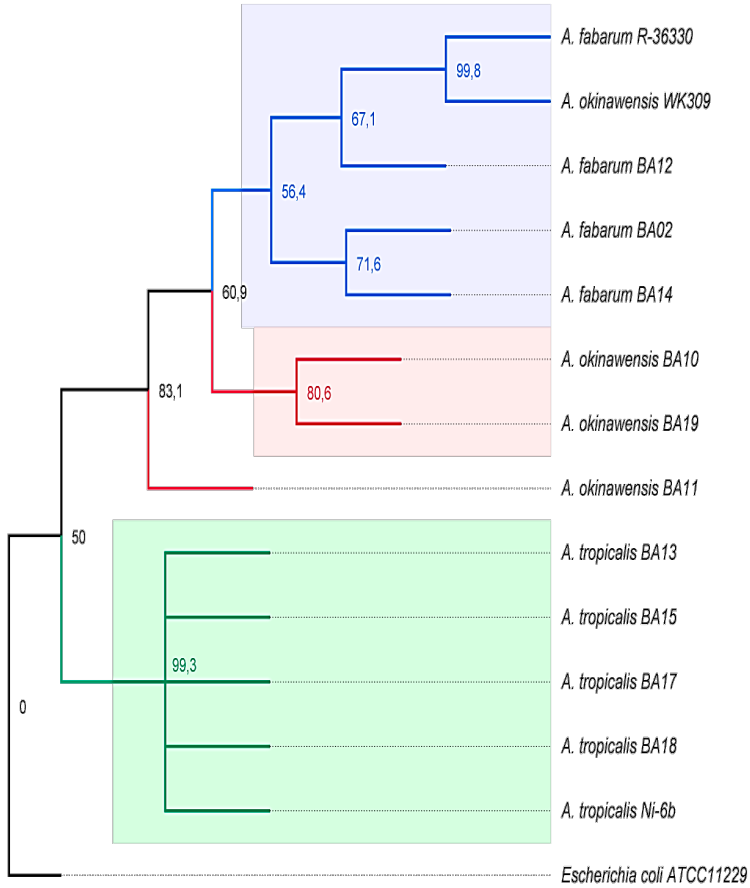


Figura 4. Árbol filogenético construido por Neighbor-joining de las secuencias correspondientes a la región 16S ARNr de las AAB identificadas. Los números en los nodos corresponden a valores bootstrap. Modelo evolutivo: HKY85 + I + G (gama shape= 0.259; p-invar= 0.470).

Análisis in-silico con corte con enzimas de restricción

Teniendo en cuenta las politomías y las relaciones no resueltas en algunos análisis de distancias por *Neighbor-joining*, se realizaron los análisis *in-silico* de RFLP para corroborar las diferencias moleculares entre las posibles especies identificadas y resolver las relaciones intraespecíficas de los aislados en cada grupo microbiano. En la tabla 5 se presentan las enzimas seleccionadas para cada análisis y el número promedio de cortes generados.

Tabla 5. Enzimas de restricción seleccionadas para realizar los ensayos *in-silico* de RFLP

Grupo microbiano	Número de secuencias analizadas	Región	Enzimas de restricción	No. Promedio de cortes
LEV	20 20	ITS1-5.8S ARNr-ITS2 D1/D2 ARNr (26S)	*Hae*III - *Hinf*I - *Hpa*II- *Mse*I- *Taq*I *Hae*III- *Hha*I- *Hinf*I- *Rsa*I- *Set*I	3 – 3 – 3 – 9 – 4 3 – 1 – 3 – 3 – 8
BAL	10	16S ARNr	*Alu*I- *Hae*III- *Hinf*I- *Mse*I- *Taq*I	4 – 4 – 2 – 6 – 3
BAA	10	16S ARNr	*Alu*I – *Hae*III - *Hinf*I- *Rsa*I- *Taq*I	6 – 6 – 2 – 3 – 4

Levaduras

De acuerdo con la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 de levaduras, todos los aislados de *S. cerevisiae* compartieron fragmentos formados por las enzimas *MseI* (8, 86, 11, 206 pb), *HaeIII* (172, 311 pb), *HinfI* (382 pb) y *TaqI* (138 pb), planteándose como fragmentos de RFLP exclusivos para estos aislados. De manera similar, los aislados de *P. kudriavzevii* compartieron determinados fragmentos generados por las enzimas *HaeIII* (38 pb), *HinfI* (137 pb) y *TaqI* (58, 228 pb). Por otro lado, *C. glabrata* y *C. tropicalis* presentaron un menor número de fragmentos similares entre los aislados de la misma especie, destacándose la enzima *MseI* por generar fragmentos de 30 pb para todos los aislados de *C. glabrata* y fragmentos de 100 pb para los aislados de *C. tropicalis*. Según el coeficiente de *Sorensen-Dice*, se tiene que los aislados de *S. cerevisiae* comparten una mayor similitud con los aislados de *P. kudriavzevii*, separándose del clado formado por los aislados del género *Candida* (Figura 5).

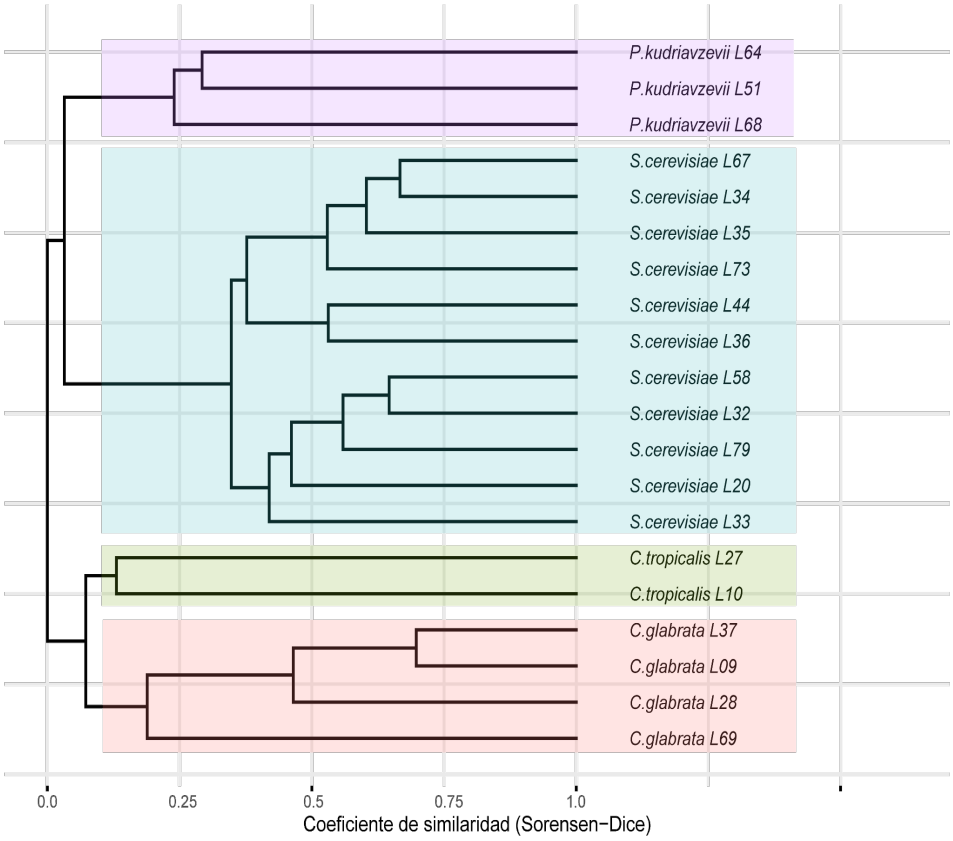


Figura 5. Dendrograma de similitud de las LEV con respecto a las secuencias ITS1-5.8S ARNr-ITS2 mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).

En cuanto a la región D1/D2 ARNr (26S), todos los aislados de *S. cerevisiae* compartieron fragmentos exclusivos generados por las enzimas *HaeIII* (322 pb) y *SetI* (20, 41, 135 pb); y para los aislados de *P. kudriavzevii*, los fragmentos compartidos fueron digeridos por las enzimas *HaeIII* (33 pb), HhaI (24, 151 pb), y SetI (69, 68, 130 pb). Para el género *Candida* se destaca la presencia de un mayor número de fragmentos exclusivos. Por su parte, *C. glabrata* presentó fragmentos únicos con las enzimas HaeIII (67 pb), SetI (39 pb) y *HhaI* (93 pb); y *C. tropicalis* con las enzimas SetI (24, 86, 199 pb) y HhaI (193 pb). Con respecto al porcentaje de similitud se observó una mayor relación entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, debido a que los fragmentos formados por las enzimas *MseI* y *HinfI* presentan un patrón de RFLP similar entre los aislados. Por otra parte, los aislados de *P. kudriavzevii* y *C. tropicalis* se encuentran en clados separados (Figura 6). Cabe resaltar que en este análisis por RFLP fue posible resolver los casos de politomías observados en el árbol por Neighbor-joining (Figura 2), debido a que las enzimas *HhaI* y *HaeIII* generaron patrones exclusivos entre los aislados de *S. cerevisiae* y entre los aislados de *P. kudriavzevii*.

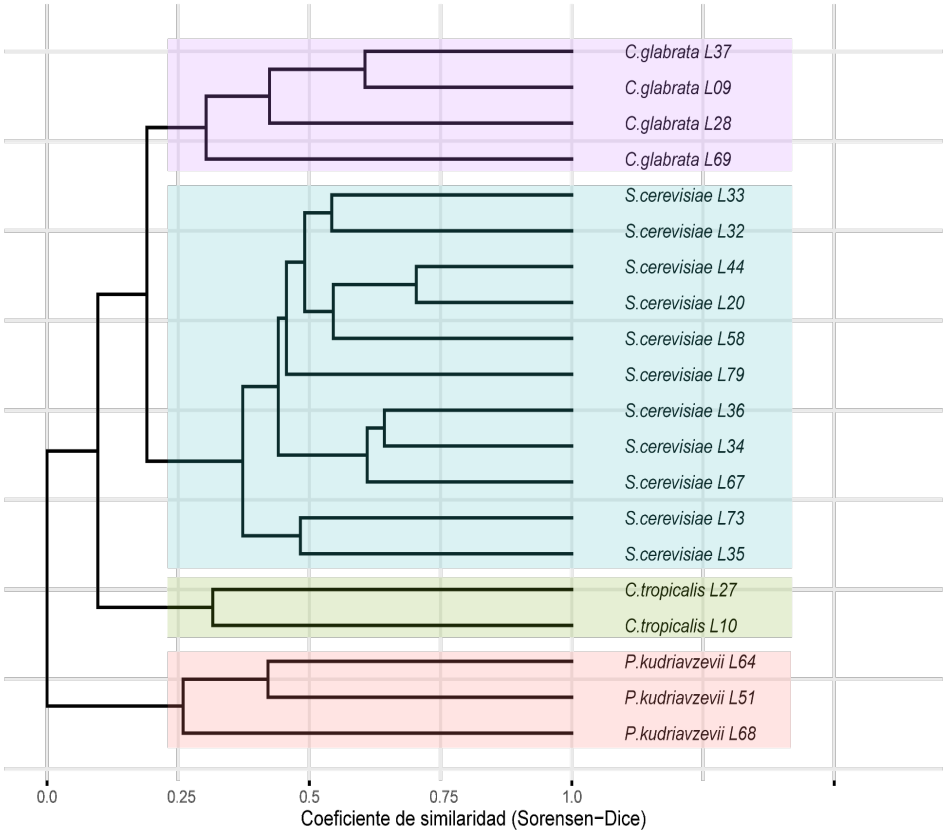


Figura 6. Dendrograma de similitud de las LEV con respecto a las secuencias D1/D2 ARNr (26S) mediante el análisis por RFLP (fuente: esta investigación).

BAL y BAA

Para la región 16S ARNr de BAL, los aislados de *L. plantarum* presentaron fragmentos únicos generados por las enzimas *TaqI* (14 pb), *HaeIII* (34, 286, 564 pb), *AluI* (51, 172, 615 pb) y *HinfI* (378). Por otro lado, los aislados de *L. brevis* presentaron fragmentos únicos se deben a las enzimas *MseI* (26 pb), *HaeIII* (414 pb) y *AluI* (816 pb). Según el coeficiente de *Sorensen-Dice*, los aislados de *L. brevis* presentan aproximadamente un 25% de similitud y los aislados de *L. plantarum* comparten más de un 20%. Por otro lado, se verificó el estado clonal entre los aislados BL12 y BL14, los cuales presentaron una similitud del 100 % (Figura 7).

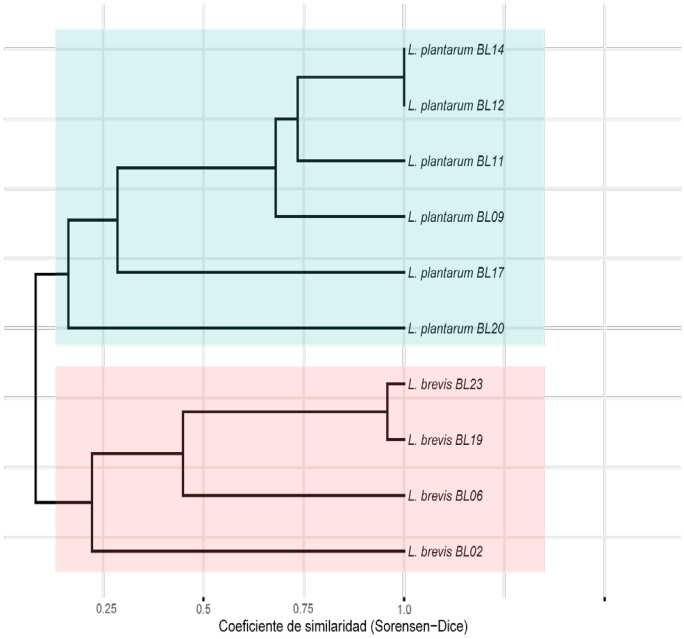


Figura 7. Dendrograma de similitud de las BAL con respecto a las secuencias 16S ARNr mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).

En cuanto a las BAA, los aislados de *A. fabarum* presentaron fragmentos únicos digeridos por las enzimas *TaqI* (497 pb), *RsaI* (405 pb), *AluI* (80, 439 pb) y *HinfI* (40 pb). Por su parte, los aislados de *A. tropicalis* compartieron fragmentos generados por las enzimas RsaI (107 pb), *HaeIII* (7 pb), *HinfI* (30, 75, 122 pb), *AluI* (208, 231 pb) y *TaqI* (653 pb); además, se resalta que la politomía evidenciada anteriormente en el análisis de distancias (Figura 4), fue resuelta por los fragmentos generados por las enzimas *HaeIII* y *AluI* que facilitaron diferenciar entre los aislados del cluster. Por último, los aislados de *A. okinawensis* no presentaron fragmentos exclusivos, lo cual probablemente se relaciona con la dificultad para establecer una correcta relación dentro de este clado (Figura 4). No obstante, la formación del cluster de *A. okinawensis* se logró resolver a partir de un 20% de similitud (Figura 8).

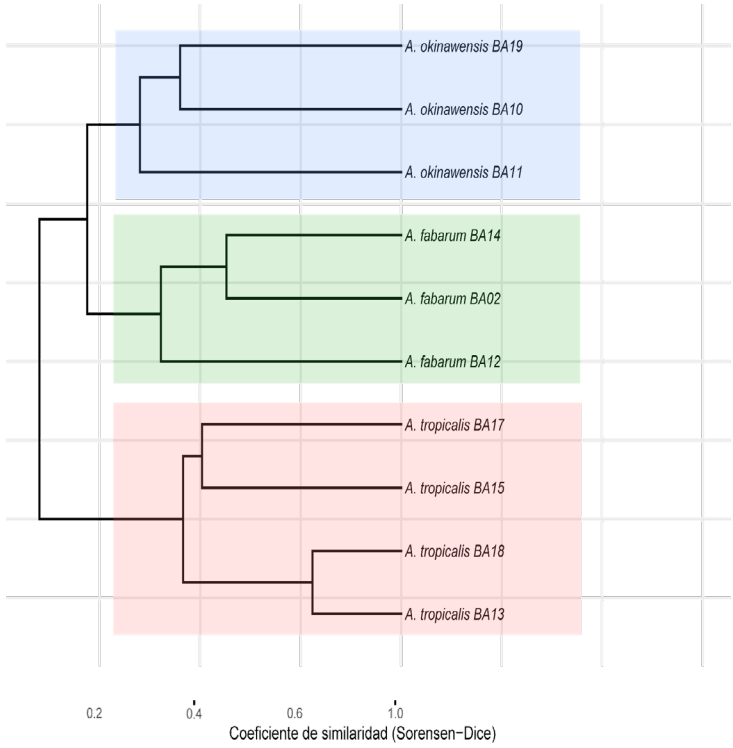


Figura 8. Dendrograma de similitud de las BAA con respecto a las secuencias 16S ARNr mediante el análisis por RFLP. (fuente: esta investigación).

Discusión

Del total de LEV aisladas de los procesos de fermentación de cacao, el mayor número se identificó para los géneros *Candida* y *Saccharomyces*, por otra parte, el género *Pichia* estuvo representado con un menor número de aislados, resultados similares a los descritos por (25). *S. cerevisiae* presentó el mayor número de aislados, abundancia que probablemente se relaciona con su tolerancia a pH ácido, capacidad metabólica para el consumo de diferentes azúcares y su actividad pectinolítica (26,27). (14) en su revisión sobre la microbiota asociada a la fermentación de cacao en la última década, describieron que al igual que en esta investigación, *A. fabarum, A. tropicalis, L. brevis, L. plantarum, C. tropicalis, P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* están presentes en los procesos de fermentación bajo condiciones artesanales alrededor del mundo. Por otro lado, en el estudio de (12) se reportó la presencia de *C. glabrata* en fermentaciones de cacao en Ghana y el trabajo de (28) asocia la presencia de *A. okinawensis* en fermentaciones realizadas en Costa de Marfil. Estos microorganismos podrían tener aplicaciones biotecnológicas, en este caso podrían servir para fermentaciones de cacao en la región (29).

Levaduras

La región ITS1-5.8s-ITS2 es un marcador molecular efectivo en la discriminación de aislados de levaduras en comparación con otras regiones ribosomales, siendo compatible con características bioquímicas y apropiado para la caracterización de especies (30,31). Además, es utilizado con enfoques filogenéticos y métodos de RFLP para establecer las posibles relaciones entre unidades taxonómicas (32,33). Con respecto al dominio D1/D2 ARNr (26S), generalmente es utilizado como un marcador molecular confirmatorio para la identificación de levaduras, ya que contiene secuencias de bases altamente conservadas y suficientes variaciones de secuencia para la identificación entre especies (34).

Con respecto a las relaciones establecidas por los análisis de distancias para las dos regiones mencionadas, el trabajo de (35) explica que la cercanía entre los aislados de *S. cerevisiae* y *C. glabrata,* probablemente se asocia con la presencia de genes ortólogos que sugieren un origen evolutivo en común. De la misma manera, (36) mencionan que *C. glabrata* exhibe una mayor relación filogenética dentro del género *Saccharomyces*, lo que la separa del género *Candida*. Cabe resaltar que la ausencia de una cantidad suficiente de secuencias y las bajas distancias genéticas entre los aislados pueden derivar en casos de politomias a nivel intraespecífico, siendo fundamentales los análisis de RFLP para resolver estos casos (37).

En este sentido, los resultados del análisis por RFLP para la región ITS1-5.8s-ITS2 se relacionan con las investigaciones de (33,38,39), en donde describieron que las enzimas *Hae*III, *Hinf*I y *Hha*I permiten diferenciar de manera más precisa y rápida especies de levaduras, algunas de estas pertenecientes a los géneros *Candida*, *Saccharomyces* y *Pichia*. Por su parte, (40,41), mencionan que la enzima *Hae*III permite establecer un patrón de RFLP entre los aislados de *S. cerevisiae,* lo cual se asemeja con los resultados de este estudio. Además, según el trabajo realizado por Koffi et al., (2017), la enzima *Hae*III permite la obtención de un patrón de RFLP para diferenciar entre aislados de levaduras asociadas a fermentaciones de cacao, incluyendo a *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* y *C. tropicalis*. Por último, para el dominio D1/D2 ARNr (26S), los resultados se relacionan con los trabajos de (34,42), los cuales implementaron enzimas de restricción para diferenciar aislados de levaduras de la misma especie, resaltando específicamente la enzima *Hha*I que género patrones exclusivos para todas las especies y permitió resolver las relaciones intraespecíficas de los aislados que se encontraban en politomias para esta región.

BAL y BAA

El análisis del gen 16S ARNr se ha utilizado ampliamente para identificar especies bacterianas mediante estudios con enfoques filogenéticos y a través de métodos

por RFLP (43). En particular, la técnica de RFLP ha demostrado ser adecuada para discriminar especies estrechamente relacionadas y determinar el grado de variación a nivel intraespecífico (44).

Con respecto al análisis filogenético de las BAL, los resultados se asemejan con las observaciones de (45,46), indicando que los aislados de *L. plantarum* se mantienen separadas de *L. brevis* con base en el gen 16S ARNr. Además, (47) describieron que la separación entre *L. plantarum* y *L. brevis* puede estar relacionada con las diferencias entre sus características metabólicas. Lo anterior se relaciona con el análisis por RFLP, siendo claves las enzimas *Alu*I y *Hae*III que permitieron diferenciar entre los aislados de *L. brevis* y *L. plantarum*, tal como lo describen (28,48). Además, los perfiles de RFLP de las enzimas *HinfI* y *Taq*I permitieron el correcto agrupamiento de los aislados *L. plantarum,* resultados que se corresponden con la investigación de (49).

De acuerdo con las BAA, el análisis filogenético mantiene relación con los trabajos de (50,51), en donde los árboles presentan una topología similar separando con una mayor distancia el clado de *A. tropicalis* con respecto a la ubicación de los aislados de *A. okinawensis* y *A. fabarum* que estuvieron más cercanos. Con respecto a las inconsistencias entre las relaciones de los aislados de *A. okinawensis* y su raíz interna, probablemente se deben a las diferencias de origen de la secuencia de referencia y al grado de variabilidad genética dentro de la especie, caso similar al reportado por (18). Los resultados del análisis por RFLP se asemejan con los descritos por (52), en donde el polimorfismo de los fragmentos producidos por la enzima *Taq*I permitió diferenciar adecuadamente entre especies del género *Acetobacter*. De la misma manera, (53) lograron discriminar entre aislados de especies del género *Acetobacter* a través de la digestión con *Taq*I, *Alu*I y *Hae*III; de tal forma, se destacan las últimas dos enzimas que permitieron resolver la politomía entre los aislados de *A. tropicalis* para este estudio.

Conclusiones

La identificación de los aislados estuvo respaldada por una elevada coincidencia nucleotídica de las secuencias obtenidas con respecto a las secuencias disponibles en la base de datos del *GenBank* en el análisis por BLAST. Asimismo, en la mayoría de los casos, los análisis de distancias por *Neighbor-joining* relacionaron correctamente los aislados pertenecientes a la misma especie, con excepción de algunas politomias en el clado de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* para la región D1/D2 ARNr (26S) y en el clado de *A. tropicalis* para la región 16S ARNr. Además, fue evidente la dificultad para establecer los clados de *A. fabarum* y

A. okinawensis, en donde las raíces internas se agruparon entre sí.

A través de los análisis por RFLP se confirmaron las diferencias moleculares entre las especies identificadas y se resolvieron las relaciones intraespecíficas de los aislados. Para la región ITS1-5.8s-ITS2 ARNr, las enzimas *Mse*I, *Hinf*I y *Hae*III lograron agrupar correctamente los aislados de levaduras para una misma especie. De la misma manera, estas dos últimas enzimas generaron fragmentos de RFLP exclusivos que permitieron diferenciar entre los aislados de levaduras para la región D1/D2 (26S). Cabe resaltar que las enzimas *Hha*I y *Hae*III permitieron resolver las politomías evidenciadas en los clados de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii*. Por otro lado, para la región 16S ARNr de las BAL, las enzimas *Alu*I y *Hae*III permitieron la correcta agrupación de los aislados de *L. brevis* y *L. plantarum* en clusters diferentes; y por último, los patrones de RFLP generados con la enzima *Taq*I permitieron la correcta clasificación de los aislados de BAA en 3 cluster bien definidos, correspondientes a las 3 especies registradas. Adicionalmente, las enzimas *Hae*III y *Alu*I permitieron resolver las relaciones internas entre los aislados de *A. tropicalis* que anteriormente exhibieron una politomía.

Notas

Los resultados de este estudio demuestran que existen diferencias moleculares a nivel interespecífico intraespecífico en los diferentes grupos microbianos, lo cual podría estar relacionado con diferencias metabólicas importantes entre los aislados microbianos de esta región. Por tanto, se requiere de estudios adicionales que faciliten la selección de levaduras, BAL y BAA con alto potencial biotecnológico para la fermentación de cacao. Además, se plantea el desarrollo de un cultivo iniciador mixto con microorganismos silvestres que facilite la optimización del proceso de fermentación de cacao y permita la obtención de perfiles organolépticos deseables del producto final. Por otro lado, las inconsistencias observadas en las relaciones filogenéticas de algunos aislados sugieren la necesidad de investigaciones complementarias a través de herramientas moleculares como los análisis genómicos.

Agradecimientos

A la Universidad de Nariño y a la Vicerrectoria de Investigaciones e Interaccion Social por haber apoyado esta investigación.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conficntos de intereses.

Referencias

1. Badrie N, Bekele F, Sikora E, Sikora M. Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015;55(5):620–59.

2. Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, et al. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (Theobroma cacao L). PLoS One. 2008;3(10):e3311.

3. Cornejo OE, Yee MC, Dominguez V, Andrews M, Sockell A, Strandberg E, et al. Population genomic analyses of the chocolate tree, Theobroma cacao L., provide insights into its domestication process. Commun Biol [Internet]. 2018;1(1):167. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s42003-018-0168-6

4. Krähmer A, Engel A, Kadow D, Ali N, Umaharan P, Kroh LW, et al. Fast and neat - Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. Food Chem [Internet]. 2015;181:152–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.084

5. Osorio-Guarín JA, Berdugo-Cely J, Coronado RA, Zapata YP, Quintero C, Gallego-Sánchez G, et al. Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of Theobroma cacao L. Front Plant Sci. 2017;8(November):1–13.

6. Santander-Muñoz M, Rodríguez Cortina J, Vaillant FE, Escobar Parra S. An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2020;60(10):1593–613. Available from: https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726

7. Jespersen L, Nielsen DS, Hønholt S, Jakobsen M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. FEMS Yeast Res. 2005;5(4–5):441–453.

8. Nielsen D, Crafack M, Jespersen L, Jakobsen M. The Microbiology of Cocoa Fermentation. In: Watson IRR, Preedy VR, Zibadi S, editors. Chocolate in Health and Nutrition [Internet]. Nutrition. New York: Springer Science+Business Media, LLC.; 2013. p. 39–60. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_4

9. Escobar S, Santander M, Zuluaga M, Chacón I, Rodríguez J, Vaillant F. Fine cocoa beans production: Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation. Food Chem. 2021;365:130627.

10. Kratzer U, Frank R, Kalbacher H, Biehl B, Wöstemeyer J, Voigt J. Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors. Food Chem [Internet]. 2009;113(4):903–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.017

11. Pereira GV de M, Soccol VT, Brar SK, Neto E, Soccol CR. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017;57(13):2775–88.

12. Agyirifo DS, Wamalwa M, Otwe EP, Galyuon I, Runo S, Takrama J, et al. Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. Heliyon [Internet]. 2019;5(7):e02170. Available from: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170

13. De Vuyst L, Weckx S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. J Appl Microbiol. 2016;121(1):5–17.

14. Figueroa-Hernández C, Mota-Gutierrez J, Ferrocino I, Hernández-Estrada ZJ, González-Ríos O, Cocolin L, et al. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. Int J Food Microbiol [Internet]. 2019;301(April):41–50. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002

15. Viesser JA, de Melo Pereira G V., de Carvalho Neto D, Rogez H, Góes-Neto A, Azevedo V, et al. Co-culturing fructophilic lactic acid bacteria and yeast enhanced sugar metabolism and aroma formation during cocoa beans fermentation. Int J Food Microbiol [Internet]. 2021;339:109015. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109015

16. Vega N, Gutiérrez NS. Evaluación antioxidante de compuestos fenólicos obtenidos en la fermentación de residuos en la poscosecha de Theobroma cacao L. Nova [Internet]. 2024;22(42):35–46. Available from: https://doi.org/10.22490/24629448.8183

17. Yu J, Sun Z, Liu W, Zhang J, Sun T, Bao Q, et al. Rapid identification of lactic acid bacterial isolated from home-made fermented milk in Tibet. J Gen Appl Microbiol. 2009;55(3):181–90.

18. Ruiz A, Poblet M, Mas A, Guillamón JM. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(6):1981–7.

19. Pinilla G, Cubillos K, Rodríguez M. Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Nova. 2008;6(9):65–75.

20. Darriba D, Taboada G, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [Internet]. Nature methods, 9. 2012 [cited 2023 May 11]. p. 772. Available from: https://doi.org/10.1038/nmeth.2109

21. Davis MW, Jorgensen EM. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. Front Bioinforma [Internet]. 2022;2:818619. Available from: https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619

22. Vásquez E, Máttar S, Mossos N, Mogollón D, Poutou R. Caracterización molecular de cepas colombianas de Salmonella spp. a través del RFLP-IS200. Nova [Internet]. 2005;3(3):37–45. Available from: https://doi.org/10.22490/24629448.17

23. Pavia P, Calderón C, Puerta PhD C. Diferenciación de especies de Rhodococcusmediante una prueba de PCR-RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16S ribosomal. Nova [Internet]. 2005 Dec 15;3(4):14–20. Available from: http://dx.doi.org/10.22490/24629448.332

24. R Core Team R. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. 2013. Available from: https://www.r-project.org/

25. Romanens E, Freimüller Leischtfeld S, Volland A, Stevens M, Krähenmann U, Isele D, et al. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. Int J Food Microbiol [Internet]. 2019;290:262–72. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001

26. Haile M, Kang WH. Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. Microorganisms. 2019;7(10).

27. Roini C, Asbirayani Limatahu N, Mulya Hartati T, Sundari. Characterization of Cocoa Pulp (Theobroma cacao L) from South Halmahera as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2019;276(1):012038.

28. Ouattara, Niamké SL. Mapping the functional and strain diversity of the main microbiota involved in cocoa fermentation from Cote d'Ivoire. Food Microbiol. 2021;98:103767.

29. Ostos Ortíz OL, Rosas Arango SM, González Devia JL. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. Nova. 2019;(31):129–63.

30. Porter TM, Brian-Golding G. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? New Phytol. 2011;192(3):775–82.

31. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(16):6241–6.

32. Del-Prado R, Cubas P, Lumbsch HT, Divakar PK, Blanco O, de Paz GA, et al. Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. Mol Phylogenet Evol [Internet]. 2010;56(1):125–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.014

33. Kirchmayr MR, Flores E. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. e-Gnosis. 2010;8:1–12.

34. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. J Microbiol Methods. 2005;61(2):281–4.

35. Herrero E. Evolutionary relationships between Saccharomyces cerevisiae and other fungal species as determined from genome comparisons. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2005;22(4):217–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70046-2

36. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MAS, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes. Nature. 2009;459(7247):657–62.

37. Hashim HO, Al-Shuhaib MBS. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. J Appl Biotechnol Reports. 2019;6(4):137–44.

38. Fadda ME, Pisano MB, Scaccabarozzi L, Mossa V, Deplano M, Moroni P, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection. J Dairy Sci [Internet]. 2013;96(12):7692–7. Available from: http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6996

39. Samagaci L, Ouattara H, Niamké S, Lemaire M. Pichia kudrazevii and Candida nitrativorans are the most well-adapted and relevant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. Food Res Int [Internet]. 2016;89:773–80. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.007

40. Clavijo A, Calderón IL, Paneque P. Yeast assessment during alcoholic fermentation inoculated with a natural "pied de cuve" or a commercial yeast strain. World J Microbiol Biotechnol. 2011;27(7):1569–77.

41. Dlauchy D, Tornai-Lehoczki J, Péter G. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. Syst Appl Microbiol. 1999;22(3):445–53.

42. Jang SJ, Lim SH, Ko JH, Oh BH, Kim SM, Song YC, et al. The investigation on the distribution of Malassezia yeasts on the normal Korean skin by 26S rDNA PCR-RFLP. Ann Dermatol. 2009;21(1):18–26.

43. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods. 2007;69(2):330–9.

44. Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. Appl Environ Microbiol. 1996;62(7):2501–7.

45. Ramos CL, Thorsen L, Schwan RF, Jespersen L. Strain-specific probiotics properties of Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum and Lactobacillus brevis isolates from Brazilian food products. Food Microbiol [Internet]. 2013;36(1):22–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010

46. Todorov SD, de Melo-Franco B. Lactobacillus plantarum: Characterization of the species and application in food production. Food Rev Int. 2010;26(3):205–29.

47. Ehrmann MA, Vogel RF. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. Trends Food Sci Technol. 2005;16(1–3):31–42.

48. Park SH, Jung JH, Seo DH, Lee HL, Kim GW, Park SY, et al. Differentiation of lactic acid bacteria based on RFLP analysis of the tuf gene. Food Sci Biotechnol. 2012;21(3):911–5.

49. Mancini A, Lazzi C, Bernini V, Neviani E, Gatti M. Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNAAla–23S rDNA-RFLP. J Microbiol Methods. 2012;91(3):380–90.

50. Pitiwittayakul N, Yukphan P, Sintuprapa W, Yamada Y, Theeragool G. Identification of acetic acid bacteria isolated in Thailand and assigned to the genus Acetobacter by groEL gene sequence analysis. Ann Microbiol. 2015;65(3):1557–64.

51. Yamada Y. Systematics of Acetic Acid Bacteria. In: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Kainuma A, editors. Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology. Springer Japan; 2016. p. 299–320.

52. Jara C, Mateo E, Guillamón JM, Mas A, Torija MJ. Analysis of acetic acid bacteria by different culture-independent techniques in a controlled superficial acetification. Ann Microbiol. 2013;63(1):393–8.

53. Poblet M, Rozès N, Guillamón JM, Mas A. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. Lett Appl Microbiol. 2000;31(1):63–7.

© 2025 – Pablo Fernández Izquierdo, Julián Felipe Martínez Muñoz, Kevin Mauricio Miramag Yaqueno, Fedra Ortiz Benavides



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Attribution (CC BY). Se permite el uso, distribución o reproducción en otros foros, siempre que se acredite al autor original y al propietario del copyright y se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada. No se permite ningún uso, distribución o reproducción que no cumpla con estos términos.