

ARTÍCULO

MICROORGANISMOS Y CHOCOLATE

María del Carmen Wachter Rodarte

Microorganismos y chocolate

Resumen

Los granos de cacao tienen un sabor ácido desagradable, por lo que para obtener cacao con el color y el sabor del chocolate deben ser fermentados, tostados y secados. En el proceso de fermentación participan los microorganismos que se encuentran naturalmente en los granos, de entre los cuales actúan primeramente las levaduras. Posteriormente actúan las bacterias lácticas y, finalmente, intervienen las bacterias acéticas, los *Bacillus* y las enterobacterias. Esta fermentación es esencial tanto para modificar los granos, eliminando el mucílago, como para preparar el grano que requieren las enzimas encargadas de modificar su color, sabor y olor, produciendo también compuestos de sabor. La fermentación es una etapa del procesamiento del grano de cacao, que requiere aún de investigación, ya que hasta la fecha sigue siendo bastante empírica. Una fermentación en condiciones controladas permitirá obtener cacao de buena calidad y de características homogéneas.

Palabras clave: cacao, fermentación, microorganismos del cacao.

Microorganisms and chocolate

Abstract

Cocoa grains must be fermented, roasted and dried in order to obtain the color and flavor of chocolate, from the original unpleasant acid flavor of the beans. Microorganisms naturally present in the grains participate in the fermentation process that involves the sequential action of yeasts, lactic acid bacteria and finally acetic acid bacteria, different species of *Bacillus* and of enterobacteria. Fermentation is essential to remove the mucilage and to prepare the grains for the enzyme modification of its color and flavor, as well as to produce flavor compounds. Further studies on the fermentation are needed to be able to perform it under controlled conditions in order to obtain cocoa of high and constant quality.

Keywords: cacao, fermentation, microorganisms of cacao.

Introducción

El cacao son semillas del árbol *Theobroma cacao*, que vienen en una vaina. Esta tiene entre 30 y 40 granos envueltos en una sustancia mucilaginoso de aspecto gelatinoso. El cacao crudo tiene un sabor astringente desagradable, de manera que debe ser tratado mediante un proceso en el que los microorganismos, a través de una fermentación, modifiquen sus componentes. Posteriormente los granos son secados y tostados, para que se desarrollen las características sensoriales del chocolate.

Existen básicamente dos sistemas de fermentación: en pilas y en charolas. En el primero se hacen pilas de granos de cacao, se rompen las vainas y se acumulan los granos. Se voltean cada 24-72 horas para asegurarse que el aire circule entre ellos. El otro sistema consiste en usar charolas, en las que se colocan los granos en capas delgadas, acomodando las charolas una encima de otra, de manera tal que el aire pase a través de ellas y no sea necesario mover los granos para que se aireen.

Los microorganismos llevan a cabo la fermentación en la pulpa, que contiene carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa) y un valor de acidez (pH) entre 3.3 y 4.0, debido a la presencia de ácido cítrico. La pulpa es viscosa porque contiene pectina y otros polisacáridos, que además dificultan la difusión del aire.

El proceso de fermentación del cacao es natural o espontáneo, ya que no se añaden intencionalmente los microorganismos a los granos, que de hecho se encuentran estériles dentro de las vainas. Se contaminan con microorganismos provenientes de todas las superficies con las que entran en contacto: los utensilios y las manos de las personas que manipulan el cacao.

Durante la fermentación, que puede dividirse en fases, ocurre una sucesión de poblaciones de microorganismos:

Primera fase

La pulpa es rica en carbohidratos y tiene un pH bajo. En esas condiciones se favorece el desarrollo de levaduras.

En la primera fase aparecen entre 5 y 6 especies diferentes de levaduras, que luego desaparecen dejando su lugar a *Hanseniaspora guilliermondii*, que es la levadura predominante durante las primeras 24 horas. A *Hanseniaspora* sólo se le encuentra ocasionalmente en las fases posteriores. La levadura *Candida zemplinina* es una nueva especie que sólo se pudo detectar hasta que aparecieron las técnicas modernas de la biología molecular que detectan la presencia de microorganismos por sus genes, más no cultivándolos. *Candida silvae*, *Candida zemplinina* y *Candida diversa* son levaduras que se encuentran comúnmente en las fermentaciones en charolas, posiblemente por la mayor concentración de oxígeno en ese tipo de fermentación. Se reporta que a las 36-38 horas dominan *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia membranaefaciens*, que se encuentra al final de la fermentación; *Candida krusei* y *Hanseniaspora guilliermondii*, en las fermentaciones en charolas, y predomina también *Saccharomyces cerevisiae* (Nielsen *et al.*, 2007).

En las fermentaciones por pilas que se llevan a cabo en Ghana, uno de los principales países productores de cacao, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae*

son los componentes principales de la comunidad de levaduras. *H. opuntiae* se desarrolla al principio de la fermentación, debido a su tolerancia a valores bajos de pH y a sus características metabólicas (Daniel *et al.*, 2009).

En la fermentación del cacao participan un gran número de especies de microorganismos, algunos de los cuales no se han reportado en otros ambientes o fueron aislados inicialmente del cacao. Este es el caso de nuevas levaduras como *Candida halmiae*, *Geotrichum ghanense*, *Candida awuuii* (Nielsen *et al.*, 2010).

Las levaduras llevan a cabo el proceso de fermentación, transformando los azúcares sencillos del mucílago o pulpa en etanol, degradando la pectina, lo que modifica la textura del grano y elimina el ácido cítrico, lo que trae como consecuencia una disminución de la acidez. Por otro lado, el consorcio de levaduras consume el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece el desarrollo de bacterias lácticas.

Segunda fase

En la segunda fase del proceso de fermentación del cacao, se favorece el desarrollo de bacterias lácticas, que fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico. En las fermentaciones de pilas se han aislado sobre todo bacterias del tipo *Lactobacillus* (*Lb. collonides*, *Lb. fermentum*, *Lb. mali* y *Lb. plantarum*), aunque también se han identificado bacterias como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc pseudoficulneum*, y *Pediococcus acidilactici*. Por otro lado, *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* son indígenas de esta fermentación.

Una cepa de *Weissella*, una bacteria láctica aislada de fermentaciones de cacao en Ghana, se reportó como una especie nueva, *Weissella fabaria* (De Bruyne *et al.*, 2010).

Las levaduras contienen enzimas del tipo "pectinolítico", lo que les permite hidrolizar las pectinas, ocasionando una disminución de la viscosidad de la pulpa de mucílago y favoreciendo la entrada de aire. Con este ambiente aerobio y menos ácido -debido al consumo de ácido cítrico- se favorece el desarrollo de bacterias acéticas.

Tercera fase

En la tercera fase del proceso de fermentación ocurre un cambio importante en términos de los productos de la fermentación, ya que intervienen bacterias acéticas que llevan a cabo la transformación del etanol que produjeron las levaduras en ácido acético, tal como ocurre en la industria productora de vinagre. Dado que la transformación de etanol en ácido acético es una reacción exotérmica, se produce calor. El etanol y el ácido acético se difunden hacia el interior de los granos y, junto con la temperatura alta, matan al embrión. Las más importantes bacterias acéticas que se han aislado de la fermentación del cacao, son: *Gluconobacter oxydans*,

Acetobacter aceti y *Acetobacter pasteurianus*. Se encuentra primero *Gluconobacter oxydans*, luego *A. syzygii* y *Acetobacter pasteurianus* y, al final de la fermentación, *Acetobacter tropicalis* (Nielsen *et al.*, 2007). *Acetobacter fabarum* es una especie nueva, aislada de fermentaciones de cacao en Ghana (Cleenwerck *et al.*, 2008).

Cuarta fase

En la cuarta y última fase de la fermentación, que se desarrolla entre las 48 y las 60 horas, se detectan bacterias del género *Bacillus*. Al voltear la pila de granos, se favorece la presencia, en las partes externas, de *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y un grupo pequeño de *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*.

La temperatura alta favorece el desarrollo de bacterias del género *Bacillus*, conocido por la producción de numerosas enzimas, que catalizan reacciones cuyos productos dan al cacao sabores y olores desagradables, como las proteolíticas, que degradan las proteínas y las lipolíticas, que actúan sobre las grasas; pero podrían contribuir en el sabor con la producción de ácidos orgánicos y saborizantes, como 2,3-butanodiol (Ardhana y Fleet, 2003).

Cuando García-Armisen *et al.* (2010) usaron métodos modernos basados en la biología molecular de los microorganismos para estudiar la fermentación del cacao, detectaron bacterias *Tatumella*, *Pantoea* y *Erwinia*, que no se habían reportado nunca antes en la fermentación del cacao. Se sabe que pueden ser fitopatógenas (es decir, que causan daño a la planta), pero estos autores piensan también que podrían contribuir en el consumo de citrato.

Consecuencias de la Fermentación

Se sabe que en el sabor a chocolate participan por lo menos 500 compuestos diferentes y que este sabor depende de muchos factores, como el tipo de grano de cacao, la época en la cual se cosechó, la fermentación (la acción de microorganismos), la acción de enzimas endógenas (enzimas del cacao), el tostado y el secado. Es por lo mismo muy difícil definir de cuál de todas estas etapas depende la producción de aromas. Las enzimas endógenas, por ejemplo, pueden actuar sobre los carbohidratos, proteínas y polifenoles del grano de cacao, generando aromas. Lo que es un hecho es que el sabor característico del chocolate no se desarrolla si no hay fermentación.

Durante la fermentación los microorganismos juegan papeles muy importantes: las levaduras eliminan la pulpa que rodea a los granos de cacao frescos, des-polimerizando o rompiendo la pectina y en las condiciones anaeróbicas (sin oxígeno) que imperan en el ambiente, llevando a cabo la fermentación de los azúcares para producir etanol. Las bacterias lácticas fermentan los azúcares y producen ácido láctico, ácido acético y manitol. Ambos tipos de microorganismos

consumen el ácido cítrico. Las bacterias lácticas convierten el etanol en ácido acético y esa reacción produce calor, por lo que la temperatura aumenta hasta 50°C. El etanol y el ácido acético producidos penetran en los granos, haciendo que su pH interno disminuya de 6.5 a 4.8 y junto con el incremento de la temperatura a 50°C, dañando la estructura interna del cacao. Esto debe ocurrir para que se formen precursores del sabor, que en etapas posteriores se convertirán en compuestos de sabor. También ocurre la degradación de pigmentos por las enzimas endógenas.

Tal vez el papel más importante de los microorganismos es el desarrollo de precursores del sabor a chocolate, porque, como hemos señalado, sin la fermentación no se obtiene el sabor completo del chocolate. Pero por otra parte, los microorganismos también son esenciales para preparar el grano, ya que sin ellos no se eliminaría el mucílago, no se eliminaría la acidez del grano, causada por la presencia del citrato, y sin la producción del ácido acético, el etanol y la temperatura alta, el grano de cacao no se dañaría, dando lugar a la acción de sus enzimas.

No se conoce con detalle cuáles son los compuestos que determinan el sabor a chocolate; sin embargo, Nielsen *et al.* (2008) encontraron que existía una correlación entre el aroma de un lote de cacao y el conjunto de microorganismos que lo fermentan, identificados a través de técnicas modernas como la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE), que consiste en identificar microorganismos dentro de poblaciones complejas en un medio ambiente determinado mediante la separación de los genes de sus ribosomas. Estos análisis se realizan por separado para analizar bacterias y levaduras de forma separada.

Conclusiones

La fermentación del cacao es un proceso complicado, ya que intervienen muchos microorganismos que actúan de manera secuencial (unos después de otros) para modificar el grano. A la acción de los microorganismos se agrega la de las enzimas de la planta y los efectos físicos y químicos de las operaciones posteriores (por ejemplo el rostizado y el secado), para dar lugar al sabor y al color del producto. Si alguno de los componentes anteriores falla o se modifica un poco, la calidad del producto final cambia también, razón por la cual es importante controlar el proceso de fermentación.

Existen reportes de fermentaciones del cacao en condiciones asépticas. Lefeber *et al.* (2010), llevaron a cabo fermentaciones espontáneas de cacao en recipientes de plástico de 20 Kg y como en las fermentaciones tradicionales, encontraron una diversidad limitada de bacterias lácticas, en la que predominaron *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* y, ocasionalmente, *Fructobacillus pseudofiliculneus*. Aparte se agruparon las bacterias acéticas, compuestas principalmente por *Acetobacter pasteurianus* y en menor medida por *Acetobacter ghanensis* y *Acetobacter senegalensis*. Se detectaron asimismo enterobacterias de los géneros *Tatumella* y

Pantoea, que no se detectaron mediante los métodos tradicionales. El consumo de sustratos y la producción de metabolitos fueron similares a los reportados para las fermentaciones tradicionales, con la única desventaja de que no se mezclaron los granos de manera eficiente.

Mientras mejor se conozcan los eventos que ocurren durante cada etapa del proceso, será posible controlarlo. Aunque todavía es necesario mejorarlos, los métodos actuales de microbiología han permitido avanzar en ese conocimiento, que guarda hasta la fecha un importante carácter empírico.

Bibliografía

Ardhana, M.M., Fleet, G.H. 2003 The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia, *International Journal of Food Microbiology* 86: 87-89.

Cleenwerck, I., A. González, N., Camu, E., Engelbeen, P. de Vos, L. de Vuyst. 2008. *Acetobacter fabarum*, sp. Nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2180-2185.

Camu, N., De Winter, T., K. Addo S., J.S. Takrama, Bernaert, H. and L. de Vuyst. 2008 Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavor of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2288-2297.

Daniel, H-M., Vracken, G., Takrama, J.F., Camu, F., de Vos, P. & de Vuyst, Yeast Diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research* 9: 774-783

De Bruyne, K., Camu, N., de Vuyst, P. Vandamme. 2010. *Weissella fabaria*, sp. Nov., from a Ghanaian cocoa fermentation.

García-Armisen, T., Z. Papalexandratou, H. Hendryckx N., Camu, Vrancken, G., De Vuyst, L., P. Cornelis. 2010 Diversity of total bacterial Community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 2281-2292.

Lefeber, T., W. Gobert, G. Vranken, N. Camu and L. De Vuyst. 2010 Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels.

Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 168-186.

Nielsen, DE., P. Snitkjaer and den F. Berg, 2008. Investigating the fermentation of cocoa by

denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near spectra. *Internacional Journal of Food Microbiology* 125: 133-140.

Nielsen, D.S., J. Jakobsen, J.J., Jespersen. 2010 *Candida halmiae* sp. nov., *Geotrichum ghanense* sp. nov., and *Candida awaia* sp. nov. , isolated from Ghanian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1460-1465.