



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
MICROORGANISMOS DURANTE EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN DE
THEOBROMA CACAO L. DE LA VARIEDAD
“CHUNCHO” OBTENIDA EN CUZCO, PERÚ

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

LILIAN GABRIELA SALAZAR ALVAREZ

LIMA – PERÚ

2017

Jurado

Presidente: Dr. José Luis Bauer Cuya

Secretaria: Dra. Dora Maurtua Torres

Vocal: Dr. Michael Sauvain

Asesor

Dra. Jasmin Hurtado

*Dedico esta tesis a mis padres y hermano, quienes me han apoyado
en todas las etapas de mi vida*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a Dios por todo.

A mí mamá, Lilian Alvarez, por su sostén emocional, sus palabras sabias y certeras; por su paciencia y dedicación; por los valores inculcados; y por motivarme siempre a seguir adelante.

A mí papá, Iván Salazar, porque a pesar de estar lejos siempre está presente preocupándose porque nada me falte y apoyándome con la que esté a su alcance.

A mi hermano Iván Salazar por ser un gran ejemplo de persona, de profesional y por siempre estar pendiente de mí.

A mis amigas del laboratorio (Pamela Obando, Jacqueline Begazo, Andrea Revoredo y Betsabé Román) quienes hicieron de esta tesis una etapa agradable llena de risas y por apoyarnos mutuamente a cumplir nuestros objetivos. En especial a Pamela Obando, por su amistad desde pregrado y su disposición en ayudarme en la realización de la tesis.

A mis hijos de 4 patas quienes fueron un apoyo emocional incondicional.

A David Iglesias quien hizo de esta tesis un tema de conversación divertido y quien me escuchó y aconsejó en todo momento.

A mis abuelitos (Martha Arboleda y Luis Alvarez) por su bondad, cariño y su apoyo a la distancia.

A mí asesora de tesis la Dra. Jasmín Hurtado y a la Dra. Rosario Rojas por darme la oportunidad de realizar la tesis y poder así culminar con una etapa más de mi vida.

Finalmente agradecer a todos los que contribuyeron con un granito de arena para que esta tesis pueda ser concluida.

Gracias al cacao, a las bacterias y levaduras que en conjunto forman el producto del que nadie puede resistirse: el chocolate.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente trabajo recibió el financiamiento del Programa Nacional para la Competitividad y Productividad-Innovate Perú, de acuerdo al contrato 159-PNICP-PIAP-2015.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
Proceso fermentación del cacao.....	3
Características generales de las levaduras presentes en las fermentaciones de cacao.....	6
Caracterización general de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en las fermentaciones de cacao.....	7
Características generales de las bacterias ácido acéticas (BAA) presentes en las fermentaciones de cacao.....	9
Cacao “Chuncho” del Cusco.....	10
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Recolección de frutos de la variedad de cacao Chuncho cultivar “Común Cáscara de Huevo”.....	16
4.2 Desarrollo del proceso de fermentación.....	18
4.3 Recolección de las muestras de los granos de cacao fermentados.....	19
.....	
4.3.1 Caracterización fisicoquímica.....	19
4.3.2 Tratamiento de la muestra.....	19

4.3.3	Siembra en medios diferenciales y conteo de microorganismos	
	totales.	20
4.3.3.1	Levaduras.	20
4.3.3.2	Bacterias ácido lácticas.	20
4.3.3.3	Bacterias ácido acéticas.	21
4.4	AISLAMIENTO DE LEVADURAS PROVENIENTES DE LAS	
	MUESTRAS.	21
4.4.1	Caracterización macroscópica.	22
4.4.2	Caracterización microscópica.	22
4.4.3	Caracterización bioquímica.	22
4.4.3.1	Crecimiento en agar maíz.	22
4.4.3.2	Prueba del tubo germinal.	22
4.4.3.3	Crecimiento a 37 °C.	23
4.4.3.4	Asimilación de carbohidratos mediante API 20	
	AUX.	23
4.4.3.5	Crecimiento en manitol.	23
4.4.3.6	Prueba de crecimiento en medio con TTC.	24
4.4.3.7	Prueba de tiamina.	24
4.5	AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	
	PROVENIENTES DE LAS MUESTRAS.	24
4.5.1	Caracterización macroscópica.	25
4.5.2	Caracterización microscópica.	25
4.5.3	Caracterización bioquímica.	25
4.5.3.1	Prueba de catalasa.	25

4.5.3.2	Prueba de oxidasa.	26
4.5.3.3	Fermentación de carbohidratos mediante API 50 CHL.	26
4.6	AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS PROVENIENTES DE LAS MUESTRAS.	27
4.6.1	Caracterización macroscópica.	27
4.6.2	Caracterización microscópica.	27
4.6.3	Caracterización bioquímica.	28
4.6.3.1	Oxidación de acetato.	28
4.6.3.2	Crecimiento en 30% D-glucosa.	28
4.6.3.3	Crecimiento en 10% de etanol.	28
4.6.3.4	Crecimiento en distintos pH.	29
4.6.3.5	Formación de ácido a partir de azúcares.	29
4.6.3.6	Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol. . .	29
4.6.3.7	Para la prueba de motilidad.	30
V.	RESULTADOS.	31
5.1	PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.	31
5.2	SUCESIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS.	33
5.3	IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.	35
5.3.1	Características morfológicas de las levaduras aisladas.	36
5.4	IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.	39
5.4.1	Caracterización morfológica de las bacterias ácido lácticas aisladas.	40
5.5	IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS.	42

5.5.1	Caracterización morfológicas de las bacterias ácido acéticas. . .	
	44
VI.	DISCUSIÓN.	45
VII.	CONCLUSIONES.	52
VIII.	RECOMENDACIONES.	53
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	54
	ANEXOS	

Índice de tablas

Tabla 1. Recuento de Microorganismos en los distintos agares.	33
Tabla 2. Recuento de microorganismos en las distintas diluciones.	
.	ANEXO IV
Tabla 3. Resultados del API 20 AUX para identificación de levaduras.	
.	36
Tabla 4. Descripción macroscópica y microscópica de las levaduras encontradas.	
.	ANEXO IV
Tabla 5. Pruebas bioquímicas adicionales para la confirmación de especies de levaduras.	ANEXO IV
Tabla 6. Resultados del API 50 CHL para identificación de Lactobacilos y especies relacionadas.	39
Tabla 7. Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las BAA aisladas.	43

Índice de gráficos

Gráfico 1. Variaciones fisicoquímicas temperatura durante el proceso de fermentación.	31
Gráfico 2. Variación en las poblaciones microbianas durante el proceso de fermentación de cacao.	34

Índice de figuras

Figura 1. Características geográficas de Echarati.	ANEXO V
Figura 2. Características del fruto del cacao Chuncho.	ANEXO V
Figura 3. Características del cacao Chuncho del cultivar “Cáscara de Huevo”	ANEXO V
Figura 4. A. Recolección del cacao. B. Quiebre de la mazorca. C. Extracción del grano del cacao.	ANEXO V
Figura 5. Preparación de la caja de madera para el proceso de fermentación. A. Recubrimiento con hojas de plátano. B. Vaciado de granos de cacao en la caja de madera C. Recubrimiento con talegas.	ANEXO V
Figura 6. A. Colonia (20X) B. Células (1000X) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Figura 7. A. Colonia (20X) B. Células (1000X) de <i>Kloeckera apiculata</i>	37
Figura 8. A. Colonia (20X) B. Células (1000X) de <i>Candida utilis</i>	37
Figura 9. A. Colonia (20X) B. Células (1000X) de <i>Candida tropicalis</i>	38
Figura 10. A. Colonia (20X) B. células (1000X) de <i>Candida boidinii</i>	38
Figura 11. A. Colonia (20X) B. Bacilos Gram positivos (1000X) de <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
Figura 12. A. Colonia (20X) B. Bacilos Gram positivos (1000X) de <i>Lactobacillus brevis</i>	41
Figura 13. A. Colonia (20X) B. Cocobacilos Gram positivos (1000X) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	41
Figura 14. Halos de aclaramiento en el agar CYG.	42

Figura 15. A. Colonia (20X) **B.** Bacilos Gram negativos (1000X) de *Gluconobacter spp.*44

Figura 16. A. Colonia (20X) **B.** Bacilos Gram negativos (1000X) de *Acetobacter spp.*44

ABREVIATURAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
BAA	Bacterias ácido acéticas
UFC	Unidad formadora de colonias
°C	grados Celsius
KOH	Hidróxido de potasio
CO ₂	Dióxido de carbono
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
cm	centímetros
gr	gramos
ml	mililitros
TTC	2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio
Agar MRS	Agar Man, Rogosa y Sharpe
Agar GYC	Glucosa, extracto de levadura, carbonato de calcio
CaCO ₃	Carbonato de calcio
NaCl	Cloruro de sodio

RESUMEN

Los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) son la materia prima principal para la producción de chocolate. La fermentación de los granos de cacao es un proceso post cosecha esencial para el desarrollo de precursores del sabor del chocolate la cual viene dada por su genotipo. Perú posee una alta diversidad de genotipos del árbol de cacao . Entre ellas tenemos La variedad de cacao “Chuncho” la cual posee una superioridad en calidad organoléptica. En este trabajo se reporta el estudio microbiológico del proceso de la fermentación del cacao “Chuncho” del Cusco del cultivar “Cáscara de Huevo”. Las levaduras identificadas durante el proceso de la fermentación fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), *Candida utilis*, *Candida tropicalis* y *Candida boidinii*. Esta última no ha sido reportada en estudios de procesos de fermentación del cacao. Entre las bacteria ácido lácticas se aisló e identificó a *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. En cuanto a las bacterias ácido acéticas se determinó que pertenecían a los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

Palabras claves: Fermentación, cacao Chuncho, levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas

ABSTRACT

The cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) are the main raw material for the production of chocolate. The fermentation of the cocoa beans is a post-harvest process essential for the development of precursors of the chocolate flavor. These precursors are given by its genotype. Peru has a high diversity of cacao tree genotypes. Among them, we have the variety of cacao "Chuncho" which has a great organoleptic quality. This paper reports the microbiological study of the process of fermentation of the "Chuncho" from Cusco cocoa of the cultivar "Cáscara de Huevo". The yeasts identified during the fermentation process were *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), *Candida utilis*, *Candida tropicalis* and *Candida boidinii*. The latter has not been reported in studies of cocoa fermentation processes. Among acid lactic bacteria, *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* were isolated and identified. At the time, acid bacteria were determined to belong to the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*.

Key words: Fermentation, cocoa Chuncho, yeast, acid lactic bacteria and acid acetic bacteria

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie originaria de los bosques tropicales húmedos de América del Sur. Sus granos constituyen la materia prima para la industria del chocolate y sus derivados; la industria farmacéutica, y la industria cosmética (1). Pertenece a la familia de las esterculiáceas. El nombre científico *Theobroma Cacao* L. que significa en griego: “alimento de los dioses” fue descrita por el botánico Carlos Linneo. Puede crecer en terrenos planos como también en terrenos que sobrepasan el 50 % de pendiente, en quebradas y a orilla de ríos, el clima debe ser constantemente húmedo y debe crecer bajo una cubierta de árboles sin luz solar directa, con temperatura media diaria entre 20 y 30 °C, con una mínima de 16 °C. Puede medir hasta 12 metros de altura y en cultivo se mantienen normalmente entre 4-8 metros (2). El fruto del cacao es una baya grande llamada mazorca, de forma variable (oblonga, elíptica, ovada, obovada, esférica u oblata) (3), amarilla o púrpura, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene entre 30 y 60 semillas (4) que están recubiertas por una pulpa mucilaginoso de color blanco y de sabor dulce y ácido. Todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los granos, también llamados almendras de cacao, las cuales son ricas en almidón, en proteínas y en grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo. Son de estos granos de donde salen los principales subproductos: el licor de cacao, la manteca de cacao, el cacao en polvo y el chocolate (5).

Desde el punto de vista botánico o genético, la especie *Theobroma cacao* L. se clasifica en: criollo, trinitario y forastero. En Perú existen 5 grupos genéticos de

acuerdo a la clasificación propuesta por Lachenaud, en 1997: Criollo, Forastero del Alto Amazonas o Amazonas, Forastero del Bajo Amazonas o Guyanas, Nacional y Trinitario (6).

El tipo de cacao que más se comercializa en el mundo es el cacao ordinario, que representa aproximadamente entre el 90% y 92% de la producción mundial y proviene de las variedades forastero; mientras que el cacao fino o aromático, que proviene de las variedades criollo o trinitario, apenas representa entre el 5 y 8% del total mundial (6).

En la actualidad el mercado del grano de cacao es una base importante y estable de ingresos agrícolas para millones de agricultores en las regiones tropicales de todo el mundo. Sus semillas fermentadas y secas son la materia prima clave en la fabricación de chocolate. En todo el mundo se producen anualmente unos 4 millones de toneladas de cacao (6).

En el Perú se está llevando a cabo una selección de árboles de cacao para el uso en la producción futura y en programas de mejoramiento, llamados "Árboles Promisorios". En los últimos años Perú ha incrementado su exportación con grandes expectativas para los siguientes años. El *Perú* está clasificado según el Convenio Internacional del *Cacao* 2010 de la ICCO, como el *segundo* país productor y *exportador de cacao* fino (7).

Las semillas de cacao constan de 50% de grasa, 15% compuestos fenólicos, 12% de proteínas y 7% de carbohidratos. La pulpa acuosa contiene 12% de mono y disacáridos, 2% de ácido cítrico así como otros ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, metilcetonas, alcoholes secundarios y terpenos (8).

El sabor de la semilla de cacao es multisensorial. Además del sabor típico del cacao con notas de acidez, amargor y astringencia también pueden contribuir al perfil sensorial notas afrutadas, florales y de nuez. El potencial para desarrollar sabores específicos depende principalmente del genotipo (9). Sin embargo, las intensidades pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo. Las semillas frescas de cacao no contienen los precursores necesarios para la formación del sabor del chocolate y pueden caracterizarse por un desagradable sabor amargo y astringente (9,10). Por lo tanto, se someten a un proceso posterior a la cosecha, que consiste en la fermentación y el secado (11).

PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL CACAO

El método de procesamiento está relacionado con el país productor y se puede realizar en montones (por ejemplo, Ghana y Costa de Marfil), cajas de madera (por ejemplo, Brasil, Malasia y Perú), canastas (Nigeria y Ghana), bandejas (por ejemplo, Ghana), sacos (Ecuador) y fermentación de plataforma (Ecuador) (12).

La fermentación de los granos de cacao se produce en dos pasos: la primera etapa implica reacciones microbianas que tienen lugar en la pulpa y la parte exterior de los granos; la segunda fase involucra varias reacciones hidrolíticas que ocurren dentro de los cotiledones (13).

Durante la fermentación, la pulpa de la fruta se degrada, el etanol y el ácido acético se difunden en los granos de cacao y, combinado con el aumento de la temperatura, matan el embrión de la semillas, en consecuencia, la estructura interna del grano de cacao se descompone, liberando compuestos y pigmentos que interactúan bioquímicamente con enzimas endógenas activadas para desarrollar precursores de sabor y color (13).

La compleja composición del sabor del grano de cacao depende del genotipo, los tratamientos post cosecha, como el pre acondicionamiento de la pulpa, la fermentación y el secado, los procesos industriales como el tostado, así como el tipo de suelo y la edad del árbol de cacao. El genotipo del cacao determina la composición química del grano de cacao, específicamente el contenido de proteínas de almacenamiento, polisacáridos y polifenoles. Esto determina las cantidades y el tipo de precursores que se formarán durante la fermentación. El proceso de secado conduce a la formación del sabor, por lo tanto, influye tanto en el tipo de sabor como en la intensidad. La fermentación y secado del grano de cacao da como resultado la descomposición de las proteínas de almacenamiento por parte de proteasas endógenas en aminoácidos y oligopéptidos de cadena corta mientras que los polisacáridos también son degradados por la invertasa a glucosa

y fructosa. Los aminoácidos, oligopéptidos, glucosa y fructosa reaccionan entre sí durante el proceso de tostado para producir los compuestos volátiles típicos del sabor del cacao. Los polifenoles también son oxidados por la polifenol oxidasa durante la fermentación y el secado, esto reduce la astringencia y el amargor de los granos, mejorando así el sabor (9,14,15). Se pueden resaltar diferentes atributos del potencial del sabor del mismo cacao fresco a través de la fermentación. Es decir que el perfil de sabor del cacao se define durante la fermentación (9,10).

El proceso de fermentación requiere una acción secuencial compleja de diferentes microorganismos:

En primer lugar, en condiciones anaerobias, los carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) de la pulpa de la fruta se degradan por las levaduras, dando como resultado la licuefacción de la pulpa, drenaje y formación de etanol en condiciones de altas concentraciones de carbohidratos (característica de la masa de pulpa de cacao fresco) y a disponibilidad limitada de oxígeno (16).

Posteriormente, las condiciones anaeróbicas y micro-aeróbicas facilitan el establecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) que también contribuyen a la degradación de la pulpa de la fruta. Las BAL fermentan una amplia gama de sacáridos (principalmente glucosa y fructosa), homo o heterofermentativamente, en ácido láctico, ácido acético, etanol y / o dióxido de carbono, y convierten algunos ácidos orgánicos en ácido láctico (por ejemplo, ácido cítrico y ácido málico) o ácido acético. El ácido láctico y el ácido acético son los productos

principales finales de la fermentación del metabolismo de las BAL durante el proceso de fermentación del grano de cacao (17).

Finalmente, las bacterias ácido acéticas (BAA) que aparecen desde las primeras etapas del proceso de fermentación persisten hasta que las condiciones para el crecimiento sean óptimas. Cuando la pulpa es metabolizada y es en gran parte drenada la aireación de la masa de fermentación aumenta promoviendo el desarrollo de las BAA. Es en estas condiciones aerobias donde las BAA oxidan el etanol a ácido acético. Esta oxidación provoca el calentamiento de la masa de fermentación a temperaturas de aproximadamente 45-50 °C (18).

Características generales de las levaduras presentes en las fermentaciones de cacao

Actualmente los hongos presentan 5 divisiones: Basidiomicetos, Ascomicetos, Glomeromicetos, Zigomicetos y Quitridiomicetos (19). Las levaduras pertenecen a los ascomicetos y basidiomicetos.

Las levaduras son hongos unicelulares no filamentosos de forma esférica, ovoides, elipsoides o alargadas (algunos géneros pueden producir hifas) que se reproducen de manera asexual predominantemente por gemación o fisión (20). Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie. Algunas levaduras son aerobias mientras que otras son especies fermentadoras principalmente de hexosas y disacáridos. Se encuentran sobre la epidermis de la fruta y también en el suelo. Las fermentaciones realizadas por levaduras son importantes en la elaboración de alimentos como pan, cerveza,

vino, vinagre y quesos de maduración superficial(21). Varios estudios han revelado una abundante diversidad de levaduras en la fermentación del cacao abarcando especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Yamadazyma*, *Yarrowia*, *Vanderwaltozyma*, *Wickerhamomyces* y *Zygosaccharomyces* (18,22–24).

El grupo de especies de levaduras más frecuentemente aisladas son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia manshurica*, *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Pichia anomala* y *Kluyveromyces marxianus* (24–26).

En las fermentaciones las levaduras producen ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético y ácido succínico) que pueden tener una capacidad tampón en la masa de granos de cacao de fermentación. Producen también alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres de ácidos grasos, que junto con los ácidos orgánicos se convierten en precursores del sabor del cacao. Algunos compuestos ingresan de la pulpa hacia el interior de los granos por medio de difusión mientras que otros son ingresados de manera enzimática (13).

Caracterización general de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en las fermentaciones de cacao

Las BAL comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos que se encuentran representados por varios géneros que producen ácido láctico como el

único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Estos muestran características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no móviles y no generan esporas. Son catalasa negativa y oxidasa negativa. Pueden ser anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes (27).

Dentro de las BAL se consideran alrededor de 20 géneros. *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* y *Aerococcus* son los grupos que tienen mayor incidencia en alimentos (27).

Las especies aisladas con más frecuencia en las fermentaciones de cacao son: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* (22,23,28–32).

Lactobacillus: son bacterias Gram positivas en forma de bacilos que se encuentran en pares o cadenas. Estrictamente fermentativos con requerimientos nutricionales complejos. Son organismos importantes también en la fabricación de otros alimentos fermentados (lácteos, carnes, levadura, cerveza y vino). Son anaerobios y anaerobios facultativos (27).

Leuconostoc: son bacterias Gram positivas en forma de cocobacilos, anaerobias facultativas, dispuestas en pares y cadenas. Es un género predominante entre las BAL encontrado en plantas. *L. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* es el género

que principalmente se aísla en los alimentos fermentados de origen vegetal, es generalmente el primer organismo en crecer y ser sustituido por lactobacilos más tolerantes al ácido (27).

Características generales de las bacterias ácido acéticas (BAA) presentes en las fermentaciones de cacao

Las BAA son bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae*, aeróbicas estrictas, no formadoras de esporas, con forma elipsoidal o de bacilo que pueden presentarse aisladas, en pares o en cadenas. Son motiles por la presencia de flagelos ya sean polares o peritricos. Son oxidasa negativas y catalasa positivas, a excepción de *Acetobacter peroxydans*, la cual es catalasa negativa. Su pH óptimo de crecimiento es entre 5 y 6,5 pero algunas especies pueden crecer en valores más bajos (entre 3 y 4). Su temperatura de crecimiento está entre 25-30 °C. Pueden producir pigmento en medio sólido y producir también distintos tipos de polisacáridos (33).

Entre los géneros pertenecientes a esta familia se encuentran: *Granulibacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acetobacter*. En este último género tenemos especies capaces de realizar la oxidación completa del etanol convirtiéndolo en CO₂ y agua (34). En un estudio realizado en Ghana (23) por análisis moleculares se reveló que *A. pasteurianus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter tropicalis*,

Acetobacter malorum y *Gluconobacter oxydans*, son las BAA predominante durante las fermentaciones de grano de cacao (23).

En general, los miembros del género *Acetobacter* se encuentran con más frecuencia que los de *Gluconobacter* (28) debido a la capacidad de las primeras en crecer en presencia de etanol. Los métodos comúnmente utilizados para la identificación a nivel de especie se basan en la diferenciación fisiológica y bioquímica como: crecimiento en etanol, producción de pigmentos y fermentación de carbohidratos (35).

En presencia de etanol, *Acetobacter* y *Gluconobacter* son capaces de producir ácido acético como producto de la oxidación incompleta (33). Estas reacciones de oxidación corresponden a la fermentación oxidativa, que implican la oxidación incompleta del alcohol acompañada por la acumulación de gran cantidad de los metabolitos que son liberados en el medio de cultivo (34).

CACAO “CHUNCHO” DEL CUSCO

Perú posee una diversidad única con respecto a los genotipos del árbol de cacao (1). Entre ellas tenemos La variedad de cacao “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”.

El cacao “Chuncho” se encuentra ubicado geográficamente en los valles de La Convención de la Región Cusco. Las mayores extensiones fueron sembradas hace más de cien años y domesticadas por la comunidad nativa “Matsiguengas” (Figura

1, Anexo IV) (7). Pertenece al grupo genético Forastero del Alto Amazonas. Las principales características organolépticas de este cacao nativo son de nota floral, frutal y nuez; con baja astringencia y amargor. El fruto es elíptico y oblongo, algunos poseen una constricción basal intermedia mientras que en otros cultivares esta es ausente. La forma del ápice es obtusa. Presenta rugosidad ligera e intermedia en toda la mazorca. Los surcos pueden tener una profundidad intermedia o superficial. El color del estado inmaduro del fruto es verde o verde pigmentado (Figura 2, Anexo IV) (36). El cultivar “Cáscara de huevo” se caracteriza por tener una mazorca cuyo grosor es delgado y se quiebra fácilmente con la mano, es un fruto pequeño de color amarillo y presenta un grano de color violeta (Figura 3, Anexo IV). La importancia del estudio de esta variedad de cacao se debe a su superioridad en la calidad organoléptica que interesa a chocolateros con nivel internacional. Esto trae consigo poder demostrar la importancia del manejo post-cosecha en cuanto a la fermentación y el conocimiento a nivel microbiológico de lo que está ocurriendo en ella. Un buen manejo de esto asegura que las cualidades de sabor y aroma (determinadas por su genotipo) se expresen, mejoren y/o se formen a partir de precursores presentes en el grano (37). Para la variedad “Chuncho” existe un estudio sobre variables organolépticas además de informes sobre la cosecha y post cosecha de variables físicas de la fermentación (37).

En las fermentaciones espontáneas tradicionales que todavía se aplican en todo el mundo, los microorganismos necesarios para la fermentación entran aleatoriamente en la masa de fermentación y provienen de distintos medios como

el suelo, la cáscara de la mazorca, instrumentos de cosecha, manos de los agricultores, cajas de fermentación y microorganismos presentes en la hoja de plátano que se utiliza para el recubrimiento de la cada de fermentación (18). Esto hace que la fermentación y, por ende, el desarrollo del perfil del sabor sean escasamente controlables. El control de algunas especies de bacterias durante la fermentación podría permitir el control de una producción de alta calidad de chocolate (30,31).

Para el proceso de fermentación del cacao, los cultivos iniciadores o pre cultivos mixtos que consisten en levaduras, BAL y BAA generalmente se prueban con el fin de simular el desarrollo secuencial de estos grupos microbianos durante un proceso espontáneo. Para Pereira et al. 2015, Los criterios para la selección y el desarrollo de los cultivos iniciales de cacao y café son los siguientes: En primer lugar, es esencial saber qué especies están presentes y cuales son dominantes. Esto permite seleccionar levaduras (beneficiosas) y / o cepas bacterianas iniciales que sean capaces de superar el proceso espontáneo. Por lo tanto, la capacidad del cultivo inicial para dominar la microbiota nativa es uno de los principales criterios para su aplicación para mejorar la calidad del cacao.

A continuación, se debe seleccionar cepas con actividad pectinolítica con el fin de provocar la degradación del mucílago del grano de cacao para componer el pre cultivo. La eliminación del mucílago por parte de la microbiota puede facilitar el secado de los granos y producir metabolitos responsables del sabor del producto final (12).

El conocimiento de los microorganismos presentes en las diversas variedades de cacao podrá en un futuro ayudar a realizar un pre cultivo óptimo para mejorar la fermentación, obtener aromas deseados en el chocolate, obtener productividad constante en la fermentación y calidad de chocolate. En este trabajo se reporta el estudio microbiológico del proceso de la fermentación del cacao “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”.

II. HIPÓTESIS

Existen microorganismos específicos que intervienen en el proceso de fermentación del grano de *Theobroma cacao* L. de la variedad “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de microorganismos durante el proceso de fermentación del cacao “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el proceso de fermentación del cacao de la variedad “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”.
- Monitorear los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de fermentación.
- Aislar microorganismos durante el proceso de fermentación.
- Identificar y caracterizar los microorganismos aislados a partir del proceso de fermentación de los granos de cacao mediante técnicas microbiológicas, bioquímicas y correlacionarlas con el proceso de fermentación.
- Cuantificar de manera relativa para definir la importancia de cada uno de los microorganismos en las etapas del proceso de fermentación de cacao “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 RECOLECCIÓN DE FRUTOS DE LA VARIEDAD DE CACAO “CHUNCHO”, CULTIVAR “CÁSCARA DE HUEVO”

La colecta de la muestra de cacao fue llevada a cabo en el distrito de Echarati, de la provincia de La Convención, en la ciudad de Quillabamba ubicada en el departamento de Cusco a 1400 m.s.n.m. La identificación taxonómica del cacao “Chuncho” fue realizada por el Ing. Carlos Rodríguez de SENASA tomando en cuenta caracteres morfológicos del fruto (ver anexo VI). Para determinar el ámbito de estudio se utilizó Información Estadística Agraria de la Convención-Cusco, mapas satelitales, documentos con información sobre cacao chuncho y trabajos de Investigación realizados en cacao Chuncho. Con toda esta información se eligieron como zonas de estudio a la Microcuenca del Río Chuyapi (sectores Potrero - Cacaopampa), la Microcuenca del Río Sambaray (sectores San Pedro - Caldera) y la Microcuenca del Río Vilcanota (Sectores: Calzada - Chahuares) que representan a la parte más antigua en cultivo de cacao chuncho constituido por plantaciones con más de 50 años, libres de plantas intrusas como son los forasteros, trinitarios y misceláneos. Para el presente estudio no se tomó en cuenta a la Microcuenca del Río Urubamba (Palma Real – Kiteni – Kepashiato – Ivochote) ya que en esta zona crecen principalmente plantaciones jóvenes de cacao chuncho, posiblemente híbridas con trinitarios u otros tipos de cacao.

En las zonas escogidas se visitaron varias parcelas de productores, eligiéndose aquellas que mostraron uniformidad para la selección de tipos de cacao Chuncho, en tal sentido, se decidió trabajar en las parcelas de los agricultores Ricardo Quintanilla Gamarra y Orlando Tupayachi Muñoz (Microcuenca del Río Chuyapi), Lorenzo Bedoya Farfán (Microcuenca del Río Sambaray), Francisco Torres Baca, y Demetrio Villavicencio Pereira (Microcuenca del Río Vilcanota). En las parcelas seleccionadas se marcaron 15 plantas representativas de cada tipo de cacao Chuncho con pintura de color y con numeración sucesiva en el tronco, las cuales fueron objeto del presente estudio.

La cosecha fue realizada empleando la misma metodología utilizada por los agricultores de la zona: utilizando un machete y con un instrumento fabricado de un palo largo con una cuchilla al inicio para poder cortar el pedúnculo. El tiempo de cosecha fue aproximadamente de 3 horas, esto dependía de la dificultad para cosechar el cacao debido a la altura de los árboles, presencia de pendientes y clima (lluvias). Luego de cortar los cacaos de los árboles los cuales caían al suelo desde una altura de 3 metros (dependiendo de la altura del árbol) eran recolectados y juntados en un plástico extendido en el piso (figura 4).

4.2 DESARROLLO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Luego de cosechar los frutos de cacao, se procedió al quiebre de las mazorcas para extraer su contenido. Se partió la mazorca con un machete y luego se realizó la extracción del mucílago junto con los granos de cacao utilizando las manos. Cabe señalar que ninguno de los instrumentos usados era previamente esterilizado. El tiempo de remoción del contenido de la mazorca del cacao fue aproximadamente de 1 minuto por mazorca. Los granos obtenidos fueron puestos en baldes y llevados a la Cooperativa Agraria Cafetalera Alto Urubamba LTDA. N° 239. Se colocaron en baldes y luego en bolsas de polietileno selladas. Estas bolsas fueron transportadas a temperatura de 28 °C. El tiempo de viaje fue de aproximadamente 45 minutos. Una vez en la cooperativa, los granos de cacao fueron colocados con las manos en cajas de fermentación (dimensión de 65 x 65 x 65 cm). Estas cajas tienen la capacidad de albergar aproximadamente 200 kg de granos de cacao fresco que al ser fermentados y secados se reducen aproximadamente entre 70 y 80 kg. Debido a que no se contaba con la cantidad de necesaria de granos de cacao del cultivar “Cáscara de Huevo” para llenar una caja de fermentación y por el cumplimiento con otros objetivos que presentaba el proyecto se decidió utilizar cajas de tecnopor con dimensiones de 50 x 50 x 50 cm. A las cajas de tecnopor se les realizó agujeros para la aireación y drenaje. Luego se cubrió internamente con hojas de plátano, se agregó los 40 kg de muestra de cacao fresco “Chuncho” del cultivar “Cáscara de Huevo”. Finalmente se colocó una capa más de hojas de plátano. Para mantener y concentrar el calor, la parte superior de las cajas fueron cubiertas con talegas. En este momento se inició el proceso de la fermentación el

cual pasa por una técnica de volteo (para mantener la aireación interna) cada 24 horas. La técnica de volteo consiste en remover los granos en proceso de fermentación con las manos para permitir la oxigenación de la masa. El proceso de fermentación duró aproximadamente 4 días (figura 5).

4.3 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LOS GRANOS DE CACAO FERMENTADOS

Se recolectó alrededor de 30 gramos de granos de cacao con pulpa cada día, desde el momento en el que inició el proceso (tiempo 0) y cada 24 horas hasta el quinto día. La toma de muestra se realizó utilizando bolsas de polietileno con cierre hermético, tomando porciones en la superficie y en 5 puntos distintos distribuidos en la mitad de la caja de fermentación. Las muestras se transportaron en refrigeración hasta el lugar donde se realizó el análisis microbiológico (28).

4.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Se tomó la temperatura con un termómetro digital infrarrojo laser y se midió el pH de la masa en el momento de la recolección de cada muestra. Además se midió la temperatura de la masa de fermentación en diferentes zonas y la temperatura del cuarto de fermentación.

4.3.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras se transportaron manteniendo una cadena de frío con gel packs hasta el lugar donde se realizó el análisis microbiológico ubicado a 7 minutos de los cuartos de fermentación. Una vez ahí, se pesaron asépticamente 20 gramos de

muestra y se lavaron en 180 ml de agua peptonada al 0.1%, agitando las botellas por cinco minutos y dejando reposar por 30 minutos. Se tomaron 0.3 mL de la fase líquida y se le agregaron a viales que contenían 2.7 mL de agua peptonada al 0.1% para realizar diluciones seriadas decimales (28). Posteriormente se sembraron alícuotas de 0.1 mL por extensión en medios selectivos para los microorganismos que se iban a aislar por triplicado. Una vez sembradas las muestras en las placas fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología Ambiental en la Universidad Peruana Cayetano Heredia para el aislamiento y caracterización.

4.3.3 SIEMBRA EN MEDIOS SELECTIVOS Y CONTEO DE MICROORGANISMOS TOTALES

4.3.3.1 Levaduras

Para el aislamiento se utilizó el medio de cultivo agar Sabouraud de (HIMEDIA) (caseína enzimática hidrolizada 0.5%, peptona 0.5%, glucosa 4% y agar 1.5%). Se realizó la siembra por diseminación de 0.1 mL de inóculo.

4.3.3.2 Bacterias ácido lácticas

Para el aislamiento se utilizó el medio de cultivo agar MRS (marca HIMEDIA) (peptona 1%, extracto de carne 1%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 2%, tween 80 0.1%, citrato de amonio 0.2%, acetato de sodio 0.5%,

sulfato de magnesio 0.01%, sulfato de manganeso 0.005%, fosfato dipotásico 0.2% y agar 1.2%). Se realizó la siembra por diseminación de 0.1 mL de inóculo y se puso en jarras de microaerofilia.

4.3.3.3 Bacterias ácido acéticas

Para el aislamiento se empleó el medio de cultivo GYC (2% glucosa, 1% extracto de levadura, 0.3% CaCO₃, y 1.5% agar) suplementado con 5% de etanol para las bacterias ácido acéticas. Se realizó la siembra por diseminación de 0.1 mL de inóculo.

4.4 AISLAMIENTO DE LEVADURAS PROVENIENTES DE LAS MUESTRAS

Cada una de las muestras obtenidas al ingresar al laboratorio de Biotecnología Ambiental fueron re sembradas en el medio de cultivo Sabouraud con cloranfenicol (marca HIMEDIA) (caseína enzimática hidrolizada 0.5%, peptona 0.5%, glucosa 4%, 0.005% cloranfenicol y agar 1.5%) e incubadas a 28 °C durante 2 días en estufa (marca Bluepard instruments Co., Ltd. Shanghai). Posteriormente se realizaron repiques y siembras para cada una de las colonias aisladas hasta lograr cultivos axénicos.

4.4.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

Se observó al estereoscopio (marca Beltec Scientific) para reconocer las características específicas de algunas especies de levaduras.

4.4.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Para la caracterización microscópica de levaduras, se realizó la tinción Gram (ver anexo 3) y se observó en el microscopio (marca Zeiss) con el objetivo de 100X y 40X respectivamente. Se registraron las características de la célula (forma esférica, ovoide, alimonada, cilíndrica, triangular e incluso alargada) así como la presencia de hifas, pseudohifas, blastoconidios para ser comparadas con información reportadas en el libro *The yeast, a taxonomic study* (38).

4.4.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

4.4.3.1 CRECIMIENTO EN AGAR MAÍZ

Se sembró en agar maíz (4% harina de maíz, 2% agar y 1 mL de tween 80) a 28 °C por 48 horas en estufa para observar la producción de clamidosporas de *Candida albicans* y la micromorfología y distribución de las blastoconidias y artroconidias y pseudohifas para diferenciar las distintas especies de Cándida. Luego se observó al microscopio con 4% KOH.

4.4.3.2 PRUEBA DEL TUBO GERMINAL

Una porción de la colonia aislada fue introducida en 0,5 mL de suero de conejo, se incubó a 37 °C durante 2 horas en estufa. Se depositó una gota de

la emulsión sobre un portaobjetos limpio y se colocó un cubre-objetos. La visualización de la presencia de tubos germinativo se realizó a 400X.

4.4.3.3 CRECIMIENTO A 37 °C

Se sembró en medio de cultivo agar Sabouraud de (HIMEDIA) (caseína enzimática hidrolizada 0.5%, peptona 0.5%, glucosa 4% y agar 1.5%) y se incubó a 37 °C se incubó por 2 días en estufa.

4.4.3.4 ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS MEDIANTE API 20 AUX

Para la caracterización bioquímica se utilizó el método de identificación API 20C AUX (Biomérieux, Francia), el cual está constituido por 20 cúpulas que contienen substratos deshidratados y permiten efectuar 19 ensayos de asimilación de carbohidratos. Los carbohidratos que utiliza este método son: D-glucosa, glycerol, 2-ceto-Gluconato cálcico, L-arabinosa, D-xylosa, adonitol, xylitol, D-galactosa, inositol, D-sorbitol, Metil-DD-Glucopiranosida, N-Acetil-Glucosamina, D-cellobiosa, D-lactosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melezitosa y D-rafinosa.

4.4.3.5 CRECIMIENTO EN MANITOL

Se sembró en medio manitol (HIMEDIA) (0.5% de enzima digestiva de caseína, 0.5% enzima digestiva de tejido animal, 0.1% de extracto de

carne, 1% D-manitol, 7.5% de NaCl, 0.0025% rojo de fenol y 1.5% de agar. Se incubó por 2 días a 28 °C en estufa y se observó el crecimiento.

4.4.3.6 PRUEBA DE CRECIMIENTO EN MEDIO CON TTC

Se utilizó el medio Yeast Malt Agar (peptona 0.5%, extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, glucosa 1% y 2% de agar). A este medio se le agregó una solución de 2, 3, 5-cloruro de trifetil tetrazolio (Merck) (TTC) a una concentración de 1%. Se sembró y se incubó por 24 horas a 28 °C en estufa y se observó la coloración de las colonias que crecieron. La presencia de colonias de color rojo oscuro eran positivo para *Candida tropicalis* (20).

4.4.3.7 PRUEBA DE TIAMINA

Se sembró en medio de cultivo agar Sabouraud de (HIMEDIA) (caseína enzimática hidrolizada 0.5%, peptona 0.5%, glucosa 4% y agar 1.5%) adicionándole 0.02% de Tiamina y se incubó a 37 °C por 48 horas en estufa.

4.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROVENIENTES DE LAS MUESTRAS

Cada una de las muestras obtenidas fue re sembrada en el medio de cultivo MRS a 28 °C durante 4 días en microaerofilia en estufa. Posteriormente se realizaron repiques para cada una de las colonias aisladas hasta lograr cultivos axénicos. Una

vez obtenidos cultivos axénicos se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa además de la tinción de Gram, para luego proseguir con las pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares.

4.5.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

Se observó al estereoscopio (marca Beltec Scientific) para reconocer características de la colonia de algunas especies de bacterias ácido lácticas para compararlas con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (39).

4.5.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Se utilizó un microscopio (marca Zeiss) para determinar la tinción Gram (ver anexo 3) y observar la forma y tinción características de cada cepa. Estos resultados fueron comparados con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (39).

4.5.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

4.5.3.1 Prueba de catalasa

Colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur. Suspender la bacteria y detectar la formación de burbujas. La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.

4.5.3.2 **Prueba de oxidasa**

Se toma con un palillo grueso de madera una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo de 24 horas. La muestra se pone en contacto con la tira o disco impregnado con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina. Se debe observar una coloración morada en un lapso no mayor a 30 segundos para que sea positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

4.5.3.3 **FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS MEDIANTE API 50 CHL MEDIUM**

Para la prueba de fermentación de azúcares se utilizó el sistema de identificación api 50 CHL Medium (Biomérieux, Francia) el cual está constituido por 50 microtubos que contienen substratos deshidratados que permiten realizar el estudio de fermentación de 49 carbohidratos: D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, L-rhamnosa, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, Metil- α D-Manopiranosida, Metil- α D-Glucopiranosida, N-Acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina citrato férrico, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, almidón, glicógeno, xilitol, gentiobiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato potásico, 2-cetogluconato potásico y 5-cetogluconato potásico. Para la inoculación en los microtubos se sigue las instrucciones que vienen en la caja del fabricante.

4.6 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS PROVENIENTES DE LAS MUESTRAS

Para las bacterias ácido acéticas se empleó el medio GYC suplementado con etanol. Este medio permite observar aquellas bacterias que usan etanol para transformarlo a ácido acético produciendo la formación de un halo alrededor de la bacteria. De esta manera estas bacterias fueron aisladas del resto de bacterias y hongos capaces de crecer en este medio. Cada una de las muestras obtenidas fue re sembrada durante 10-15 días a 28 °C en estufa hasta obtener cultivos axénicos.

4.6.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

Se observó al estereoscopio (marca Beltec Scientific) para reconocer las características específicas de algunas especies de bacterias ácido acéticas para compararlas con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (39) con el libro Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology (34).

4.6.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Se utilizó un microscopio (marca Zeiss) para determinar la tinción Gram (ver anexo 3) y observar la forma y tinción característica de cada cepa. Estos resultados serán comparados con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (39) con el libro Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology (34).

4.6.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Se realizó una serie de pruebas bioquímicas: prueba de la catalasa y oxidasa (descritas anteriormente); oxidación de acetato; crecimiento en 30% de glucosa; crecimiento en 10% de etanol; crecimiento a pH 3, 3,5, 4, 5, y 6,8; fermentación de azúcares; formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol y prueba de motilidad.

4.6.3.1 Oxidación de acetato

Se inoculó cada cepa en tubos con 4 mL de caldo YP (0,3% extracto de levadura, 0.2% peptona, 0.002% azul de bromotimol pH 6.8) suplementado con 0.2 % de acetato de sodio y se incubaron a 28 °C por 15 días en estufa, se consideraron positivos aquellos aislados que mostraron un cambio de color en el caldo a color azul.

4.6.3.2 Crecimiento en 30% de D-glucosa

Se inoculó cada cepa en tubos con 4 mL de caldo (0,5% extracto de levadura, 30% D-glucosa pH 6.4), se incubaron por 15 días a 28 °C en estufa y se observó el crecimiento por un aumento de la turbidez en el tubo.

4.6.3.3 Crecimiento en 10% de etanol

Se inoculó cada cepa en tubos con medio base (0,5% extracto de levadura, 0,5% D-glucosa pH 6) suplementado con 10 % de etanol y se incubaron a 28 °C por 15 días en estufa. Se observó el crecimiento por un aumento de la turbidez del tubo.

4.6.3.4 Crecimiento en distintos pH

Se inoculó cada cepa en tubos con caldo MEP (D-Manitol 2,5%, extracto de levadura 0,5%, peptona 0,3%,) al cual se le ajusto el pH a distintos niveles (3, 3,5, 4, 5, y 6,8) se incubaron por 15 días a 28 °C en estufa y se observó el crecimiento por un aumento de la turbidez en el tubo.

4.6.3.5 Formación de ácido a partir de azúcares

Las bacterias se inocularon en un medio con 0,5% de extracto de levadura, 0,002% de púrpura de bromocresol y 1% del azúcar a utilizar. Se incubaron durante 15 días a 28 °C en estufa. Se ensayaron los siguientes azúcares: L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, D-manitol, D-sorbitol y glicerol. El cambio de color (de púrpura a amarillo), producido por la acidificación del medio debido a la oxidación del sustrato se interpretó como prueba positiva (40).

4.6.3.6 Formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol

Se observó la formación de dihidroxiacetona en el medio que contenía 3% de glicerol, 0,5% de extracto de levadura, 1% de peptona y 1,5 % de agar, el pH se ajustó a 6,0 y se incubó en estufa durante 15 días a 30 °C. Después de incubar se agregó solución de Fehling sobre la superficie de la placa de Petri. La aparición de un color naranja oscuro pone de manifiesto la presencia de dihidroxiacetona.

4.6.3.7 **Prueba de motilidad**

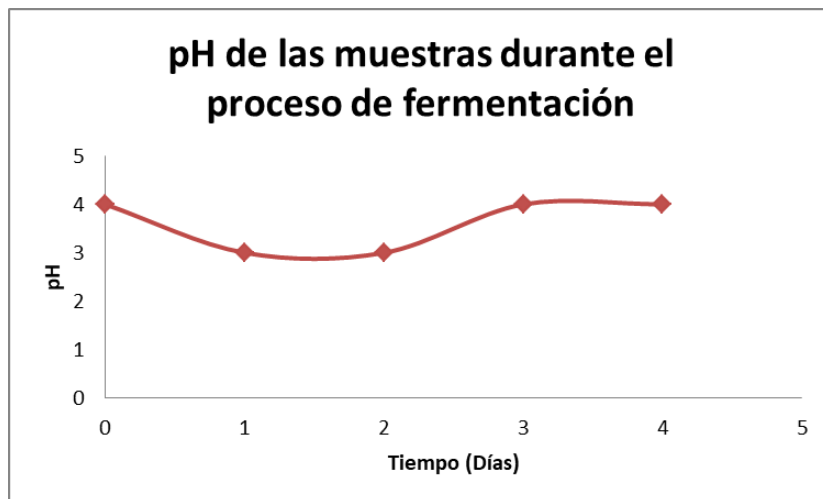
Se inoculó cada cepa por punción en tubos de agar MEP (D-Manitol 2,5%, extracto de levadura 0,5%, peptona 0,3%,) con 0.5% de agar y se incubaron a 30°C por 15 días observándose la motilidad de las bacterias en el agar.

V. RESULTADOS

5.1 Parámetros fisicoquímicos

En el Gráfico 1 se muestra las variaciones de los parámetros fisicoquímicos que se pudieron observar durante los días que duró el proceso de la fermentación de los granos de cacao. En el gráfico 1A se observa la variación del pH y el gráfico 1B la variación de las temperaturas: ambiental, del cuarto de fermentación y de la muestra tomada.

A.



B.

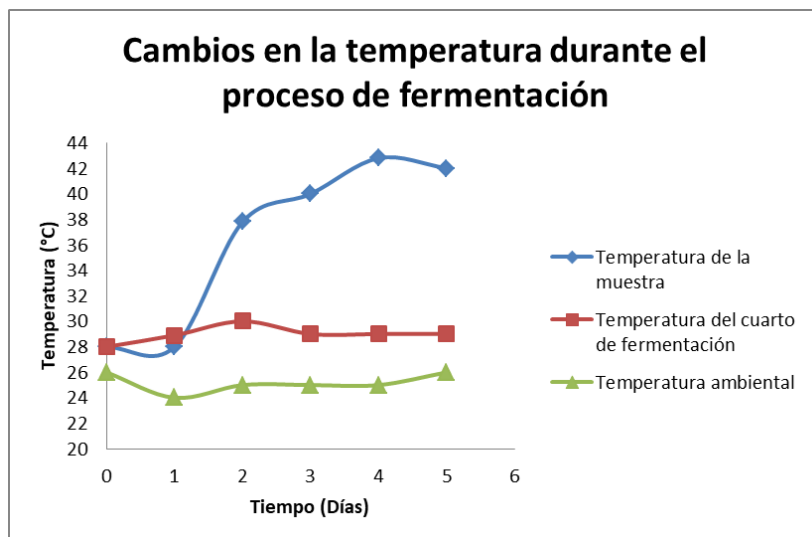


Gráfico 1. Variaciones fisicoquímicas temperatura durante el proceso de fermentación. **A.** Variación del pH **B.** Variación de la temperatura durante el proceso de fermentación

En el gráfico 1A se puede observar que el pH inicial de la muestra es de 4. Durante el primer día disminuye a 3 manteniéndose así hasta el segundo día. En los siguientes días y ya para culminar la fermentación el pH vuelve a su valor inicial. El pH inicial de 4 se debe a la presencia de ácido cítrico en la pulpa del cacao. La disminución del pH se da por la presencia de la generación de ácido láctico y ácido acético; sin embargo el pH vuelve a su valor inicial ya que estos ácidos ingresan por difusión a la parte interna del grano de cacao. El aumento en el pH se debe esencialmente a la descomposición y reducción en el contenido de ácido cítrico de la pulpa de cacao (41).

En cuanto a la temperatura ambiental y a la temperatura del cuarto de fermentación durante los días de fermentación se mantuvieron constantes. Sin embargo la temperatura de la masa de fermentación varía conforme van transcurriendo los días. Esta variación va siempre en aumento teniendo un cambio importante en los días dos y tres, ya que el aumento es rápido. El cambio va de una temperatura de 28 °C a una temperatura de 38 – 40 °C, para luego seguir subiendo la temperatura pero en menor cantidad (gráfico 1B).

5.2 SUCESIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS

Se realizó un recuento en placa de los microorganismos aislados. Para las bacterias ácido lácticas también se contó levaduras ya que el medio no contenía inhibidores de éstas. Luego de obtener estos valores se utilizó la siguiente fórmula: UFC/mL sembrados X inversa del factor de dilución. Se prosiguió finalmente a realizar el logaritmo de éstos para poder ser graficados (Ver tabla 2 anexo IV).

Tabla 1. Recuento de Microorganismos en los distintos agares

Tiempo (días)	Recuento de Microorganismos en los distintos agares (UFC/mL)		
	Sabouraud	MRS	GYC
0	410000	75000	587000
1	310000	79500	274500
2	1000000	16100000	1074000
3	1300000	374500	287500
4	5200000	460000	83450000

En el Gráfico 2 se muestra la variación en las poblaciones microbianas durante el proceso de fermentación de cacao. Estas variaciones están representadas mediante el crecimiento en agar Sabouraud para levaduras, agar MRS para bacterias ácido lácticas y levaduras; y agar GYC para bacterias ácido acéticas y levaduras.

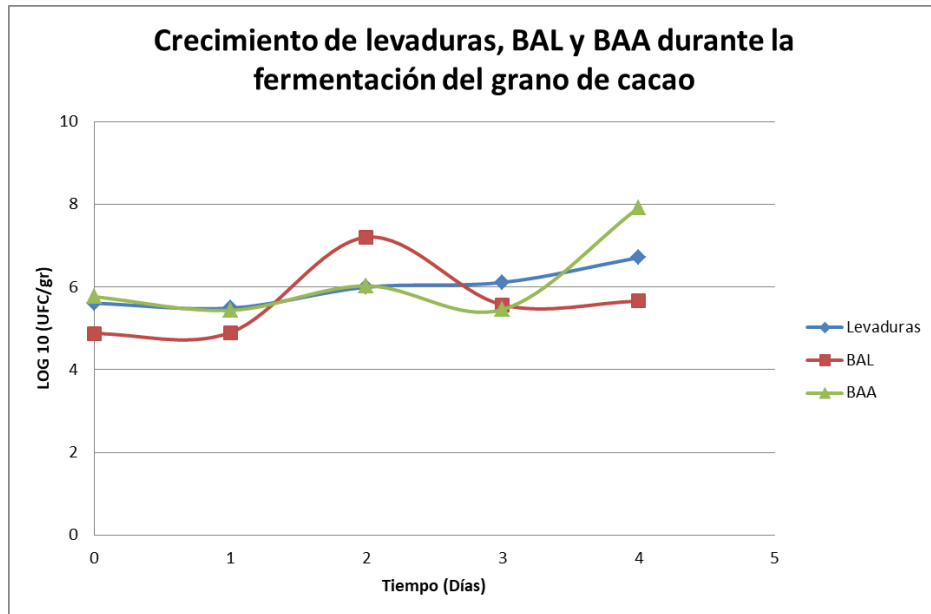


Gráfico 2. Variación en las poblaciones microbianas durante el proceso de fermentación de cacao

Durante el análisis microbiológico se observó una sucesión de microorganismos durante el proceso de fermentación. A partir del segundo día se evidenció mayor número de microorganismos en el medio de cultivo MRS que incluía Lactobacilos y levaduras. Posteriormente hubo un incremento marcado de crecimiento en el medio Sabouraud que indicaba presencia de levaduras. A partir del cuarto día se incrementó el crecimiento en el medio GYC que está relacionado con el aumento de las BAA (bacterias ácido acéticas), conservando este crecimiento hasta el final de la fermentación (Gráfico 2).

5.3 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Utilizando el medio de cultivo Sabouraud se seleccionaron 10 colonias en los 4 días de fermentación, las cuales poseían diferentes características tanto microscópicas como macroscópicas. A estos 10 morfotipos aislados se les realizó la prueba de asimilación de azúcares mediante API 20 AUX con el cual se pudo determinar que correspondían a 5 especies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp.* (anamorfo de *Hanseniaspora*), *Candida utilis*, *Candida tropicalis* y *Candida boidinii* (Tabla 3). En la tabla 4 (anexo IV) se muestra la prevalencia de estas durante los diferentes días del proceso de fermentación con todas sus características macroscópicas, microscópicas y organolépticas (aroma).

Además para confirmar las especies se les realizó pruebas bioquímicas adicionales expuestas en la tabla 5 (anexo IV). Con la prueba de crecimiento en tiamina y crecimiento a 37 °C se determinó que la especie perteneciente al género *Kloeckera spp.* fue *Kloeckera apiculata*. Para confirmar la posibilidad de la presencia de *Candida tropicalis* se realizó la prueba de crecimiento en agar TTC, dando como resultado positivo. La presencia de *Candida utilis* fue también corroborada por el olor a acetona que desprendía.

Tiempo de fermentación	Microorganismo
0	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0	<i>Kloeckera sp.</i>
0	<i>Candida utilis</i>
0	<i>Candida tropicalis</i>
4	<i>Candida boidinii</i>

Tabla 3. Resultados del API 20 AUX para identificación de levaduras

5.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS LEVADURAS AISLADAS

En la figura 6A se muestra la colonia de *Saccharomyces cerevisiae* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta colonia con forma circular, con bordes enteros, convexa, opaca, color blanco con 1 cm de diámetro. En la figura 6B se muestra la levadura con tinción Gram presentado células de globosas a elipsoidales grandes observadas al microscopio a 1000X.

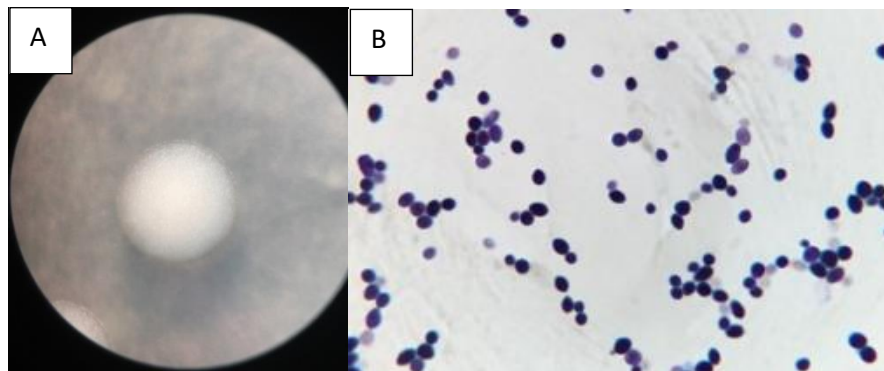


Figura 6. **A.** Colonia (20X) **B.** Células (1000X) de *Saccharomyces cerevisiae*

En la figura 7A se muestra la colonia de *Kloeckera apiculata* (anamorfo de *Hanseniaspora uvarum*) vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia de forma circular, con borde ondulado, plana, opaca, color beige con 1.3 cm de diámetro. En la figura 7B se muestra la levadura con tinción Gram presentado células con forma apiculada observadas al microscopio a 1000X.

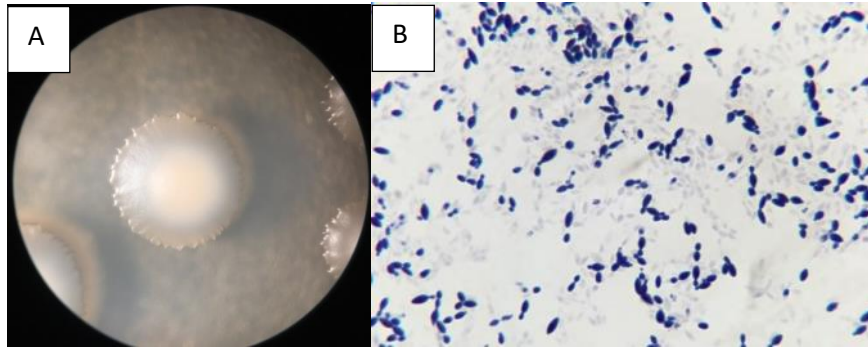


Figura 7. **A.** Colonia (20X) **B.** Células (1000X) de *Hanseniaspora uvarum*

En la figura 8A se muestra la colonia de *Candida utilis* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia con forma circular, con borde entero, convexa, opaca, color beige con 5 mm de diámetro. En la figura 8B se muestra la levadura con tinción Gram presentado células globosas a elipsoidales pequeñas observadas al microscopio a 1000X.

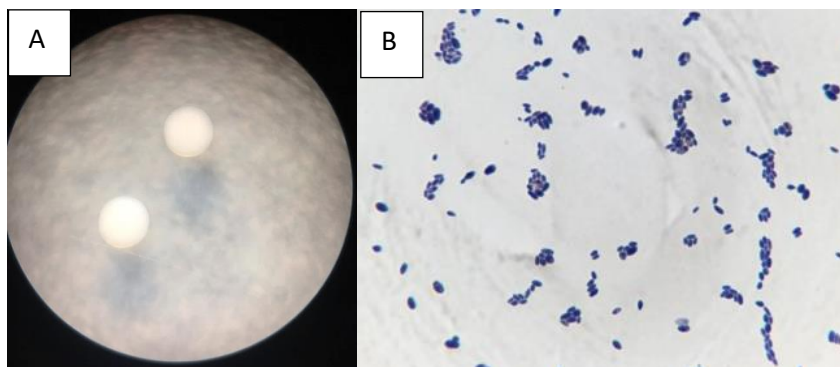


Figura 8. **A.** Colonia (20X) **B.** Células (1000X) de *Candida utilis*

En la figura 9A se muestra la colonia de *Candida tropicalis* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia con forma circular, con borde entero, convexa, brillante, color beige con 5 mm de diámetro. En la figura 9B se muestra la levadura con tinción Gram presentado Célula elipsoidal pequeña observadas al microscopio a 1000X.

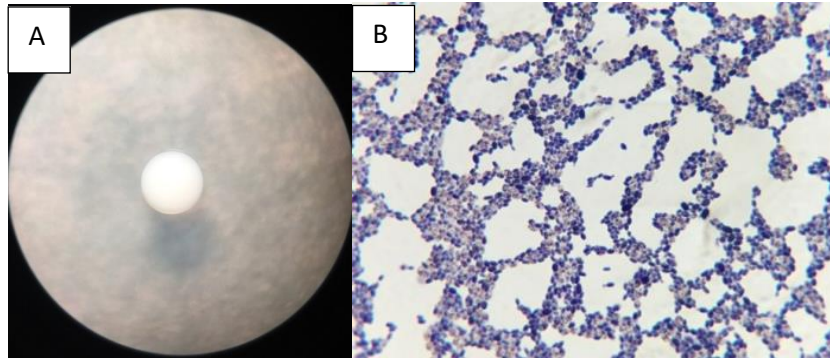


Figura 9. **A.** Colonia (20X) **B.** Células (1000X) de *Candida tropicalis*

En la figura 10A se muestra la colonia de *Candida boidinii* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia con forma irregular, con borde irregular, convexa, opaca, seca, rugosa, color blanco con 6 mm de diámetro. En la figura 10B se muestra la levadura con tinción Gram presentado Célula globosa a elipsoidal pequeñas observadas al microscopio a 1000X.

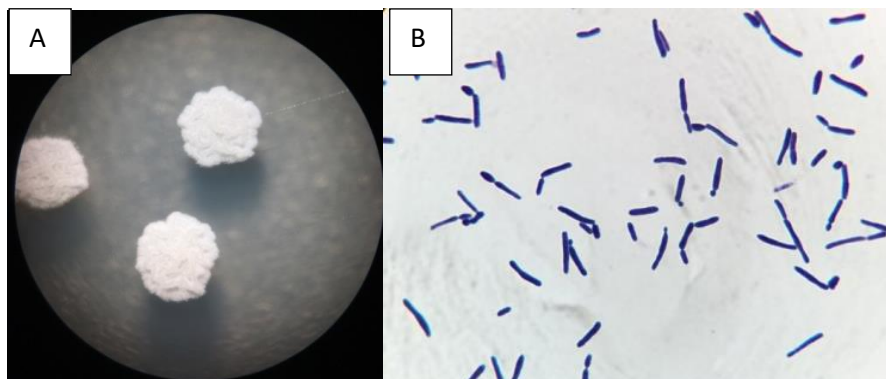


Figura 10. **A.** Colonia (20X) **B.** células (1000X) de *Candida boidinii*

5.4 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Utilizando el medio MRS se logró identificar el crecimiento de 20 tipos de colonias bacterianas las cuales fueron de tipo bacilos Gram positivos, catalasa negativas y oxidasa negativas. A 10 de las colonias aisladas se les realizó la prueba de fermentación de azúcares API 50 CH con la cual se pudo determinar la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* sp, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* (Tabla 6).

Tiempo de fermentación	MICROORGANISMO
0	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp/dextranicum 1</i>
1	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp/dextranicum 2</i>
2	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp/dextranicum 2</i>
2	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp/dextranicum 2</i>
2	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp/dextranicum 1</i>
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp/dextranicum 2</i>
4	<i>Lactobacillus brevis 3</i>

Tabla 6. Resultados del API 50 CHL para identificación de Lactobacilos y especies relacionadas

5.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS

En la figura 11A se muestra la colonia de *Lactobacillus plantarum* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia convexa, 6 mm diámetro, forma circular con borde irregular, opaca y cremosa. En la figura 11B se Bacilos alargados Gram positivos observadas al microscopio a 1000X.

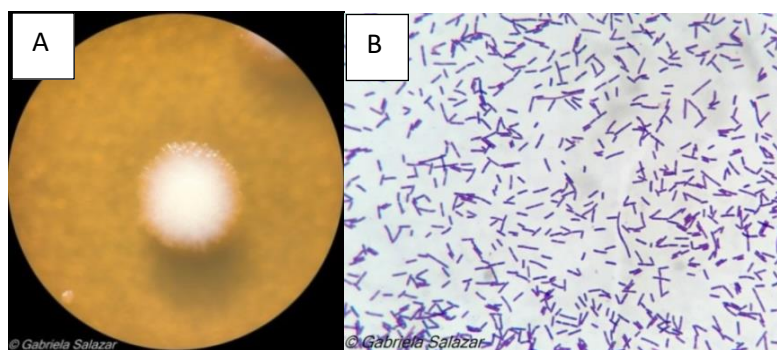


Figura 11. A. Colonia (20X) B. Bacilos Gram positivos (1000X) de *Lactobacillus plantarum*

En la figura 12A se muestra la colonia de *Lactobacillus brevis* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia convexa con forma circular, 4 mm de diámetro, opaca y cremosa En la figura 12B se Bacilos Gram positivos observadas al microscopio a 1000X.

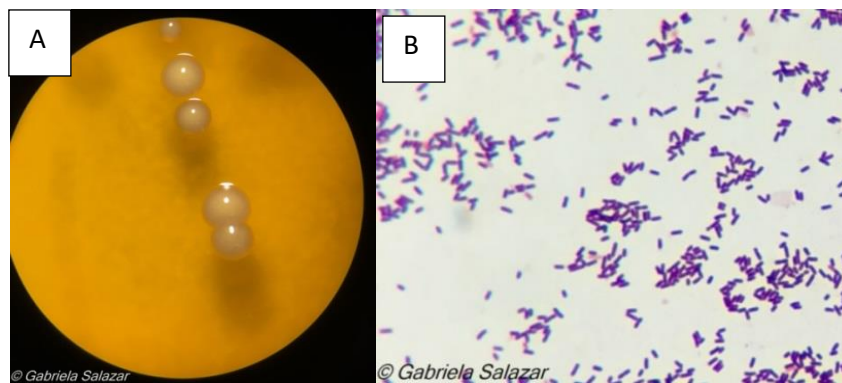


Figura 12. **A.** Colonia (20X) **B.** Bacilos Gram positivos (1000X) de *Lactobacillus brevis*

En la figura 13A se muestra la colonia de *Leuconostoc mesenteroides* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia con forma circular, 3 mm de diámetro, convexa, brillante, cremosa y color blanco. En la figura 13B se pueden apreciar bacilos Gram positivos observados al microscopio a 1000X.

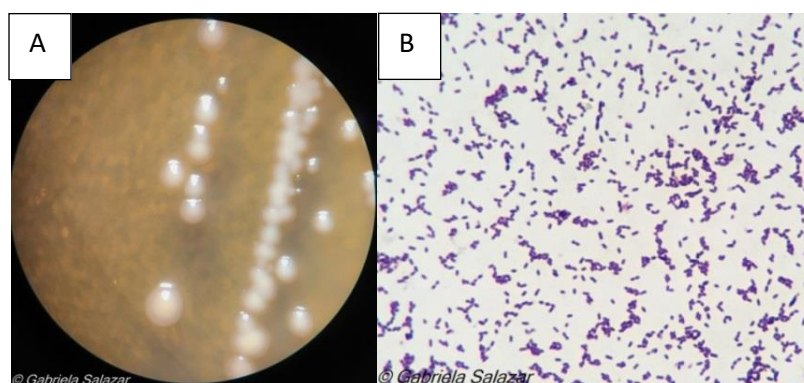


Figura 13. **A.** Colonia (20X) **B.** Cocobacilos Gram positivos (1000X) de *Leuconostoc mesenteroides*

5.5 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS

El aislamiento de las BAA se realizó a partir de las muestras de cacao recolectadas durante los 4 días de fermentación utilizando el agar GYC. Se obtuvieron 12 colonias provenientes que mostraban características típicas de las BAA presentando halos de aclaramiento en el agar CYG (figura 14) y siendo bacilos Gram negativos al ser observados al microscopio. El crecimiento fue lento por lo que se tuvo que esperar hasta 7 días para poder observar la morfología de la colonia. Las colonias en el medio CYG fueron de color beige con borde regular con un tamaño pequeño de 2 -5 mm.



Figura 14. Halos de aclaramiento en el agar CYG

En la Tabla 7 se muestran las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a las bacterias ácido acéticas aisladas. Estas pruebas permiten determinar a qué género pertenecen las bacterias aisladas y las posibles especies a las cuales podrían corresponder.

	A1	A5	A6	A7	A17	A25	A27	A29	A46	A89	A90	A91
Oxidación de acetato	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
10% Etanol	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
30% de Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 3	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
pH 3.5	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
pH 4	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
pH 5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 6.8	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Agar Glicina	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aclaramiento en agar GYC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de dihidroxiacetona a partir del glicerol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 7. Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las BAA aisladas.

En la Tabla 7 se muestra las pruebas fisiológicas y bioquímicas que se le realizaron a los aislados, resultando todos motiles, la mayoría catalasa positiva y oxidasa negativo. Dos de los aislados (A17, A90) dieron resultados positivos para la oxidación de acetato. Ninguno creció en concentraciones altas de glucosa. Se evaluó el crecimiento de los aislados a diferentes pH (3, 3.5, 4, 5, 6.8) creciendo todos en estos rangos, tres de los aislados (A17, A25, A27) crecieron en pH 3 y ocho crecieron en la prueba de crecimiento a una concentración de 10% de etanol. (A1, A5, A6, A7, A17, A46, A89, A90 y A 91).

5.5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS

En la figura 15A se muestra la colonia de *Gluconobacter sp.* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una colonia con forma circular, 5 mm de diámetro, convexa, brillante, cremosa y color beige. En la figura 15B se observan bacilos Gram negativos observadas al microscopio a 1000X.

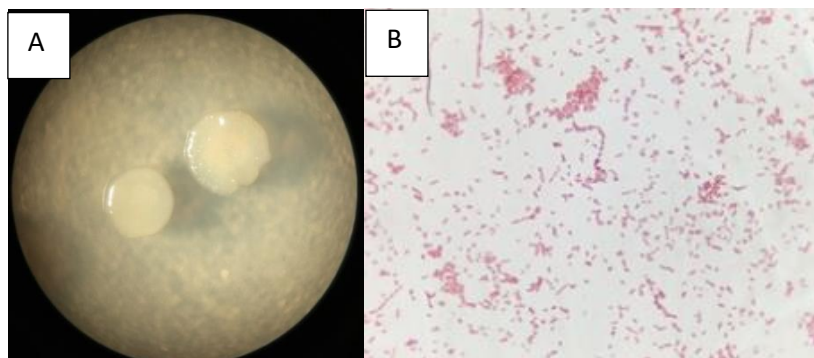


Figura 15. A. Colonia (20X) B. Bacilos Gram negativos (1000X) de *Gluconobacter spp.*

En la figura 16A se muestra la colonia de *Acetobacter spp.* vista al estereoscopio a 20X. Esta presenta una con forma circular, 2 mm de diámetro, convexa, brillante, cremosa y color beige oscuro. En la figura 16B se pueden apreciar bacilos con forma de curva Gram negativos observados al microscopio a 1000X.

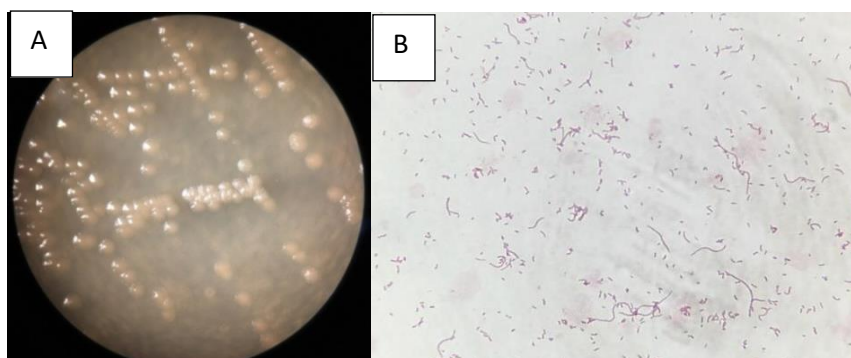


Figura 16. A. Colonia (20X) B. Bacilos Gram negativos (1000X) de *Acetobacter spp.*

VI. DISCUSIÓN

Durante el proceso de fermentación del cacao “Chuncho” del cultivar “Cáscara de huevo” se observó una variación en el pH. El pH inicial observado fue de 4 (grafico 1A). En publicaciones relaciones con fermentación de cacao ha sido reportado que el pH inicial de los granos está entre 3.5 y 4.5 (42) debido a la presencia de ácidos orgánicos en especial por el ácido cítrico en la pulpa del grano de cacao (14,18). El consumo de citrato va acompañado de la formación de ácido acético y ácido láctico. Estos ácidos son importantes para el proceso normal de la fermentación del cacao ya que penetran profundamente en los granos y activan la formación de precursores del aroma (28). La disminución del pH se da por la presencia de la generación del ácido acético; sin embargo el pH vuelve a su valor inicial ya que estos ácidos ingresan por difusión a la parte interna del grano de cacao. El aumento en el pH se debe esencialmente a la descomposición y reducción en el contenido de ácido cítrico de la pulpa de cacao (41).

Durante las primeras 24-48 horas de fermentación, las levaduras convierten sacáridos (sacarosa, glucosa y / o fructosa) en etanol (42). La producción de etanol genera un moderado aumento de temperatura debido a que es un proceso exotérmico además genera dióxido de carbono, que mantiene un ambiente anaeróbico (28). En términos generales la continua conversión de sacáridos en etanol y este al ser oxidado en ácido acético (13) eleva la temperatura de la masa de cacao desde una temperatura de 25-30 °C a 35-40 °C en 48 horas. Posteriormente (en el tercer día) la temperatura y el pH aumentan hasta 40 °C y 4

respectivamente (ver gráfico 1 A y B). Esta cinética de variación de pH y temperatura también fueron reportados en estudios previos de fermentación de cacao (18).

Durante el análisis microbiológico se observó una sucesión de microorganismos durante el proceso de fermentación. Como se observa en la gráfico 2 a las 48 horas de la fermentación la población microbiana aumenta y luego esta disminuye con excepción de las BAA y las levaduras.

En general, durante el proceso de la fermentación, el recuento total de microorganismos presentes en la masa de pulpa de cacao en grano aumenta durante las primeras 24-36 horas (primer y segundo día de fermentación) y luego se estabiliza o se reduce gradualmente dependiendo del microorganismo (28). En este estudio se encontró que las BAL cumplían con esta generalidad, mientras que las levaduras y las BAA al cuarto día aumentaron su población. Esto se puede deber a la frecuencia con la que se realizó el proceso de volteado, cada 24 horas y no pasando un día, permitiendo así mayor oxigenación de la masa y ayudando a la prevalencia de microorganismos aerobios como lo son las levaduras y las BAA.

Las poblaciones iniciales microbianas son variables en número, tipo y distribución. Esto se debe a que dependen de varios factores como son: el cultivar de cacao, la calidad de la mazorca y la calidad del grano, por lo que la dinámica de la comunidad microbiana varía entre lugares de fermentación y tipos de fermentación (23,28,30).

Se identificó durante el proceso de fermentación la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6), *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*) (Figura 7), *Candida utilis* (Figura 8), *Candida tropicalis* (figura 9) y *Candida Boidinii* (Figura 10). Dos de estas especies aisladas se encuentran dentro del grupo de especies de levaduras más frecuentemente aisladas (*S. cerevisiae*, *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica*, *P. kluyveri*, *P. fermentans*, *P. anomala* y *Kluyveromyces marxianus*) (24–26).

Tanto en las investigaciones dependientes de cultivos como en las independientes se ha demostrado el papel dominante de *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *P. kudriavzevii*, *P. manshurica*, *P. membranifaciens* y *S. cerevisiae* en varios procesos de fermentación del grano de cacao (24,26). Sugiriéndonos así que al haber aislado estos microorganismos (*S. cerevisiae* y *H. uvarum*) podrían también tener un papel de dominancia en la fermentación llevada a cabo con cacao “Chuncho”. Además de una diversidad de especies de levaduras se producen también varias cepas de la misma especie dentro de un proceso de fermentación del grano de cacao. Otros autores han reportado especies de levaduras que no han sido encontradas en procesos de fermentación anteriores (24,43). En este estudio se aisló a *Candida boidinii* especie que no ha sido reportada en otra literatura relacionada con la fermentación del cacao. Sin embargo esta levadura ha sido relacionada con el café (44). Alrededor de las chacras donde se siembra el cacao también hay plantaciones de café, por esta razón pudo haberse debido el aislamiento de esta levadura.

La levadura *S. cerevisiae* domina el curso de la fermentación (26) por lo tanto puede ser encontrada en todos los tiempos de toma de muestra es por esta razón que la hemos logrado aislar en todos los días que transcurrió la fermentación ya que posee un rápido crecimiento a un pH ligeramente alto y tiene la capacidad de tolerar concentraciones altas de etanol y de temperatura. En el día cero se aisló mayor diversidad de especies de levaduras *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* *Candida tropicalis* que en otros días de fermentación.

La importancia de la presencia de levaduras radica en provocar la reducción de la viscosidad y el drenaje de la masa de la pulpa de cacao, debido a la secreción de enzimas pectinolíticas que descomponen las paredes celulares de la pulpa (18,22) esto permite la entrada de aire, lo que promueve el crecimiento de bacterias, en particular BAL y BAA.

Utilizando el medio MRS se logró identificar el crecimiento de 20 tipos de colonias bacterianas las cuales fueron de tipo bacilos Gram positivos, catalasa negativas y oxidasa negativas. A 10 de las colonias aisladas se les realizó la prueba de fermentación de azúcares API 50 CHL con la cual se pudo determinar la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. (Figura 12), *Lactobacillus plantarum* (figura 11) y *Lactobacillus brevis* (figura 10) (Tabla 1). Este aislamiento se ve corroborado con estudios previos donde han encontrado que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* son las especies aisladas con más frecuencia (22,23,28–32).

La importancia de la presencia de *L. plantarum* en la fermentación radica en que junto con *Leuc. Pseudomesenteroide* y *L. fermentum* consumen el citrato en las primeras etapas de la fermentación del cacao bajo condiciones de pH bajo evitando así la competencia con las levaduras (citrato - negativas) que se encuentran degradando anaeróbicamente azúcares a etanol (28).

A pesar de que se observó un gran crecimiento de BAL en los primeros 2 días de fermentación no se logró aislar diversidad de especies.

Todas las BAA fueron bacilos Gram negativos (Figura 15B y 16B), las cuales presentaron halos de aclaramiento en el agar GYC, que es una característica de las bacterias acéticas ya que al utilizar el etanol y convertirlo en ácido acético este disuelve el CaCO_3 del medio de cultivo formando un halo alrededor de la colonia (figura 14). Dos de los aislados que dieron positivo para la prueba de oxidación de acetato, confirman la presencia del género *Acetobacter* y/o *Gluconacetobacter*; mientras que el resto de las 10 colonias fueron identificadas como *Gluconobacter*. Esta prueba es utilizada para realizar esta diferenciación ya que el acetato se integra en el ciclo de Krebs, *Gluconobacter* al no tener un ciclo de Krebs funcional es incapaz de oxidar este compuesto.

La incapacidad de crecimiento de los 12 aislados en una concentración de 30% de glucosa confirma la pertenencia a los géneros de *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*.

El pH inicial de la masa de fermentación registró un valor de 4 para luego aumentar gradualmente, sugiriendo que todos los aislados son capaces de soportar las condiciones de pH iniciales de la masa ya que todos crecieron a este valor de pH.

El crecimiento en 10% de etanol es una característica diferencial entre algunas de las especies del genero *Acetobacter*, de los aislados que dieron positivo a la prueba de la oxidación de lactato ambos dieron positivo para la prueba de crecimiento en 10% de etanol (A17 y A90). *A. ghanensis*, *A. oeni*, *A. nitrogenifigens* y *A. pasteurianus* son las especies que toleran tales condiciones (39). Por lo tanto es probable que los aislados pertenezcan a alguna de estas especies. Sin embargo para confirmar esto se tendrían que realizar más pruebas bioquímicas y correlacionarlas con pruebas moleculares.

En un estudio realizado en Ghana (23) por análisis moleculares se revelo que *A. pasteurianus*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter malorum* y *Gluconobacter oxydans*, son las BAA predominante durante las fermentaciones de grano de cacao (23). En general, los miembros del género *Acetobacter* se encuentran con más frecuencia que los de *Gluconobacter* (23,45) sin embargo en este estudio se ha encontrado lo contrario de 12 aislamientos solo 2 pertenecieron al género de *Acetobacter*.

El predominio de cepas específicas de *Acetobacter* sobre *Gluconobacter* en otros procesos reportados, puede atribuirse a su preferencia por la oxidación del etanol,

que es fácilmente disponible en la masa de la pulpa, en lugar de la fermentación de la glucosa; su crecimiento en manitol y lactato; y su tolerancia al calor y al etanol (22,25). El mayor aislamiento de *Gluconobacter* en este estudio, puede indicar una fermentación diferente de la masa de la pulpa, ya que la fermentación de la glucosa dominará la oxidación del etanol, dando como resultado la producción de otros ácidos orgánicos distintos del ácido acético u otros productos finales de la fermentación por otras bacterias, que podrían ser responsables del sabor diferente de la semilla fermentada del cacao “Chuncho”.

VII. CONCLUSIONES

- Durante el proceso de la fermentación, siguiendo los procedimientos tradicionales de Echarati, se encontró que las variaciones de pH y temperatura fueron similares a las encontradas en otros países.
- Las levaduras identificadas durante el proceso de la fermentación fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis* y *Candida boidinii*. Esta última no ha sido reportada en estudios de procesos de fermentación del cacao.
- Las bacterias ácido lácticas (y relacionadas) aisladas e identificadas fueron: *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*.
- En cuando a las bacterias ácido acéticas aisladas se determinó que pertenecían a los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.
- En la presente tesis se reporta por primera vez un estudio de aislamiento y caracterización de la flora microbiana presente en el proceso de fermentación de una variedad de cacao nativo peruano tratando de correlacionarlo con las características del proceso de fermentación que podrían servir como literatura para la realización de un cultivo inicial para la obtención de una fermentación de mayor calidad y productividad.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación molecular de las cepas aisladas y correlacionarlas con las pruebas bioquímicas.
- Identificar las actividades bioquímicas de cada especie dentro del proceso de fermentación y su importancia en la generación de sabor y aroma del chocolate.
- Cuantificar los microorganismos presentes en las diferentes etapas del proceso de la fermentación mediante Q-PCR.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Llorca 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).
2. Doster N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. Cacao *Theobroma cacao* L. Hoja botánica. 2011;19 p.
3. M&O Consulting. Marco General de la Diversidad Genética del Cacao: Estudio de Caracterización del Potencial Genético del Cacao en el Perú. 2008. 4-21 p.
4. Ministerio de Agricultura. Cacao: Un campo fértil para sus inversiones y el desarrollo de sus exportaciones. 2011; Available from: http://www.salondelcacaoychocolate.pe/2012/archivos/ficha_cacao.pdf
5. Species Plantarum. *Theobroma cacao* L. Species Plant. 1994;2(1753):253–8.
6. (MINAG) Ministerio de Agricultura. Estudio del CACAO en el Perú y en el Mundo [Internet]. 2015. p. 90. Available from: agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/.../estudio_cacao_para_ii_ca.pdf
7. (MINAG) Ministerio de Agricultura. Superárboles de Cacao “chuncho” (cusco). 2012;1–3.
8. Kadow D, Bohlmann J, Phillips W, Lieberei R. Identification of main fine or flavour components in two genotypes of the cocoa tree (*Theobroma cacao* L.). J Appl Bot Food Qual. 2013;86:90–8.

9. Misnawi, Jinap S, Jamilah B, Nazamid S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *J Sci Food Agric*. 2005;85(6):917–24.
10. Aikpokpodion PE, Dongo LN. Effects of Fermentation Intensity on Polyphenols and Antioxidant Capacity. *Int J Sustain Crop Prod*. 2010;5(4):66–70.
11. Kadow D, Niemenak N, Rohn S, Lieberei R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2015;62(1):357–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>
12. Pereira GV de M, Soccol VT, Soccol CR. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Curr Opin Food Sci*. 2016;7:50–7.
13. da Veiga Moreira I, da Cruz M, Miguel P, Ferreira W, Ribeiro D, Freitas R. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *FRIN* [Internet]. 2013;54(1):9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
14. Kongor JE, Hinneh M, Walle D Van De, Afoakwa O, Boeckx P, Dewettinck K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review. *FRIN* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
15. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008;48(9):840–57.

16. Koné MK, Guéhi ST, Durand N, Ban-Koffi L, Berthiot L, Tachon AF, et al. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Res Int* [Internet]. 2016;89:910–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>
17. De Vuyst L, Weckx S. The Functional Role of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Bean Fermentation. *Biotechnol Lact Acid Bact Nov Appl Second Ed.* 2015;248–78.
18. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):205–21.
19. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, et al. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(6):e0130114. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130114>
20. Kurtzman CP, Fell J., Boekhout T. *The Yeasts, A Taxonomic Study.* 2011. 537 p.
21. Boulton C, Quain D. *Brewing Yeast and Fermentation* [Internet]. *Brewing Yeast and Fermentation.* 2001. 492-494 p. Available from: http://www.academia.edu/6545837/Brewing_yeast_and_fermentation
22. Ardhana MM, Fleet GH. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(1–2):87–99.
23. Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J*

- Food Microbiol. 2007;114(2):168–86.
24. Papalexandratou Z, De Vuyst L. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(7):564–74.
 25. 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):441–53.
 26. Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa . *Food Microbiol.* 2013;35(2):73–85.
 27. De Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume three (the Firmicutes). 2009. 1450 p.
 28. Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(6):1809–24.
 29. Lefeber T, Janssens M, Moens F, Gobert W, De Vuyst L. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria.

- Appl Environ Microbiol. 2011;77(18):6694–8.
30. Papalexandratou Z, Camu N, Falony G, De Vuyst L. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. Food Microbiol [Internet]. 2011;28(5):964–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.010>
 31. Papalexandratou Z, Vrancken G, de Bruyne K, Vandamme P, de Vuyst L. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. Food Microbiol [Internet]. 2011;28(7):1326–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
 32. Papalexandratou Z, Falony G, Romanens E, Jimenez JC, Amores F, Daniel HM, et al. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. Appl Environ Microbiol. 2011;77(21):7698–714.
 33. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two (The Proteobacteria). 2005. 1409 p.
 34. Tonouchi N. Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology. Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology. 2016. 299-320 p.
 35. Seearunruangchai A, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Thawai C, Itoh T, Yamada Y. Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. J Gen Appl Microbiol. 2004;50:47–53.
 36. APPCACAIO. Cacao “chuncho” (cusco). 2012;1–3.
 37. Rojas R. Estudio del proceso poscosecha y caracterización morfológica-

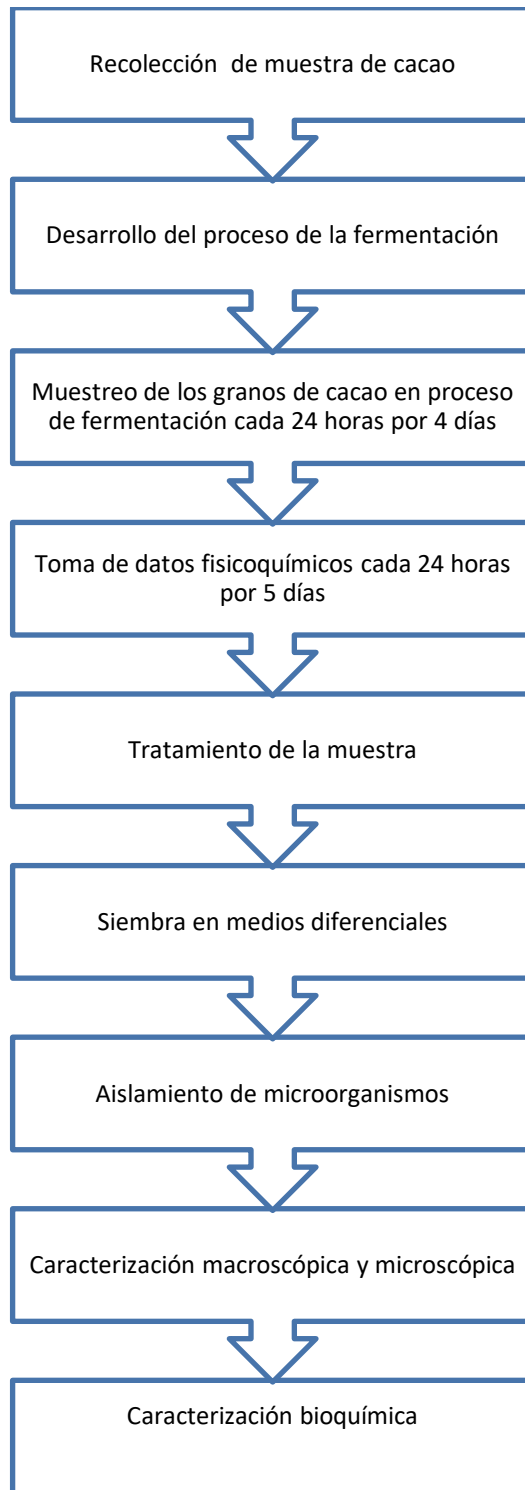
- sensorial-molecular de 3 variedades de cacaos nativos de Cusco, Junin y Piura. Lima; 2015. 82 p.
38. Demain ALCPKJWF. The yeasts, a taxonomic study. fourth edi. Elsevier B.V.; 1998. 1075 p.
 39. Bergey DH, Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Williams & Wilkins; 2000. 787 p.
 40. Mamlouk D, Gullo M. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian J Microbiol.* 2013;53(4):377–84.
 41. Ouattara H, Ouattara H, Droux M, Reverchon S, Nasser W, Niamke SL. Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
 42. Ouattara D, Ouattara H, Adom J, Goualié B, Koua G, Doué G, et al. Screening of Lactic Acid Bacteria Capable to Breakdown Citric Acid during Ivorian Cocoa Fermentation and Response of Bacterial Strains to Fermentative Conditions. *Br Biotechnol J* [Internet]. 2016;10(3):1–10. Available from: <http://sciencedomain.org/abstract/11816>
 43. Daniel HM, Vrancken G, Takrama JF, Camu N, De Vos P, De Vuyst L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(5):774–83.
 44. Hoang TNT, Tran KK, Le PH. Isolation and Identification of Anaerobic Yeasts and Bacteria from Weasel Coffee for Cellulase and Pectinase. 2015;5(December):19–24.

45. Moens F, Lefeber T, De Vuyst L. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(6):1848–57.

ANEXOS

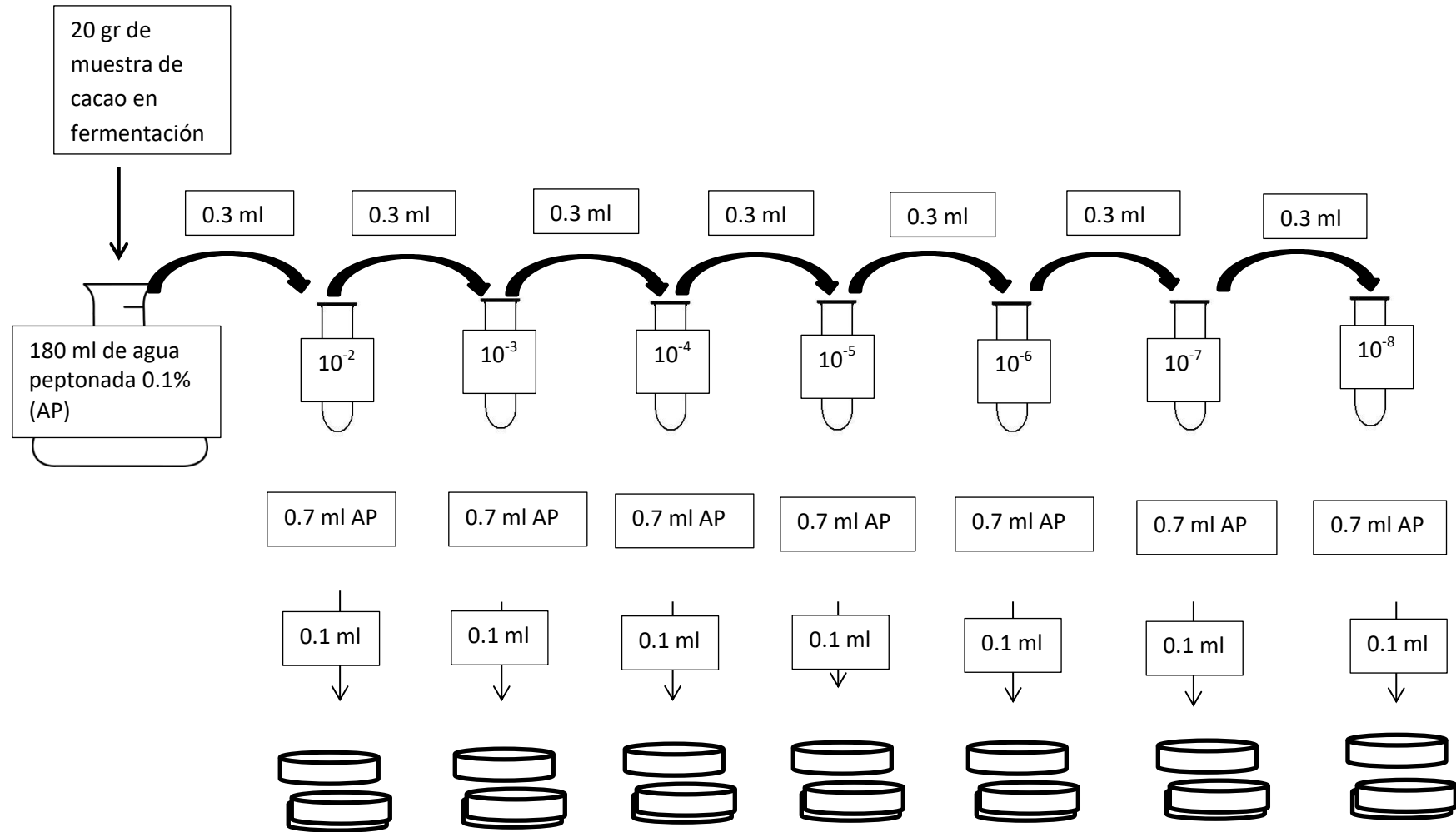
ANEXO I

FLUJOGRAMA DEL PROCESO



ANEXO II
DIAGRAMA DEL PROCESO

Figura 30. Diagrama de la metodología utilizada para realizar las diluciones para la siembra en los 3 medios de cultivo diferenciales (Siembra por triplicado)



ANEXO III

A. Tinción Gram

- Agregar cristal violeta, solo el suficiente para que se cubra el extendido bacteriano.
dejar actuar durante 60 segundos.
- Agregar el lugol, solo el suficiente, dejar actuar durante 60 segundos.
- Enjuagar con agua.
- Agregar una o dos gotas de alcohol-acetona e inmediatamente enjuagar con agua corriente.
- Agregar Safranina, solo la suficiente, Dejar actuar durante 60 segundos.
- Enjuagar con agua.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Observar en un microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.

ANEXO IV

Tabla 2. Recuento de microorganismos en las distintas diluciones

Conteo de microorganismos						
		Medios				
DÍAS	DILUCIÓN	Sabouraud	MRS		GYC	
T0	-2		74	76	553	621
	-3	47 35				
	-4		0	0	0	0
	-5	11 17				
	-6		188	157	0	0
	-7	0 17				
T1	-2		84	75	261	288
	-3	30 32				
	-4		0	0	0	0
	-5	0 0				
	-6		0	0	0	0
	-7	0 0				
T2	-2		0	0	1068	1080
	-3	104 96				
	-4		160	162	0	0
	-5	11 18				
	-6		18	12	0	0
	-7	0 0				
T3	-2		445	304	297	278
	-3	259 261				
	-4		20	28	3	38
	-5	0 0				
	-6		0	0	0	0
	-7	0 0				
T4	-2		408	513	incontable	incontable
	-3	500 540				
	-4		200	150	821	848
	-5	137 139				
	-6		0	30	252	417
	-7	0 0				

(Los datos sombreados de celeste fueron utilizados para el conteo final de los microorganismos)

Se aplicó la siguiente fórmula para determinar los microorganismos totales: $\text{UFC/mL} = \text{mL sembrados} \times \text{inversa del factor de dilución}$.

Recuento de microorganismos finales

Recuento de Microorganismos en los distintos agares (UFC)

Tiempo (días)	Sabouraud	MRS	GYC
0	410000	75000	587000
1	310000	79500	274500
2	1000000	16100000	1074000
3	1300000	374500	287500
4	5200000	460000	83450000

Logaritmo de los valores finales del recuento de microorganismos

LOG de las UFC

Tiempo (días)	Levaduras	BAL	BAA
0	5.612783857	4.875061263	5.768638101
1	5.491361694	4.900367129	5.438542349
2	6	7.206825876	6.031004281
3	6.113943352	5.573451822	5.458637849
4	6.716003344	5.662757832	7.921426341

Esta última tabla se utilizó para realizar la gráfica de la sucesión de microorganismos.

Tabla 4. Descripción macroscópica y microscópica de las levaduras encontradas

Tiempo de fermentación	Código	Color	Elevación	Borde	Forma	Apariencia	Forma de la célula	Reproducción	Aroma	Microorganismo
0	1	blanca	convexa	entero	circular	opaca	globosa grande	gemación multilateral	frutado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0	2	beige	convexa	entero	circular	opaca	globosa a elipsoidal grande	gemación multilateral	frutado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0	3	beige	convexa	ondulado	circular	opaca	forma de limón	gemación polar	frutado	<i>Kloeckera apiculata</i>
0	9	beige	convexa	entero	circular	opaca	elipsoidal pequeña	gemación multilateral	acetona	<i>Candida utilis</i>
0	12	blanca	convexa	entero	circular	brillante	elipsoidal pequeña	Gemación polar	frutado	<i>Candida tropicalis</i>
1	24	beige	convexa	ondulado	circular	opaca	forma de limón	gemación polar	frutado	<i>Kloeckera apiculata</i>
2	25	blanca	convexa	entero	circular	opaca	globosa a elipsoidal grande	gemación multilateral	frutado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	46	beige	convexa	entero	circular	opaca	elipsoidal y pseudohifas	gemación multilateral	frutado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	69	blanca	convexa	entero	circular	opaca	globosa a elipsoidal grande	gemación multilateral	frutado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	70	beige	convexa	entero	circular	opaca	globosa grande	gemación multilateral	frutado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	83	blanca	convexa	ondulado	irregular	opaca, seca, rugosa	Alargada	gemación polar	frutado	<i>Candida boidinii</i>

Tabla 5. Pruebas bioquímicas adicionales para la confirmación de especies de levaduras

Temperatura de crecimiento							
37 °C	45 °C	Urea	Tiamina	Manitol	Tubo germinativo	Crecimiento en medio TTC	Microorganismo
+	-	-	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
+	-	-	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
-	-	-	+	-	-	-	<i>Kloeckera apiculata</i>
+	-	-		+	-	-	<i>Candida utilis</i>
+	-	-	+	-	-	Colonias color vino oscuro	<i>Candida tropicalis</i>
-	-	-	+	-	-	-	<i>Kloeckera apiculata</i>
+	-	-	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
+	-	-	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
+	-	-	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
+	-	-	+	-	-	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
-	-	-	-	+	-	-	<i>Candida boidinii</i>

ANEXO V
FOTOGRAFÍAS

Figura 1. Características geográficas de Echarati



Figura 2. Características del fruto del cacao Chuncho



Figura 3. Características del cacao Chuncho del cultivar “Cáscara de Huevo”



Figura 4. A. Recolección del cacao. B. Quiebre de la mazorca. C. Extracción del grano del cacao



Figura 5. Preparación de la caja de madera para el proceso de fermentación. A. Recubrimiento con hojas de plátano. B. Vaciado de granos de cacao en la caja de madera C. Recubrimiento con talegas



ANEXO VI

CERTIFICADO DE VARIEDAD DE CACAO CHUNCHO CULTIVAR “CÁSCARA DE HUEVO”

Quillabamba, 20 de noviembre de 2017

Certificado de recolección de cacao “Chucho” del Cusco de la variedad “Cáscara de Huevo”

Yo, Carlos Rodríguez, Ingeniero Agrónomo Tropical, certifico que los frutos recolectados de cacao fueron de la variedad Chuncho del Cusco del cultivar “Cáscara de Huevo” identificados morfológicamente según la tabla proporcionada a continuación. Dichos frutos fueron utilizados para el proceso de fermentación para la elaboración de la tesis titulada “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE *THEOBROMA CACAO* L. DE LA VARIEDAD “CHUNCHO” OBTENIDA EN CUZCO, PERÚ” realizada por la Bachiller Gabriela Salazar Alvarez.

Tamaño de Fruto:	Intermedio
Grosor de Cáscara:	Delgada
Tamaño de Almendras:	Pequeño
Forma básica de Fruto:	Oblongo
Constricción basal de Fruto:	Ausente
Forma del ápice del Fruto:	Obtuso
Rugosidad del Fruto:	Intermedio
Profundidad del surco del Fruto:	Intermedio
Color del Fruto inmaduro:	Verde
Forma longitudinal de la Semilla:	Oblonga
Forma transversal de la Semilla:	Intermedia
Color de Cotiledones:	Morado



Carlos Armando Rodríguez Callanauca
Ing° Agronomo Tropical
CIP: 58332