



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN MODULADA POR
CULTIVOS INICIADORES EN GRANOS DE CACAO EN LA
ACTIVIDAD DE POLIFENOL OXIDASA Y VARIABLES
FISICOQUÍMICAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

PRESENTA:

ING. JESSICA ALARCÓN NARVÁEZ

DIRECTOR

DR. PEDRO GARCÍA ALAMILLA

CODIRECTOR

DR. VÍCTOR JOSÉ ROBLES OLVERA

VILLAHERMOSA TABASCO

MAYO, 2021



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



JEFATURA DE POSGRADO

Villahermosa, Tabasco a 23 de abril de 2021

Of. No. 078/JP/2021

Asunto: Autorización de impresión de Tesis

C. JESSICA ALARCÓN NAVÁEZ

EGRESADA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

PRESENTE

Por medio de la presente y de acuerdo con su solicitud de autorización de impresión de su trabajo bajo la modalidad de tesis, le informo que sobre la base del Artículo 26 del reglamento de estudios de Posgrado de esta Universidad, y atendiendo a las indicaciones de su Comité Sinodal, esta Dirección a mi cargo, le **autoriza la impresión** de su tesis titulada: **"Efecto de la fermentación Modulada por Cultivos Iniciadores en Granos de cacao en la Actividad de Polifenol Oxidasa y Variables Fisicoquímicas"**, en virtud de que reúne los requisitos establecidos para el realizar su defensa de Examen Profesional para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agroalimentarias.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

Ph.D. ROBERTO ANTONIO CANTÚ GARZA
DIRECTOR

c.c.p. M.C.E Miguel Hernández Hernández – Jefe de Posgrado-DACA
RACG'mhh

www.ujat.mx

CARTA DE CEDE DE DERECHOS

La que suscribe, Jessica Alarcón Narváez del programa de estudios de posgrado de la Maestría en Ciencias Agroalimentarias, con número de matrícula 182C26001, adscrito a la División Académica de Ciencias Agropecuarias, manifiesto ser autora intelectual y titular de los Derechos de Autor del presente Trabajo de Tesis denominado “Efecto de la fermentación Modulada Por Cultivos Iniciadores en Granos de Cacao en la Actividad de Polifenol Oxidasa y Variables Físicoquímicas”, y autorizo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice el presente trabajo con fines Académicos y de Investigación ya sea de forma física o digital para su difusión y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la Tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la Ciudad de Villahermosa, Tabasco; a los 29 días del mes de Abril del año 2021.

ATENTAMENTE



Jessica Alarcón Narváez
MATRICULA: 182C26001

RECONOCIMIENTO A LAS INSTITUCIONES PARTICIPANTES EN LA INVESTIGACIÓN

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca académica otorgada, al financiamiento por parte del Consejo Regulador del Cacao a través del Fomix-Conacyt del proyecto: “Impulso de la Competitividad del Ecosistema Cacao-Chocolate del Estado de Tabasco mediante el Fortalecimiento de sus Capacidades Científicas, Tecnológicas y de Innovación” con clave TAB-2018-01-01-84312, al Laboratorio de Ingeniería de Procesos de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la UJAT por las facilidades otorgadas para el estudio y al Laboratorio del Centro Mexicano para la producción más limpia, Unidad Tabasco. IPN.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque Él es el dador de la vida y de todo conocimiento.

A mis padres por ser unos padres excepcionales y ejemplares. Por su amor, cariño y por todo el apoyo incondicional que me han brindado en todo momento.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por haberme aceptado como estudiante de maestría y ser parte de ésta institución.

A mi director de tesis, el Dr. Pedro García Alamilla por su dedicación, atención y orientación en este trabajo. Por compartir sus conocimientos y experiencias en el área y por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis.

Al Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha por su generosidad al brindarme su experiencia en el área, apoyo y atención en este trabajo.

A mi codirector de tesis, el Dr Víctor José Robles Olvera por su orientación en este trabajo y atención en mi estancia realizada en el laboratorio de Enzimología de la UNIDA del Instituto Tecnológico de Veracruz.

A todos los profesores de la maestría, agradezco de todo corazón todas las enseñanzas y conocimientos brindados. De todos me llevo algo muy especial.

A mis compañeros del Laboratorio de Ingeniería de Procesos de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la UJAT, por sus enseñanzas y apoyo.

A mis compañeros de maestría de diversas generaciones que también compartieron de sus conocimientos y experiencia.

Y finalmente gracias a mi hermosa familia y amigos por su comprensión, que durante ésta trayectoria han estado conmigo, por sus atenciones y cariño. Los amo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades del cacao	2
2.2 Cosecha y Poscosecha	3
2.2.1 Fermentación.....	4
2.2.2 Métodos de fermentación.....	5
2.2.3 Secado.....	6
2.3 Cultivos iniciadores	7
2.4 Compuestos fenólicos.....	8
2.5 Cinética enzimática.....	16
2.6 Actividad enzimática	18
2.6.1 Polifenol Oxidasa (PFO)	18
2.6.2 Factores de la Polifenol Oxidasa (PFO)	20
2.6.3 Polifenol Oxidasas en granos de cacao.....	21
2.7 Pruebas de calidad fisicoquímica del grano de cacao.....	31
2.7.1 pH.....	31
2.7.2 Acidez.....	32
2.7.3 Índice de fermentación.....	35
2.7.4 Temperatura.....	35
2.7.5 Prueba de corte.....	37
3. PLANTEAMIENTO, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	39

3.1 PLANTEAMIENTO	39
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	40
3.3 OBJETIVOS.....	41
3.3.1 Objetivo general.....	41
3.3.2 Objetivos específicos.....	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
4.1 Área de estudio	42
4.2 Fermentación dirigida con un cultivo iniciador.....	42
4.3 Colección de muestras	43
4.4 Registro de la temperatura.....	43
4.5 Secado.....	44
4.6 Procedimiento para el análisis de la PFO.....	44
4.6.1 Obtención del extracto crudo para la cuantificación de PFO del grano de cacao....	44
4.6.2 Determinación de proteína.....	44
4.6.3 Determinación de la cantidad de sustrato a utilizar para la actividad de la PFO.....	44
4.6.4 Determinación de la actividad de la PFO extraída.....	45
4.7 Determinaciones de variables fisicoquímicas.....	45
4.7.1 pH del cotiledón.....	45
4.7.2 Acidez total expresada a través de la acidez libre.....	46
4.7.3 Humedad del cotiledón.....	46
4.7.4 Determinación del contenido fenólico total.....	46
4.7.5 Índice de fermentación.....	47
4.8 Prueba de corte	47
4.9 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier	48
5. RESULTADO Y DISCUSIÓN	49
5.1 Actividad de la Polifenol Oxidasa	49
5.1.1 Determinación de la cantidad de sustrato a utilizar para la actividad de la PFO.....	49

5.1.2 Actividad enzimática de la PFO durante la fermentación y secado.....	50
5.1.3 Comportamiento del contenido de proteína durante la fermentación y secado.....	53
5.2 Cambios en las variables fisicoquímicas	54
5.2.1 Compuestos fenólicos totales durante la fermentación y el secado.....	54
5.2.2 Variación del pH durante la fermentación y el secado.....	57
5.2.3 Acidez total durante la fermentación y el secado de cacao.....	59
5.3 Análisis de componentes principales.....	60
5.4 Pruebas de calidad	71
5.4.1 Índice de fermentación.....	71
5.4.2 Prueba de corte.....	71
5.5 Dinámica de la temperatura durante la fermentación de cacao	73
5.6 Caracterización por Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier en muestras secas finales.	76
5.6.1 Cambios espectrales en la grasa de cacao.....	76
5.6.2 Cambios espectrales en polvo de cotiledón desgrasado.....	78
5.6.3 Cambios espectrales en polvo de cotiledón fermentado y seco.....	80
6. CONCLUSIONES.....	85
7. LITERATURA CIENTÍFICA CITADA.....	86
8. ANEXOS.....	102
Anexo A. Ficha de envío del artículo	102
Anexo B. Acervo fotográfico de la fermentación y secado de cacao.....	103
Anexo C. Acervo fotográfico de análisis experimental.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Principales clases de compuestos polifenólicos	9
Tabla 2.2 Contenido fenólico total en función del tipo de cacao y origen geográfico	12
Tabla 2.3 Purificación parcial de la PFO en granos de cacao	24
Tabla 2.4 Contenido polifenólico de granos morados y granos marrones	24
Tabla 2.5 Efecto de la fermentación en pilas sobre las actividades enzimáticas en los granos de cacao ICS-95.....	25
Tabla 2.6 Efecto del secado sobre las actividades enzimáticas en granos de cacao fermentados de 1 día.....	26
Tabla 2.7 Contenido total de fenoles (mg de ácido tánico/g de muestra) en semillas de cacao después del tratamiento con PFO, aire y agua.....	27
Tabla 2.8 Contenido total de taninos (mg de ácido tánico/ g de muestra) en semillas de cacao después del tratamiento con PFO	27
Tabla 2.9 Actividad de la PFO de granos de cacao secos (n=4)	28
Tabla 2.10 Variación de pH y acidez durante la fermentación	33
Tabla 2.11 Variación de pH y acidez de diferentes variedades.....	34
Tabla 2.12 Índice de fermentación en función de origen y variedad.....	35
Tabla 4.1 Combinación de consorcios y muestra testigo	43
Tabla 5.1 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento uno (T1) durante la fermentación.....	61
Tabla 5.2 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento dos (T2) durante la fermentación.	62
Tabla 5.3 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento tres (T3) durante la fermentación.	63

Tabla 5.4 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento cuatro (T4) durante la fermentación.	64
Tabla 5.5 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento uno (T1) durante el secado.	65
Tabla 5.6 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento dos (T2) durante el secado.	66
Tabla 5.7 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento tres (T3) durante el secado.	67
Tabla 5.8 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento cuatro (T4) durante el secado.	68
Tabla 5.9 Área total bajo la curva de temperatura durante el proceso de fermentación de los diferentes tratamientos.	76
Tabla 5.10 Asignación de modo vibracional y atribución a la frecuencia de muestras de grasa de cacao obtenidas durante la fermentación inoculada.....	81
Tabla 5.11 Asignación de modo vibracional y atribución a la frecuencia de muestras de cotiledón de cacao desgrasado obtenidas durante la fermentación inoculada.....	82
Tabla 5.12 Asignación de modo vibracional y atribución a la frecuencia de muestras de cotiledón de cacao fermentado y seco obtenidas durante la fermentación inoculada	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura básica de los flavonoides y flavanoles	9
Figura 2.2 Estructuras químicas de los principales flavanoles presentes en el cacao	10
Figura 2.3 Gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten	18
Figura 2.4 Esquemización de pardeamiento enzimático por la PFO	19
Figura 2.5 Evolución de la actividad PFO de los cotiledones y el embrión durante la fermentación	22
Figura 2.6 Evolución de la actividad peroxidasa de los cotiledones y el embrión durante la fermentación	22
Figura 2.7 Evolución de la actividad peroxidasa en función del pH (tiempo de incubación: 10 min	23
Figura 2.8 Actividad de la PFO en función de la concentración de sustrato (catecol) (0.05 a 0.4M).	30
Figura 2.9 Dependencia del pH de la PFO. (a) Cultivar PH 16; (b) Cultivar TSH 1188	30
Figura 2.10 Efecto de la temperatura sobre la actividad PFO. (a) Cultivar PH 16; (b) Cultivar TSH 1188.....	31
Figura 5.1 Cambio de la absorbancia a diferentes concentraciones de sustrato, a una cantidad fija de proteína.	50
Figura 5.2 Cinética de Michaelis-Menten de la actividad PFO en extractos crudos de cacao. .	50
Figura 5.3 Linearización de Lineweaver-Burk de la actividad de la PFO	50
Figura 5.4 Actividad de la PFO por mg de proteína durante la fermentación y secado de cacao	53
Figura 5.5 Actividad de la PFO en base seca durante la fermentación y secado de cacao	53
Figura 5.6 Contenido de proteína (mg) durante la fermentación y secado de cacao	54

Figura 5.7 Variación del contenido de compuestos fenólicos totales durante la fermentación de granos de cacao.....	56
Figura 5.8 Variación del contenido de compuestos fenólicos totales durante el secado de granos de cacao.....	56
Figura 5.9 Variación de pH durante la fermentación de granos de cacao de los diferentes tratamientos.....	57
Figura 5.10 Variación de pH durante el secado de granos de cacao de los diferentes tratamientos.....	58
Figura 5.11 Variación de acidez durante la fermentación de granos de cacao de los diferentes tratamientos.....	59
Figura 5.12 Variación de acidez durante el secado de granos de cacao de los diferentes tratamientos.....	60
Figura 5.13 Gráficos de puntuaciones y cargas de los tratamientos T1(A), T2(B), T3(C) y T4(D) en fermentación.....	69
Figura 5.14 Gráficos de puntuaciones y cargas de los tratamientos T1(A), T2(B), T3(C) y T4(D) en secado.....	70
Figura 5.15 Índice de fermentación en granos de cacao secos	71
Figura 5.16 Porcentaje de la prueba de corte.....	73
Figura 5.17 Cambio de temperatura como efecto de la fermentación modulada de los tratamientos T1(A), T2 (B), T3 (C) y T4(D).	75
Figura 5.18 Espectro FT IR de la grasa de cacao fermentados y secos.....	77
Figura 5.19 Espectro FT IR del polvo del cotiledón desgrasado.....	79
Figura 5.20 Espectro FT IR del cotiledón fermentado y seco	80

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la fermentación modulada con cultivos iniciadores en granos de cacao sobre la actividad de Polifenol Oxidasa (PFO) y variables fisicoquímicas. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos, tres fermentaciones dirigidas a través de cultivos iniciadores y un testigo (fermentación endógena) con cacaos trinitarios de Teapa, Tabasco. Se llevó a cabo la determinación de la actividad de la PFO, variables fisicoquímicas y pruebas de calidad (prueba de corte e índice de fermentación). Se aplicó espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier a cotiledón de cacao fermentado y seco, cotiledón desgrasado y grasa de cacao al final del secado. Se aplicó un análisis de componentes principales (ACP), las variables evaluadas fueron: Unidad de actividad/mg proteína ($U \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$), Unidad de actividad/g ($U \cdot g^{-1}$), mg proteína, humedad, acidez, pH y compuestos fenólicos totales. Las variables que aportaron positivamente y negativamente a la variabilidad fue distinta para cada uno de los tratamientos, sin embargo las variables que aportaron positivamente en todos los tratamientos durante la fermentación fueron: $U \cdot g^{-1}$, mg proteína y pH, para el secado las variables fueron: $U \cdot mg \text{ de proteína}^{-1}$, $U \cdot g^{-1}$ y acidez. Las cinéticas mostraron que las fermentaciones con cultivos iniciadores tuvieron efecto sobre la PFO, las variables fisicoquímicas, temperatura y en las pruebas de calidad, en algunos casos positivamente en comparación al testigo. En la prueba de corte, mediante fermentación dirigida se obtuvieron porcentajes mayores a 80% e índice de fermentación con valores de 1, en comparación a la fermentación testigo, lo que indica granos de cacao bien fermentados. La técnica por espectroscopía de FT IR permitió caracterizar señales asociadas en lípidos en la grasa de cacao. Se encontró en cotiledón fermentado y seco señales asociadas a proteínas y compuestos fenólicos, además de cotiledón desgrasado con más de 20 picos identificados en las regiones de vibración, doble enlace y huella dactilar. La PFO se mantuvo activa durante la fermentación y secado de cacao en todos los tratamientos, presentando la mayor actividad a las 81 h de secado. Este estudio establece las bases para subsecuentes investigaciones enzimáticas y la mejora de los procesos de fermentación y secado.

Palabras claves: cacao, fermentación, inóculos, actividad enzimática, indicadores de calidad, espectros infrarrojos.

ABSTRACT

In the present study, the effect of modulated fermentation with starter cultures in cocoa beans on Polyphenol Oxidase (PPO) activity and physicochemical variables was evaluated. Four treatments were carried out, three fermentation directed through starter cultures and a control (endogenous fermentation) with Trinitario cocoa beans from Teapa, Tabasco. The determination of the PFO activity, physicochemical variables and quality tests (cut test and fermentation index) were carried out. Fourier transform infrared spectroscopy (FT IR) was applied to fermented and dry cocoa cotyledon, defatted cotyledon and cocoa fat at the end of drying. A principal components analysis (PCA) was applied, the variables evaluated were: Activity unit/mg protein ($\text{U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$), Activity unit/g ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$), mg protein, moisture, acidity, pH and total phenolics content. The variables that contributed positively and negatively to the variability were different for each of the treatments, however the variables that contributed positively in all the treatments during fermentation were: $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, mg protein and pH, for drying the variables were: $\text{U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$, $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ and acidity. The kinetics showed that the fermentations with starter cultures had an effect on PPO, the physicochemical variables, temperature and on the quality tests, in some cases positively compared to the control. In the cut test, through directed fermentation percentages greater than 80% and fermentation index were obtained with values of one, compared to the control fermentation, which indicates well-fermented cocoa beans. The FT IR spectroscopy technique made it possible to characterize associated signals in lipids in cocoa fat. Signals associated with proteins and phenolic compounds were found in fermented and dry cotyledon, as well as defatted cotyledon with more than 20 peaks identified in the vibration, double bond and fingerprint regions. The PPO remained active during the fermentation and drying of cocoa in all treatments, the highest activity was presented at 81 h of drying. This study establishes the bases for subsequent enzymatic investigations and the improvement of the fermentation and drying processes.

Key words: Cocoa, fermentation, inoculum, enzymatic activity, quality indicators, infrared spectra.

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol que se ha distinguido a nivel mundial debido a que es la principal materia prima para la producción de chocolate (Kongor *et al.*, 2016; Chetschik *et al.*, 2017). Sin embargo, sus aplicaciones se extienden a la industria alimentaria, de bebidas, farmacéutica y cosmética (Schwan y Wheals, 2004; Waizel-Haiat *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2015;). Es originario de América y se cultiva en todos los países que disponen de climas cálidos y lluviosos entre 20° N y 20° S del ecuador con un cultivo máximo entre 10°N y 10° S, se cultiva desde el nivel del mar y hasta los 1200 msnm (Enríquez, 1985; Bhattacharjee y Kumar, 2007).

Para obtener indicadores y atributos de calidad de los granos de cacao, principalmente para la producción de chocolate, se requiere la combinación de factores del proceso que incluyan: el tipo de material de siembra, las prácticas agrícolas y el manejo poscosecha (Lima *et al.*, 2011). En el procesamiento, la fermentación es muy importante debido a la formación de los precursores del sabor y aroma, que se originan por la acción de microorganismos en la pulpa de cacao y de las enzimas en el cotiledón (Cruz *et al.*, 2015; Peláez *et al.*, 2016). Los granos de cacao que no se fermentan poseen poco desarrollo de las características del aroma y resultarán con una intensidad elevada de amargura y astringencia (García-Alamilla *et al.*, 2007). Por otra parte, investigadores han propuesto la posibilidad de reemplazar la fermentación natural del cacao, desarrollando cultivos iniciadores para un mejor manejo que homogenicen el proceso de fermentación de cacao y la influencia de éstos sobre la actividad enzimática con el fin de mejorar los atributos e indicadores de calidad física, química y sensorial del cacao fermentado (Schwan, 1998; Batista *et al.*, 2015). Diversos estudios han demostrado que las enzimas tienen un papel muy importante para la producción y formación de los precursores de sabor y degradación de pigmentos durante la fermentación del cacao (Camu *et al.*, 2008; Sousa, *et al.*, 2016). Los estudios indican la acción de diversas enzimas en el cotiledón del cacao, como proteasas, glucosidasas y polifenol oxidasas y, que una adecuada combinación de las enzimas es un factor clave para la producción de precursores del sabor del cacao, lo que contribuye a una mejor aceptación de los productos de cacao (Hansen *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2004). Las polifenol oxidasas (PFOs) son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de varios fenoles a o-

quinonas. Estas quinonas conducen a la formación de polímeros marrones, conocido como pardeamiento enzimático que afecta negativamente el color, sabor, las propiedades nutricionales y la vida útil de los alimentos (Jukanti, 2017; de Oliveira Carvalho y Orlanda 2017; Loh *et al.*, 2018). En la elaboración de chocolate, la PFO es un factor clave para el desarrollo de los precursores de sabor, iniciando en la fase oxidativa de la fermentación hasta la etapa de secado (Yoshiyama e Ito, 1996). Este proceso puede dar lugar a cambios en las características sensoriales, como el sabor y el color (Macedo *et al.*, 2016).

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la fermentación modulada con cultivos iniciadores en granos de cacao sobre la actividad de polifenol oxidasa y variables fisicoquímicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cacao

El cacao es una planta que se clasifica en el género *Theobroma*, de la familia Malvaceae, que incluye veintidós especies que se encuentran principalmente en América del Sur y Central (García-Alamilla *et al.*, 2012; Kongor *et al.*, 2016). Se ha distinguido a nivel mundial debido a que es la principal materia prima para la producción de chocolate (Menezes *et al.*, 2016; Do Carmo Brito *et al.*, 2017; Chetschik *et al.*, 2017). Es un cultivo comercial muy importante en el oeste de África, América Latina y el sudeste asiático (Naoki *et al.*, 2017). Actualmente África proporciona el 70% de la producción mundial, siendo Costa de Marfil y Ghana los principales productores, seguido de Nigeria y Camerún (Wessel y Quist-Wassel, 2015; Kongor *et al.*, 2016). El 80% del cacao es cultivado por pequeños agricultores y a veces se cultiva como un componente de agroecosistemas, proporcionando economía como beneficios ecológicos, como hábitat, conservación del agua, suelo, estabilización y carbono (Bhattacharjee y Kumar, 2007; Wessel y Quist-Wassel, 2015; Naoki *et al.*, 2017).

En la actualidad se comercializan tres tipos de cacao: el criollo, el forastero y el trinitario (Afoawka *et al.*, 2008; Castro-Alayo *et al.*, 2019). El cacao criollo comprende árboles delgados y por lo tanto frágiles; produce mazorcas finas y suave sabor aromático con una pigmentación rojiza. Normalmente se desarrolla en Venezuela, México, Nicaragua, Guatemala y Colombia (Rangel-Fajardo *et al.*, 2012; Aprotosoai *et al.*, 2016; Santander Muñoz *et al.*, 2020). El

forastero presenta poblaciones con diferentes orígenes, la mayor parte del Amazonas (Motamayor *et al.*, 2002). Se caracteriza por tener una mazorca fuerte y resistente, por su fruto verde, semillas redondas y ligeramente aplanadas. Es el más cultivado y el que mayor predomina en la producción de cacao en el mundo (Cruz *et al.*, 2015). Presenta un sabor a chocolate básico y se clasifica como cacao a granel, básico u ordinario (Aprotosoie *et al.*, 2016). El trinitario es un grupo híbrido del cruce entre criollos y forasteros (Motamayor *et al.*, 2002; Santander Muñoz *et al.*, 2020) surgió para hacerlo resistente a enfermedades y más fácil de cultivar (Aprotosoie *et al.*, 2016). Las plantas son robustas con frutos verdes y con semillas violetas y abarca del 10-15% de la producción mundial de cacao (Dostert *et al.*, 2012).

La Organización Internacional del Cacao (ICCO) por sus siglas en inglés, el mercado internacional clasifica los granos de cacao en dos formas: el cacao “ordinario” o “a granel” y el cacao fino o de aroma. El cacao ordinario son los granos producidos por el cultivo forastero, son utilizados en la fabricación de manteca de cacao y productos que tienen una elevada proporción de chocolate. El cacao fino o de aroma proviene del cacao criollo y trinitario, son de alta calidad, con características específicas del aroma o color en chocolate finos de revestimientos o capas de cobertura, también se usa para producir cacao en polvo empleados para aromas y preparación de algunos alimentos o bebidas (Quintero y Díaz, 2004; Gutiérrez, 2017).

2.2 Cosecha y Poscosecha

La cosecha del cacao se lleva a cabo en el período de septiembre a marzo, las mazorcas se cortan cuando ya están maduras reconociéndose por el color de la cáscara, los frutos deben pasar de color verde a amarillo y de rojo a naranja según la variedad. Las mazorcas se deben cortar cuidadosamente con cuchilo, navaja o tijeras de podar, evitando dañar el fruto o en su caso el tronco. Una vez cosechados se agrupan dependiendo de su estado de madurez, enfermas o dañadas, para proceder a la quiebra, no dejando pasar más de tres días para sacar los granos para evitar pérdidas por la maduración excesiva de las mazorcas. Si las semillas germinan dentro de las mazorcas, se afecta la calidad y por tanto su valor económico (Batista, 2009; Arvelo *et al.*, 2016; Gutierrez, 2017).

El manejo poscosecha de los granos de cacao incluye las etapas de recolección, apertura, fermentación, secado, selección y almacenamiento. De las cuales, la fermentación y el secado

son los principales procesos que determinan la calidad del producto en el mercado (García-Alamilla *et al.*, 2007; Sandhya *et al.*, 2016).

2.2.1 Fermentación

Las mazorcas de cacao una vez que se encuentran en su estado de madurez fisiológica son cosechadas y se cortan por la mitad extrayéndose los granos. Los granos con la pulpa o mucílago adheridos se colocan sobre hojas de plátano o cajones de madera donde se dejan durante 2 a 8 días de acuerdo al tipo de cultivar para llevar a cabo la fermentación. Durante la fermentación el cacao es removido (o volteado) de una caja hacia otra con la finalidad de proporcionar oxígeno (Schwan y Wheals, 2004; Cruz *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017; Magalhães *et al.*, 2017; Castro-Alayo *et al.*, 2019). Este paso es importante porque surgen los precursores del sabor y aroma, como función de la acción de microorganismos en la pulpa de cacao y de las enzimas en el cotiledón (Cruz *et al.*, 2015; Peláez *et al.*, 2016; Utami *et al.*, 2016). Por otra parte, los granos de cacao que no se fermentan poseen poco desarrollo de las características del aroma y resultarían con una intensidad de amargor y astringencia (García-Alamilla *et al.*, 2007).

La composición del mucílago que es la parte que cubre la semilla (pulpa) tiene un alto contenido de agua (82 a 87%), azúcar (10 a 15%), pentosanos (2 a 3%), 1 a 3 % de ácido cítrico y sales 8-10 %. Mientras que el cotiledón tiene 32-39% de agua, celulosa 2 a 3%, almidón 4-6%, pentosanos 4-6%, sacarosa 2-3%, grasa 30-32%, proteínas 8-10%, teobromina 2-3%, cafeína 1%, ácidos 1% y polifenoles 6% (Lecumberri *et al.*, 2006; Hii *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2011; Ganda-Putra *et al.*, 2019; Rawel *et al.*, 2019). Estos compuestos serán modificados durante el proceso de fermentación mediante actividad microbiana en el mucílago y enzimática en el cotiledón (Schwan y Wheals, 2004).

En la práctica, el método de fermentación varía de un lugar a otro, ya que está influenciado por diversos factores, desde el manejo agronómico, la variedad del cacao, las condiciones climáticas, la recolección, almacenamiento del fruto, apertura del fruto, tipo de fermentador, mezclado y duración de la fermentación. Comúnmente el final de la fermentación está determinado por estos factores involucrados en la cosecha y poscosecha del cacao (Romero-Cortes *et al.*, 2013).

La fermentación de los granos de cacao es un proceso natural, debido a la actividad microbiana de microorganismos, principalmente bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias ácido

acéticas (BAA) y levaduras (Batista *et al.*, 2015). Las BAL se producen en la primera fase del proceso de fermentación en cantidades grandes, generando metabolitos como ácidos orgánicos (láctico y acético), dióxido de carbono, etanol, manitol y glicerol. También producen compuestos volátiles. Las BAA están presentes en las etapas posteriores de la fermentación, éstas oxidan el etanol producido por las levaduras, produciendo ácido acético que se difunde en el sabor de cacao. A la vez, existe el aumento de la temperatura generada durante la producción exotérmica de ácido acético, además, este ácido se difunde al interior del cotiledón de cacao y contribuye a la ruptura de las células causando la muerte del embrión de la semilla. En consecuencia, se liberan enzimas endógenas involucradas en la degradación de los pigmentos y la producción de precursores de sabor y color característicos de los granos de cacao completamente fermentados (Sandhya *et al.*, 2016; Meersman *et al.*, 2016). Las levaduras dominan la fermentación durante las primeras 24 h. De acuerdo a Schwam (1998) las funciones más importantes de las levaduras son: 1) la descomposición del ácido cítrico en la pulpa, lo que lleva a un aumento en el pH de 3.5 a 4.2, lo que permite el crecimiento de bacterias; 2) producción de etanol en condiciones de bajo contenido de oxígeno y alto contenido de azúcar, que eventualmente se consume oxidativamente; 3) producción de ácidos orgánicos (oxálico, fosfórico, succínico, málico y acético), que permeabilizan y destruyen los cotiledones del grano; 4) producción de algunos compuestos orgánicos volátiles que pueden contribuir al sabor del chocolate o, más probablemente, a los precursores del sabor del chocolate; y 5) secreción de pectinasas que reducen la viscosidad de la pulpa, permitiendo la aireación de la masa de la pulpa.

2.2.2 Métodos de fermentación

Existen diversos métodos de fermentación, cada uno se emplea con mayor o menor frecuencia dependiendo del país, área, agricultor o productor (Saltini *et al.*, 2013; Romero-Cortes *et al.*, 2013). Dentro de los más usados se encuentra el método por cajas, bandejas, montones y cestas (Senayake, 1997; Lagunes-Galvéz *et al.*, 2007; Portillo *et al.*, 2009; Romero-Cortes *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2015; Do Carmo *et al.*, 2017). Las cajas de madera pueden ser de diferentes capacidades, dependiendo de los granos de cacao a fermentar, pueden tener una profundidad de al menos 1 m, sin embargo, algunas más pequeñas de 25 a 50 cm. Deben de tener orificios o ranuras de salida para proporcionar ventilación y para que los fluidos drenen (Gutiérrez, 2017).

Por lo general este método se usa con frecuencia en plantaciones más grandes, aunque diversos autores mencionan que esta técnica tiene menor calidad que el de montón debido a que afecta significativamente el valor de pH (alto), el contenido de taninos, azúcares y también por presentar granos defectuosos (Saltini *et al.*, 2013; Aprotosoai *et al.*, 2016). El método del montón, consiste en amontonar los granos de cacao sobre hojas de plátano, cubrirlos con hojas o lonas. Es fácil de realizar y de mínimo costo, ofrece una mejor calidad que el de caja debido a que se realiza una fermentación más uniforme (Aprotosoai *et al.*, 2016). De acuerdo a Gutiérrez (2017), ésta técnica se puede usar para fermentar granos de cacao en cantidades entre 25 y 2500 kg, aunque en pequeñas cantidades es más deseable ya que producen mejores sabores.

2.2.3 Secado

El proceso de secado es la etapa final durante la poscosecha (Barrientos *et al.*, 2019). El secado tiene como finalidad de reducir el contenido de humedad de 55-60% a 6-8% (Chang *et al.*, 2014; Gutierrez-Correa, 2012; Saltini *et al.*, 2013; Kongor *et al.*, 2016; Hernández-Hernández *et al.*, 2018; Barrientos *et al.*, 2019), debido a que valores más altos podrían conducir a crecimiento de hongos y los valores más bajos podrían disminuir la calidad sensorial y producir granos de cacao muy frágiles. A su vez el secado ayuda para reducir el contenido de ácidos volátiles y detener las reacciones no deseadas de oxidación de polifenoles (García-Alamilla *et al.*, 2007; Barrientos *et al.*, 2019). Durante este proceso, las reacciones de oxidación que comenzaron en la fermentación continúan produciendo reacciones que hacen que los polifenoles se degraden, el ácido acético se evapore, se formen pigmentos debido a la condensación de quinonas y está presente la síntesis de aldehídos. Por este motivo, para favorecer las reacciones que son responsables del sabor y el aroma, el proceso de secado debe realizarse lentamente, a una temperatura controlada y también verificando la humedad por día (Alean *et al.*, 2016).

Existen dos métodos de secado, el secado al sol y el secado artificial. El primer método consiste en poner los granos de cacao directamente en el suelo que puede ser en tablas o en plataformas. Los granos deben removerse constantemente para alcanzar un secado uniforme, esto evitará que no se peguen y se produzca el crecimiento de hongos. Este método puede verse afectado debido a las condiciones climáticas, por lo tanto, no es recomendable hacer el secado a sol en regiones en donde la cosecha coincida con lluvias frecuentes. Para estos casos, se utiliza

el método de secado artificial. De acuerdo a Aprotosoai *et al.*, (2016), el secado al sol es el más adecuado ya que le da un sabor al chocolate más acentuado y el secado artificial puede dar lugar a sabores desagradables, como notas ahumadas.

2.3 Cultivos iniciadores

En años recientes, investigadores han estudiado y propuesto la posibilidad de reemplazar la fermentación natural del cacao, desarrollando cultivos iniciadores para un mejor manejo del proceso con el fin de mejorar los atributos e indicadores de calidad física, química y sensorial del cacao fermentado (Schwan, 1998; Batista *et al.*, 2015). Los cultivos iniciadores son un conjunto de microorganismos utilizados para inocular, añadidos a un producto con el fin de iniciar una fermentación (Sandine, 1979), se han utilizado en mayor frecuencia para mejorar la consistencia y la eficiencia de las fermentaciones industriales, como es el caso de la industria de la biotecnología, alimentaria, vinícola, láctea y farmacéutica (Saltini *et al.*, 2013; Meersman *et al.*, 2016).

En un estudio realizado por Meersman *et al.* (2016) los resultados mostraron a través de un análisis sensorial diferencias significativas en los aromas de los chocolates producidos con diferentes cultivos iniciadores. También se demostró que el uso de un 10% de inóculo de consorcios iniciadores reguló la sucesión microbiana y el desarrollo de las características deseables de los granos de cacao forastero, reduciendo el tiempo de fermentación a 3 días, en comparación con los 7 días que normalmente se requiere en la fermentación natural (Sandhya *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, los principales microorganismos que intervienen en la fermentación del cacao son las levaduras, las bacterias lácticas y las bacterias acéticas; pero un hallazgo importante de diversos estudios, menciona que el éxito del cultivo iniciador depende en gran medida de las levaduras, ya que se ha demostrado que son indispensables en el desarrollo del sabor de chocolate a pesar de las altas temperaturas, mientras que las bacterias del ácido láctico desempeñan un papel mucho menor (Meersman *et al.*, 2016).

Algunos de los inóculos con cultivos iniciadores por levaduras son: *Saccharomyces cerevisiae* var. Checarieli, *Saccharomyces epidevisiae*, por bacterias de ácido láctico: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, y por bacterias de ácido acético: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxidans subsp suboxidans* y cepas como

Pichia Kluyveri, *Kluyveromyces marxianus*, *Cyb. Fabianil* (Schwan, 1998; Batista *et al.*, 2015; Meersman *et al.*, 2016; Sandhya *et al.*, 2016; Jhon *et al.*, 2019).

2.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se almacenan en las células pigmentadas del cotiledón y que desempeñan diversas funciones en la planta, como la regulación de su desarrollo, entre otras (Hernández-Hernández *et al.*, 2018). Son compuestos que poseen uno o más anillos aromáticos con uno o más grupo hidroxilo que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales, constituyendo uno de los grupos de sustancias más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras fenólicas (Dai y Mumper, 2010). En el cacao, los compuestos fenólicos son uno de los compuestos de mayor interés debido a su función como antioxidantes y constituyen alrededor de 15-20% de la composición química en granos de cacao sin fermentar (Wollgast y Anklam, 2000). Sin embargo, esta proporción puede variar significativamente entre los granos de cacao según las condiciones de procesamiento, el origen de los granos y debido a que los polifenoles representan a los compuestos químicos involucrados en la astringencia y en la amargura (Misnawi *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2011; Martín y Ramos, 2016).

Los polifenoles se pueden dividir en al menos 10 clases de acuerdo a su estructura química básica (Tabla 2.1). De esas 10 clases, los Flavonoides (Figura 2.1) son el grupo más grande y diverso de compuestos fenólicos que se encuentran en el grano de cacao y pueden subdividirse en 6 subclases diferentes, incluyendo flavonas, isoflavonas, flavanoles flavononas, flavon-3-ols, antocianinas (Bravo, 1998; Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

Tabla 2.1 Principales clases de compuestos polifenólicos

Clases	Esqueleto básico
Fenoles simples	C ₆
Benzoquinonas	C ₆
Ácidos Fenólicos	C ₆ -C ₁
Acetofenonas	C ₆ -C ₂
Ácidos Fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Cromonas	C ₆ -C ₃
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄
Chalconas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆

Fuente: Bravo, 1998.

Los compuestos más comunes en los granos de cacao son los flavanoles como epicatequina, catequina y procianidinas B2 y B1 (Figura 2.2) (Ribas-Agusti *et al.*, 2014; Martín y Ramos, 2016; Utami *et al.*, 2016; Do Carmo Brito *et al.*, 2017; Hernández-Hernández *et al.*, 2018). De acuerdo con diversos estudios la epicatequina es el compuesto que se encuentra en mayores cantidades en los granos de cacao, representa el 37% del contenido fenólico total (Wollgast y Anklam, 2000). Estos compuestos presentes en el cacao tienen un alto potencial antioxidante, pueden actuar como agentes contra las enfermedades crónicas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, neurodegenerativas y el envejecimiento (Ding *et al.*, 2006; Jalil e Ismail, 2008; Da Silva *et al.*, 2011, Gómez-Juaristi *et al.*, 2011; Quiñones *et al.*, 2012; Martín y Ramos, 2016).

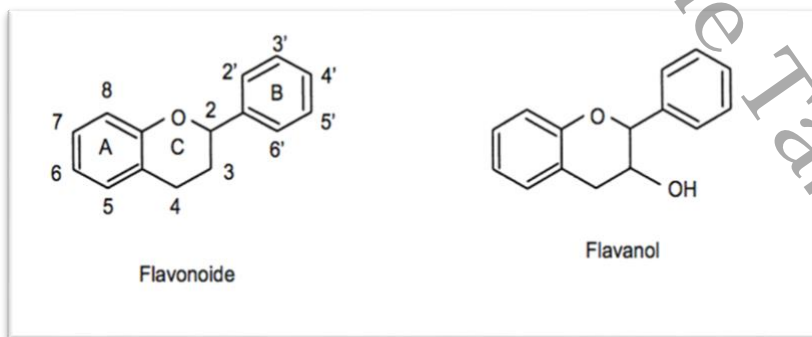


Figura 2.1 Estructura básica de los flavonoides y flavanoles

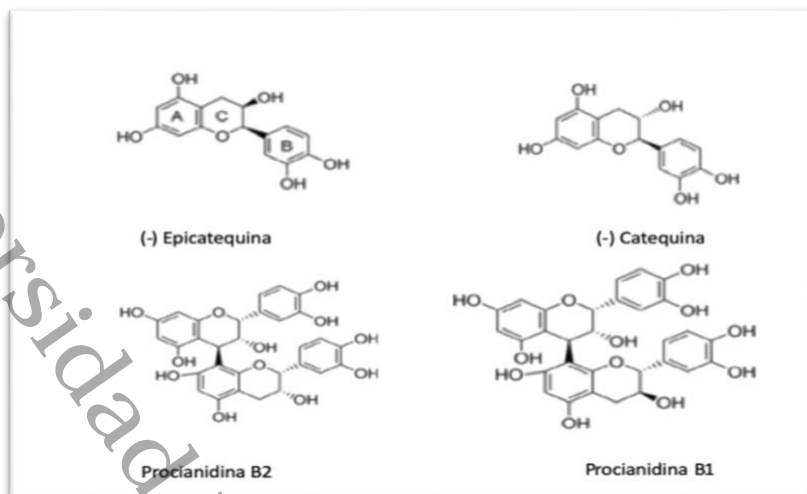


Figura 2.2 Estructuras químicas de los principales flavanoles presentes en el cacao (Martín y Ramos, 2016).

Durante el tratamiento poscosecha se presentan cambios bioquímicos que disminuyen el contenido de polifenoles, puede reducirse desde un 100% hasta el 10%, ya que durante el secado, las cantidades de polifenoles se reducen sustancialmente debido a la presencia de la enzima, polifenol oxidasa y por la polimerización de las quinonas (Misnawi *et al.*, 2003; Hernández-Hernández *et al.*, 2018). De acuerdo a Da Silva *et al.* (2011) desde 1930 se conoce el vínculo entre los compuestos fenólicos, su sabor amargo y la astringencia de los granos de cacao, estudios recientes han intentado mejorar el sabor del chocolate utilizando polifenol oxidasa para disminuir los compuestos fenólicos presentes en los granos.

Una revisión de la concentración de compuestos fenólicos totales en granos de cacao sin fermentar y fermentados se presentan en la tabla 2.2. La concentración en granos varía de acuerdo a la variedad, origen y método de fermentación. La concentración de CFT en granos de cacao no fermentados es de 116 mg GAE/g para híbridos amazónicos de costa de Marfil, de 86.6-139.4 mg EPC/g para clones de Camerún, 284 mg GAE/g para cultivo orgánico de Brasil, 274.41 mg GAE/g para cultivo convencional de Brasil, 108.76 g AT/g de granos tipo forastero de Brasil, 92.12 g GAE/g de granos de Tabasco, 18279 g GAE/100g mezcla de clones de Colombia y 98.56 g GAE/g de clon de Manabí, Ecuador. La concentración de CFT para granos de cacao fermentados (8 días) es de 40.1 mg GAE/g para híbridos amazónicos de Costa de Marfil, para clones de Camerún fermentados por dos días varía de 103-143.6 mg EPC/g, para híbrido forastero Brasil es de 53.26 mg CE/g fermentados siete días, 44.55 mg AT/g para granos forastero de Brasil fermentados siete días, para cultivo orgánico de Brasil 233.32 mg GAE/g y

cultivo convencional 221.82 mg GAE/g, en cultivos de Tabasco 73.6 mg GAE/g fermentados seis días, mezcla de clones de Colombia 1308.2 mg GAE/100g fermentados cinco días y medio. Para cultivos secados al sol es de 43.10 g AT/ g, 36.68 mg GAE/g para clon de Ecuador, para genotipos del INIFAP de Tabasco varían de 30.61 a 81.99 mg GAE/g. También se observa que se determinó la concentración de CFT en granos secos de cacao durante una fermentación dirigida con diferentes concentraciones de inóculo que varía de 24 a 34 mg ECE/g.

México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Tabla 2.2 Contenido fenólico total en función del tipo de cacao y origen geográfico

Origen	Variedad	Fermentación/ secado	CFT	Fuente
Costa de Marfil	Híbridos amazónicos	Fermentados (0)	116.6 mg GAE/ g	Cross <i>et al.</i> , 1982
		Fermentados (8 días)	40.1 mg GAE/g	
Camerún	Clones SNK 143	No fermentados	103.5 mg EPC/g	Niemenak <i>et al.</i> , 2006
		Fermentados (D1)	112.8 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	105.3 mg EPC/g	
	SNK 480	No fermentados	86.6. mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	119.8 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	116.2 mg EPC/g	
	T79/467	No fermentados	94.1 mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	112.1 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	126.6 mg EPC/g	
	IMC60	No fermentados	139.4 mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	139.6 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	141.6 mg EPC/g	
	ICS95	No fermentados	139.4 mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	135.7 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	143.6 mg EPC/g	
	UPA134	No fermentados	118.5 mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	113.2 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	107.9 mg EPC/g	
	ICSI	No fermentados	126.6 mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	116.0 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	103.0 mg EPC/g	
	UPA143	No fermentados	118.2 mg EPC/g	
		Fermentados (D1)	138.6 mg EPC/g	
		Fermentados (D2)	130.2 mg EPC/g	

Isla, Combu, Brasil	Híbrido Forastero	Fermentación (7 días)	53.26 ± 10.72 mg CE/g	Do Carmo Brito <i>et al.</i> , 2017
Costa de Marfil	Forastero	-	81.5 mg GAE/g	Hii <i>et al.</i> , 2009
Colombia	Amazónico	-	81.4 mg GAE/g	
Guinea Ecuatorial	Forastero Amazónico	-	72.4 mg GAE/g	
Ecuador	Híbrido Amazónico	-	84.2 mg GAE/g	
Venezuela	Trinitario	-	64.3 mg GAE/g	
Peru	Criollo	-	50.0 mg GAE/g	
Domina Republicana	Criollo	-	40.0 mg GAE/g	
Malasia	Desconocido	-	71.42 mg GAE/g	
Camerún	Desconocido	-	86.6 mg EPC/g	
Brasil	Forastero	Fermentación (D0)	108.76 g AT/g	Efraim <i>et al.</i> , 2010
		Fermentación (D3)	71.42 g AT/g	
		Fermentado (D7)	44.55 mg AT/g	
		Secado natural	43.10 g AT/g	
		Secado artificial	38.47 g AT/g	
Sur de Bahía, Brasil (Insituto Biodinámico)	Cultivo orgánico (Se desconoce variedad)	No fermentados	284 ± 3.22 mg GAE/g	Da silva olveira <i>et al.</i> , 2011
		Fermentados	233.32 ± 0.33 mg GAE/g	
	Cultivo convencional (Se desconoce variedad)	No fermentados	274.41 ± 5.22 mg GAE/g	
		Fermentados	221.82 ± 0.53 mg GAE/g	
Ecuador	Clon CCN-51	Secados	36.68 ± 2.08 mg GAE/g	Pallares <i>et al.</i> , 2016
India	Forastero	Secados		Sandhya <i>et al.</i> , 2016
		Fermentación natural	25.0 ± 0.8 mg ECE/g	
		Inóculo (10%)	34.0 ± 0.2	
		Inóculo (20%)	32.0 ± 0.3	
		Inóculo (30%)	32.5 ± 0.5	
		Inóculo (40%)	28.0 ± 0.2	
		Inóculo (50%)	28.0 ± 0.1	
		Inóculo (60%)	24.0 ± 0.8	

Huimanguillo, Tabasco, México	Genótipos del INIFAP			Hernández-Hernández <i>et al.</i> , 2018
	CAF	Secados	48.04 ± 2.63 mg GAE/g	
	CONA 1		30.61 ± 3.73 mg GAE/g	
	CONA 2		49.00 ± 1.68 mg GAE/g	
	CRC		30.49 ± 6.73 mg GAE/g	
	CRP		51.94 ± 7.43 mg GAE/g	
	INI1		39.08 ± 3.17 mg GAE/g	
	INI4		40.35 ± 1.82 mg GAE/g	
	INI9		39.99 ± 1.93 mg GAE/g	
	INI10		81.99 ± 5.03 mg GAE/g	
	INI813		58.39 ± 7.00 mg GAE/g	
	M001		45.64 ± 1.21 mg GAE/g	
	M002		56.46 ± 4.05 mg GAE/g	
	M003		33.08 ± 3.13 mg GAE/g	
	M008		41.28 ± 4.45 mg GAE/g	
	M022		47.28 ± 7.29 mg GAE/g	
	M024		51.47 ± 2.58 mg GAE/g	
	M025		43.59 ± 4.35 mg GAE/g	
	M026		49.91 ± 2.17 mg GAE/g	
	M028		39.29 ± 2.30 mg GAE/g	
	M029		55.69 ± 2.47 mg GAE/g	
	M031		84.95 ± 4.82 mg GAE/g	
	M032		71.66 ± 4.16 mg GAE/g	
	M033		58.65 ± 7.20 mg GAE/g	
	RIM 44		70.72 ± 9.97 mg GAE/g	
	RIM 88		46.40 ± 9.55 mg GAE/g	
	RIM 105		43.35 ± 3.49 mg GAE/g	
Tabasco, México	Desconocido	Sin fermentar	93.12 mg GAE/g	Romero-Cortés <i>et al.</i> , 2013
		Fermentados (6 días)	73.6 mg GAE/g	
Colombia	Mezcla de clones	Sin fermentar (0)	18279.1 ± 1082 mg GAE/100 g	Barrientos <i>et al.</i> , 2019
	CCN-51			
	ICS-1	Fermentados (5.5 días)	16002.6 ± 0.00 mg GAE/100 g	
	FEC-2			
	FLW-2	Secados (5.5 días)	1308.2 ± 1303.08 mg GAE/100g	
	FSV41			

Manabí-Ecuador	Clon	Sin fermentar	98.56 mg GAE/g	Rivera <i>et al.</i> , 2012
		Fermentados (5 días)	38.36 mg GAE/g	

GAE=equivalente de ácido gálico; EPC=equivalente de epicatequina; AT=equivalente de ácido tánico. D0= día 0, D1 = día 1 , D2 = día 2

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2.5 Cinética enzimática

La cinética enzimática describe la velocidad de reacción de diversas enzimas. Es el análisis cuantitativo de cada uno de los factores que intervienen en la tasa de una reacción, lo que permite conocer el mecanismo de las reacciones y la especificidad de la enzima. (Saucedo y Soto *et al.*, 1999). La velocidad de la reacción catalizada por la enzima dependerá de la temperatura, pH y la concentración del sustrato.

La cinética enzimática fue estudiada hace más de 100 años por Leonor Michaelis y Maud Menten donde propusieron una ecuación que explica el comportamiento cinético de las enzimas, estudiando la enzima invertasa debido a su facilidad de medir su actividad. De acuerdo a este modelo, una enzima (E) se une reversiblemente a un sustrato (S) para formar un complejo enzima-sustrato (ES), posteriormente forma un complejo enzima-producto (EP) y una vez formados los productos, la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción (E + P) (Michaelis y Menten, 1913; Johnson y Goody, 2011; Reuveni *et al.*, 2014; Toulas y Kitsos, 2016). De ésta manera el modelo de Michaelis-Menten se describe de la siguiente manera



En este caso, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales y podemos decir que:

$$v_1 = k_1 [E][S]$$

$$v_2 = k_2[ES]$$

$$v_3 = k_3[ES]$$

Posteriormente siguiendo la aproximación del estado estacionario, la cual señala que la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante durante la reacción enzimática:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES] = 0 \quad (2)$$

$$[ES] = \frac{k_1 [E][S]}{k_2 - k_3}$$

Se define:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3)$$

Entonces tenemos:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (4)$$

La velocidad de reacción es:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 [ES] \quad (5)$$

La concentración total de la enzima:

$$[E_0] = [E] + [ES]$$

Por lo tanto

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (6)$$

Sustituyendo la ecuación 3 en 1:

$$[ES] = \frac{([E_0] - [ES]) [S]}{K_m}$$

$$K_m [ES] + [S][ES] = [E_0][S]$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Sustituyendo ecuación 4 en 2:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 [E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Por lo que obtenemos la ecuación más conocida de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad (8)$$

Que describe la velocidad enzimática (V), V_{\max} es la velocidad máxima alcanzada a altas concentraciones de sustrato y la constante de Michaelis (K_m) se define como la concentración del sustrato a la cual la velocidad enzimática alcanza la mitad de su valor máximo (Reuveni *et al.*, 2013). La ecuación de Michaelis-Menten es una hipérbola como se observa en la figura 2.3. De esta manera para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad de reacción.

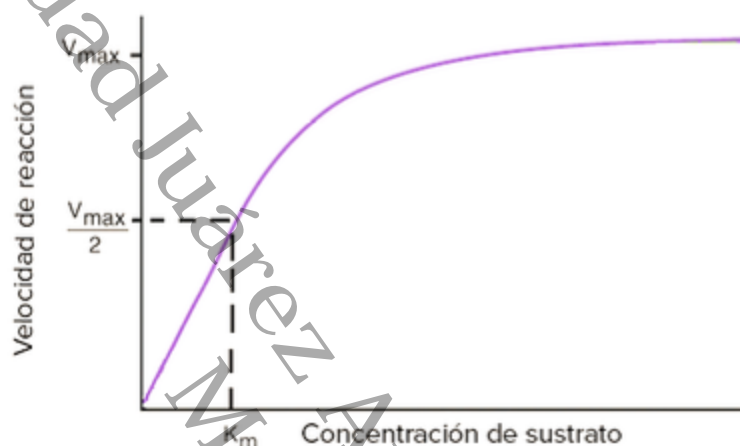


Figura 2.3 Gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten

Fuente: Imagen modificada de "Enzimas: Figura 3", de OpenStax College, Biología (CC BY 3,0)

2.6 Actividad enzimática

Durante el siglo XX se ha estudiado la actividad enzimática en la fermentación y secado en cacao. Se han detectado diversas enzimas como proteasas, glucosidasas y polifenol oxidasas y una adecuada combinación de las enzimas es un factor muy importante para la producción de precursores del sabor, degradación de pigmentos durante la fermentación y reducción del sabor, lo que contribuye a una mejor aceptación de los productos de cacao (Hansen *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 2004; Camu *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2017).

2.6.1 Polifenol Oxidasa (PFO)

Las polifenol oxidasas son un grupo de enzimas que contienen Cu, el cual participan en la oxidación de varios fenoles a o-quinonas. Estas quinonas conducen a la formación de polímeros marrones, conocido como pardeamiento enzimático que afecta negativamente el

color, sabor, las propiedades nutricionales y la vida útil de los alimentos. Sin embargo, en algunos casos el pardeamiento enzimático podría ser beneficioso, ya que conduce a la formación de compuestos que confieren sabores característicos (Morante *et al.*, 2014; Mejía-Doria *et al.*, 2014). La conversión de sustratos fenólicos en o-quinonas por la PFO se produce por medio de dos etapas de oxidación. El primero es la hidroxilación de la posición orto adyacente a un grupo hidroxilo existente (actividad de “monofenol oxidasa”, también conocida como hidroxilasa). El segundo es la oxidación de o-dihidroxibencenos a o-benzoquinonas (conocida como actividad de catalasa u oxidasa) (Figura 2.4) (Taranto *et al.*, 2017). Algunas de las plantas de PFO exhiben ambos tipos de actividades, mientras que otras tienen solo una, pero generalmente la actividad difenolasa es la forma predominante en las plantas superiores (Jukanti, 2017).

De acuerdo a la nomenclatura International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) las PFOs se pueden diferenciar en; i) monofenol monooxigenasas (E.C.1.14.18.1); y ii) enzimas que catalizan la oxidación de los difenoles usando oxígeno como aceptador de electrones (subclase E.C.1.10.3.), incluidas las catecol oxidasas (E.C. 1.10.3.1) y las lacasas (E.C.1.10.3.2).

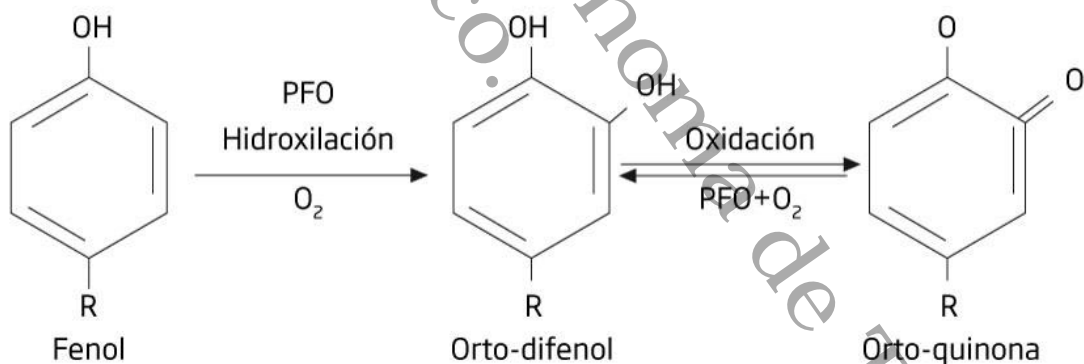


Figura 2.4 Esquematzación de pardeamiento enzimático por la PFO
Fuente: Ciencia y Desarrollo <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=304>

Según el sustrato específico y su mecanismo de acción, las PFOs se clasifican en tres tipos diferentes: tirosinasas, catecol oxidasas y lacasas. Las tirosinasas tienen actividades tanto cresolasa y catecolasa. Las catecol oxidasas, también conocidas como o-difenol oxidasas,

catalizan la oxidación de o-difenoles a o-quinonas. Finalmente, las lacasas son capaces de oxidar compuestos aromáticos mediante un mecanismo de reacción catalizado por radicales (Taranto, *et al.*, 2017).

2.6.2 Factores de la Polifenol Oxidasa (PFO)

Existen diversos factores como la temperatura, pH y sustrato que pueden afectar la actividad enzimática. Cada enzima tiene una temperatura óptima y un pH óptimo. Las enzimas son sensibles a los cambios de pH y su actividad enzimática depende estrictamente del pH del ensayo o medio. En general, el pH óptimo de diversas plantas de PFO está en el rango de 4-8 (Jukanti, 2017). En el cacao de cacao se ha obtenido un pH óptimo de 6.8 (Lee, 1991), esto puede variar por diversos factores como: los métodos de extracción, el sustrato, temperatura, el buffer utilizado, etc.

La temperatura es otro factor vital que afecta la actividad. La velocidad de las reacciones enzimáticas aumenta, por lo general, con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y activa. Jukanti (2017) menciona que la velocidad de la reacción química aumenta con la temperatura de dos a tres veces cada 10°C y que la desestabilización de la estructura tridimensional termosensible de enzima a temperatura más alta provoca desnaturalización y una disminución de la velocidad de reacción.

Al igual que el pH, la temperatura óptima para la PFO es diferente para cada especie de plantas. En el caso de cacao la temperatura óptima es de 45° C (Lee, 1991) ésta puede variar por algunos factores ya mencionados.

Otro factor muy importante es el sustrato. Los compuestos fenólicos son los principales sustratos de las Polifenol oxidasas de plantas. Al aumentar la concentración de sustrato, la actividad enzimática aumenta, hasta alcanzar la velocidad máxima. La actividad de PFO de diferentes especies muestra una variación distinta para diferentes sustratos, se reporta que para la PFO los sustratos son: catequina, 4-metilcatecol, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, difenoles, *p*-cresol, tirosina, y dihidroxifenilalanina (Hansen *et al.*, 1998; Paul y Gowda, 2000; García *et al.*, 2006; Mejía-Doria *et al.*, 2014; Cheema y Sommerhalter, 2015; Bravo y Osorio, 2016; Jukanti, 2017). En el caso de cacao se reporta que la enzima tiene mayor reactividad con el sustrato catecol (Lee, 1991; Macedo *et al.*, 2016).

2.6.3 Polifenol Oxidasas en granos de cacao

Se han realizado diversos estudios para la caracterización de la actividad de polifenol oxidasa en frutas y verduras como el plátano, mango, manzana, mamey, uva, tomate, fresas, papa, lechuga, arándanos, lulo, aguacate, cacao, entre otros (García *et al.*, 2006; Mejía-Doria *et al.*, 2014; Cheemma y Sommerhalter, 2015; Goel y Paul, 2015; Macedo *et al.*, 2016; Bravo y Osorio, 2016; Février *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2017; Siddiq y Dolan, 2017; Moschetti *et al.*, 2019; Kschonsek *et al.*, 2019). En muchas de estas frutas y verduras el pardeamiento enzimático por la PFO es negativo, ya que causa la oxidación y polimerización de los alimentos, desarrollando un color café. Por lo tanto, puede ser considerado un cambio indeseable para el consumidor (García *et al.*, 2006). En los granos de cacao las PFOs son enzimas muy importantes en la oxidación de los polifenoles. Su actividad comienza a partir de la fermentación y continúa a través del proceso de secado. La eliminación del sabor astringente y amargo de los granos de cacao es el resultado principal de la fase de oxidación enzimática durante la fermentación y el secado, lo que lleva al color marrón, siendo un factor clave para el desarrollo de los precursores de sabor (Yoshiyama e Ito, 1996; Hansen *et al.*, 1998; Minsawi *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2016; El kiyat *et al.*, 2018).

Algunas de las investigaciones sobre la actividad de la PFO en granos de cacao se han realizado por diferentes métodos, ya sea de extracción, purificación, fermentación, secado y en diferentes tipos de variedad.

Villeneuve *et al.*, (1985) estudiaron las actividades de peroxidasas y polifenol oxidadas en granos de cacao durante la fermentación en el embrión y en el cotiledón. Los granos utilizados fueron obtenidos de árboles híbridos de la selección del Instituto de Investigación del Café y Cacao de Costa de Marfil. La evolución de la actividad de la peroxidasa del embrión y del cotiledón fueron muy diferentes, estando la actividad casi por completo en el cotiledón, que representa el 98% del peso de la materia seca de grano. Después del tercer día de fermentación en el embrión y al cuarto día para el cotiledón la actividad de la peroxidasa es insignificante (Figura 2.5).

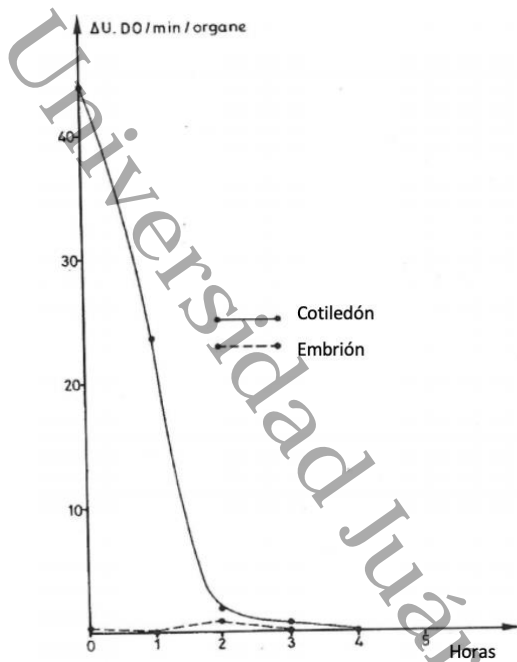


Figura 2.5 Evolución de la actividad peroxidasa de los cotiledones y el embrión durante la fermentación (Villeneuve *et al.*, 1985)

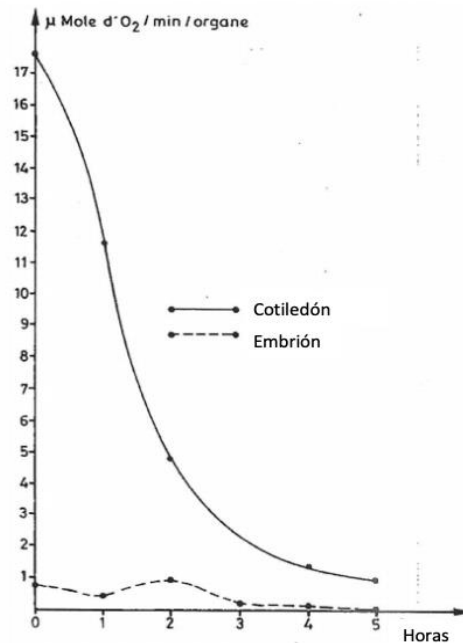


Figura 2.6 Evolución de la actividad PFO de los cotiledones y el embrión durante la fermentación (Villeneuve *et al.*, 1985)

En cambio, la evolución de la actividad de la PFO dura hasta el quinto día, disminuye rápidamente en los primeros dos días de fermentación quedando el 15% de la actividad en el tercer día y solo el 5% en el quinto día. En el embrión tiene un ligero máximo en el segundo día de fermentación (Figura 2.6). El pH óptimo para la peroxidasa se extiende de pH 5 a pH 8 (Figura 2.7) y la temperatura óptima a 25° C. Este estudio mostró disminución de las actividades de peroxidasa y PFOs durante los días de fermentación, siendo la peroxidasa la que presentó una disminución más rápida con respecto a la PFO. Estos autores mencionan que los niveles de actividad enzimática puedan diferir según la variedad ya que depende de la zona geográfica, las condiciones climáticas y el proceso de fermentación.

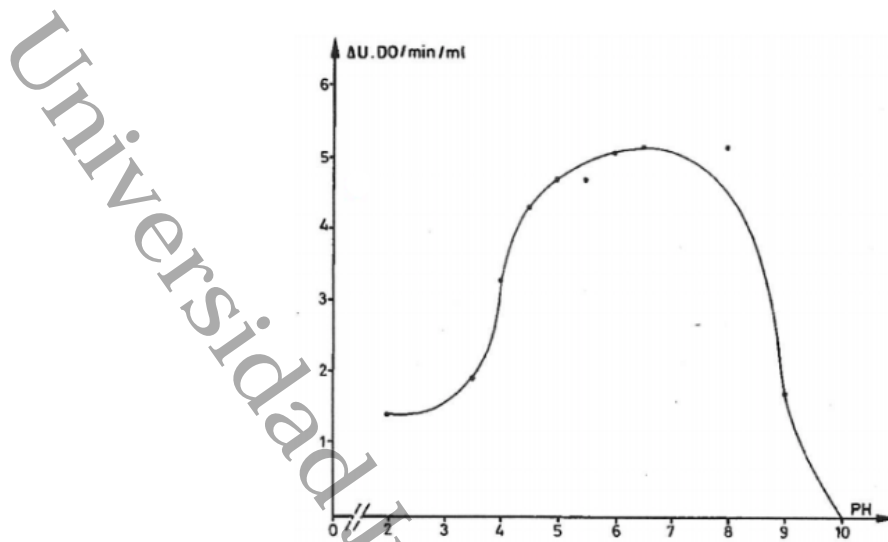


Figura 2.7 Evolución de la actividad peroxidasa en función del pH (tiempo de incubación: 10 min (Villeneuve *et al.*, 1984)

Lee, (1991) realizó estudios sobre la PFO de granos de cacao obtenidos de Teluk Intan, en Perak, Malasia, aislando y purificando parcialmente la PFO del cacao. La purificación parcial proporcionó un aumento de aproximadamente siete veces en la actividad enzimática (Tabla 2.3). Obtuvo un pH óptimo de 6.8 y temperatura de 45°C. Se determinó las constantes de Michaelis a diferentes concentraciones de sustratos utilizando catecol, 4-metilcatecol, 3(3,4-dihidroxifenil)- DL-anina, clorhidrato de 3-hidroxitiramina, tirosina, p-cresol y 4-fenol-hidroxilo, que variaban de 0.005-0.05 M. La constante K de Michaelis para catecol fue de 0.01 M, y se encontró que la enzima tiene mayor reactividad hacia el catecol. También se realizó el cambio de absorbancia de la oxidación enzimática catalizada de catecol a 410 nm con el tiempo. Por último, se determinaron los efectos de inhibidores sobre la actividad de la PFO, evaluando el ácido ascórbico, bisulfito de sodio, L-cisteína, tiourea y EDTA; de los cuales el ácido ascórbico fue el más efectivo, ya que causó una inhibición casi completa de la actividad enzimática a una concentración tan baja como 1 mM y la tiourea, al parecer es el inhibidor menos eficaz.

Tabla 2.3 Purificación parcial de la PFO en granos de cacao

Tipo de extracto del cotiledón de granos de cacao	Proteína Total (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Pureza
Homogeneizado	175	7-5	7.5 x 10 ²	100	1
Extracto de acetona (purificación)	70	52	5.2 x 10 ³	40	7

Fuente: Lee, 1991

Yoshiyama e Ito (1996), desarrollaron un método para disminuir la astringencia de los granos de cacao por un tratamiento enzimático, considerando que al suprimir el sabor astringente de los granos de cacao, la calidad del chocolate podría mejorar. Los granos fueron originarios de Ghana. Los autores realizaron una comparación de los granos de cacao no fermentados (morados) con granos de cacao totalmente fermentados (marrones) con diferentes tratamientos, lo cual demostró que los granos de cacao morados tenían mayor cantidad de polifenoles (Tabla 2.4) y mayor astringencia que los granos de cacao marrones. Por lo que realizaron preparaciones enzimáticas capaces de disminuir la astringencia y resultó que la PFO extraída de hongo de paja (*Coriolus versicolor*) fue la más efectiva entre las enzimas analizadas. Los contenidos polifenólicos de los granos de cacao morado se redujeron al nivel de los granos marrones por el tratamiento enzimático.

Tabla 2.4 Contenido polifenólico de granos morados y granos marrones

	Polifenoles totales (mg/g)	Flavanol (mg/g)	Prontocianidina (mg/g)
Marrones	12.2	5.5	0.9
Morados	19.9	16.9	2.6

Fuente: Yoshiyama e Ito (1996)

Hansen *et al.*, (1998) estudiaron las actividades enzimáticas de diversas enzimas como: Glucosidasas, Polifenol Oxidasas, Endoproteasas, invertasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Los granos de cacao utilizados fueron del genotipo Imperial College Selection (ICS-95), la fermentación se realizó en Quevedo, Ecuador. Se utilizó 80 kg de granos fresco (1040 vainas o mazorcas), cada vaina contenía 30 granos con un peso de 1 g

por grano aproximadamente. La fermentación duró 4 días y se realizó por el método de “montón” de aproximadamente 80 cm de diámetro, estaba cubierto con plástico y se recogieron muestras de 40 g cada 24 h. La temperatura ambiente durante la fermentación osciló entre 22 y 34 C. Se realizaron los extractos enzimáticos a partir del polvo de cotiledón seco desgrasado con acetona cada día antes del análisis y se usó el mismo conjunto de muestras para comparar las actividades durante la fermentación y secado. La PFO se determinó usando un procedimiento de ensayo para la monofenol monooxigenasas. Se midió la absorbancia a 475 nm y se calculó la actividad a partir de una curva estándar de tirosinasa de hongos. La actividad enzimática mostró diferencias en el pH óptimo y en la estabilidad durante la fermentación. Para la Polifenol Oxidasa los valores óptimos de pH fueron 5.5 y 7.0 con 4-metilcatecol y dihidroxifenilalanina (DOPA) como sustrato. La PFO se inactivó durante la fermentación (Tabla 2.5), aproximadamente el 50% y el 6% de la actividad se encontraron después del primer y segundo día, después del tercer y cuarto día la actividad bajo hasta el 5%. Durante el secado al sol y artificial fue fuertemente inactivada (Tabla 2.6). Para las otras enzimas, los resultados muestran que la aminopeptidasa e invertasa se inactivaron total o fuertemente, la carboxipeptidasa, se inactivó parcialmente, mientras que la endoproteasa y glucosidasa permanecieron activas.

Tabla 2.5 Efecto de la fermentación en pilas sobre las actividades enzimáticas en los granos de cacao ICS-95 (las actividades enzimáticas se expresan como U g⁻¹ materia seca)

Enzima	Días de fermentación en días				
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Endoproteasa	381	312	227	187	190
Aminopeptidasa	1.14	0.49	0.06	0.07	0.06
Carboxypeptidasa	0.33	0.25	0.18	0.18	0.05
Invertasa (cotyledon)	0.037	0.011	NS ^a	NS	NS
Invertasa (mucílago)	0.573	0.046	NS	NS	NS
Polifenol Oxidasa	4.51	2.07	0.27	0.21	0.24
β-Galactosidasa	9.9	9.6	10.7	9.8	6.7
α-Arabinosidasa	2.9	2.7	2.9	2.6	2.2
α - Manosidasa	27.8	26.7	22.2	22.2	20.4

Fuente: Hansen *et al.*, (1998)

^aNS no significativo

Tabla 2.6 Efecto del secado sobre las actividades enzimáticas en granos de cacao fermentados de 1 día (las actividades enzimáticas se expresan como U g⁻¹ materia seca)

Enzima	No fermentado		Fermentado	
	Liofilizado	Liofilizado	Secado al sol	Secado artificial
Endoproteasa	381	312	446	462
Aminopeptidasa	1.14	0.49	0.66	0.50
Carboxypeptidasa	0.33	0.25	0.76	0.72
Invertasa (cotiledón)	0.037	0.011	0.007	0.006
Invertasa (mucílago)	0.57	0.046	0.048	0.030
Polifenol Oxidasa	4.51	2.07	0.38	0.50
β-Galactosidasa	9.9	9.6	7.6	8.9
α-Arabinosidasa	2.9	2.7	2.9	3.5
α - Manosidasa	27.8	26.7	34.0	32.9

Fuente: Hansen *et al.*, (1998)

Un estudio realizado por Brito *et al.*, (2002) sobre el efecto de los tratamientos con PFO en nib de cacao demostró que el uso de PFO es útil para reducir el contenido total de polifenoles en los granos de cacao. Los granos de cacao utilizados fueron de la variedad Forastero de Brasil, fueron fermentados y secos. Para las determinaciones se usó PFO de hongo comercial. Las semillas de cacao esterilizadas en autoclave se trataron con PFO o agua en presencia o ausencia de un flujo de aire. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas a diferentes horas del tratamiento (0, 0.5, 1, 2 y 3 h) Posteriormente las muestras se secaron a 65° C, se desgrasaron para el análisis de Polifenoles totales. Los resultados muestran que la PFO de los hongos redujo el contenido total de compuestos fenólicos en las semillas de cacao en un 20%, que fue inferior al obtenido por Yoshiyama e Ito (1996) por la PFO *Coriolus Versicolor* durante el mismo tiempo de tratamiento, pero cuando se asocia con el aire hubo un aumento en el contenido de fenoles (Tabla 2.7). Sin embargo, el contenido de taninos no se redujo por la PFO de los hongos. Solo se redujo por el tratamiento con agua y aire (Tabla 2.8).

Tabla 2.7 Contenido total de fenoles (mg de ácido tánico/g de muestra) en semillas de cacao después del tratamiento con PFO, aire y agua

Tiempo (h)	Muestra			
	PFO + Aire	PFO	H ₂ O + Aire	H ₂ O
0	7.9 ± 0.4 a, A	7.9 ± 0.4 a, A	7.9 ± 0.4 a, A	7.9 ± 0.4 a, A
0.5	10.4 ± 0.7 b, A	6.8 ± 0.2 b, B	8.4 ± 0.6 a, C	5.9 ± 0.1 b, B
1	8.6 ± 0.4 a, A	6.4 ± 0.5 b, B	8.5 ± 0.9 a, A	6.4 ± 0.8 b, B
2	8.2 ± 0.1 a, A	6.3 ± 0.5 b, B	8.8 ± 0.9 a, A	6.4 ± 0.1 b, B
3	7.9 ± 0.2 a, A	6.5 ± 0.6 b, B	7.9 ± 0.6 a, A	7.3 ± 0.1 a, A

Fuente: Brito *et al.*, (2002)

Los valores son el promedio ± la desviación estándar. Las medias dentro del mismo tratamiento seguidas de las mismas letras minúsculas no son significativamente en <0.05. Las medias dentro del mismo tiempo seguidas por las mismas letras mayúsculas no son significativamente diferentes en p <0.05.

Tabla 2.8 Contenido total de taninos (mg de ácido tánico/ g de muestra) en semillas de cacao después del tratamiento con PFO

Tiempo (h)	Muestra			
	PFO + Aire	PFO	H ₂ O + Aire	H ₂ O
0	2.6 ± 0.6 a, b, A	2.6 ± 0.6 a, b, A	2.6 ± 0.6 a,b, A	2.6 ± 0.6 a, A
0.5	3.5 ± 0.6 a, A	3.6 ± 0.4 a, A	2.9 ± 0.6 a, A	2.9 ± 0.5 b, B
1	3.1 ± 0.6 a, A	3.1 ± 0.2 a, b, A	3.1 ± 0.2 a, A	3.3 ± 0.2 a A
2	2.7 ± 0.1 a, A	2.7 ± 0.1 b, A	2.1 ± 0.1 b, B	3.3 ± 0.2 a, C
3	2.2 ± 0.3 b, A	2.5 ± 0.3 b, A	1.7 ± 0.1 c, B	3.3 ± 0.1 a, C

Fuente: Brito *et al.*, (2002)

Los valores son el promedio ± la desviación estándar. Las medias dentro del mismo tratamiento seguidas de las mismas letras minúsculas no son significativamente en <0.05. Las medias dentro del mismo tiempo seguidas por las mismas letras mayúsculas no son significativamente diferentes en p <0.05.

Misnawi *et al.*, (2002) estudió la PFO y la oxidación de polifenoles en relación al tiempo de incubación y pH de incubación. Los granos de cacao utilizados fueron híbridos F1 (GC7 vs SCA6/SCA12) obtenidos de Kotta Blater Estate, Indonesia. El estudio se realizó para granos de cacao no fermentados, parcialmente fermentados (2 días) y la muestra control de 5 días de fermentación. La fermentación se realizó en cajas de madera de 90 cm de profundidad y una capacidad de 2 T. Los granos se secaron al sol, hasta alcanzar una humedad de 7%. La enzima del cacao se extrajo de los granos de cacao PBC 140 recolectados de la plantación Golden Hope, Setiawan, Perak Malasia. La evaluación de la actividad de la PFO se llevó a cabo para granos frescos (liofilizados) y granos secos no fermentados y parcialmente fermentados y se evaluó espectrofotométricamente a 438 nm. Se llevó a cabo una incubación de granos de cacao no fermentados y parcialmente fermentados en tiempo de incubación (0, 1, 2, 4, 8 y 16 h) y pH de (3.5, 4.5, 5.5 y 6.5). Posteriormente se realizaron

tratamientos de incubación \pm enriquecimiento combinando el tiempo de incubación y la adición de PFO de cacao crudo y tirosinasa. Los resultados muestran que las actividades restantes de polifenol oxidasas de granos de cacao secos no fermentados y parcialmente fermentados fueron de 1 y 0.08% de la actividad total original; las actividades específicas mostraron una tendencia similar (Tabla 2.9) donde se encontraron 75, 7 y 0.8 unidades mg^{-1} en granos frescos y granos secos no fermentados y parcialmente fermentados. Las actividades específicas que permanecieron en los granos secos no fermentados y parcialmente fermentados fueron iguales al 9 y 1% de la actividad específica original. Esto resultados muestran que los procesos de secado y fermentación inactivaron fuertemente. En cuanto a los polifenoles de granos no fermentados se oxidaron por incubación sin enriquecimiento enzimático, mientras que los granos parcialmente fermentados requirieron enriquecimiento enzimático. Misnawi *et al.*, (2002) concluyeron que se podría optimizar el proceso de fermentación y sería beneficioso para las industrias tanto del cacao, como de chocolate. El contenido de polifenoles asociados con el sabor astringente y amargo de los granos de cacao no fermentados y parcialmente fermentados podría reducirse a una cierta concentración mediante una incubación adecuada con polifenol oxidasas.

Tabla 2.9 Actividad de la PFO de granos de cacao secos (n=4)

Polifenol Oxidasa	Granos frescos (liofilizado)	Granos secos no fermentados	Granos secos parcialmente fermentados
Proteína total			
1) mg ml^{-1}	73.2 ± 5.5	7.7 ± 0.6	6.1 ± 0.5
2) contenido relativo de granos frescos (%)	100	10	8
Actividad total			
1) unidades ml^{-1}	5517 ± 392	52.7 ± 3.6	4.7 ± 0.4
2) actividad relativa de granos frescos (%)	100	1	0.08
Actividad específica			
1) unidades mg^{-1}	75.4 ± 10.5	6.8 ± 1.0	0.77 ± 0.15
2) actividad específica relativa de granos frescos (%)	100	9	1

Fuente: Misnawi *et al.*, (2002)

Otro estudio, reportado por Misnawi *et al.*, (2003) realizado con las mismas muestras del trabajo anterior demostraron que las características de los granos de cacao completamente

fermentados, en términos de color, valor de índice de fermentación, contenido total de polifenoles y puntaje de prueba de corte, se podría alcanzar mediante la incubación de granos no fermentados sin enriquecimiento de PFO. Sin embargo, en el caso de los granos parcialmente fermentados, la incubación debe ser enriquecida por polifenol oxidasa para lograr el mismo resultado.

En una investigación más reciente Macedo *et al.*, (2016), caracterizaron la actividad de la PFO a partir del mucílago (pulpa) y del cotiledón de dos cultivares de cacao estudiados antes del comienzo de la fermentación. Los dos cultivares fueron híbridos: El cultivar PH 16 (Porto Híbrido, un híbrido forastero resultante del cruce entre los cultivares Forastero de Alto Amazónico y Trinitario) y el cultivar TSH 1188 (Trinidad Selected Hybrid, un híbrido trinitario) producidos en la granja Lajedo do Duro, Ciudad de Ibirataia, Brasil. Para los cotiledones, previamente a la realización del extracto, las semillas se liofilizaron y se desgrasaron con éter de petróleo. La actividad se determinó espectrofotométricamente a 420 nm. Se observaron diferencias en la actividad enzimática entre el mucílago de los dos cultivares, la actividad de PFO fue 6 veces mayor para el cultivar TSH 1188 que para el cultivar PH 16. Sin embargo, la actividad de PFO en el cotiledón fue menor y similar para ambos cultivares (Figura 2.8). La PFO mostró buena afinidad para el catecol, el pH óptimo para la actividad de la PFO del mucílago y del cotiledón se determinó con valores de pH entre 2 y 8. Para el cultivar PH 16, el pH óptimo para los extractos de mucílago fue de 6.5 y para los extractos del cotiledón fue de 5.8, con actividades enzimáticas de 7.1 U. mg de proteína⁻¹ y 6.5 U. mg de proteína⁻¹. Para el cultivar TSH 1188, el pH óptimo para los extractos de mucílago fue de 6.6 y para el cotiledón de 6.0 (Figura 2.9). Las temperaturas óptimas para la actividad de la PFO se determinaron con valores de un rango de temperatura de 20° a 60° C. Para el cultivar PH 16 la actividad máxima de PFO se alcanzó a 30° C para el cotiledón (9.7 U. mg de proteína⁻¹) y a 27° C para el mucílago (7.1 U. mg de proteína⁻¹). Para TSH 1188, la temperatura óptima para el cotiledón fue de 25° con 4.3 U. mg proteína⁻¹ y 40.3 U. mg proteína⁻¹ para el mucílago (Figura 2.10). Lo que indica que las altas temperaturas no son favorables para la actividad de la PFO y que la actividad enzimática es mayor entre 25 y 30 °C. Los resultados sugieren que durante la fermentación, se deben adoptar criterios específicos en función de la temperatura y pH óptimos para la PFO, para prolongar y aumentar la actividad de la PFO debido a la oxidación de los compuestos fenólicos realizada

por esta enzima, lo cual es de gran importancia para las características sensoriales del chocolate, como la amargura y la astringencia.

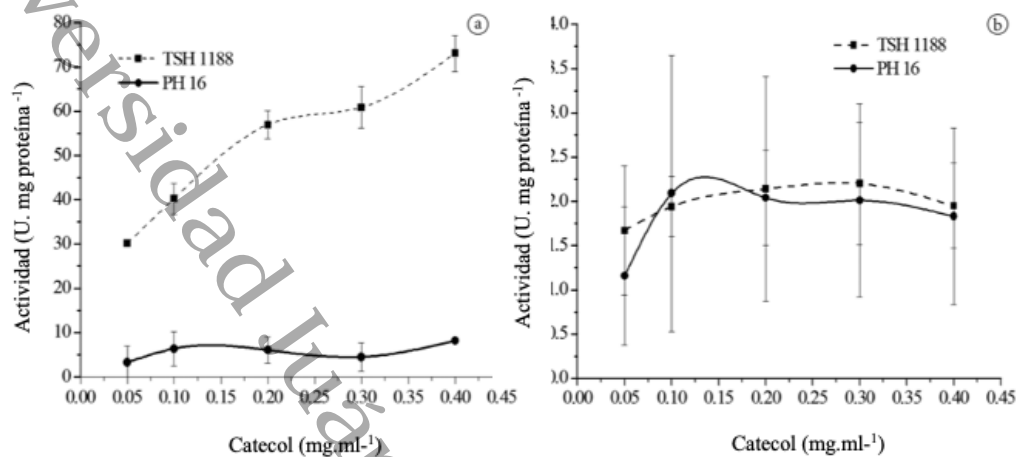


Figura 2.8 Actividad de la PFO en función de la concentración de sustrato (catecol) (0.05 a 0.4M). (a) Pulpa; (b) Semilla (Macedo *et al.*, 2015).

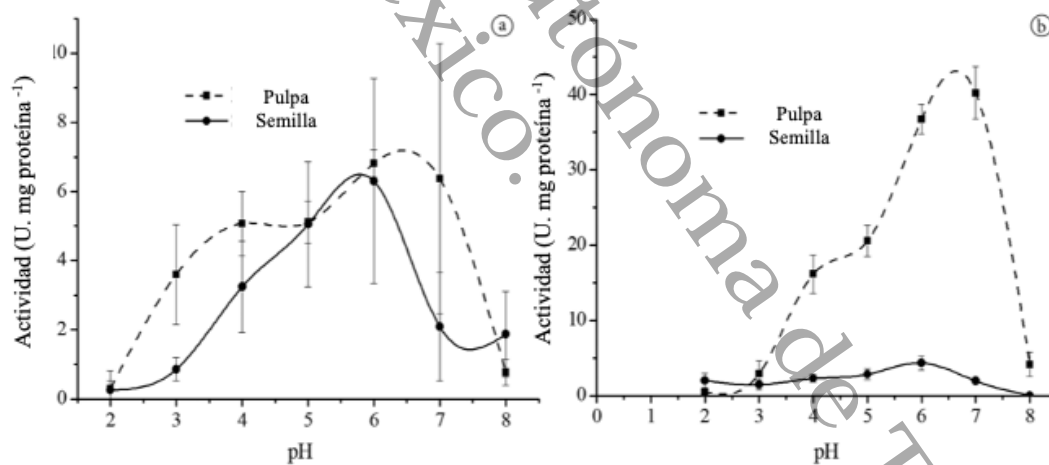


Figura 2.9 Dependencia del pH de la PFO. (a) Cultivar PH 16; (b) Cultivar TSH 1188 (Macedo *et al.*, 2015).

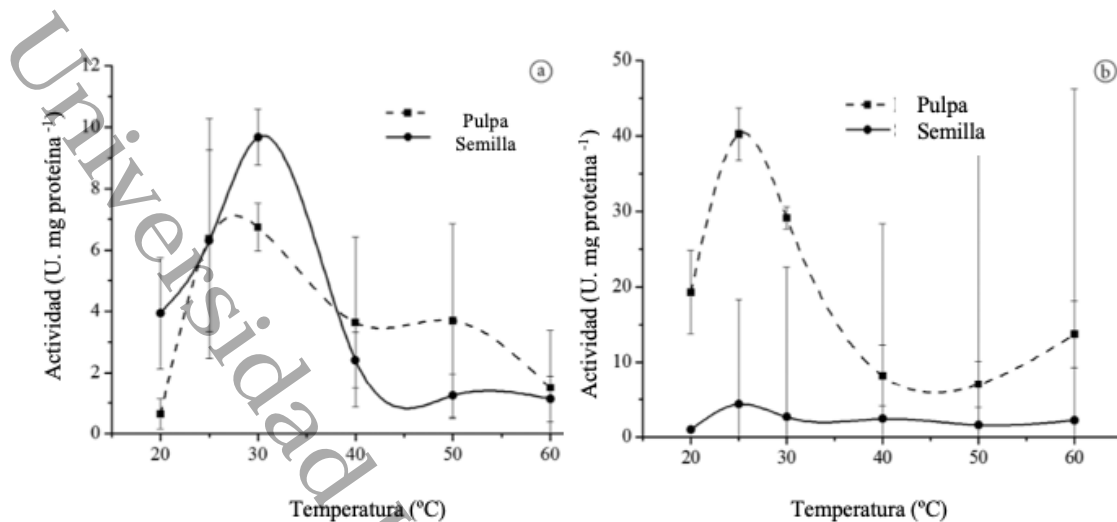


Figura 2.10 Efecto de la temperatura sobre la actividad PFO. (a) Cultivar PH 16; (b) Cultivar TSH 1188 (Macedo *et al.*, 2015).

2.7 Pruebas de calidad fisicoquímica del grano de cacao

La Organización Internacional de Cacao (ICCO) utiliza algunos criterios para evaluar la calidad de cacao fino o de sabor; estos incluyen el origen genético del material de plantación, las características morfológicas de la planta, las características de sabor de los granos de cacao producidos, las características químicas de los granos de cacao, el color de los granos y las semillas de cacao, el grado de fermentación, el secado, la acidez, los sabores desagradables, porcentaje de moho interno, infestación de insectos y porcentajes de impureza. Por lo que en los siguientes apartados se mencionaran algunas definiciones de las pruebas de calidad químicas y físicas de los granos de cacao.

2.7.1 pH

La medición de pH es un indicador utilizado muy importante de calidad durante la fermentación y el secado, debido a que puede indicar exceso de acidez en los granos fermentados, lo que reduce la calidad sensorial (Romero-Cortes *et al.*, 2013). Al inicio de la fermentación, el pH de la pulpa es ácido (<4), mientras que el cotiledón es más alcalino. El pH en el cotiledón disminuye de 6.5 a 4.5 aproximadamente los primeros días de fermentación, debido que durante la fermentación el etanol y ácido acético penetran a través

de la cáscara hacia los cotiledones (Saltini *et al.*, 2013). Posteriormente después de ésta disminución el pH aumenta ligeramente hasta alcanzar un valor de 5 al final del proceso de fermentación. Considerandose valores óptimos para cacao de calidad entre 5.0 y 5.4 (Loureiro *et al.*, 2017)

2.7.2 Acidez

Es fundamental conocer este parámetro ya que el exceso de acidez puede ser perjudicial para la calidad final de los granos de cacao (Loureiro *et al.*, 2017). Los niveles de acidez en el grano de cacao, dependen de los procesos de fermentación y de secado, pero pueden verse afectados por la variedad del grano y su contenido de mucílago (Perea *et al.*, 2011).

En la tabla 2.10 se observa el pH y la acidez en el mucílago y en el cotiledón durante la etapa de fermentación. El pH y la acidez del mucilago, se muestra que aumenta con el tiempo, el pH de 4.21 a 5.81 y la acidez de 0.96 a 3.06, mientras que el pH del cotiledón disminuyó durante la fermentación de 6.99 a 4.76 y la acidez del cotiledón aumentó de 0.77 a 2.88. En la tabla 2.11 se muestran datos de pH y acidez total durante la fermentación y secado de cacao de diferentes variedades. Se puede apreciar en los datos reportados por Nogales *et al.*, (2006) las características químicas del grano de cacao fermentado durante el secado al sol durante 4 días, mostrando que la acidez total de los granos disminuyó el primer día con la exposición al sol, permaneciendo constante en los días posteriores. En cuanto al pH tuvo un comportamiento constante los primeros 3 días (5.80-5.87), posteriormente descendió y al final presentó un pH de 5.83.

Se observan también datos reportados por Ortiz de Bertorelli *et al.*, (2009) los promedios de las características químicas del cotiledón del grano fresco, fermentado y seco. El pH muestra un aumento durante el transcurso de la fermentación y secado (5.86, 5.98 y 6.07), mientras que la acidez hay una disminución durante la fermentación y secado (1.35, 0.75 y 0.70). En la tabla se observan los resultados reportados por do Carmo Brito *et al.*, (2017) que durante el transcurso de la fermentación hubo un incremento de la acidez y para el tercer día no parece haber cambios significativos. El pH se mantuvo de 6 los primeros dos días, posteriormente disminuye a 5 hasta el quinto día, disminuyendo ligeramente el sexto día. Otros datos de acidez y pH más recientes (Barrientos *et al.*, 2019) se muestra que la acidez inicial es de 0.75 , a las 132 h de fermentación es de 0.12 y al final del secado es de 0.14. En

los estudios reportados el comportamiento del pH presentó una tendencia similar para pH y acidez, mientras los valores de pH cuantitativos se pueden comparar, para el caso de acidez debido a que hay diversas formas de presentar los resultados es más difícil de comparar.

Tabla 2.10 Variación de pH y acidez durante la fermentación

Tiempo de fermentación (h)	pH		Acidez (ácido acético g/100 g de cacao)	
	Mucílago	Cotiledón	Mucílago	Cotiledón
0	4.21 ± 0.02	6.99 ± 0.20	0.96 ± 0.19	0.77 ± 0.19
48	4.39 ± 0.05	5.98 ± 0.02	1.44 ± 0.18	1.08 ± 0.00
72	4.63 ± 0.08	5.37 ± 0.11	1.98 ± 0.18	1.62 ± 0.00
96	4.77 ± 0.05	5.05 ± 0.03	2.16 ± 0.00	1.98 ± 0.18
120	4.80 ± 0.03	4.91 ± 0.06	2.52 ± 0.18	2.16 ± 0.00
144	4.79 ± 0.05	4.81 ± 0.02	2.70 ± 0.00	2.52 ± 0.18
168	5.81 ± 0.01	4.76 ± 0.03	3.06 ± 0.18	2.88 ± 0.18

Fuente: Peláez *et al.*, 2016

Tabla 2.11 Variación de pH y acidez de diferentes variedades

Variedad	Fermentación/ secado	pH	Acidez	Fuente	
Criollos	Fermentados durante el secado al sol (días)	0	5.87	0.57 %	Nogales <i>et al.</i> , 2006
		1	5.82	0.25 %	
		2	5.80	0.25 %	
		3	6.09	0.20 %	
		4	5.83	0.24 %	
Criollo	Fresco	5.86	1.35 %	Ortiz de Bertorelli <i>et al.</i> , 2009	
Forastero	Fermentado	5.98	0.75 %		
	Seco	6.07	0.70 %		
Híbrido forastero	Fermentados (días)	0	6.56 ± 0.008	2.85 ± 0.35 (mEq NaOH/100 g)	Do Carmo Brito <i>et al.</i> , 2017
		1	6.47 ± 0.008	3.32 ± 0.32 (mEq NaOH/100 g)	
		2	6.21 ± 0.16	5.08 ± 0.86 (mEq NaOH/100 g)	
		3	5.53 ± 0.55	15.25 ± 0.33 (mEq NaOH/100 g)	
		4	5.39 ± 0.57	14.95 ± 0.67 (mEq NaOH/100 g)	
		5	5.10 ± 0.22	15.28 ± 3.85 (mEq NaOH/100 g)	
		6	4.98 ± 0.27	15.04 ± 4.60 (mEq NaOH/100 g)	
		7	5.13 ± 0.26	13.78 ± 3.91 (mEq NaOH/100 g)	
Mezcla de clones	Fermentación (0)			Barrientos <i>et al.</i> , 2019	
	Fermentación (132 h)	4.5 ± 0.12	0.175 ± 0.05 (meq NaOH *10/g)		
	Secado (132 h)	5.0 ± 0.12	0.12 ± 0.04 (meq NaOH *10/g)		
		5.1 ± 0.1	0.14 ± 0.014 (meq NaOH *10/g)		

2.7.3 Índice de fermentación

El índice de fermentación (IF) es un atributo que evalúa o determina el grado de fermentación de los granos a partir del cambio de coloración por la degradación de los compuestos fenólicos y las antocianinas (Loureiro *et al.*, 2017). Es una medida del color marrón del cotiledón de cacao. Los granos de cacao fermentados con valores de IF de menos de uno indican una fermentación baja, mientras que los granos de fermentación con valores de IF de uno o más se consideran bien fermentados (Kongor *et al.*, 2013). La alteración de la materia colorante resulta de la polimerización de antocianinas, por lo tanto, un aumento en la velocidad de polimerización (Cross *et al.*, 1982). El aumento del índice de fermentación es producido por el oscurecimiento de los granos a medida que transcurre la fermentación (Ortiz de Bertorelli *et al.*, 2009).

En la tabla 2.12, podemos observar el IF de granos de cacao obtenidos en Huimanguillo, Tabasco fermentados y secos con un IF de 1.074 y para el IF en el cotiledón fue de 1.311. Para granos de cacao híbridos de Ghana al inicio de fermentación el IF fue de 1.389 y al final del secado disminuye con un IF de 1.023. El IF para todos los casos fue mayor a uno lo que indica que todos los granos estaban bien fermentados.

Otros estudios relacionados con el índice de fermentación mostraron un incremento durante el proceso de fermentación (Nogales *et al.*, 2006; Ortiz de Bertorelli *et al.*, 2009; Gutiérrez, 2012; Loureiro *et al.*, 2017).

Tabla 2.12 Índice de fermentación en función de origen y variedad

Origen	Fermentados /secos	IF	Fuente
Huimanguillo, Tabasco	Granos secos	1.074	Romero-Cortes <i>et al.</i> , 2013
	Cotiledón	1.311	
Híbridos Mixtos-Ghana	Inicio de secado	1.389	Kongor <i>et al.</i> , 2014
	Final de secado	1.023	

2.7.4 Temperatura

Este parámetro es muy importante y es necesario llevar un registro ya que es una imagen de desarrollo microbiológico que permite diferenciar las etapas de anaerobiosis y aerobiosis que ocurren durante la fermentación. La temperatura después de las 24 a 40 horas debe incrementarse por efecto de las reacciones exotérmicas y mantenerse de forma homogénea

en toda la masa de fermentación para evitar la presencia de hongos, evitando zonas frías que son perjudicial en la calidad de los granos de cacao. Se ha mencionado anteriormente que durante la fermentación es necesario que los granos de cacao sean mezclados o volteados con la finalidad de proporcionar oxígeno, tener buena aireación y así lograr una uniformidad en los granos de cacao (Schwan y Wheals, 2004; Cruz *et al.*, 2015; Pereira, 2017; Magalhães, 2017; Castro-Alayo, 2019). Por lo tanto, es necesario la aireación para la producción y conservación de calor. Durante la fermentación el desarrollo de la temperatura y la acidez dependen de la aireación de la masa de los granos de cacao (Senanayake *et al.*, 1997).

Un estudio por Ortiz de Bertorelli *et al.*, 2009, se realizaron distintas frecuencias de remoción. La primera fue sin mezclarlos, otra con una frecuencia de remoción de 24 h y otra cada 48 h, sin embargo, la frecuencia de mezclado no afectó la temperatura, el autor argumenta que esto puede deberse al volumen de granos de cacao que se tenían (150 mazorcas por lote) ya que se ha señalado que para volúmenes pequeños no es necesario la remoción. Los resultados indicaron que durante el proceso de fermentación la temperatura aumentó, alcanzando su máximo valor el día 2 con temperatura de 41.22°C y luego descendió hasta 31.19°C. Otro estudio por Senanayake *et al.*, 1997 realizaron fermentaciones con tres variedades de cacao con intervalos de mezcla de 6, 12, 18 y 24. Los resultados mostraron que los intervalos de mezcla fueron significativamente diferentes para las variaciones de temperatura. La temperatura durante la fermentación inicial fue de 22°C, posteriormente fue aumentando, alcanzando un máximo de 41°C en el quinto día de fermentación. Luego disminuyó a 34°C al final de la fermentación. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Schwan y Wheals (2004) que mencionan que el pico máximo de temperatura fue entre el cuarto y quinto día. Sandhya *et al.*, 2016 evaluó la temperatura en diferentes fermentaciones inoculadas y fermentación natural. La temperatura inicial de la masa de cacao fue de 23°C y aumento linealmente a un máximo de 40°C en todos los conjuntos de inóculos. La temperatura varió durante el crecimiento sucesivo de las levaduras y las bacterias ácido lácticas de 23°C a 38°C y al final de 38°C y 42°C

La Organización Internacional de cacao en sus diversos estudios menciona que la temperatura se eleva a 40°C – 45°C durante las primeras 48 horas de fermentación y en los siguientes días la actividad bacteriana continúa en las condiciones de aireación a medida que el mucílago se drena y se mantiene la temperatura.

La temperatura de los granos de cacao durante la fermentación puede variar dependiendo de las condiciones climáticas, el tiempo de remoción o mezclado y el volumen de los granos, sin embargo se han reportado en diversos estudios que la temperatura oscila entre 24°C- 50°C (Schwan y Wheals, 2004; Do carmo Brito *et al.*, 2017; Visintin *et al.*, 2017)

2.7.5 Prueba de corte

La prueba de corte es un medio ampliamente utilizado para controlar la calidad de los granos de cacao comercializados (Cross *et al.*, 1982). Es la prueba de calidad más utilizada para determinar la calidad y los defectos del grano de cacao mediante una evaluación visual de los granos de cacao cortados (Hii *et al.*, 2009; Kongor *et al.*, 2013). La prueba consiste en cortar 300 granos de cacao longitudinalmente desde el medio y cada mitad inspeccionarla visualmente y clasificarla en función de su color y defectos. Posteriormente cada grano defectuoso se cuenta por separado y el resultado se expresa como un porcentaje de los 300 granos examinados (Ho *et al.*, 2015; Kongor *et al.*, 2013). Los granos de cacao fermentados aceptables dependerá de los productores y consumidores. De acuerdo a la Organización Internacional del Cacao el porcentaje ideal para granos fermentados es 100% fermentados, sin ningún defecto, sin embargo algunos productores y consumidores lo aceptan no mayor al 5% de defectuosos o 5% pizarrosos, no más del 10% de defectos o pizarroso respectivamente.

Algunos defectos de acuerdo a la norma mexicana NMX-FF-124-SCFI-2015: Granos de cacao-Prueba de corte son:

Grano fermentado: Es el grano entero y sano extraído de las mazorcas maduras, sometidos a un proceso de fermentación y secado que cumple con las especificaciones establecidas en la NMX-FF-118-SCFI-2014.

Grano dañado por insecto: Es el grano de cacao en cuyo interior se encuentran daños por insectos o presencia de insectos en cualquier estado (larvas, adultos, vivos y/o muertos, observables a simple vista.

Grano germinado: Es el cacao cuya cascarilla ha sido perforada o rota por el crecimiento del germen del grano.

Grano mohoso: Grano de cacao en cuyas partes internas o externas se aprecian colonias de hongos a simple vista, en la prueba de corte.

Grano pizarroso: Grano de cacao que al ser cortado longitudinalmente, presenta en su interior un color gris negruzco, verdoso o azulado con aspecto compacto y textura arenosa.

Grano violáceo: Es el grano de cacao cuyo cambio de color debido a la fermentación no se ha alcanzado completamente, por lo que muestra un color violáceo en la mitad o más de la superficie, expuesta al ser cortado. Longitudinalmente por el centro.

Pacha: Grano de cacao que carece de cotiledones o que éstos son demasiados delgados para aplicar la prueba de corte.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3. PLANTEAMIENTO, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 PLANTEAMIENTO

La fermentación de los granos de cacao es la etapa que permite el desarrollo de los precursores de aroma y sabor a partir de los compuestos de origen y de las condiciones de manejo poscosecha. Durante la etapa de fermentación los compuestos fenólicos se degradan como función principal de la actividad de la polifenol oxidasa en el cotiledón. Con el fin de homogenizar los lotes de fermentación se han utilizado cultivos iniciadores, como es el caso de la industria vinícola, cervecera y de lácteos. Estos cultivos iniciadores se agregan y compiten con la flora endógena buscando predominar, por lo que representa un tema de investigación arduo y vigente en la actualidad. Por ello, es importante, la búsqueda de cultivos iniciadores para el proceso de fermentación de cacao que permita lograr un estándar de calidad solicitado, principalmente en características sensoriales. Estas últimas características dependen de la influencia de la actividad enzimática y de cambios fisicoquímicos en pH, acidez volátil, acidez no volátil, compuestos fenólicos, entre otros, que se llevan a cabo simultáneamente. Además, existen asociados cambios en la temperatura del proceso debido a que existen dos fases: una anaerobia-hidrolítica y otra aerobia-oxidativa. Además, durante la fermentación del cacao, las referencias indican actividad de oxidasas, proteasas y glucosidasas. La PFO es fundamental en la degradación de compuestos fenólicos debido a que influye sobre la amargura, el color y la astringencia en la fermentación de cacao. Es por ello, que resulta necesario analizar el efecto que puedan tener los cultivos iniciados sobre la actividad enzimática de las PFOs, las variables fisicoquímicas y la dinámica de temperatura, como un primer paso que permita sentar las bases para los subsecuentes estudios enzimáticos y de calidad (Quintero y Díaz 2004; Bhattacharjee y Kumar, 2007; Macedo *et al.*, 2016).

3.2 JUSTIFICACIÓN

Un cacao con indicadores y atributos de calidad (aroma y sabor) es altamente cotizado en el mercado internacional para la elaboración de chocolates gourmet. Para poder tener cacaos con características sobresalientes se requiere de varios factores, comenzando con el origen genético, los procesos de fermentación, secado y tostado. El estudio de cada factor es fundamental para avanzar en el entendimiento y mejora de los procesos que involucran diversos campos del conocimiento. En la búsqueda de esos mercados, la investigación esta jugando un rol de suma importancia ya que se desea evaluar las condiciones de operación y optimizar los procesos. Actualmente en México hay pocos estudios orientados a la influencia de la polifenol oxidasa sobre los diferentes cultivares de cacao durante el proceso de fermentación y secado. El entendimiento del rol de ésta enzima bajo diferentes condiciones permitirá comprender su acción durante el proceso de poscosecha. Además, en el proceso de la fermentación se presentan cambios fisicoquímicos, los cuales contribuyen a determinar calidad final del producto y son los más comprensibles por el mercado. Por otra parte, los efectos de cualquier alteración de la microbiota natural o espontánea se observaran en la prueba de corte. En el caso de la búsqueda de homogenizar los indicadores de calidad, se requiere una incursión de cultivos iniciadores y con ello las características de las variables fisicoquímicas, como temperatura, pH, acidez, índice de fermentación y compuestos fenólicos se modificarán y con ello el efecto sobre la actividad enzimática. Por lo anterior, el estudio de la polifenol oxidasa representa el primer paso en el grupo de enzimas involucradas en los indicadores y atributos de calidad.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la fermentación modulada con cultivos iniciadores en granos de cacao sobre la actividad de polifenol oxidasa y variables fisicoquímicas.

3.3.2 Objetivos específicos

Determinar la actividad de polifenol oxidasa durante la fermentación y secado de granos de cacao trinitarios mexicanos.

Evaluar la actividad de la polifenol oxidasa durante la fermentación modulada con cultivos iniciadores en granos de cacao trinitarios mexicanos.

Evaluar las cinéticas de variables fisicoquímicas durante la fermentación y secado de cacao modulado con cultivos iniciadores en granos de cacao trinitarios mexicanos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Los granos de cacao que se utilizaron en la presente investigación corresponden al cultivar trinitario mexicano, proporcionado por Agroflorestra Mesoamericana SPR de RL Sociedad de producción rural de responsabilidad limitada de capital variable, que se encuentra ubicada en la carretera Teapa San Joaquín, Miguel Hidalgo 2ª sección, Ra. San Joaquín Km. 4.3 (N 17° 35' 22.5''). El desarrollo del trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería de Procesos de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco ubicada en Carretera Villahermosa-Teapa Km. 25. Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México.

4.2 Fermentación dirigida con un cultivo iniciador

Se utilizaron tres consorcios experimentales y un testigo; los consorcios fueron integrados como se muestra en la tabla 4.1 de acuerdo a la propuesta de Álvarez-Villagómez y Robles-Olvera (2019). La fermentación se llevó a cabo en sistemas de fermentación de cajas de madera (120 kg de capacidad) a nivel de suelo, cubiertos con hojas de plátano. La fermentación duró 6 días y, cada 24 horas se removieron los granos de cacao para oxigenar la masa y homogeneizar la distribución de los granos en la caja.

Tabla 4.1 Combinación de consorcios y muestra testigo

Conformación del inóculo					
Tratamiento 1 (T1)	LV1	LV2	LV3	BAL	BAA
Tratamiento 2 (T2)	LV1	LV3	BAL	BAA	
Tratamiento 3 (T3)	LV2	LV3	BAL	BAA	
Testigo (T4)	Fermentación endógena				

LV1: *Saccharomyces cerevisiae* var. *Diasticus* 23; LV2: *Saccharomyces cerevisiae* 58; LV3: *Saccharomyces cerevisiae* 120; BAL1: *Lactobacillus plantarum* 14; BAA: *Acetobacter pasterianus* 98.

4.3 Colección de muestras

Las muestras fueron colectadas durante el comienzo de la fermentación (tiempo cero), a las 6 y 12 h y posteriormente cada 24 h hasta las 144 h. Se colectó una muestra compuesta tomada de diferentes puntos de la caja de fermentación para tener un total de 250 gramos aproximadamente. Las muestras fueron almacenadas en congelación a una temperatura de -15 °C.

4.4 Registro de la temperatura

Durante la fermentación se registró la temperatura utilizando termopares tipo K, colocándolos al centro de la caja que contiene los granos de cacao y el almacenamiento de los datos se realizó a través de un datalogger (Measurement Computing, USB-TC) conectado a una laptop (Toshiba). Mediante los datos obtenidos a través del tiempo se integró el valor bajo la curva obtenida para cuantificar un valor en °C/h.

4.5 Secado

El secado se realizó de forma natural exponiendo los granos de cacao al sol con una duración de 5 días. Durante el proceso de secado, los granos fueron removidos cada hora con el fin de evitar apelmazamiento y para que el secado sea uniforme. Las muestras se colectaron una vez al día.

4.6 Procedimiento para el análisis de la PFO

4.6.1 Obtención del extracto crudo para la cuantificación de PFO del grano de cacao

Los granos de cacao se pelaron de forma manual, el material se congeló con nitrógeno líquido y posteriormente se molió hasta obtener polvo fino que fue tamizado a través de una malla # 20. Del material obtenido se pesaron 4 g y se agregaron 20 ml de una solución metanol-agua (50:50 v/v). La suspensión se homogenizó utilizando un agitador magnético durante 20 min a 3°C. La suspensión se centrifugó a 2000xg durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a -15 °C para su posterior uso.

4.6.2 Determinación de proteína

La concentración de proteína en los extractos crudos se cuantificó por el método Bradford (1976). Utilizando el azul brillante de Coomassie (G25 dye) y BSA como estándar de proteína, ambos de BioRad (Hercules, CA).

4.6.3 Determinación de la cantidad de sustrato a utilizar para la actividad de la PFO

Para determinar la cantidad de sustrato a usar en los ensayos se obtuvieron los valores de las velocidades iniciales de reacción a concentraciones del sustrato (catecol) de 0, 1.0, 4.0, 8.0 y 16.0 mM. Inicialmente, se realizó un espectro de absorbancia de 250-700 nm para determinar el pico de mayor absorción del producto de reacción, en el cual se fijó la longitud de onda (λ) de mayor absorbancia del producto generado por la PFO en el extracto crudo sobre el catecol. Con la curva de reacción generada se obtuvieron los valores cinéticos mediante el modelo de Michaelis-Menten.

4.6.4 Determinación de la actividad de la PFO extraída

La determinación de la actividad de la PFO se realizó en un volumen final de reacción de 3 ml, durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción contiene buffer de fosfatos (20 mM, pH 7.5), 14 mM de catecol (pyrocatechol C9510-100G, Sigma-Aldrich, Dermstadt, Germany), ácido ascórbico 5 μ M (PH21008-2G, Sigma-Aldrich, Dermstadt, Germany), cada ensayo se ajustó a 50 ± 2.5 μ g de proteína de extracto crudo (16.66 μ g proteína ml^{-1}). Todas las reacciones se realizaron por triplicado y se determinó midiendo el aumento de absorbancia a una longitud de onda de 435 nm (λ de máxima absorción en este equipo del producto de la reacción) en un espectrofotómetro (UV-Vis, Lambda 365, PerkinElmer, Shelton, Connecticut) con intervalos de tres minutos durante 30 minutos siguiendo la reacción en línea. Se usó un blanco que consistió en 2.7 ml de buffer (20 mM, pH 7.5) y 0.3 ml de sustrato al que no se le agregó extracto. Una unidad de actividad de PFO (U) en el extracto crudo se definió como un aumento de absorbancia de 0.001 (λ_{435}) min^{-1} (Erzengin 2009). La pendiente del cambio de absorbancia por 30 min, es la velocidad de la reacción ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) obtenida por regresión lineal de las tres réplicas de cada muestra. Las unidades de actividad de la PFO (U) para cada muestra se reportaron por mg de proteína (U. mg proteína $^{-1}$) y por gramo de cacao (U.g $^{-1}$) en base seca.

4.7 Determinaciones de variables fisicoquímicas

A los granos secos se les retiró la cascarilla (testa) y el germen de forma manual para obtener los cotiledones, los cuales fueron sometidos a una reducción de partícula (Krupps, GX4100, México) y tamizados a través de una malla # 20 (Montinox, México) en un agitador de tamices (WQS, China). El polvo obtenido fue utilizado para llevar a cabo los análisis fisicoquímicos.

4.7.1 pH del cotiledón

Se pesaron 5 g de cacao, posteriormente se diluyeron en 50 mL de agua destilada hirviendo, mediante agitación por 15 min, inmediatamente se filtró a vacío y se realizó la medición del pH con un potenciómetro (Hanna Instrument, pH211, Rumania) (Senanayake *et al.*, 1997).

4.7.2 Acidez total expresada a través de la acidez libre

Se tomaron 5 g de muestra y se agregaron 50 mL de agua destilada, dejando en agitación durante una hora para homogenización, se filtró al vacío y posteriormente se realizó la titulación potenciométrica con NaOH al 0.1 N hasta alcanzar un valor de pH de 8.3, medido con un potenciómetro (Hanna instrument, pH211, Rumania) (Pontillon, 1999). Los resultados se expresaron en mL de Hidróxido de Sodio gastados para neutralizar la acidez libre (Ecuación 1) contenida en un gramo de cacao (mL de NaOH 0.1 N / g de cacao). Y la acidez total (Ecuación 2)

$$A_L = \frac{(mL NaOH * 0.1 N)}{5} \quad 9$$

El coeficiente de Zeller permite el cálculo para acidez total (A_t):

$$A_t = A_L \left(\frac{1}{0.5792} \right) \quad 10$$

4.7.3 Humedad del cotiledón

Se pesaron 5 g de muestra molida y tamizada, para posteriormente ser depositada dentro de una cápsula a peso constante; la muestra se colocó en una estufa (Felisa, FE-291, México) a una temperatura de 105 °C durante 24 horas hasta alcanzar peso constante. Los resultados se reportaron como contenido de humedad en base seca (g agua g⁻¹ m.s) (Senanayake *et al.*, 1997).

4.7.4 Determinación del contenido fenólico total

Los fenoles totales se determinaron mediante el método de Singleton y Rossi (1965) modificado por Othman *et al.*, (2007). A 200 mg de cacao molido previamente desgrasados por el método de extracción Soxhlet, se le añadió 2 ml de agua destilada agitándose por 2 horas a 200 rpm (Orbit Shaker, 2346, China). La mezcla se centrifugó (HERMLE, Z236K, Alemania) a 7267 x g por 15 min a 25°C. El sobrenadante se considera como extracto de cocoa y fue utilizado para las pruebas de determinación del contenido fenólico total.

Se tomaron 200 μ L del extracto acuoso y se añadió 1.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se mantuvo en reposo durante 5 minutos, pasado el tiempo se agregó 1.5 ml de Na_2CO_3 al 0.566 M dejando reposar 90 min. Para ambos tiempos la solución permaneció en una cámara oscura. De la mezcla resultante se tomó una alícuota de 200 μ l y se ajustó con 1.8 ml de la solución considerada como blanco (Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio), después se centrifugó a 7267 x g durante 10 min a 25°C y posteriormente se tomó la lectura a 725 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, G10S Uv-Vis, China). Los valores se reportaron en miliequivalentes de ácido gálico. La curva de calibración se realizó en un rango de 0.02 a 1.0 mg/mL.

4.7.5 Índice de fermentación

Se solubilizaron 500 mg de cacao desgrasado secado al sol en 50 mL de una solución de metanol-ácido clorhídrico (MeOH-HCl) (97:3 v/v). La solución se almacenó a 8 ± 2 °C por 16-18 h. Después la mezcla se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 1, enseguida se tomaron 4 mL del filtrado y se aforaron a 25 mL con la solución de metanol-ácido clorhídrico (97:3 v/v). A partir de esta solución se tomó la lectura de la absorbancia a 460 nm y 525 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, G10S Uv-Vis, China). El índice de fermentación o encafecimiento fue obtenido por la razón de las absorbancias a 460 nm y 525 nm (Ecuación 3) (Cros *et al.*, 1982).

$$FI = \frac{Abs\ 460}{Abs\ 525} \quad 11$$

4.8 Prueba de corte

La prueba de corte se realizó según el procedimiento descrito por Afoakwa (2014). La prueba consistió en analizar 300 granos del cacao tomados al azar de la muestra, los cuales se colocaron en porciones de 50 granos en una guillotina en la que se realizó un corte longitudinal mediante una cuchilla metálica cortante. Los defectos determinados durante la prueba de corte son: granos violetas, pizarrosos, sobre-fermentados, mohosos, dañados por insectos y germinados. Los resultados se expresaron en porcentaje.

4.9 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier

Caracterización de muestras de grasa de cacao obtenida por soxhlet, polvo de cotiledón desgrasado y polvo de cotiledón fermentado y seco. Las muestras correspondieron a cacao seco obtenido en el último tiempo de secado. 1 g de muestra por triplicado fue analizada en la región de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, con 32 scans por espectro con resolución de 4 cm^{-1} , en un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) (Perkin Elmer, EUA, modelo Spectrum 100), empleando una reflexión total atenuada (ATR) de diamante controlado con software para Windows©. Los datos de los espectros fueron exportados en formato ASCII y analizados utilizando Origen 8.3.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. RESULTADO Y DISCUSIÓN

Los resultados se encuentran divididos en seis apartados que corresponden: 5.1) Actividad de la Polifenol Oxidasa, 5.2) Cambios en las variables fisicoquímicas durante el proceso de fermentación y secado, 5.3) Análisis de Componentes Principales (ACP), 5.4) Pruebas de calidad a través del índice de fermentación y pruebas de corte, 5.5) Dinámica de la temperatura durante la fermentación de cacao y 5.6) Caracterización por espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier en muestras secas finales.

5.1 Actividad de la Polifenol Oxidasa

5.1.1 Determinación de la cantidad de sustrato a utilizar para la actividad de la PFO

La reacción de la PFO se llevó a cabo utilizando concentraciones de catecol de 0.0, 1.0, 4.0, 8.0, 16.0 mM final, bajo las condiciones de reacción descritas en material y métodos. Previo se realizó un escaneado para determinar el pico de absorbancia del producto de la reacción, el escan se realizó de 250-700 nm, el máximo pico obtenido fue a 435 nm. Una vez teniendo este dato se realizó el ensayo del efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción. En la figura 5.1 se observa el cambio de absorbancia para cada concentración de sustrato, obteniendo la pendiente de cada una, de la cual resulta en la velocidad inicial de la reacción, es decir el cambio de absorbancia por unidad de tiempo ($\Delta A_{435} \text{ min}^{-1}$). La velocidad inicial obtenida mediante la regresión lineal para cada concentración utilizando tres replicas se graficó vs la concentración de sustrato (Figura 5.2). En ésta figura obtenemos una curva típica de Michaelis-Menten. Los valores cinéticos de la PFO pueden ser obtenidos mediante el uso directo de la figura 5.2 por una regresión no-lineal utilizando el modelo matemático de Michaelis-Menten, utilizando el paquete PrismaGraph V9, se obtuvieron los valores de $V_{\max} 0.0071 \pm 0.001 \Delta A_{435} \text{ min}^{-1}$ y se obtuvo un K_m de 14.31 ± 2.2 . Se compararon los datos obtenidos con la regresión inversa mediante la linearización Lineweaver-Burk (Figura 5.3), obteniendo los datos de $V_{\max} 0.008 \pm 0.0015$ y un K_m de $12.8 \pm 1.7 \text{ mM}$. Con base a estos resultados, la concentración de sustrato fue fijada para los siguientes ensayos a utilizar a una concentración de 14 mM y una concentración de 16.66 μg de proteína por ml. La constante K_m de Michaelis para catecol obtenida es similar a lo reportado con Lee (1991) que fue de 10.0 mM, encontrando que a concentraciones mayores de sustrato la velocidad inicial cae

debido a la saturación de la PFO por el catecol. Con esta concentración de sustrato podemos realizar un análisis comparativo de la actividad de la PFO en extractos crudos fijando la cantidad de sustrato y la cantidad de proteína.

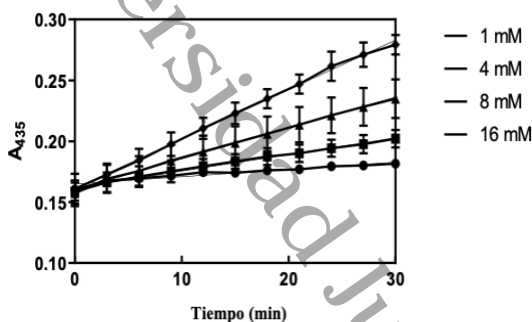


Figura 5.1 Cambio de la absorbancia a diferentes concentraciones de sustrato a una cantidad fija de proteína.

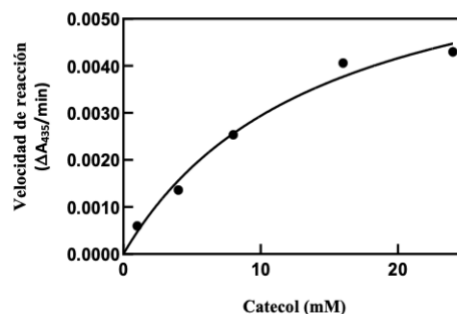


Figura 5.2 Cinética de Michaelis-Menten de la actividad PFO en extractos crudos de cacao.

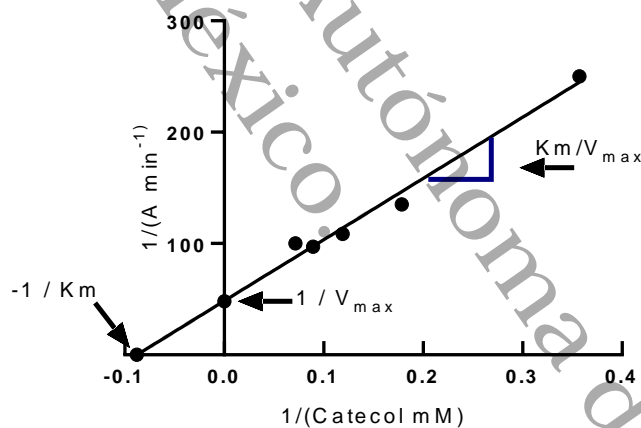


Figura 5.3 Linearización de Lineweaver-Burk de la actividad de la PFO

5.1.2 Actividad enzimática de la PFO durante la fermentación y secado

La actividad de la PFO fue evaluada en U.mg proteína⁻¹ y en U.g⁻¹. Las figuras 5.4 y 5.5 muestran el comportamiento de la actividad de la PFO durante la fermentación y secado de los granos de cacao. La actividad evaluada de la PFO por mg de proteína durante la fermentación presentó cambios entre los tiempos evaluados y los distintos tratamientos y la fermentación testigo (Figura 5.4). Se observó que la actividad de la PFO está presente durante

todo el proceso de fermentación y secado. Durante la fermentación la actividad se mostró sin cambios importantes durante el proceso de fermentación y en los tratamientos. Al inicio de la fermentación, la actividad para el tratamiento uno (T1) fue de 204 U.mg de proteína⁻¹ el tratamiento dos (T2) fue de 182 U.mg de proteína⁻¹ el tratamiento tres (T3) de 200 U.mg de proteína⁻¹ y la fermentación testigo (T4) de 206 U.mg de proteína⁻¹ posteriormente en las siguientes horas de fermentación disminuye ligeramente la actividad y al final de la fermentación el tratamiento uno (T1) tuvo la actividad más alta con 236 U.mg de proteína⁻¹, seguido del tratamiento dos (T2) con una actividad de 222 U.mg de proteína⁻¹, el tratamiento cuatro, nuestra fermentación testigo (T4) con 200 U.mg de proteína⁻¹ y el tratamiento tres (T3) con una actividad de 140 U.mg de proteína⁻¹.

Durante el proceso de secado la enzima continuó activa, teniendo un incremento significativo en la actividad de la PFO a las 81 h. Se puede observar que la actividad final durante secado, el tratamiento uno (T1) fue mayor a la fermentación testigo (T4), siendo similar la actividad del tratamiento dos y el tratamiento cuatro (T2 y T4). El cambio de la actividad de la PFO se observó al comparar la actividad entre la fermentación y el secado, con un incremento de 2 a 3 veces durante el secado para todos los tratamientos y durante el secado la actividad se incrementa a través del tiempo. La actividad mínima durante los dos procesos se mostró a las 96 h de fermentación.

Por otro lado, en la figura 5.5 se observa la actividad de la PFO evaluada en gramos de cacao en base seca, mostrando una actividad similar a la anterior. La enzima se encuentra activa durante los dos procesos. Al inicio de la fermentación la actividad es alta, oscilando entre 12.44 y 14.32 U.g⁻¹, posteriormente hubo una disminución las siguientes horas, permaneciendo constantes. Al final de la fermentación la actividad más alta fue para el tratamiento dos (T2) de 12.02 U.g⁻¹, seguido del tratamiento tres (T3) de 9.68 U.g⁻¹, posteriormente la fermentación testigo (T4) con 8.16 U.g⁻¹ y finalmente el tratamiento uno (T1) con 7.98 U.g⁻¹. Posteriormente se observa un incremento en el secado a partir de las 33 h, concentrando la mayor actividad en este proceso. La actividad máxima fue a las 81 h del secado, el tratamiento uno (T1) con 17.49 U.g⁻¹, el tratamiento dos (T2) 15.37 U.g⁻¹, el tratamiento tres (T3) 21.39 U.g⁻¹ y el tratamiento (T4) que es la fermentación testigo con una actividad de 15 U.g⁻¹, siendo ésta la actividad más baja. Al final del secado, las fermentaciones dirigidas tratamiento uno y tres (T1, T3) obtuvieron mayor actividad, el

tratamiento uno (T1) con 21.79 U.g⁻¹, tratamiento tres (T3) con 14.99 seguidas de la muestra testigo (T4) con 14 U.g⁻¹ y el tratamiento dos (T2) con 13.38 U.g⁻¹. Estos datos difieren con los reportados con Hansen *et al.*, (1998) mencionando que la enzima se inactiva en el proceso de fermentación y secado. Al inicio de la fermentación reporta 4.51 U.g⁻¹, a las 24 h 2.9 U.g⁻¹ y a las 96 h 0.24 U.g⁻¹. Durante el secado artificial y al sol fue inactivada aproximadamente el 50%, 0.38 U.g⁻¹ en secado a sol y 0.50 U.g⁻¹ en secado artificial. Cabe mencionar que en ese estudio el efecto del secado sobre las actividades enzimáticas se estudió en granos de cacao fermentados de 24 h que se prepararon por secado al sol o artificial y no se estudió en detalle el tiempo de secado. Lee (1991), menciona que purificando parcialmente la enzima, la actividad enzimática aumenta aproximadamente siete veces.

La actividad de la PFO en este estudio, inicia al inicio de la fermentación y continúa a través del secado, este proceso puede dar lugar a cambios en las características sensoriales como el sabor y el color (Macedo *et al.*, 2016; Ouattara *et al.*, 2017; El Kiyat *et al.*, 2018). Ésta actividad que se observa se puede deber a que los metabolitos que se produjeron por las levaduras y bacterias durante la fermentación estimularon la actividad de las enzimas (Domínguez-Pérez *et al.*, 2020). Durante la fermentación intervienen microorganismos, como levaduras y bacterias provocando diversas reacciones que influyen en la calidad de los granos de cacao. Posteriormente los azúcares contenidos en el mucílago se oxidan formando etanol y ácido acético que penetran al interior del cotiledón, por lo que hay una disminución del pH e induce a las reacciones enzimáticas para formar los precursores de sabor y aroma (Ouattara *et al.*, 2017). Por otro lado, la actividad enzimática puede diferir según la variedad, zona geográfica, proceso de fermentación, secado, condiciones climáticas, preparación de las muestras, método de extracción y purificación (Macedo *et al.*, 2016).

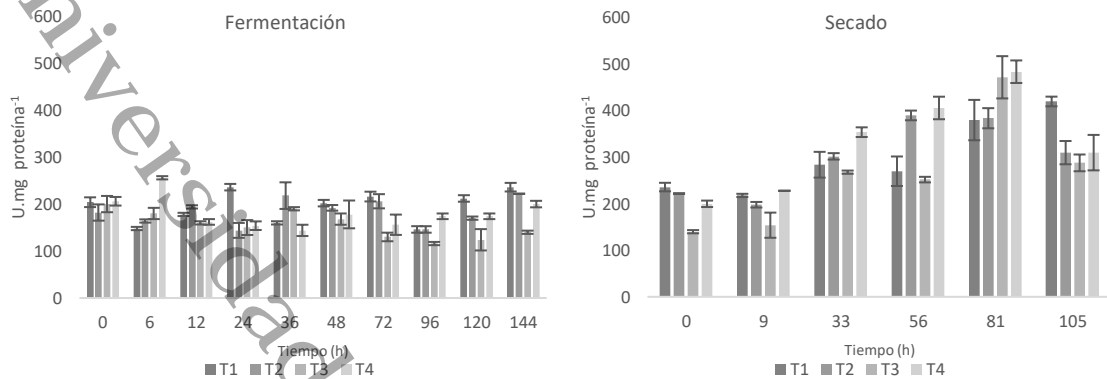


Figura 5.4 Actividad de la PFO por mg de proteína durante la fermentación y secado de cacao

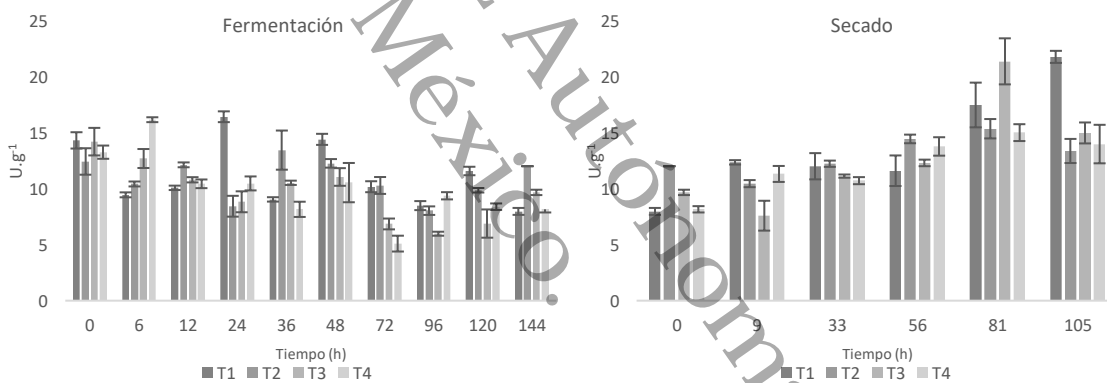


Figura. 5.5 Actividad de la PFO en base seca durante la fermentación y secado de cacao

5.1.3 Comportamiento del contenido de proteína durante la fermentación y secado

El comportamiento del contenido de proteína se midió durante la fermentación y secado (Figura 5.6). Se puede apreciar al inicio de la fermentación un contenido de proteína alto y se mantiene constante las primeras 48 h de fermentación con valores que oscilan entre 0.05 y 0.069 mg. El tratamiento uno (T1) tiene mayor cantidad de proteína con un valor de 0.69 mg de proteína, seguido del tratamiento dos (T2) con 0.063 mg proteína, posteriormente la fermentación testigo (T4) con 0.059 mg proteína y el tratamiento tres (T3) con 0.055 mg

proteína. Posteriormente disminuye ligeramente a las 72 h de fermentación y aumenta las siguientes horas al final de la fermentación. Durante el secado la cantidad de proteína disminuye, pero no parece haber cambios entre los tiempos, sin embargo, se observan diferencias entre los tratamientos y el testigo. Al final del secado los tratamientos uno y tres (T1 y T3) presentan mayor cantidad de proteína con 0.051 y 0.052 mg, seguido del tratamiento cuatro (T4) con 0.045 mg y el tratamiento dos (T2) con 0.043 mg. Este cambio de proteína durante la fermentación ha sido atribuido a la acción de la actividad microbiana en el mucílago y enzimática en el cotiledón (Schwan y Wheals, 2004). La proteína del cacao se ha reportado que contiene 11 a 13% de su peso seco, pudiendo variar y ser afectada por el origen geográfico, clima, suelo, fertilizantes y por la genética del cacao (Rawel *et al.*, 2019).

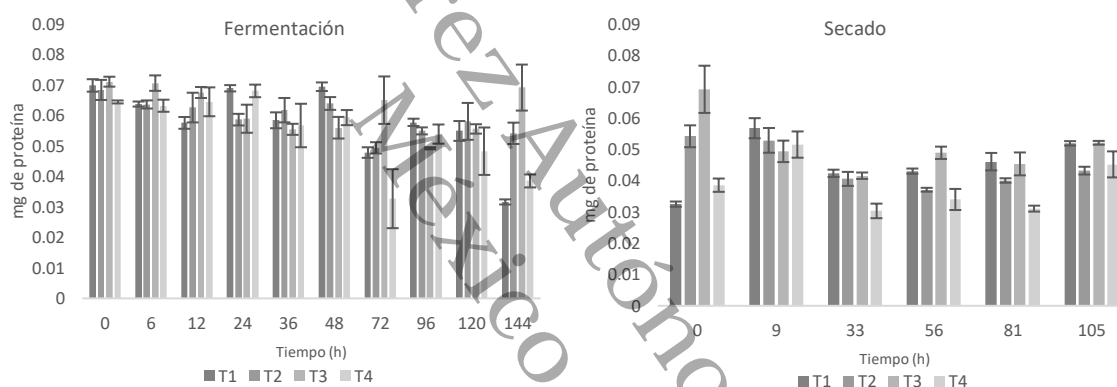


Figura 5.6 Contenido de proteína (mg) durante la fermentación y secado de cacao

5.2 Cambios en las variables fisicoquímicas

5.2.1 Compuestos fenólicos totales durante la fermentación y el secado

El comportamiento del contenido de fenoles totales (CFT) se puede observar en la figura 5.7. Al inicio de la fermentación el CFT fue de 80.52 mg EAG/g y punto de partida para el estudio. A las 6 h es difícil interpretar el resultado, debido a que para el tratamiento uno y dos (T1 y T2) hay una caída abrupta en el CFT, mientras que en el tratamiento tres y cuatro (T3 y T4) se mantuvieron sin cambios aparentes. Los resultados mostraron que de forma general el CFT en la fermentación testigo (T4) se mantuvo siempre por debajo de los otros

tratamientos con excepción del último día (144h) donde los resultados mostraron un incremento por arriba del contenido inicial. En el proceso de secado también el último tiempo registró un aumento considerable con respecto a los valores iniciales (Figura 5.8). Los tratamientos con fermentación dirigida tuvieron la mayor cantidad de fenoles totales. El tratamiento (T1) con 194 mg EAG/g, el tratamiento dos (T2) con 201 mg EAG/g, el tratamiento (T3) con 204 mg EAG/g y la fermentación testigo (T4) con 164 mg EAG/g.

Estos valores difieren con datos reportados por diversos autores (Cross *et al.*, 1982; Efraim *et al.*, 2010; Da silva olyeira *et al.*, 2011; Pallares *et al.*, 2016; Romero-Cortés *et al.*, 2012; Barrientos *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2012) donde se observó que durante el proceso de fermentación el CFT disminuyó durante la fermentación y el secado. Sin embargo, existen estudios donde se ha mostrado un incremento del CFT (Niemenak *et al.*, 2006; Zapata *et al.*, 2013; Ooi *et al.*, 2020).

El aumento de fenoles y las diferencias que existen de las variables fisicoquímicas de los granos de cacao, puede depender de las variedades, clones de cacao, de la zona geográfica, proceso y tipo de fermentación, manejo agronómico, variables ambientales, etc. Ooi *et al.*, (2020) en su estudio con fermentación dirigida menciona que los altos compuestos fenólicos que se encuentran en los granos de cacao fermentados con inoculos posiblemente podría deberse a la liberación de los compuestos fenólicos que estaban ligados a la estructura celular de los granos de cacao. Estos compuestos fenólicos se unen inicialmente al azúcar, lo que reduce su disponibilidad. Durante la fermentación, los microorganismos en el mucílago son capaces de hidrolizar fenoles complejos en fenoles simples solubles que se absorben fácilmente, lo que lleva a un aumento del contenido fenólico de las semillas de cacao. De igual forma la degradación de la estructura celular de los granos de cacao, que ocurre durante el secado, también liberaría los compuestos fenólicos unidos, lo que conduciría al incremento del contenido fenólico. Por último y como un factor de gran importancia es, si el análisis se realizó sobre granos secos al sol o bajo alguna técnica de secado artificial a condiciones de temperatura por arriba de 50°C con o sin corriente convectiva. Otra causa probable en los resultados que se presentan en la literatura científica con respecto al comportamiento durante la fermentación son las condiciones de análisis de estos componentes dada la alta sensibilidad a luz y al calor.

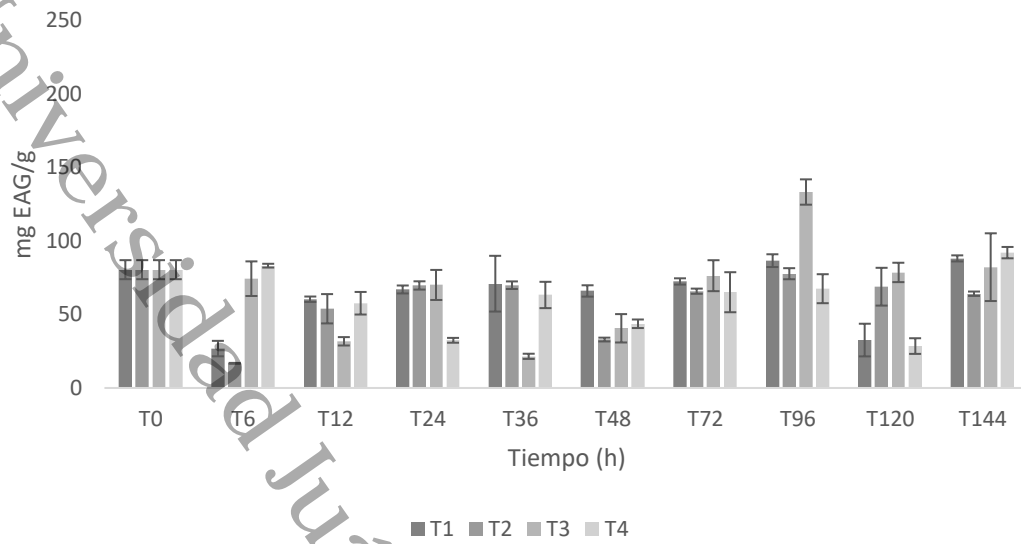


Figura 5.7 Variación del contenido de compuestos fenólicos totales durante la fermentación de granos de cacao.

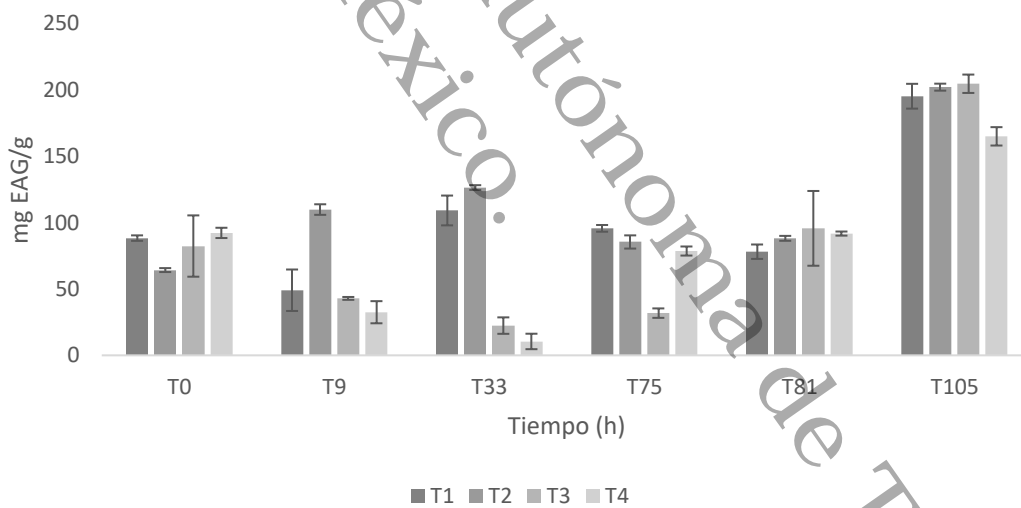


Figura 5.8 Variación del contenido de compuestos fenólicos totales durante el secado de granos de cacao.

5.2.2 Variación del pH durante la fermentación y el secado

El comportamiento del pH durante la fermentación y secado se muestran en las figuras 5.9 y 5.10.

Durante la fermentación la evolución del pH para los distintos tratamientos fue sin cambios importantes, disminuyendo de un valor de 6.49 aproximado a 4.63 a las 72 y 96 h de fermentación, lo cual concuerda con resultados descritos por Saltini *et al.*, (2013); posteriormente el pH aumenta hasta alcanzar valores de 6.65 al final de la fermentación, similares a los reportados por Do Carmo Brito *et al.*, (2017).

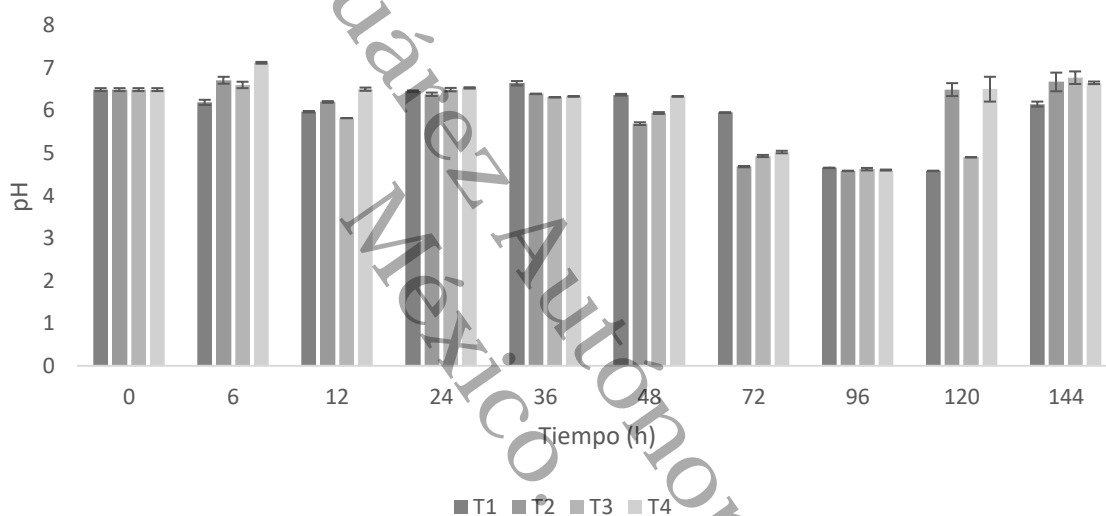


Figura 5.9 Variación de pH durante la fermentación de granos de cacao de los diferentes tratamientos

Durante el secado el pH mostró una disminución solamente durante las primeras horas de secado de forma equivalente en todos los tratamientos entre los tiempos cero y nueve horas como se muestra en la figura 5.10. El comportamiento del pH posterior a las nueve horas durante el secado al sol para todos los tratamientos osciló entre 5.78 y 5.95. Se puede observar que el pH final para granos de cacao fermentados y secos para la muestra testigo (T4) fue de 5.87, para el tratamiento uno (T1) fue de 6.06, para el tratamiento dos (T2) fue de 5.94 y el tratamiento tres (T3) de 5.8, lo que indica valores ligeramente superiores.

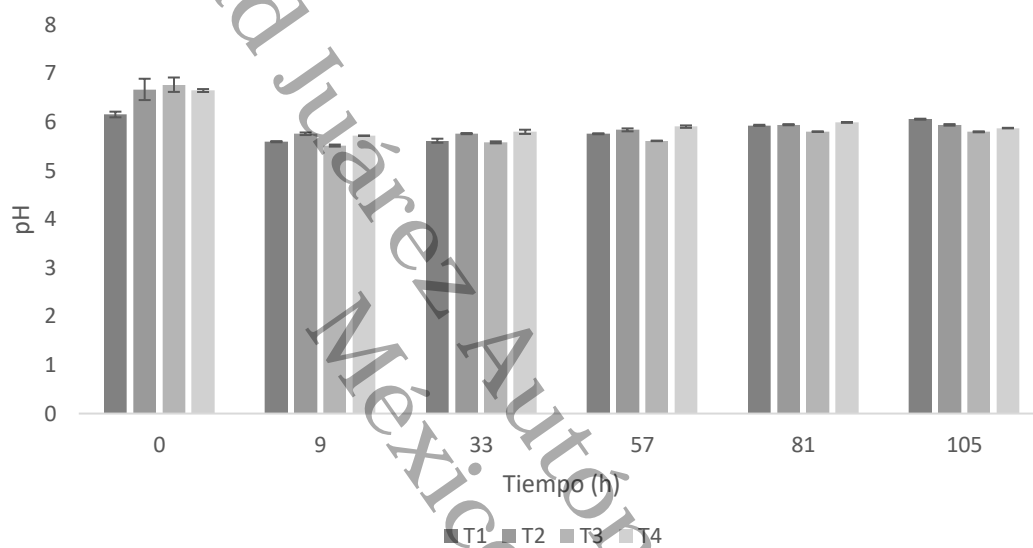


Figura 5.10 Variación de pH durante el secado de granos de cacao de los diferentes tratamientos

Los cambios en pH son función de la acción microbiana en el mucílago y que migran al interior del cotiledón. Una gran cantidad de metabolitos se forman entre los que destacan principalmente alcoholes y ácidos que afectarán el cotiledón a nivel celular provocando los cambios que permitan el desarrollo de los precursores de aroma (Kongor *et al.*, 2016). Muchas sustancias están involucradas que forman distintas clases químicas (aldehídos, cetonas, pirazinas, compuestos fenólicos, furanos, etc), sin embargo, su concentración es pequeña con respecto a sustancias como los alcoholes y ácidos orgánicos formados en el mucílago, por lo que la contribución a los cambios en pH son por estas sustancias. En el siguiente apartado se comentará sobre los cambios en acidez que provocan los cambios en pH.

5.2.3 Acidez total durante la fermentación y el secado de cacao

En las figuras 5.11 y 5.12 se muestra la acidez total durante la fermentación y secado de los granos de cacao. Se observó que durante el transcurso de la fermentación (Figura 5.11), la acidez presentó cambios durante todo el proceso de fermentación para todos los tratamientos. Estos cambios se encuentran en función de la actividad metabólica de los microorganismos que actúan en el mucílago y que se difunden al interior del cotiledón. Los cambios en acidez provocan ruptura celular lo que ocasiona liberación de sustancias e intercambio de fases (inversión de fase de manteca), estos cambios son de importancia vital debido a el intercambio entre enzimas y sustratos (Hansen *et al.*, 1998). Un máximo de acidez se registró a las 96 h de fermentación para el tratamiento tres (T3) de 3.62 (ml NaOH 0.1 N g⁻¹), mientras que para los demás tratamientos la acidez osciló entre 3.156 y 3.50 (ml NaOH 0.1 N g⁻¹). Al final de la fermentación la acidez alcanzó valores de 0.352 a 0.674 (ml NaOH 0.1 N g⁻¹).

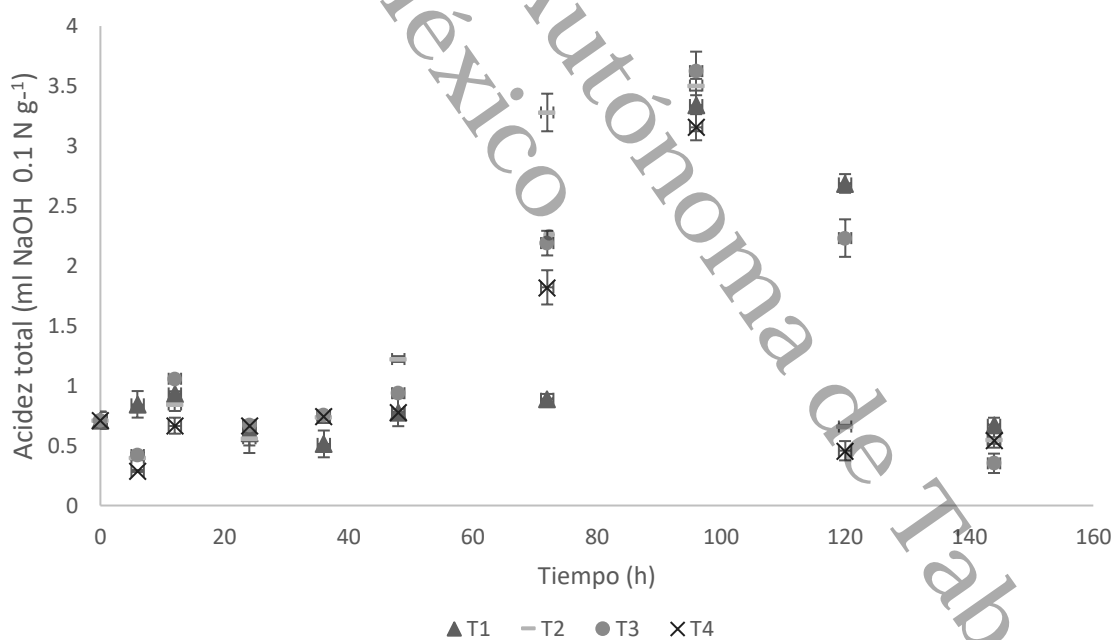


Figura 5.11 Variación de acidez durante la fermentación de granos de cacao de los diferentes tratamientos

En el secado los cambios entre los tratamientos son similares y de forma similar al pH. El principal cambio apreciable fue entre las cero y nueve horas (Figura 5.12). Lo anterior, está asociado que la mayor parte de agua libre se elimina en las primeras horas y en paralelo otros compuestos volátiles principalmente ácido acético como ha sido referenciado en trabajos sobre secado de cacao (Páramo *et al.*, 2010, García-Alamilla, *et al.*, 2007; Hii *et al.*, 2009). La acidez final de granos de cacaos secos y fermentados a las 105 h para los cuatro tratamientos osciló entre 1.428 y 1.633 (ml NaOH 0.1 N g⁻¹).

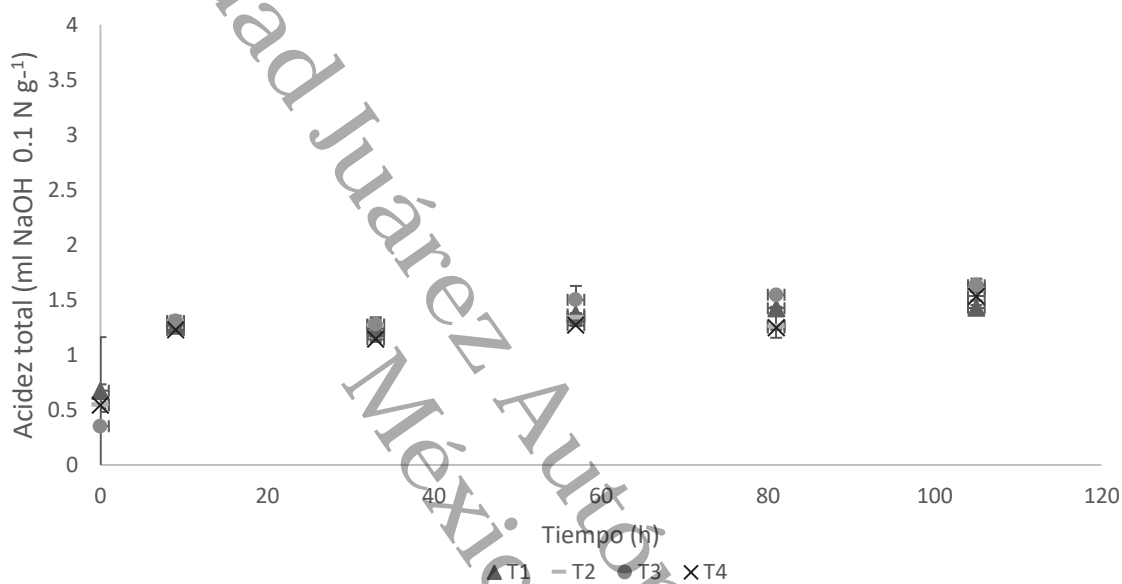


Figura 5.12 Variación de acidez durante el secado de granos de cacao de los diferentes tratamientos

5.3 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) se llevó a cabo con siete variables de respuesta durante las cinéticas de la fermentación y secado de cacao por cada tratamiento y la fermentación testigo para establecer los cambios que se producen en la actividad enzimática y fisicoquímicas. Los datos experimentales se normalizaron y la matriz resultante por cada tratamiento durante la fermentación fue de 7x10 (7 variables de respuestas: “U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹, mg proteína, pH, Acidez, Humedad y Contenido fenólico total” x 10 tiempos evaluados). Para la cinética de secado los datos experimentales se normalizaron y la matriz resultante por cada tratamiento de fermentación fue de 7x6 (7 variables de respuestas:

“U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹, mg proteína, pH, Acidez, Humedad y Contenido fenólico total” x 6 tiempos evaluados).

En la tabla 5.1 se puede observar el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para el tratamiento uno (T1). Los resultados del análisis encontraron que los tres primeros componentes principales (CP) agrupan el 85.25% de la variabilidad durante la cinética de fermentación. El análisis del primer componente principal (CP1) describe el 42.41% de la variación total, descrita por cinco de las variables evaluadas en el presente estudio con excepción de U.mg proteína⁻¹ y el contenido fenólico total, en este caso todas las variables mostraron una correlación positiva en este eje con excepción de la humedad y acidez. El segundo componente principal (CP2) describió el 25.36% y fue principalmente descrito por las variables que corresponden a U.mg proteína⁻¹, mg de proteína, acidez, la humedad y el contenido fenólico total. Dos correlaciones fueron positivas y tres negativas que corresponden a U.mg de proteína⁻¹, humedad y contenido fenólico total. El tercer componente principal (CP3) contribuyó con 17.47% y las variables que contribuyeron a la descripción fueron U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹ y pH. La única variable que contribuyó de forma positiva fue el pH.

Tabla 5.1 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento uno (T1) durante la fermentación.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	2.9689	1.7756	1.2235	0.8109	0.1874
Varianza absoluta	42.414	25.366	17.479	11.584	2.678
Varianza acumulada	42.4137	67.7801	85.2591	96.8434	99.521
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.1229	-0.5262	-0.5829	-0.1871	-0.3052
U.g ⁻¹	0.4349	0.0677	-0.5829	0.0732	0.0851
mg proteína	0.3936	0.4752	-0.2080	0.02394	0.4345
pH	0.4700	-0.2833	0.3603	-0.1346	0.3051
Acidez	-0.4552	0.3441	-0.2909	0.2665	-0.0993
Humedad	-0.4611	-0.3108	-0.2289	-0.1537	0.7793
Contenido fenólico total	0.0119	-0.4443	0.0838	0.8886	0.0225

En la siguiente tabla (5.2) los resultados de los análisis de componentes del tratamiento 2 (T2), se encuentra que los tres primeros componentes principales agrupan el 87% de la variabilidad de los datos durante la cinética de fermentación. El análisis del primer componente principal (CP1) describe el 47% de la variación total, tiene asociaciones positivas altas con U.g⁻¹, mg de proteína pH y contenido fenólico y solo una negativa grande con acidez. El segundo componente principal (CP2) describió el 21% que corresponden a las variables U.mg proteína⁻¹ y U.g⁻¹, siendo estas negativas. El tercer componente principal (CP3) describe el 17% y las variables principales fueron mg proteína, pH, humedad y contenido fenólico. Todas las variables tuvieron correlación positiva con excepción de los mg de proteína.

Tabla 5.2 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento dos (T2) durante la fermentación.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	3.3599	1.5119	1.2393	0.5448	0.2936
Varianza absoluta	47.999	21.708	17.705	7.837	4.196
Varianza acumulada	47.999	69.707	87.413	95.250	99.445
	Eigenvectores				
U.mg proteína ⁻¹	0.2072	-0.7229	0.2045	-0.0280	0.0117
U.g ⁻¹	0.4013	-0.5349	-0.0684	-0.0533	-0.1195
mg proteína	0.3832	0.1848	-0.4837	-0.1942	-0.6963
pH	0.4607	0.2515	0.3077	-0.3089	0.2136
Acidez	-0.4812	-0.2507	-0.2007	0.2896	-0.2751
Humedad	-0.2851	0.0157	0.6768	-0.3377	-0.5708
Contenido fenólico total	0.3519	0.1750	0.3554	0.8156	-0.2309

En la tabla 5.3 se puede observar el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para el tratamiento tres (T3). Los resultados muestran que los primeros dos componentes principales agrupan el 75 % de la variabilidad durante la cinética de fermentación. El análisis del primer componente principal (CP1) contribuye al 58% de la variación, descrita por cuatro variables positivas, las cuales son: U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹, mg proteína, pH y una negativa, acidez. El segundo

componente principal (CP2) describe el 17% de la variación total, asociadas solo por dos variables, humedad positiva y U.mg proteína⁻¹ negativa.

Tabla 5.3 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento tres (T3) durante la fermentación.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	4.0921	1.1971	0.9201	0.4316	0.3005
Varianza absoluta	58.459	17.102	13.145	6.166	4.293
Varianza acumulada	58.459	75.562	88.707	94.873	99.166
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.4214	-0.3886	0.0123	-0.0908	-0.4870
U.g ⁻¹	0.4502	-0.2322	0.1943	-0.0742	-0.3945
mg proteína	0.3140	0.2525	0.5946	0.6602	0.1345
pH	-0.4468	0.1051	0.0294	-0.4832	0.4534
Acidez	-0.4701	-0.1499	0.1071	0.1324	-0.3644
Humedad	0.1241	0.8283	-0.2020	-0.1098	-0.4913
Contenido fenólico total	-0.2914	-0.1075	0.7451	-0.5358	-0.0951

En la tabla 5.4 se observa el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para la fermentación testigo (T4). Los resultados muestran que los primeros tres componentes principales representan el 91% de la variabilidad durante la cinética de fermentación. El análisis del primer componente especifica el 53% de la variabilidad, descrita por cinco variables. Las variables positivas fueron U.g⁻¹, mg proteína y pH. Las variables negativas fueron acidez y humedad. El segundo componente principal (CP2) describió el 21% y fue principalmente descrito por las variables que corresponden a U.mg proteína⁻¹, mg de proteína, acidez, humedad y contenido fenólico total. Dos correlaciones fueron positivas y tres negativas que corresponden a U.mg de proteína⁻¹, humedad y contenido fenólico total. El tercer componente contribuye al 15% de la variabilidad. Solo el pH tuvo una correlación positiva y otras dos variables negativas fueron la U.mg proteína⁻¹ y U.g⁻¹.

Tabla 5.4 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento cuatro (T4) durante la fermentación.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	3.7728	1.5321	1.0717	0.4581	0.1229
Varianza absoluta	53.898	21.888	15.310	6.545	1.756
Varianza acumulada	53.898	75.785	91.096	97.641	99.397
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.1228	-0.5262	-0.5828	-0.1871	-0.3051
U.g ⁻¹	0.4348	0.06767	-0.5858	0.0732	0.0850
mg proteína	0.3935	0.4752	-0.2079	0.2394	0.4344
pH	0.4700	-0.2832	0.3602	-0.1345	0.3051
Acidez	-0.4551	0.3441	-0.2908	0.2664	-0.0992
Humedad	-0.4611	-0.3108	-0.2288	-0.1537	0.7793
Contenido fenólico total	0.0119	-0.4443	0.0837	0.8885	0.0224

En la tabla 5.5 se puede observar el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para el tratamiento uno (T1). Los resultados del análisis encontraron que los dos primeros componentes principales (CP) agrupan el 86.17% de la variabilidad durante la cinética de secado. El análisis del primer componente principal (CP1) contribuye al 58% de la variación total, descrita por cinco variables. De las cuales cuatro tuvieron correlaciones positivas, U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹, acidez y contenido fenólico. Solo humedad fue negativa. El análisis del segundo componente describe el 27% de la variabilidad descrita por las variables que corresponden a mg proteína, pH, acidez y contenido fenólico total. Dos correlaciones fueron negativas y dos positivas que corresponden a las variables pH y contenido fenólico total.

Tabla 5.5 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento uno (T1) durante el secado.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	4.0777	1.954	0.399	0.384	0.165
Varianza absoluta	58.254	27.917	5.713	5.499	2.358
Varianza acumulada	58.254	86.170	91.883	97.382	99.741
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.4544	0.1941	-0.1163	0.1489	-0.6461
U.g ⁻¹	0.4837	-0.0086	-0.1881	-0.1821	-0.3176
mg proteína	0.2676	-0.5036	-0.3460	-0.6362	0.2219
pH	0.0968	0.6574	-0.4852	-0.0949	0.3154
Acidez	0.3792	-0.4062	0.1804	0.4211	0.1407
Humedad	-0.4627	-0.0584	0.0941	-0.4100	-0.5358
Contenido fenólico total	0.3473	0.3283	0.7445	-0.4305	0.1611

En la tabla 5.6 se observa el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para el tratamiento dos (T2). Los resultados del análisis encontraron que los dos primeros componentes principales (CP) agrupan el 83% de la variabilidad durante la cinética de secado. El análisis del primer componente principal (CP1) describe el 57% de la variabilidad, descritas por las variables del presente estudio, excepto contenido fenólico total. Tres variables tuvieron correlación positiva, las cuales fueron, U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹ y acidez. Las otras tres fueron negativas. El análisis del componente dos (CP2) contribuye al 25% y las variables asociadas positivas fueron U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹ y pH y dos variables negativas, acidez y contenido fenólico total.

Tabla 5.6 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento dos (T2) durante el secado.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	4.033	1.780	0.831	0.242	0.086
Varianza absoluta	57.626	25.438	11.881	3.466	1.235
Varianza acumulada	57.625	83.064	94.945	98.410	99.645
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.4300	0.3598	0.1280	0.0011	0.2457
U.g ⁻¹	0.3701	0.4675	-0.1252	0.3060	0.4805
mg proteína	-0.4308	-0.1634	-0.2630	0.7591	0.2520
pH	-0.3056	0.4076	-0.6034	-0.2842	-0.0126
Acidez	0.4058	-0.4138	0.0798	0.2478	-0.0433
Humedad	-0.4227	-0.0478	0.5164	-0.2560	0.6462
Contenido fenólico total	0.2357	-0.5343	-0.5113	-0.3495	0.4749

En la tabla 5.7 se observa el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para el tratamiento tres (T3). Los resultados del análisis encontraron que los dos primeros componentes principales (CP) agrupan el 84% de la variabilidad durante la cinética de secado. El análisis del primer componente principal (CP1) describe el 57% de la variabilidad descritas por seis variables. Tres variables tuvieron correlaciones positivas, U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹ y acidez. Las demás variables fueron negativas, mg proteína, pH y humedad. El segundo componente principal (CP2) contribuye al 27% de la variabilidad, descritas por cuatro variables positivas, U.g⁻¹, mg proteína, pH y contenido fenólico total.

Tabla 5.7 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento tres (T3) durante el secado.

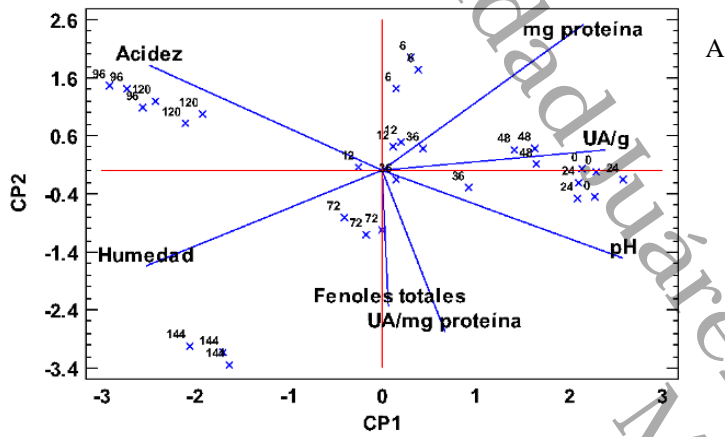
Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	4.048	1.890	0.808	0.1626	0.069
Varianza absoluta	57.838	27.013	11.556	2.323	0.995
Varianza acumulada	57.838	84.851	96.407	98.730	99.725
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.4274	0.1808	-0.4851	0.0015	0.3201
U.g ⁻¹	0.3870	0.3540	-0.4341	-0.1023	0.1185
mg proteína	-0.3614	0.4358	0.0971	-0.7930	0.1700
pH	-0.3256	0.5051	-0.2514	0.3294	-0.4767
Acidez	0.4542	-0.1917	0.3023	-0.2549	-0.0756
Humedad	-0.4470	-0.2430	-0.2156	0.1912	0.6810
Contenido fenólico total	0.1569	0.5485	0.6046	0.3878	0.3970

En la tabla 5.8 se observa el porcentaje acumulado en función del número de componentes de acuerdo al análisis de componentes principales para la fermentación testigo (T4). Los resultados del análisis encontraron que los tres primeros componentes principales (CP) agrupan el 96 % de la variabilidad durante la cinética de secado. El análisis del primero componente principal (CP1) describe el 53% de la variabilidad total, asociadas con cinco variables del presente estudio, U.mg proteína⁻¹, U.g⁻¹, pH, acidez y humedad. Tres correlaciones positivas y dos negativas que estas últimas corresponden a pH y humedad. El análisis del componente principal dos (CP2) contribuye el 22% de la variabilidad y se asocia con cuatro variables, dos con correlaciones positivas, mg proteína y acidez; las otras dos negativas, mg proteína y pH. El análisis del componente principal tres (CP3) describe el 20% y se asocia con 2 variables positivas, pH y contenido fenólico total.

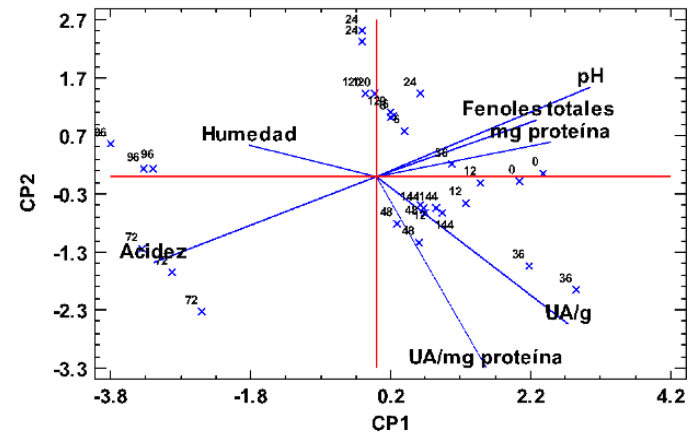
Tabla 5.8 Componentes principales mostrando los eigenvalores, proporción de variación y eigenvectores del Tratamiento cuatro (T4) durante el secado.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Valor propio	3.734	1.5742	1.417	0.244	0.020
Varianza absoluta	53.353	22.489	20.250	3.499	0.287
Varianza acumulada	53.353	75.842	96.091	99.591	99.878
Eigenvectores					
U.mg proteína ⁻¹	0.4160	-0.3989	-0.2024	0.4086	0.3254
U.g ⁻¹	0.4935	0.0231	0.0431	0.5777	-0.4520
mg proteína	-0.1033	0.7186	0.2570	0.4510	0.4145
pH	-0.3214	-0.4214	0.4692	0.2795	0.2981
Acidez	0.4539	0.3554	-0.0766	-0.2911	0.1117
Humedad	-0.4741	0.1408	-0.2609	0.3255	-0.5253
Contenido fenólico total	0.1959	-0.0061	0.7726	-0.1639	-0.3748

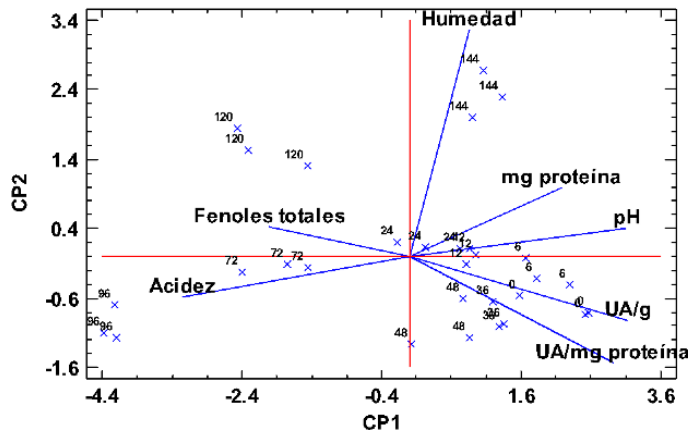
Las figuras 5.13 y 5.14 describen la distribución del tiempo como variables repetida y las variables de respuestas mostrando el peso de los dos componentes principales obtenidos de las desviaciones normalizadas.



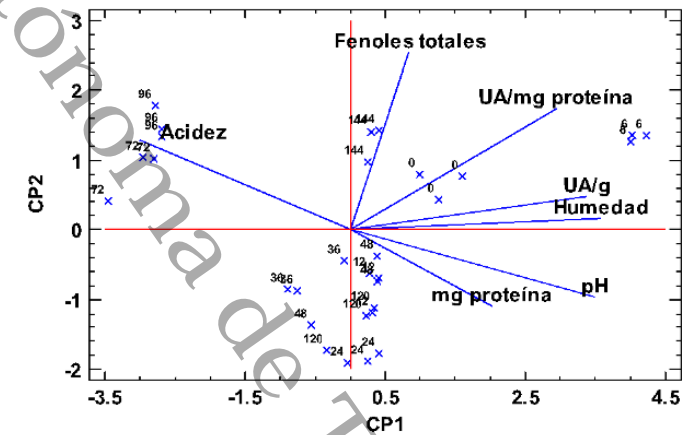
A



B



C



D

Figura 5.13 Gráficos de puntuaciones y cargas de los tratamientos T1(A), T2(B), T3(C) y T4(D) en fermentación.

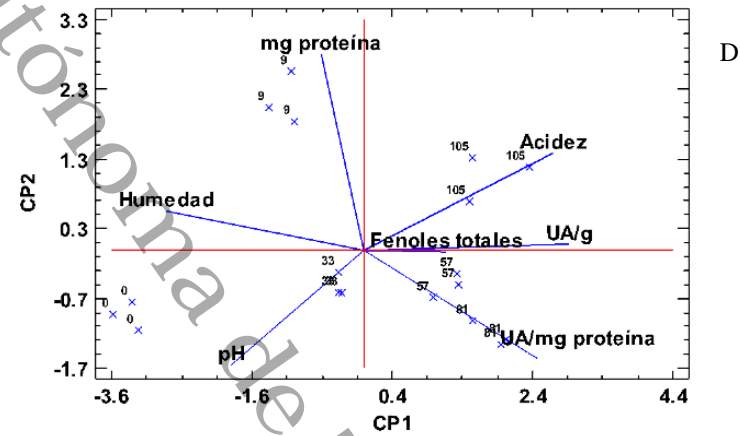
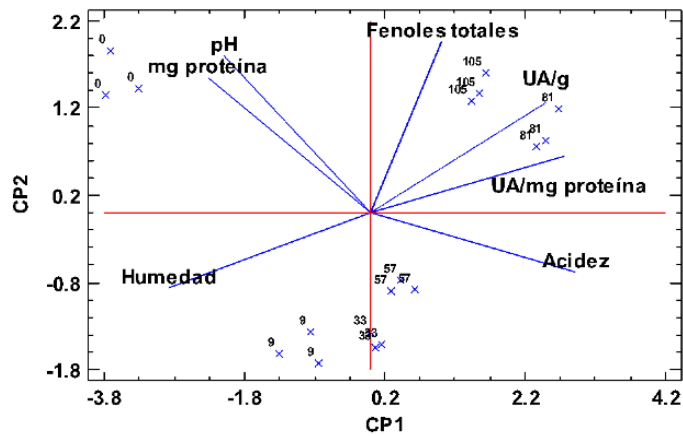
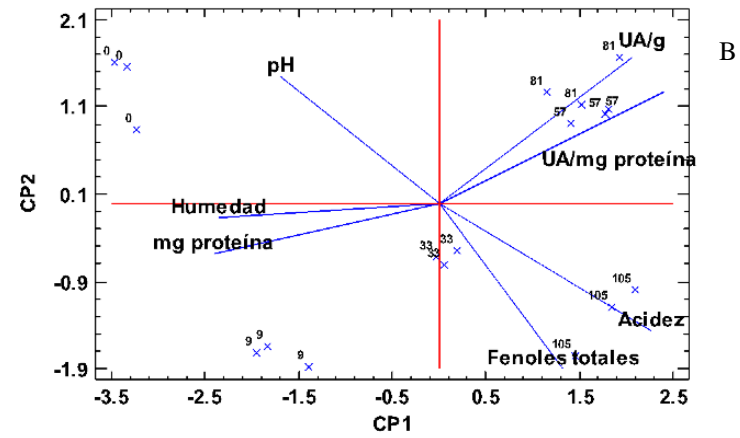
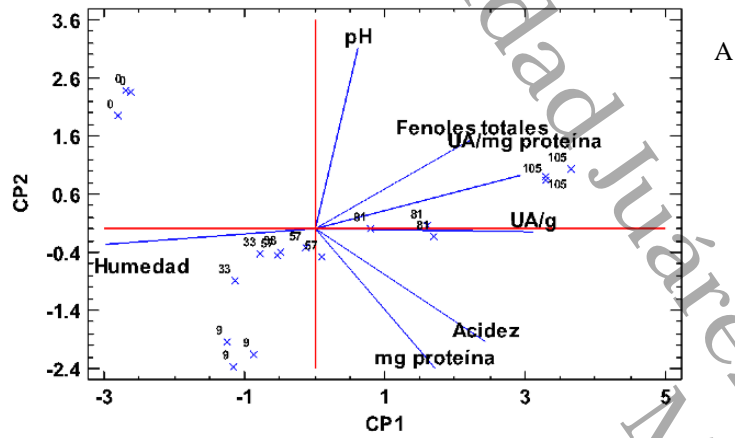


Figura 5.14 Gráficos de puntuaciones y cargas de los tratamientos T1(A), T2(B), T3(C) y T4(D) en secado.

5.4 Pruebas de calidad

5.4.1 Índice de fermentación

Se determinó el índice de fermentación en granos de cacao secos durante el último día de secado. Esta prueba se lleva a cabo en cacao desgrasado para establecer la contribución de antocianinas (525 nm) y los productos cafés de condensación de los flavonoides (460 nm). Los resultados se observan en la figura 5.15. El tratamiento dos y tres (T2 y T3) muestran un índice de fermentación de 1.13 y 1.1, siendo similares a los reportados por Romero-Cortes *et al.*, 2013 y Kongor *et al.*, 2013 que indican que los valores del índice de fermentación ≥ 1 son granos de cacao bien fermentados. Por otra parte, el valor del IF del tratamiento uno (T1) fue de 0.937 y para el tratamiento cuatro (T4) un IF de 0.96, lo que indica que la fermentación no fue completa. Este índice debe estar correlacionado con la prueba de corte que señala el porcentaje de granos adecuadamente fermentados.

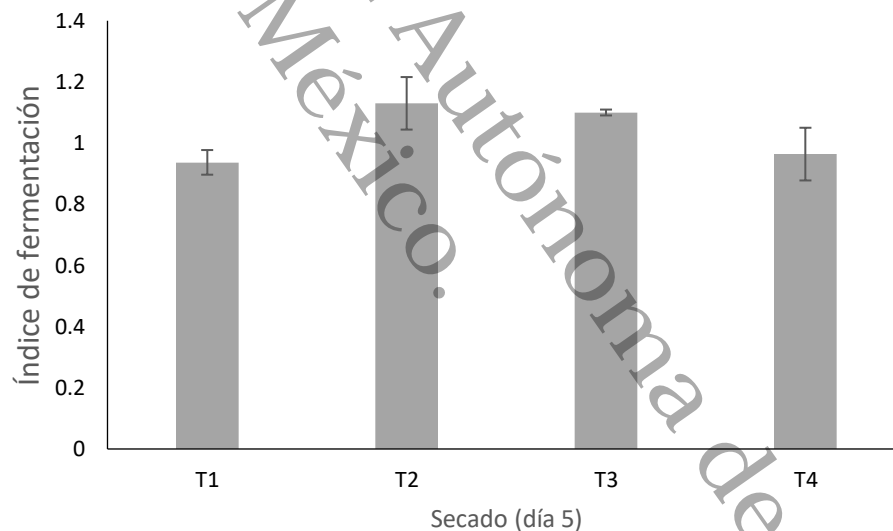


Figura 5.15 Índice de fermentación en granos de cacao secos

5.4.2 Prueba de corte

La figura 5.16 muestra los resultados de la prueba de corte en los granos de cacao fermentados y secos para todos los tratamientos. Los resultados en los tratamientos con fermentación dirigida con consorcios microbianos a partir de la prueba de corte registraron

porcentajes mayores a 80% de granos bien fermentados, mientras que en la fermentación testigo (T4) los granos bien fermentados fue de un 67%. Este resultados esta correlacionado con el valor por debajo de uno de la prueba de índice de fermentación para este tratamiento.

El tratamiento dos (T2) resultó mejor en granos de cacao bien fermentados con 88%, sin embargo se detectó un 2% de granos con moho que puede causar sabores desagradables durante el procesamiento del cacao. El siguiente tratamiento con granos de cacao bien fermentados es el tratamiento tres (T3) con un porcentaje de 85% seguido del tratamiento uno (T1) con un 81%. La fermentación natural que es nuestra testigo (T4) mostró el porcentaje más bajo en granos bien fermentados y los valores más altos en cuanto a los granos ligermante fermentados (26%) y con moho interno (7%). La prueba de corte indicó que no hubo granos pizarrosos en los diferentes tratamientos, lo que permite establecer que los granos en los tratamientos provenían de frutos con buen estado de maduración.

El porcentaje de granos bien fermentados en este estudio es mayor a lo reportado por Kongor *et al.*, (2013), donde se describe que los granos marrones tuvieron un 40.33% y un 48.67% de granos de cacao purpuras pálidos, aunque este autor menciona que los granos de cacao purpuras pálidos no son granos defectuosos, ya que cambian a granos marrones durante el almacenamiento. Por otro lado, el porcentaje de granos marrones aumenta con un rango de 60.67 y 76.33 % almacenando las mazorcas durante 3, 7 y 10 días. De igual manera, los resultados de este estudio son mayores con lo reportado por Ortiz de Bertorelli *et al.*, (2009) con valores que oscilan entre 69.83% y 74.17% con fermentación natural y con diferentes tratamientos de almacenamiento y frecuencia de remoción. Otro estudio realizado por Ho *et al.*, (2015) con fermentacion inoculada de granos de cacao, la prueba de corte mostró que todos los granos secos y fermentados estaban completamente marrones y libres de moho visible. Schwan (1998) realizó prueba de corte para granos de cacao fermentados con consorcios microbianos encontrando a través de la prueba de corte porcentajes que oscilaban entre 90 y 98% para diferentes tratamientos.

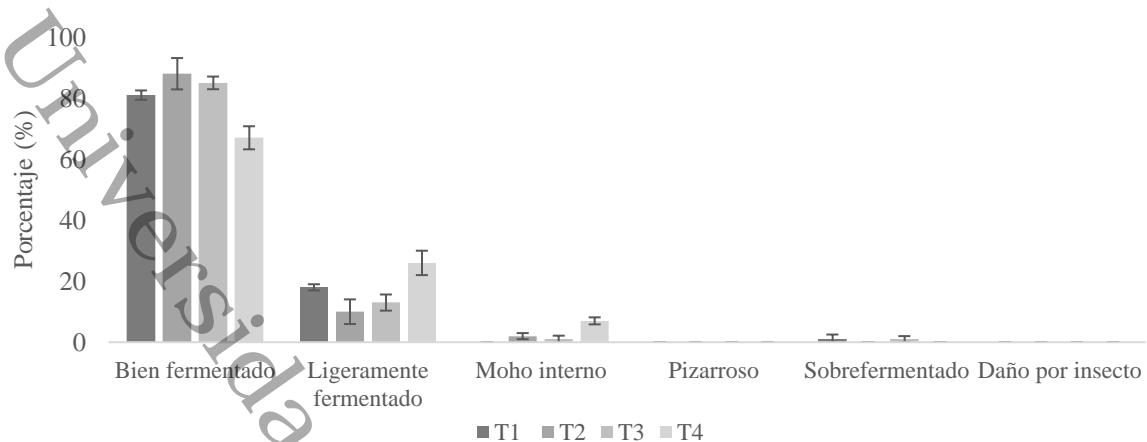


Figura 5.16 Porcentaje de la prueba de corte

5.5 Dinámica de la temperatura durante la fermentación de cacao

En la figura 5.17 se observa el cambio de la temperatura durante la fermentación de los granos de cacao de los diferentes tratamientos. El efecto de la temperatura del tratamiento uno (T1), se observa que las primeras 48 h la temperatura es de 32 a 35 °C, posteriormente aumenta hasta alcanzar su máximo de 45°C al cuarto día y disminuye a 40°C al final de la fermentación. La temperatura en el tratamiento dos (T2) durante la fermentación inicial fue de 31°C y aumenta al tercer día con una temperatura de 44°C y al final de la fermentación disminuye con 34°C. Para el tratamiento tres la temperatura osciló entre 30 y 35°C los primeros días y fue aumentando hasta llegar a la temperatura máxima de 44°C al cuarto día y finalmente disminuye al final de la fermentación con una temperatura de 34°C. El aumento de la temperatura máxima de 40° C a 45°C se debe a que el etanol de las levaduras se oxida a ácido acético por las bacterias ácido acéticas en un proceso exotérmico que inicia este aumento de temperatura en la masa fermentadora de los granos de cacao (Sandhya *et al.*, 2016). La temperatura para la fermentación testigo se observa en la figura 5.17D. Se aprecia al inicio de la fermentación que la temperatura va aumentando de forma gradual en comparación con los diferentes tratamientos con consorcios microbianos que parece llevar una temperatura constante los primeros días. Durante las primeras 48 h la temperatura fue de 31°C a 40°C, posteriormente siguió aumentando hasta llegar a una temperatura máxima de 46°C, disminuyendo hacia el último día de la fermentación, alcanzando una temperatura de

28°C a comparación de los otros tratamiendos. La disminución de temperatura está asociada al crecimiento de hongos que rápidamente colonizan durante la fermentación y que al penetrar en el cotiledón dejan una huella que se aprecia en la prueba de corte. Además, la presencia de hongos deja un sabor característico que se percibe claramente durante las pruebas de evaluación sensorial. Los cambios de temperatura se ven afectados por las condiciones climáticas entre las temporadas de cosecha y también por la cantidad de cacao a fermentar en las cajas de madera, además de un buen aislamiento de la caja de fermentación. Para el caso de nuestro experimento, las condiciones ambientales jugaron un papel fundamental, debido a que un frente frío mantuvo temperaturas atípicas que oscilaron por las noches en aproximadamente entre 16-18°C.

También se puede comparar el comportamiento de la temperatura respecto al tiempo comparando el área total bajo la curva de la temperatura durante el proceso de fermentación. Se puede apreciar en la tabla 5.9 que el área total del tratamiento dos (T2) fue mayor con un área de 1509.04 °C/h, seguido del tratamiento uno (T1) con 1485.24 °C/h, el tratamiento cuatro (T4) con 1446.32 °C/h y por último el tratamiento tres (T3) con 1305.99 °C/h.

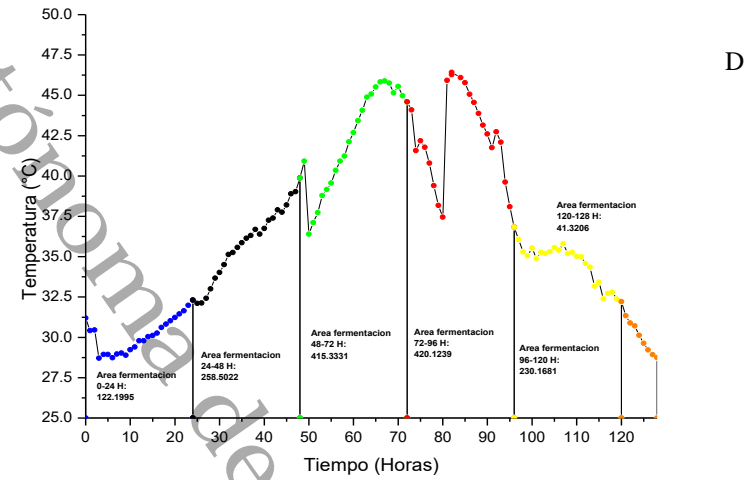
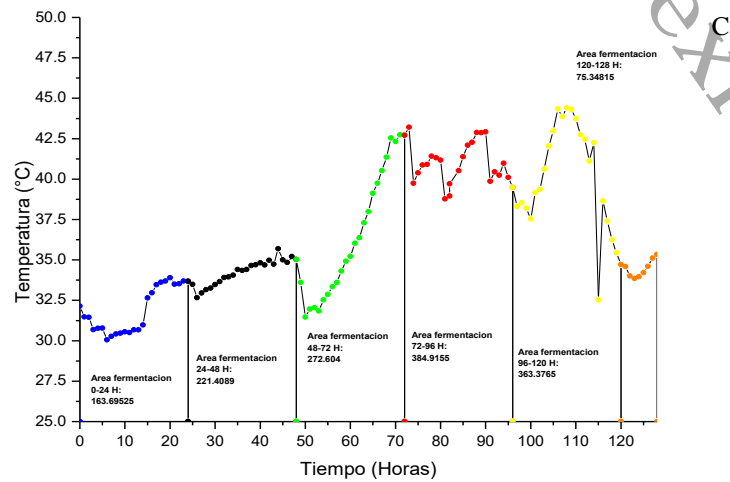
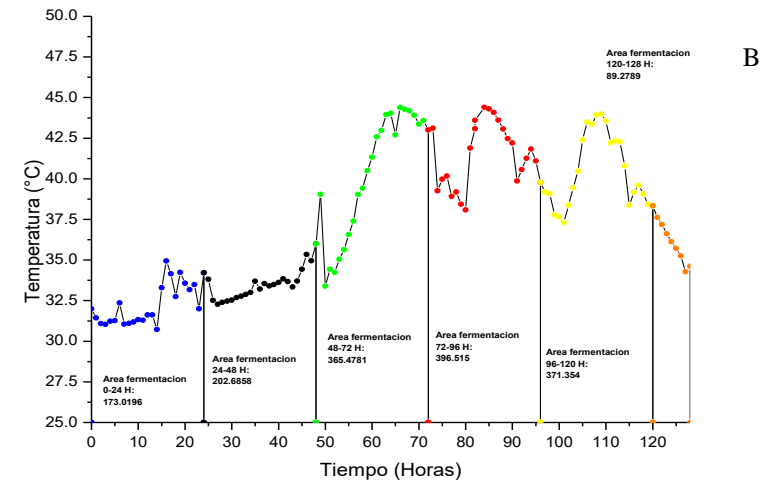
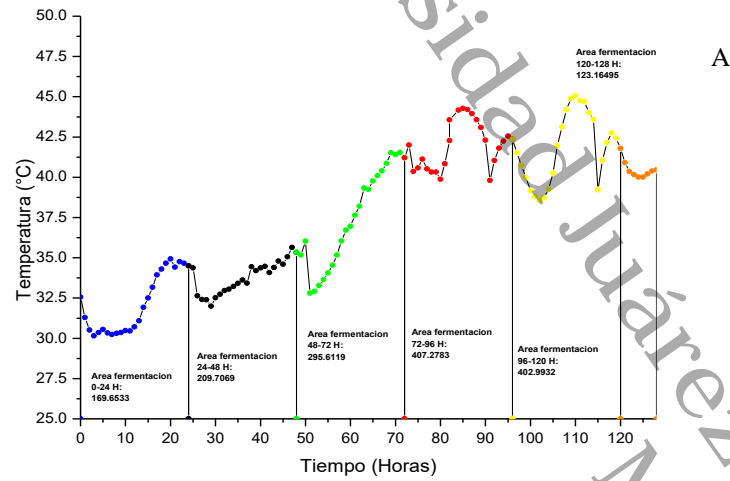


Figura 5.17 Cambio de temperatura como efecto de la fermentación modulada de los tratamientos T1(A), T2 (B), T3 (C) y T4(D).

Tabla 5.9 Área total bajo la curva de temperatura durante el proceso de fermentación de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Área Total °C/h
1	1446.32
2	1485.24
3	1509.04
4	1305.99

5.6 Caracterización por Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier en muestras secas finales.

El análisis por espectroscopía de FTIR se aplicó en tres muestras distintas del grano como fueron la grasa extraída por el método soxhlet, el polvo de cotiledón desgrasado (cocoa) y el polvo de cotiledón de muestra seca.

5.6.1 Cambios espectrales en la grasa de cacao

La figura 5.18 muestra el espectro de la grasa de cacaos fermentados y seco en los tres tratamientos y el testigo. La grasa es denominada comúnmente manteca siendo el mayor componente en la semilla del cacao y la cual es clave en el proceso de transformación del chocolate y de la repostería. La manteca es una grasa polimórfica y representa una fase continua que sirve como una matriz dispersante para las partículas sólidas del cacao y para los demás ingredientes como la azúcar y la leche. Los tipos de ácidos grasos y su distribución posicional de moléculas de triacilglicerol determinan las propiedades físicas y las características generales para su uso en la industria.

La similitud entre los espectros es clara, sin embargo, diferencias en la intensidad y frecuencias pueden ser observadas. Las frecuencias, modos vibracionales y atribución principal se muestran en la tabla 5.10. Las asignaciones de las frecuencias coinciden en su gran mayoría con lo reportado en la literatura (Guillén y Cabo, 1998) con las dificultades propias de asignación en la región de huella dactilar.

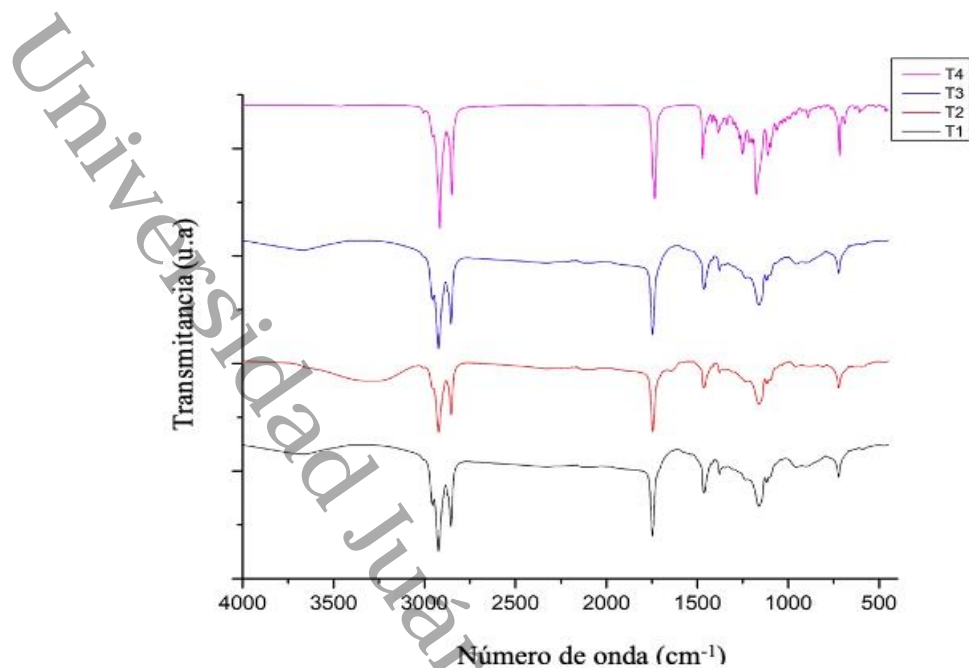


Figura 5.18 Espectro FT IR de la grasa de cacao fermentados y secos

Las bandas iniciales aparecen en el intervalo de 2958 a 2850 cm^{-1} , las cuales son vibraciones bien documentadas y asignadas a extensiones simétricas y asimétricas de grupos funcionales CH_3 y CH_2 asociados a los lípidos.

En las muestras de estudio una banda intensa de absorción debido al grupo funcional del éster carbonilo de los triglicéridos causa una banda a 1747 cm^{-1} . Entre los tratamientos y el testigo hubo un desplazamiento de la longitud de onda pronunciado de 1731 a 1747 cm^{-1} , lo que indica que existieron cambios en los ácidos grasos libres por efecto de los tratamientos. La señal a 1731-1735 cm^{-1} en el testigo puede estar asociado con la presencia de grupos funcionales de aldehídos saturados o productos de oxidación secundaria (Guillen y Cabo 1999) que oculta la señal de 1747 cm^{-1} , mientras que en los tratamientos esta señal no se presenta. Señales a 1466 cm^{-1} en los tratamientos son asignadas a flexión de grupos CH_2 y CH_3 correspondiente a lípidos, en el caso de la fermentación testigo esta señal puede estar asignada a 1471 cm^{-1} que indica cambios que se presentaron como consecuencia del proceso de fermentación.

Señales de 1471 cm^{-1} a 1378 cm^{-1} son asociadas a vibraciones de grupos alifáticos de CH_2 y CH_3 . Diferencias en las señales entre el testigo y tratamientos también son detectadas en función de desplazamiento. En 1379 cm^{-1} – 1386 cm^{-1} se asignaron señales de extensión y

flexión de grupo carbonilo y grupos metilos con desplazamientos entre el testigo y los tratamientos. Señales entre 1242 cm^{-1} y 1163 cm^{-1} fueron asignadas a vibraciones de extensión de C-O y flexión de grupos CH_2 . De acuerdo con Guillén y Cabo (1999) estas frecuencias están relacionadas con la proporción en la muestra de grupos acilo saturados. El cambio más evidente en este intervalo entre la frecuencia del testigo (1176 cm^{-1}) y tratamientos se presenta en la señal a 1663 cm^{-1} . A $1111\text{-}1118\text{ cm}^{-1}$ se asigna vibración de extensión de C-O, cambios en esta señal han sido asociados a la extinción de insaturaciones. A 1096 cm^{-1} se asigno vibraciones de extensión de C-O sin que se presentaran cambios entre las muestras de estudio.

Una señal a 953 cm^{-1} indicando vibraciones de dobles enlaces conjugados trans-cis (Wang *et al.*, 2008; Guillén y Cabo, 1999) fueron asignados en tres tratamientos, pero no asignados en el testigo. Una señal a 884 cm^{-1} en dos tratamientos fue encontrada asignándose vibraciones de extensión de grupo C-H y C-C. Finalmente una señal aproximadamente a los 723 cm^{-1} es encontrada en todas las muestras, con desplazamiento entre el testigo y los tratamientos. Esta señal ha sido asociada a la sobreposición de vibraciones de balanceo de grupos de CH_2 y vibraciones de extensión fuera del plano de olefinas disustituidas en cis.

5.6.2 Cambios espectrales en polvo de cotiledón desgrasado

En la figura 5.19 se aprecian las señales espectrales entre los tratamientos con fermentación con inóculo (T1-T3) y testigo (T4). Una amplia banda y otras señales se aprecian en la región de extensión X-H. En el intervalo las señales entre $3256\text{-}3281\text{ cm}^{-1}$ son asociadas a vibraciones de extensión simétrica del grupo OH principalmente. Otras señales pueden estar sobrepuestas en este intervalo que corresponden a una diversidad de grupos funcionales que no son independientes, sino que están acoplados a grupos adyacentes como aminas, lípidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, etc.

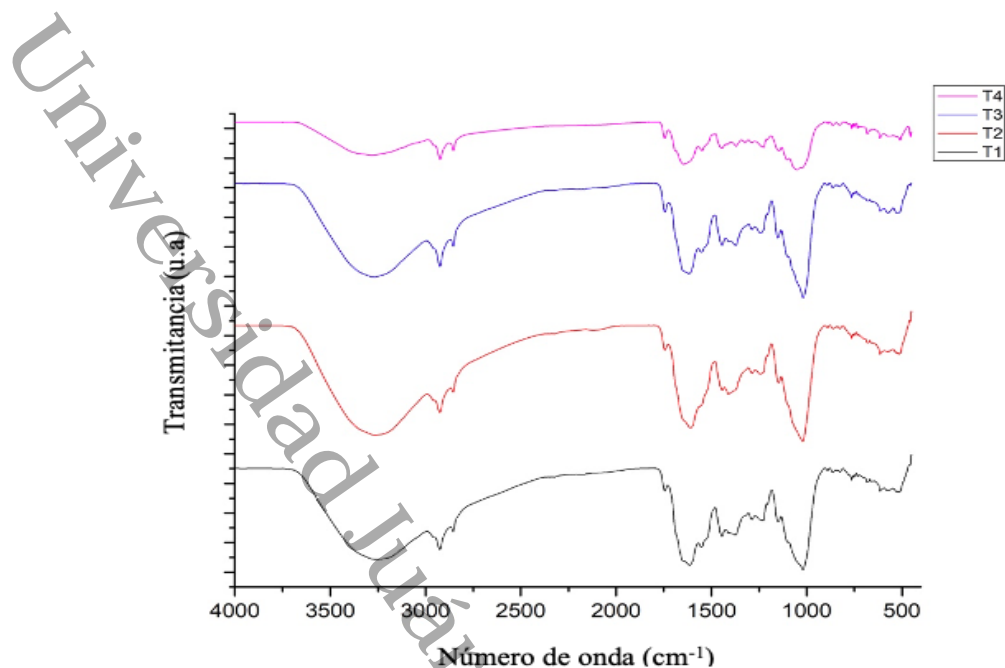


Figura 5.19 Espectro FT IR del polvo del cotiledón desgrasado

En tabla 5.11 se establecen las señales que presentan una mayor intensidad. Se identificaron señales asociadas a lípidos (2956 , 2924 , 2854 cm^{-1} y 1744 cm^{-1}) con una intensidad pequeña comparada con las mismas señales en la grasa. La presencia de grasa en la cocoa no es por la eficiencia del método de extracción soxhlet, sino porque aún la grasa y los componentes en general se encuentran aún con una cierta estructura celular que durante el tostado colapsa (Domínguez-Pérez *et al.*, 2019), por lo que extracción de la manteca se facilita después de este último proceso. La señal a 1744 cm^{-1} se asocia al grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ asociado al éster de los triglicéridos, pero también de la asociación de este grupo se encuentran aldehídos y cetonas. A 1618 se asigna una frecuencia relacionada con los flavonoides, que se encuentra ligada a la señal de 3281 cm^{-1} identificando estructuras de los compuestos fenólicos.

En la región de huella dactilar a 1488 cm^{-1} se asigna una flexión del metileno en lípidos. La señal a 1401 cm^{-1} y 1470 cm^{-1} modo de flexión simétrico de los grupos metil de las proteínas (Movasaghi *et al.*, 2008). Los cambios que se presentan son función de los grupos amino terminales y aminoácidos libres que cambian durante el proceso de fermentación. Una banda de ésteres de alcoholes secundarios puede ser asignada a 1100 cm^{-1} .

En el intervalo de 500 a 680 cm^{-1} se presentaron una gran cantidad de señales que expresan la complejidad de las muestras y resulta difícil la asignación, debido a bandas correspondientes a movimientos de las macromoléculas.

5.6.3 Cambios espectrales en polvo de cotiledón fermentado y seco

Los cambios en el cotiledón fermentado y seco de los diferentes tratamientos son una imagen de la grasa y cotiledón seco desgrasado (Figura 5.20 y Tabla 5.12). La presencia de las señales de grasa se sobrepone como las principales en el espectro mostrando similitud en los números de asignación. Así también la presencia de Amida II, ésteres, flavonoides y proteínas asociados a los encontrados en el cotiledón desgrasado. Sin embargo, a 1214 cm^{-1} y 1198 cm^{-1} emergen señales no encontradas de forma directa en los espectros previos. Estas señales están asociadas a cetonas, aldehídos y pirazinas. Esto indica que la naturaleza de las señales es enmascarada en función a los compuestos que presentan mayor peso en proporción en el grano de cacao como son los lípidos y las proteínas.

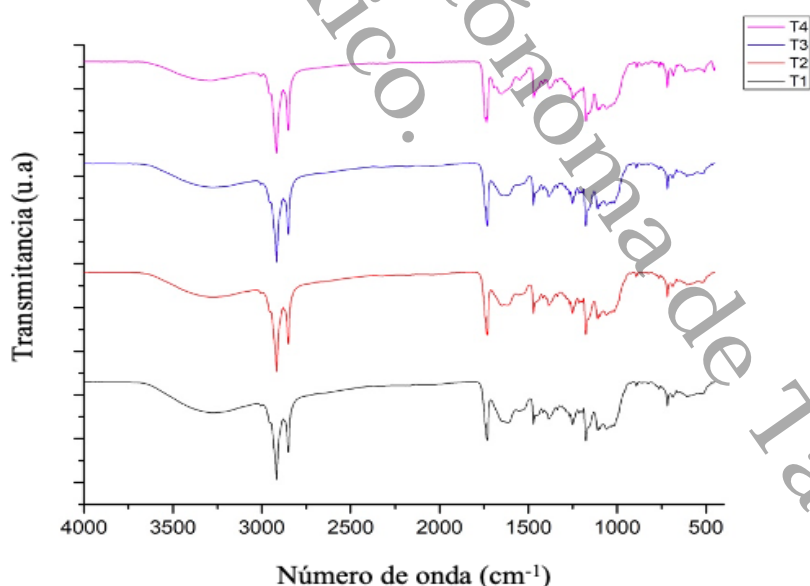


Figura 5.20 Espectro FT IR del cotiledón fermentado y seco

Tabla 5.10 Asignación de modo vibracional y atribución a la frecuencia de muestras de grasa de cacao obtenidas durante la fermentación inoculada

ID	Frecuencia				Modo vibracional	Atribución principal
	T1	T2	T3	T4		
1	2958	2958	2958	2955	$\nu_{AS}(-CH_3)$	Lípidos
2	2923	2922	2923	2915	$\nu_{AS}(-CH_2)$	
3	2897	2896	2897		$\nu_S(-CH_2)$	
4	2874	2874	2874	2871	$\nu_S(-CH_3)$	
5	2854	2853	2854	2850	$\nu_S(-CH_2)$	
6	1747	1745	1746	1735	$\nu(C=O)$	Ésteres alifáticos, aldehídos, cetonas
7	1704	1707	1704		$\bar{\nu}(C=O)$	Ácidos
8	1466	1466	1466	1471	$\rho(CH_2, CH_3)$	Lípidos
9	1379		1379	1386	$\nu(C=O), \rho(CH_3)$	Lípidos
10	1242	1240	1242	1240	$\nu(C-O), \rho(CH_2), \nu(P=O)$	Polifosfatos, fosfolípidos
11	1164	1164	1164	1176	$\nu(C-O), \rho(CH_2)$	
12	1143	1143	1143		$\nu_S(-CH_2)$	
13	1118	1117	1118	1111	$\nu(CO)$	
14	1096	1096	1096	1097	$\nu(CO)$	
15			1058	1064	$\nu(CC), \nu(=COC), \rho(CO)$	
16	955		954		$(C=C)$	Trans
17			884		$\nu(CH), \nu(CC)$	
18	723	722	722	718	$\rho(CH_2)_n, C=C$	Cis

v: extensión, ρ : flexión, δ : tijereo, S: simétrico, AS: asimétrico

Tabla 5.11 Asignación de modo vibracional y atribución a la frecuencia de muestras de cotiledón de cacao desgrasado obtenidas durante la fermentación inoculada

ID	Frecuencia				Modo vibracional	Atribución principal
	T1	T2	C3	T4		
1	3267	3266	3275	3281	vs(OH)	Grupos fenólicos
2				3116		Lípidos
3	2956	2956		2954	$\nu_{AS}(-CH_3)$	
4	2924	2924	2924	2923	$\nu_{AS}(-CH_2)$	
5	2855	2854	2854	2854	$\nu_{AS}(-CH_2)$	
6	1745	1745	1744	1745	$\nu(C=O)$	Éster de lípidos
7	1638			1645	$\delta_S(CH_2)$	
8	1618	1608	1618		$\nu(C=O), \nu(CC)$	Flavonoides
9	1612					
10	1560	1560	1559	1570		
11	1551		1551	1549	$\nu(CC)$	
12	1488	1488	1488	1488	$\rho(CH_2)$	Lípidos
13	1444	1443	1444	1443	$r(CH_2)$	Amida II
14	1426		1426	1425	$\rho_S(CH_3), \nu_S(COO^-)$	Flavonoides
15	1410	1411	1408			
16			1401	1412	$\delta_S(CH_3),$	Proteínas
17	1372		1372	1370	$\nu(C=O), \rho(CH), \rho(NH), \rho(CH_3)$	Proteínas
18	1287	1287	1287	1286		
19	1237	1239	1241	1236	C-O, CH ₂	
20	1227	1228	1207	1226	PO ₂	Fosfatos
21	1206	1206		1205		
22	1149	1147	1151	1143	C-O, CH ₂	

23	1100		1100	1103	C-O	Ésteres de alcoholes secundarios
24				1051	$\nu(\text{CC})$, $\nu(=\text{COC})$, $\rho(\text{CO})$	Alcohol primario; flavonoides
25	1020	1020	1019	1022	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$, $\nu(\text{CO})$	Doble anillo ciclohexano
26	763	763			$\nu(\text{CH})$	

v: extensión, ρ : flexión, δ : tijereo, S: simétrico, AS: asimétrico

Tabla 5.12 Asignación de modo vibracional y atribución a la frecuencia de muestras de cotiledón de cacao fermentado y seco obtenidas durante la fermentación inoculada

ID	Frecuencia				Modo vibracional	Atribución principal
	T1	T2	T3	T4		
1	3277	3268	3284	3287	$\nu(\text{OH})$	Alcohol, Fenol, Flavonoide
2	3005	3005	3005	3005	$\nu_{\text{S}}(=\text{CH})$	
3	2953	2953	2953	2954	$\nu_{\text{AS}}(\text{CH}_3)$	Lípidos
4	2916	2916	2916	2916	$\nu_{\text{AS}}(\text{CH}_2)$	
5	2871		2871		$\nu_{\text{S}}(\text{CH}_3)$	
6	2850	2850	2850	2850	$\nu_{\text{S}}(\text{CH}_2)$	Lípidos, aldehídos
7				1743	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Éster, lípidos, aldehídos
8			1655	1657	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amida I, aldehídos, cetonas
9	1619	1619	1619	1617	$\nu(\text{C}=\text{O}), \nu(\text{CC})$	Flavonoides
10	1472	1472	1472	1470	$\rho(\text{CH}_2)$	Lípidos
11	1418	1418	1418	1417	$\rho_{\text{S}}(\text{CH}_3), \nu_{\text{S}}(\text{COO}^-)$	Flavonoides
12	1400	1400	1400	1401	$\delta_{\text{S}}(\text{CH}_3)$	Proteínas
13	1386	1386	1386	1379	$\nu(\text{C}=\text{O}), \rho(\text{CH}), \rho(\text{NH}), \rho(\text{CH}_3)$	Proteínas
14	1338	1338	1338	1337	$\nu(\text{CH}), \nu(\text{CH}_2)$	Polifenoles, lípidos, cetonas
15	1301	1301	1301	1299	$\nu(\text{CN}), \rho(\text{NH})$	Amida III
16	1268	1268	1268	1267	$\rho_{\text{AS}}(\text{CCO}), \rho(\text{OH})$	Flavonoides
17	1250	1251	1251	1249	$\nu(\text{C}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{N}),$	Amida III
18	1214	1214	1214	1215	$\nu(\text{CCOC}), \rho(\text{CCOC}),$	Cetonas
19	1198	1197	1198	1197	$\nu_{\text{AS}}(\text{OC}=\text{C})$	Ésteres, pirazinas
20	1177	1177	1177	1176	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CN}), \nu(\text{CO})$	Proteínas, cetonas
21	1109	1110	1110	1109	$\nu_{\text{S}}(\text{COC})$	Éster aromático; polifenoles
22	1097	1098	1097	1097	$\nu(\text{CO})$	Éster
23	1058	1059	1058	1058	$\nu(\text{CC}), \nu(=\text{COC}), \rho(\text{CO})$	Alcohol primario; flavonoides;
24	1036	1035	1035	1035	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CN}), \nu(\text{CO})$	Doble anillo ciclohexano
25	1019	1018	1017	1020	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CN}), \nu(\text{CO})$	Alcoholes secundarios
26	717	717	717	717	$\nu(\text{CH})$	

ν : extensión, ρ : flexión, δ : tijereo, S: simétrico, AS: asimétrico

6. CONCLUSIONES

La actividad de la PFO en granos de cacao en extracto crudo estuvo presente durante el proceso de fermentación y secado para todos los tratamientos con cultivo iniciador y testigo, presentando mayor actividad a las 81 h de secado y el valor mínimo de actividad se mostró a las 96 h de fermentación. Las cinéticas de las variables fisicoquímicas del testigo y los tratamientos con cultivos iniciadores reflejaron un comportamiento complejo de evidenciar en variables como el pH, acidez total y temperatura, sin embargo, el efecto fue evidente en mediciones como el contenido fenólico total y la actividad específica de la polifenol oxidasa. Un reflejo del rol de los cultivos iniciadores durante la fermentación del cacao fue más evidente en las pruebas de calidad. La prueba de corte y el índice de fermentación en los tratamientos con cultivos iniciadores presentaron mejores indicadores porcentuales en comparación al testigo.

El análisis de componentes principales permitió conocer la variabilidad durante la cinética de fermentación y secado. Las variables que aportaron positivamente y negativamente a la variabilidad fue distinta para cada uno de los tratamientos. Las variables que aportaron positivamente en todos los tratamientos durante la fermentación fueron: $U \cdot g^{-1}$, mg proteína y pH; y en el secado fueron: $U \cdot mg$ de proteína $^{-1}$, $U \cdot g^{-1}$ y acidez.

Caracterización por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier se aplicó a tres niveles del producto fermentado y seco por cada tratamiento, lo cual permitió establecer la similitud entre los espectros, con diferencias en la intensidad y frecuencias. Las frecuencias, modos vibracionales y atribución fueron asignadas destacando las señales asociadas a lípidos, proteínas y flavonoides.

Este estudio permite como primer paso, tener las bases para subsecuentes investigaciones enzimáticas y pruebas fisicoquímicas de granos de cacao, por lo que se sugiere hacer otros métodos de extracción y purificación total de la enzima, conocer el origen genético de la variedad, establecer el método de fermentación y remoción, como de secado. De esta manera lograr un estándar único de calidad de granos de cacao por zona de producción y variedad.

7. LITERATURA CIENTÍFICA CITADA

Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan A. (2008). Flavor formation and Character in Cocoa Chocolate: A Critical Review. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 48 (9), 840-857.

Afoakwa, E. O. (2014). *Cocoa production and processing technology*. CRC Press.

Alean, J., Chejne, F., Rojano, B. (2016). Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *Journal of Food Engineering*, 189, 99-105.

Álvarez-Villagómez, K. (Instituto Tecnológico de Veracruz, México); Robles-Olvera, V. (Instituto Tecnológico de Veracruz, México). Comunicación personal, 2019.

Aprotosoai, A. C., Luca, S. V., Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73-91.

Arvelo, M. A., Delgado, T., Maroto, S., Rivera, J., Higuera, I., Navarro, A. (2016). Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica*.

Barrientos, L. D. P., Oquendo, J. D. T., Garzón, M. A. G., Álvarez, O. L. M. (2019). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, 115, 259-267.

Batista, L. (2009). El cultivo de cacao. *Santo Domingo: Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal*.

Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 221-227.

Bhattacharjee, R., Kumar, P. L. (2007). Cacao. In *Technical crops* (pp. 127-142). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56 (11), 317-333.

Bravo, K., Osorio, E. (2016). Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chemistry*, 197, 185-190.

Brito, E. S. D., García, N. H. P., Amâncio, A. C. (2002). Effect of polyphenol oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. *Food Science and Technology*, 22(1), 45-48.

Brito, E. S. D., Pezoa García, N. H., Amancio, A. C. (2004). Use of a proteolytic enzyme in cocoa (*Theobroma cacao* L.) processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(4), 553-558.

Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2288-2297.

Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1), e01157.

Chang, J. V., Torres, C. V. (2014). Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. *Revista Ciencia y Tecnología*, 7(2), 21-34.

Cheema, S., Sommerhalter, M. (2015). Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food Chemistry*, 171, 382-387.

Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., Schlüter, A., Bernath, K., Hühn, T. (2017). Investigations on the aroma of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) and its influence on the odor of fermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10), 2467-2472.

Cros, E., Rouly, M., Villeneuve, F., Vincent, J. C. (1982). Recherche d'un indice de fermentation du cacao, 2: Estimation de la matière colorante rouge des fèves de cacao. *Café, Cacao, Thé (Francia)* v. 26 (2) p. 115-122.

Cruz, J., Leite, P., Soares S. E., Bispo E. (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao*, L) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology*, 35 (2), 279-281.

de Oliveira Carvalho, J., Orlanda, J. F. F. (2017). Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chemistry*, 233, 159-163.

da Silva Oliveira, C., Maciel, L. F., Miranda, M. S., da Silva Bispo, E. (2011). Phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in different cocoa samples from organic and conventional cultivation. *British Food Journal*, 113 (9), 1094-1102.

Dai, J., Mumper R. (2010). Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.

Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., Girotra, S. (2006). Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition and metabolism*, 3(1), 1-12.

Do Carmo Brito, B., Campos, R., Da Silva, R., Abreu, M.B., Santos, A. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484-490.

Domínguez-Pérez, L. A., Lagunes-Gálvez, L. M., Barajas-Fernández, J., Olán-Acosta, M. D. L. Á., García-Alamilla, R., García-Alamilla, P. (2019). Caracterización vibracional de grupos funcionales en granos de cacao durante el tostado usando espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier. *Acta universitaria*, 29.

Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B. (2020). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73, 104134.

Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. I., Weigend, M., Luebert, F. (2012). Hoja botánica: Cacao. *Theobroma cacao* L. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo-MINCETUR. Lima-Perú.

Efraim, P., Pezoa-García, N. H., Jardim, D. C. P., Nishikawa, A., Haddad, R., Eberlin, M. N. (2010). Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Food Science and Technology*, 30, 142-150.

El Kiyat, W., Monica, A., Qomariyah, N., Manurung, B. S. (2018). Enzymes Involving in Chocolate Processing. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 1-6.

Enriquez, G. (1985). Curso sobre el cultivo de cacao. Centro Agronómico tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialbe, Costa Rica.

Erzengin, M. (2009). Affinity, purification and characterization of polyphenol oxidase from *Helianthus tuberosus* L. *Hacettepe Journal of Biological Chemistry*, 37, 313-325.

Février, H., Le Quéré, J. M., Le Bail, G., Guyot, S. (2017). Polyphenol profile, PPO activity and pH variation in relation to colour changes in a series of red-fleshed apple juices. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 353-362.

Ganda-Putra, G. P., Wartini, N. M., Darmayanti, L. P. T. (2019, September). Characteristics of cocoa vinegar from pulp liquids fermentation by various methods. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2155, No. 1, p. 020038). AIP Publishing LLC.

García, C. L., Giraldo, G. A., Hurtado, H., Mendivil, C. O. (2006). Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano gros michel en diferentes estados de maduración. *Vitae*, 13(2), 13-19.

García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M.A., Barel, M., Berthomieu, G., Rodríguez-Jimenes, G.C., García-Alvarado, M.A. (2007). Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. *Journal of Food Engineering*, 79, 1159-1165.

García-Alamilla, P., González-Lauck, V.W., De la Cruz-Lázaro, E., Lagues-Gálvez, L.M., García-Alamilla, R. (2012). Description and physical properties of mexican criollo cacao during post-harvest processing. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1), 58-65.

Goel, N., Paul, P. K. (2015). Plant age affects elicitation of polyphenol oxidase activity by neem extract in *Solanum lycopersicum* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Israel Journal of Plant Sciences*, 62(4), 283-293.

Gómez-Juaristi, M., González-Torres, L., Bravo, L., Vaquero, M.P., Bastida, S. (2011). Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 26(2), 289-292.

- Guillén, M.D., Cabo, N. (1999). Usefulness of the frequency data of the Fourier transform Infrared spectra to evaluate the degree of oxidation of edible oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 709-719.
- Gutiérrez-Correa, M. (2012). Efecto de la frecuencia de remoción y tiempo de fermentación en cajón cuadrado sobre la temperatura y el índice de fermentación del cacao (*Theobroma cacao L.*). *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), 914-918.
- Gutiérrez, T. J. (2017). State-of-the-art chocolate manufacture: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1313-1344.
- Hansen, C. E., Del Olmo, M., Burri, C. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 77(2), 273-281.
- Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A.M., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. (2018). Bioactive compounds in mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240, 831-839.
- Hii, C.L., Law, C.L., Cloke, M. (2009). Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa. *Journal of Food Engineering*, 90, 191-198.
- Ho, V.T.T., Zhao, J., Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54-67.
- Jalil, A.M., Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health?. *Molecules*, 13, 2190-2219.
- John, W.A., Bötcher, N.L. Abkamp, M., Bergounhou, A., Kumari, N., Ping-Wei, Ho, P.W., D'Souza, R., Nevoigt, E., Ullrich, M.S. (2019). Forcing fermentation: Profiling proteins peptides and polyphenols in lab-scale cocoa bean fermentation. *Food Chemistry*, 278, 786-794.

Johnson, K. A., Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269.

Jukanti, A. (2017). *Polyphenol oxidases (PPOs) in plants*. Springer Singapore.

Kongor, J.E., Takrama, J.F., Simpson, A., Mensah-Brown, H., Afoakwa, O. (2013). Effects of fermentation and drying on the fermentation index and cut test of pulp pre-conditioned Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Food Science and Engineering*, 3, 625-634.

Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. *Food Research International*, 82, 44-52.

Kschonsek, J., Dietz, A., Wiegand, C., Hippler, U. C., Böhm, V. (2019). Allergenicity of apple allergen Mal d 1 as effected by polyphenols and polyphenol oxidase due to enzymatic browning. *LWT-Food Science and Technology*, 113, 108289.

Lagunes Gálvez, S. L., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124-130.

Lecumberri, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Rúperez, P., Goya, L., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante de animales de experimentación. *Nutricion Hospitalaria*, 21(5), 622-628.

Lee, P. M., Lee, K. H., Ismail, M., Karim, A. (1991). Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(2), 251-260.

Lima, L.J, Almeida, M.H., Nout, M.R., Zwietering, M.H. (2011). *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular

reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731-761.

Loh, Z. H., Oh, H. K. F., Lim, Y. Y. (2018). Relationship between polyphenol oxidase activity and phenolics degradation on ambient air-drying of herbal plants. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(7), e13672.

Loureiro, G. A. H. D. A., Araujo, Q. R. D., Valle, R. R., Sodr e, G. A., Souza, S. M. M. D. (2017). Influencia de factores agroambientales sobre la calidad del clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) PH-16 en la región cacaotera de Bah a, Brasil. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(12), 579-587.

Macedo, A. S. L., Rocha, F. D. S., Ribeiro, M. D. S., Soares, S. E., Bispo, E. D. S. (2016). Characterization of polyphenol oxidase in two cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars produced in the south of Bahia, Brazil. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36 (1), 56-63.

Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., Da Cruz Pedroso Miguel, M. G., Santos, C., Lima, N., Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a microbial cocktail used as a starter culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. *Molecules*, 22(5), 766.

Martín, M.A., Ramos S. (2016). Cocoa polyphenols in oxidative stress: Potential health implications. *Journal of Functional Foods*, 27, 570-588.

Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vracken G., Verstrepen K. (2016). Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increases acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 732-746.

Mejía-Doria, C. M., Gaviria-Arias, D., Bru-Martínez, R., Rengifo-Ramos, L., Alegria-Soto,  . H., Aguilar-Fernández, E. (2014). Caracterización cinética de la enzima polifenol oxidasa

en seis estadios de maduración en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla. *Actualidades Biológicas*, 36(101), 107-117.

Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., e Silva, A. R. D. A., Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., Schwan, R. F. (2016). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 81, 83-90.

Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z.*, 49(333-369), 352.

Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., Nazamid, S. (2002). Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(5), 559-566.

Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., Nazamid, S. (2003). Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International Journal Of Food Science and Technology*, 38(3), 285-295.

Morante, J., Agnieszka, A., Bry-Martínez, R., Carranza, M., Pico-Saltos, R., Nieto, E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*, 7(1), 23-31.

Moscetti, R., Raponi, F., Monarca, D., Bedini, G., Ferri, S., Massantini, R. (2019). Effects of hot-water and steam blanching of sliced potato on polyphenol oxidase activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 403-411.

Motamayor, J. C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Ortiz, C.F., Moreno, A., Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89, 380-386.

Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179.

Naoki, K., Gómez, M. I., Schneider, M. (2017). Selección de diferentes sistemas de producción de cacao (*Theobroma cacao*, Malvaceae) por aves en Alto Beni, Bolivia-una prueba de cafetería en el campo. *Ecología en Bolivia*, 52(2), 100-115.

Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumou, D. O., Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 612-619.

NMX-FF-124-SCFI-2015. Granos de cacao-Prueba de corte. Norma mexicana.

Nogales, J., Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L. (2006). Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera¹. *Agronomía Tropical*, 56(1), 5-20.

Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., Siow, L. F. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT-Food Science and Technology*, 122, 108977.

Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., Rovedas, G. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical*, 59(2), 119-127.

Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.

Ouattara, H. G., Reverchon, S., Niamke, S. L., Nasser, W. (2017). Regulation of the synthesis of pulp degrading enzymes in *Bacillus* isolated from cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 63, 255-262.

Pallares Pallares, A., Estupiñán A, M. R., Perea Villamil, J. A., López Giraldo, L. J. (2016). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista Ion*, 29(2), 7-21.

Páramo, D., García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M. A., Robles-Olvera, V. J., Rodríguez-Jimenes, G. C., García-Alvarado, M. A. (2010). Mass transfer of water and volatile fatty acids in cocoa beans during drying. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 276-283.

Paul, B., Gowda, L. R. (2000). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3839-3846.

Peláez, P., Guerrero, S., Contreras, D. (2016). Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria*, 7(2), 111-119.

Perea, J. A., Ramírez, O. L., Villamizar, A. R. (2011). Physicochemical characterization of regional materials of cocoa colombian. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 35-42.

Pereira, G. V., Alvarez, J. P., Neto, D. P. D. C., Soccol, V. T., Tanobe, V. O., Rogez, H., Soccol, C. R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 290-297.

Pontillon, J. (1999). Coordonateur "Cacao et chocolat: production, utilisation, caractéristiques. Collection sciences and techniques agroalimentaires", (Technique and Documentation Lavoisier). Paris cedex 08. France.

Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Marcano, M. (2009). Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(2), 458-468.

Quintero, M., Díaz, K., (2004). El mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria*, 18, 47-59.

Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Rangel-Fajardo, M.A., Zavaleta-Mancera, H., Córdova-Tellez, L., López-Andrade A., Delgado-Alvarado, A., Vidales-Fernández, I., Villegas-Monter, A. (2012). Anatomía e histoquímica de las semillas del cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo mexicano. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 35(3), 189-197.

Rawel, H. M., Huschek, G., Sagu, S. T., Homann, T. (2019). Cocoa bean proteins—Characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing. *Nutrients*, 11(2), 428.

Reuveni, S., Urbakh, M., Klafter, J. (2014). Role of substrate unbinding in Michaelis–Menten enzymatic reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), 4391-4396.

Ribas-Agusti, A., Gratacós-Cubarsí, M., Sárraga, C., Guàrdia, M. D., García-Regueiro, J. A., Castellari, M. (2014). Stability of phenolic compounds in dry fermented sausages added with cocoa and grape seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 329-336.

Rivera Fernández, R. D., Mecías Gallo, F. W., Guzmán Cedeño, A. M., Peña Galeas, M. M., Medina Quinteros, H. N., Casanova Ferrín, L. M., Nivelá Morante, P. E. (2012). Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo nacional. *Ciencia y Tecnología*, 5(1), 7-12.

Rocha, C. C., Molina, D. A., Mejía, C. M. (2017). Modelamiento estructural y acoplamiento molecular de la proteína polifenol oxidasa del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 8(4), 1-13.

Romero-Cortes, T., Salgado-Cervantes, M.A., García-Alamilla, P., García-Alvarado, M.A., Rodríguez-Jimenes, G., Hidalgo-Morales, M., Robles-Olvera, V. (2013). Relationship between fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 93, 2596-2604.

Saltini, R., Akkerman, R., Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29(1), 167-187.

Sandhya, M.V.S., Yallappa, B.S., Varadaraj, M.C., Puranaik, J., Jaganmohan, L., Jarardhan, P., Murthy P.S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *Food Science and Technology*, 65, 731-738.

Sandine, W. E. (1979). Lactic starter culture technology. *Lactic starter culture technology*, 6.

Santander Muñoz, M., Rodríguez Cortina, J., Vaillant, F. E., Escobar Parra, S. (2020). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593-1613.

Sauceo C. G., Soto, C.O. "Fundamentos de cinética enzimática". En: Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Prado B. L. A.(Ed). Universidad Autónoma Metropolitana (1ª Ed). México (1999).

Senanayake, M., Jansz, E. R., Buckle, K. A. (1997). Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(1), 42-48.

Schwan, R., (1998). Cocoa Fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (4), 1477-1483.

Schwan, R., Wheals, A., (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 1-17.

Siddiq, M., Dolan, K. D. (2017). Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 218, 216-220.

Silveira, P., Melo, L., Souza, L., Bispo, E., Soares, S. (2017). Protease prospecion and determiration of its isoenzymes activity in cocoa cultivars. *Food Science and Technology* 37(3), 369-377.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Sousa, L. S., Rocha, F. D. S., Silveira, P. T. D. S., Bispo, E. D. S., Soares, S. E. (2016). Enzymatic activity of proteases and its isoenzymes in fermentation process in cultivars of cocoa (*Theobroma cacao* L.) produced in southern Bahia, Brazil. *Food Science and Technology*, 36(4), 656-663.

Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., Montemurro, C. (2017). Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 377.

Toulias, T. L., Kitsos, C. P. (2016). Fitting the Michaelis–Menten model. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 296, 303-319.

Utami, R. R., Armunanto, R., Supriyanto, S. R. A. (2016). Effects of cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) fermentation on phenolic content, antioxidant activity and functional group of cocoa bean shell. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15, 948-953.

Villeneuve, F., Cros, E., Macheix, J. J. (1985). Effet de la fermentation sur les activités peroxydasiques et polyphénoloxidasiques de la fève de cacao. *Café, Cacao, Thé (France)* v. 29 (2) p. 113-120.

Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 31-40.

Waizel-Haiat, S. Waizel-Bucay, J., Magaña-Serrano, J.A., Campos-Bedoya, P., San Esteban-Sosa, J.E. (2012). Cacao y chocolate: seducción y terapéutica. *Anales Médicos*, 57 (3), 236-245.

Wang, Y., Wang, Q., Artz, W. E., Padua, G. W. (2008). Fourier transform infrared spectra of drying oils treated by irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3043-3048.

Wessel, M., Quist-Wessel, P. F. (2015). Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 74, 1-7.

Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423-447.

Yoshiyama, M., Ito, Y. (1996). Decrease of astringency of cacao beans by an enzymatic treatment. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-Shi*, 43(2), 124-129.

Zapata Bustamante, S., Tamayo Tenorio, A., Alberto Rojano, B. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 391-404.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

8. ANEXOS

Anexo A. Ficha de envío del artículo



Acta Universitaria Tareas 0 Español (España) Ver el sitio katia2015

3210 / Alarcón Narváez et al. / Influencia de cultivos iniciadores en la fermentación de cacao Biblioteca de envío

Envíos Flujo de trabajo Publicación

Estado: **Desprogramado**

Título y resumen

Colaboradores/as

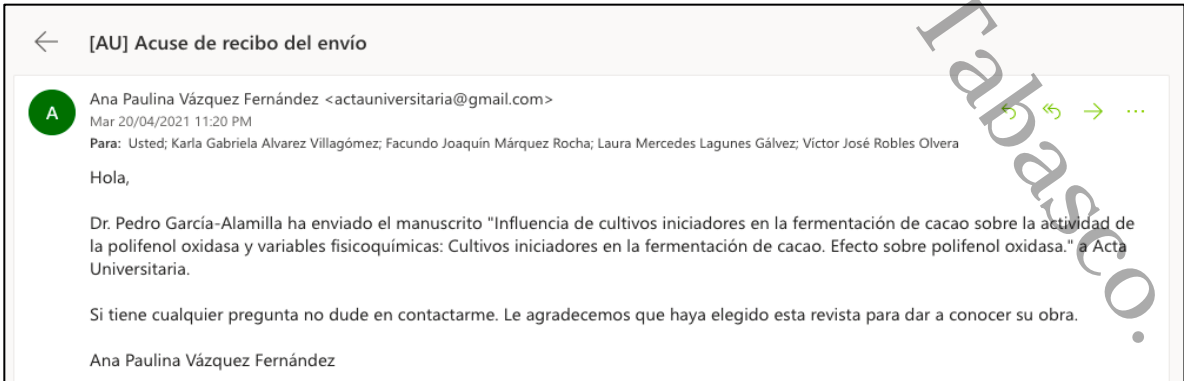
Citas

Galerías

Autoría y colaboradores/as

Nombre	Correo electrónico	Rol	Contacto principal	En listas de navegación
Jessica Alarcón Narváez	jessi_an92@hotmail.com	Autor/a	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Karla Gabriela Alvarez Villagómez	gabriella.villagomez@gmail.com	Autor/a	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Facundo Joaquín Márquez Rocha	fmarquez@ipn.mx	Autor/a	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Laura Mercedes Lagunes Gálvez	laura.lagunes@ujat.mx	Autor/a	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Victor José Robles Olvera	victor.ro@veracruz.tecnm.mx	Autor/a	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Pedro García-Alamilla	pedro.garciaa@ujat.mx	Autor/a	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Platform & workflow by OJS / PKP



← [AU] Acuse de recibo del envío

A Ana Paulina Vázquez Fernández <actauniversitaria@gmail.com>
Mar 20/04/2021 11:20 PM

Para: Usted; Karla Gabriela Alvarez Villagómez; Facundo Joaquín Márquez Rocha; Laura Mercedes Lagunes Gálvez; Víctor José Robles Olvera

Hola,

Dr. Pedro García-Alamilla ha enviado el manuscrito "Influencia de cultivos iniciadores en la fermentación de cacao sobre la actividad de la polifenol oxidasa y variables fisicoquímicas: Cultivos iniciadores en la fermentación de cacao. Efecto sobre polifenol oxidasa." a Acta Universitaria.

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactarme. Le agradecemos que haya elegido esta revista para dar a conocer su obra.

Ana Paulina Vázquez Fernández

Anexo B. Acervo fotográfico de la fermentación y secado de cacao



Anexo C. Acervo fotográfico de análisis experimental

