

Nota Técnica

IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS AISLADOS DURANTE LA FERMENTACION DE ALMENDRAS DE CACAO (*Theobroma cacao*) EN COSTA RICA^{1/*}

Maricela Cascante **

Vera García ***

Gonzalo Marín ***

ABSTRACT

Characterization of yeasts and molds isolated during the fermentation process of cocoa beans (*Theobroma cacao*) in Costa Rica. The yeast and mold flora developed during the fermentation process of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) of the "criollo" and "forastero" genetic types was studied. Thirty eight yeast strains were identified and it was possible to establish the early alcoholic phase in both cacao types. The yeasts isolated during this stage were *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevalieri* and *S. microellipsoideus*. Filamentous fungi developed at the end of the alcoholic phase, most of them belonging to the genera *Penicillium*, *Exosporiella*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Rhizopus*.

INTRODUCCION

Las almendras de cacao, utilizadas para la elaboración del chocolate, deben someterse a un proceso de fermentación donde se generan los compuestos precursores del aroma, color y sabor característicos. Durante este proceso se desarrollan varios microorganismos en la pulpa que rodea la almendra que producen sustancias, principalmente ácidos y alcoholes, que afectan el curado y las propiedades del sabor (Kempler, 1983; Schwan, *et al.*, 1986).

Se ha descrito que los microorganismos que intervienen en el proceso fermentativo se desarro-

llan en sucesión: primero levaduras, luego bacterias lácticas, seguidas por acéticas y, finalmente, por esporulados aeróbicos (Roelofsen, 1958). Se considera que los hongos filamentosos que se desarrollan en las masas de cacao en fermentación no tienen importancia para el proceso y por el contrario, se ha determinado que su desarrollo produce defectos en el grano (Allison, 1969).

La fermentación del cacao depende de muchos factores, siendo muy importantes el tipo genético y las condiciones climáticas y del medio (Helfenberger, 1964). Los autores sólo conocen 2 estudios de identificación de microorganismos sobre muestras de cacao fermentado proveniente de Costa Rica y ambos bastante antiguos (Von Lilienfeld-Toal, 1927; Hoynak *et al.*, 1941). Por no contar con información más reciente y local, se consideró de interés identificar los hongos y las levaduras que se aislaron durante la fermentación de 2 tipos de cacao, cuyos híbridos con frecuencia se cultivan en el país: el grupo denominado "criollo" y el "forastero".

1/ Recibido para publicación el 11 de setiembre de 1990.

* Parte de la tesis de grado presentada por Maricela Cascante ante la Carrera Interdisciplinaria de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica.

** Dirección actual: Vicerectoría de Investigación, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

*** Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó utilizando semillas de cacao procedentes de clones de tipo criollo (designadas CTC) y de tipo forastero (designadas CTF), de la colección del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica.

La fermentación de las semillas enteras (con su pulpa) se realizó en el CATIE en un fermentador de cajas grandes, tal como recomienda Céspedes (1953). El proceso seguido durante el proceso de fermentación fue el mismo mencionado por Roelofsen (1958) en sus investigaciones. La duración del proceso se estableció con base en el criterio expuesto por diversos autores (Hernández, 1957; Roelofsen, 1958; Roham, 1960), prolongándose por 5 días la fermentación del tipo criollo y por 7 días la del forastero. Cada 24 horas se obtuvo muestras al azar de la masa en fermentación. Se seleccionaron puntos de muestreo en la capa superficial, intermedia y en el fondo. Se tomaron 36 muestras, 15 de cacao criollo y 21 del tipo forastero.

No hubo repeticiones con diferentes lotes de semilla de cada tipo.

A las muestras recolectadas se les realizó un recuento de hongos y levaduras según lo describe Speck (1984). De las placas de recuento se aislaron cepas de hongos y levaduras, con base en las características morfológicas de las colonias. Posteriormente, se efectuaron las pruebas de identificación para mohos y levaduras, según los esquemas propuestos por Langeron (1952) y Barnett *et al.* (1979).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos durante el proceso de fermentación de los dos grupos de clones, CTC y CTF.

Durante las primeras 48 horas de fermentación se aislaron cepas de *Saccharomyces chevalieri*, *S. cerevisiae* y *Saccharomyces sp.*, a las que se les atribuye la mayor formación de alcohol a partir de los azúcares fructuosa, sacarosa y glucosa, presentes en la pulpa (Roham, 1960). Según Reed (1973) estos microorganismos son capaces de producir 18-20% de etanol, liberando energía en la reacción. La población de levaduras también estaba constituida por el género *Pichia*, el cual a pesar de su poca capacidad de fermentación, por

su tolerancia al alcohol, puede desarrollarse junto a *Saccharomyces* (Martinelli y Dittmar, 1961). Además, durante el primer día de fermentación se aislaron otras levaduras, como *Kloeckera apiculata* y *Schizoblastosporium starkey-henricii*, las que se mantuvieron presentes en la masa, posiblemente por su tolerancia al alcohol y a las altas temperaturas desarrolladas (45°C). En esta etapa también se aisló *Penicillium*, *Exosporiella* y *Geotrichum*, y aunque la mayoría de los investigadores consideran de poca importancia la acción de los hongos filamentosos durante la fermentación, se debe reconocer su capacidad de producir enzimas que hidrolizan compuestos como el almidón y las sustancias pécticas de la pulpa, iniciando así su maceración por exudado (Camargo *et al.*, 1963).

Durante el tercer día se encontró aún en el medio la especie fermentadora *S. chevalieri*, siendo importante en esta etapa su acción pectinolítica sobre las células de la pulpa (Jacquet, 1981). La eliminación de la pulpa permite una mayor circulación de aire en la masa, aumentándose las condiciones aeróbicas del medio y estimulando el crecimiento de levaduras de tipo oxidativo, lo que se pone de manifiesto por el aislamiento de *Saccharomyces acetii*, que posee este tipo de metabolismo. La naturaleza de la flora en esta fase fue diferente a la que prevaleció durante las primeras 48 horas, ya que hubo un predominio de hongos filamentosos y de levaduras oxidativas, lo que indica que la fase alcohólica en CTC se limita a los 2 primeros días. Entre los géneros que predominaron durante el cuarto y quinto día de fermentación se encuentran levaduras formadoras de pseudomicelio, como *Candida* y *Trichosporon*, y asimismo se acentuó el desarrollo de otros hongos, especialmente *Rhizoctonia solani*.

En el Cuadro 1 se aprecia que, de la misma manera que en el CTC, la fase alcohólica en el CTF se desarrolló durante las 48 primeras horas, aislándose además de *Saccharomyces cerevisiae* cepas de *S. rouxii* y *S. microellipsoideus*, ésta última con capacidad de producir una gran cantidad de alcohol a partir de los azúcares de la pulpa. Se aisló también, *Candida cacaoui*, la cual fermenta únicamente la glucosa de la pulpa (Lodder, 1970). Después del segundo día se favoreció el crecimiento de hongos, aislándose los géneros *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Curvularia*, de los cuales los dos últimos no se aislaron del CTC. Se requerirían, sin embargo,

Cuadro 1. Capas de hongos filamentosos y levaduras aisladas en Costa Rica durante la fermentación de cacao tipo criollo (CTC) y tipo forastero (CTF).

Día de Fermentación	Microorganismos presentes en CTC	Microorganismos presentes en CTF
Primero	<i>Kloeckera</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. (2)* <i>Schizoblastosporion starkey</i> <i>Penicillium</i> sp. (2) <i>Geotrichum</i> sp. <i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Saccharomyces rouxii</i> <i>Kloeckera</i> sp. <i>Saccharomyces microellipsoideus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Exosporiella</i> <i>Saccharomyces</i> sp. (2)
Segundo	<i>Saccharomyces chevalieri</i> (4) <i>Pichia</i> sp. <i>Candida catenulata</i> <i>Pichia membranaefasciens</i> <i>Saccharomyces</i> sp. (3) <i>Exosporiella</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Mucor</i> sp. <i>Saccharomyces aceti</i> <i>Penicillium</i> sp. (3) <i>Fusarium</i> sp.	<i>Saccharomyces</i> sp. (2) <i>Candida cacaoi</i>
Tercero	<i>Rhizopus</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Rhizoctonia solani</i> (3)	<i>Fusarium</i> sp. <i>Hansenula</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. (2) <i>Rhodotorula aurantiaca</i> <i>Rhizoctonia solani</i>
Cuarto	<i>Hormodendrum</i> sp. <i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Candida</i> sp. <i>Candida krusei</i>	<i>Pichia</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Paecilomyces</i> sp.
Quinto	<i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Candida</i> sp. <i>Candida krusei</i>	<i>Rhizopus</i> sp. (2) <i>Curvularia</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp.
Sexto		<i>Hansenula</i> sp. <i>Kloeckera</i> sp. <i>Paecilomyces</i> sp.
Sétimo		<i>Hansenula</i> sp. (2) <i>Saccharomyces rouxii</i>

* Los números en paréntesis corresponden al número de cepas encontrado.

repeticiones con diferentes lotes de semilla de ambos tipos de clones para verificar si estas diferencias son consistentes.

Algunos autores han informado sobre la presencia de hongos filamentosos en las masas de cacao en fermentación. Roelofsen (1985) aisló *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizobium*, así como *Aspergillus*. Marvalhas *et al.* (1965) encontraron *Aspergillus fumigatus*, *Mortirella spinosa*,

Paecilomyces varioti, *Penicillium citrininum*, *A. glaucus* y *Geotrichum candidum*; este último también fue reportado por Camargo y Martinelli (1963). Llama la atención que en este caso no se aisló ningún miembro del género *Aspergillus*.

Resulta difícil comparar estos resultados con los de Von Lilienfeld-Toal (1927) y Hoynak *et al.* (1941), pues es obvio que la metodología de tales autores no es la misma, además de que

ambas investigaciones se limitan a géneros y especies de levaduras, no de hongos filamentosos como el presente caso. Al respecto Von Lilienfeld-Toal (1927) caracterizó 4 especies, las que denominó *Saccharomyces cerevisia* var. *tropicus*, *Schizosaccharomyces busseii*, *Saccharomyces anomalus* y "Kahmefe A", esta última conocida por Ciferri (1931) como *Eutorulopsis theobromae*. Por su parte, Hoynak *et al.* (1941) informan haber aislado cepas de levaduras que no lograron hacer esporular y que clasificaron vagamente como *Torula*.

RESUMEN

Se estudió la flora de hongos filamentosos y levaduras desarrollados durante la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) de grupos de clones tipo "criollo" y "forastero". Se identificó un total de 38 cepas de levadura, lo que permitió establecer la presencia de la fase alcohólica en ambos tipos genéticos. Dicha fase se desarrolló durante los primeros 2 días de fermentación, aislándose las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevalieri* y *S. microellipsoideus*.

Los hongos filamentosos iniciaron su desarrollo al final de la fase alcohólica y los géneros identificados fueron *Penicillium*, *Exosporiella*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *Curvularia*, *Mucor* y *Hormodendrum*.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al personal del CATIE por el suministro de las semillas de cacao y las facilidades brindadas para los procesos de fermentación; asimismo, al Dr. Mario Vargas V. por su trabajo de revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- ALLISON, H.W.S. 1969. Estudios comparativos de seis tipos de fermentadores de cacao. Boletín CEPEC (Brasil). p. 159-162.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARDOW, D. 1979. A guide to identifying and classifying yeast. Cambridge University Press.
- CAMARGO, J.R. de L.; MARTINELLI, A. 1963. General observations on the microflora of fermenting cocoa beans (*Theobroma cacao*) in Bahía, Brasil. Food Technol. 17:1320-1330.
- CESPEDES PONCE, G. 1953. Estudio sobre la fermentación del cacao. Agrotecnia (Cuba) 8:45-73.
- CIFERRI, R. 1931. Studies on cacao. J. Dept. Agr. Puerto Rico 15:223-285.
- HELFENBERGER, A. 1964. A series of experiments on small scale curing of cacao. Cacao (Costa Rica) 9(1):1-8.
- HERNANDEZ, S.A. 1957. Fermentación del cacao. Café y cacao (Venezuela) 3:8-13.
- HOYNAK, S.; POLANSKY, T.S.; STONE, R.W. 1941. Microbiological studies of cocoa fermentation. Foods Res. 6:471-479.
- JACQUET, M. *et al.* 1981. Fermentation des fèves de cacao en lit fluide a trois phases. Café Cacao Thé 25(1):45-53.
- KEMPLER, G.M. 1983. Production of flavor compounds by microorganisms. Ed. by A.I. Laskin. Adv. Appl. Microbiol. 29:29.
- LANGERON, M.; VANBREUSEGHEM, R. 1952. Précis de mycologie. 2 ed. Paris, Masson et Cie Editeurs. p. 725.
- LILIENFELD-TOAL, O.A. VON. 1927. Cacao yeast. Tropenflanger 24(1):4-48.
- LODDER, J. 1970. In the yeast; a taxonomic study. 2 ed. London, North Holland Publishing. p. 1525.
- MARTINELLI, H.L.; DITTMAR, H.F.K. 1960. Cacao fermentation: yeasts isolated from cacao beans during the curing process. Appl. Microbiol. 9:370-371.
- MARVALHAS, N. *et al.* 1965. Determinação da flora micológica nos processos de fermentação, secagem e armazenamento do cacao da Bahía. Brazil. Centro de Pesquisas de cacao CEPC, Informe anual. p. 92-94.
- REED, P. 1973. Yeast technology. Connecticut, The AVI Publishing. p. 166-170.
- ROELOFSEN, P.A. 1958. Fermentation, drying and storage of cacao beans. Adv. in Foods Res. 8:225-296.
- ROHAM, T.A. 1960. El beneficiado del cacao. Italia, Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 40(1):296.
- ROMBOUTS, J.E. 1953. Contribution to the knowledge of the yeast flora of fermenting cacao (A critical review of the yeast species previously described from cacao). Tropical Agriculture (Trinidad) 30(1/3):34-41.
- SCHWAN, R.F. *et al.* 1986. Characterization and distribution of aerobic spore forming bacteria from cacao fermentations in Bahía. J. Foods Sc. 51(6):1583-1584.
- SPECK, M. 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of food. 2 ed. Washington, D.C., American Public Health Association.