

**Evaluación del almacenamiento en mazorca y  
frecuencia de volteo del grano durante la  
fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.)**

**Martín Flores Zurita**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Octubre, 2014

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Evaluación del almacenamiento en mazorca y frecuencia de volteo del grano durante la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Martín Flores Zurita**

**Zamorano, Honduras**

Octubre, 2014

# **Evaluación del almacenamiento en mazorca y frecuencia de volteo del grano durante la fermentación de cacao (*Theobroma cacao*L.)**

Presentado por:

Martín Flores Zurita

Aprobado:

---

Mayra Márquez, Ph.D.  
Asesora Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Departamento de Agroindustria  
Alimentaria

---

Jorge Cardona, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

---

Héctor Aguilar, M.Sc.  
Asesor

## **Evaluación del almacenamiento en mazorca y frecuencia de volteo del grano durante la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.)**

**Martín Flores Zurita**

**Resumen:** El cacao es un fruto originario de los trópicos. La fermentación de estos granos es el principal proceso post cosecha donde se desarrolla el sabor y aroma característico de sus posteriores productos como el chocolate. El objetivo fue determinar el efecto de tiempo de almacenamiento en mazorca y la frecuencia de volteo de la masa durante la fermentación sobre características físico-químicas y microbiológicas. Fueron cosechadas mazorcas maduras (trinitario) de la Másica, departamento Atlántida en Honduras. Un lote fue desgranado después de tres días de almacenamiento y el otro de seis días y ambos fueron sometidos a tres frecuencias de volteo durante una fermentación de seis días. El primero se volteó una vez a las 48 horas, el segundo tres veces a las 48, 96 y 120 horas y el tercero cinco veces a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Se analizó la temperatura, pH, % de grasa, polifenoles totales, levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas y se determinó la calidad mediante la prueba de corte. Los resultados demostraron que al aumentar el tiempo de almacenamiento, la fermentación fue más rápida y se alcanzaron temperaturas más elevadas en la masa de cacao ( $P=0.0002$ ), menor cantidad de polifenoles totales ( $P<0.0001$ ), menor % de grasa ( $P<0.0001$ ) y pH más elevados en el grano con mucilago ( $P<0.0001$ ). Por lo tanto se determinó que se debe reducir la frecuencia de volteo (tres volteos) durante la fermentación de granos almacenados durante seis días para obtener mayor cantidad de granos fermentados apropiadamente (72%).

**Palabras claves:** Calidad final, polifenoles totales, sucesión microbiológica.

**Abstract:** Cacao is a fruit that originates from the tropic. The main postharvest process is the fermentation of cacao beans where the characteristic flavor and aroma of its posterior products, such as chocolate, are developed. The objective was to determine the effect the amount of storage time in pods and the frequency at which the mass was turned over during fermentation would have over physical-chemical and microbiological characteristics. Ripe pods were harvested from La Másica, Atlántida department in Honduras. One lot was threshed after three days in storage and the other one after six days, both were subjected to three different turn over frequencies during a six day fermentation period. The first one was turned over once every 48 hours, the second one three times at 48, 96 and 120 hours and the third one was turned over five times at 24, 48, 72, 96 and 120 hours. Analyses were run for temperature, pH, fat %, total polyphenols, yeast, lactic-acid and acid-acetic bacteria, which helped determine quality through the cutting test. Results showed that by increasing the storage time, fermentation occurred faster and much more elevated temperatures were reached in the cacao mass ( $P=0.0002$ ), a lower amount of total polyphenols ( $P<0.0001$ ), a lower fat % ( $P<0.0001$ ) and a higher pH in the mucilaginous bean ( $P<0.0001$ ). Therefore it was determined that the frequency of turn overs should be reduced (3 turn overs) during the fermentation of the beans that were stored for six days so as to obtain a greater quantity of well-fermented beans (72%).

**Key words:** Final quality, total polyphenols, microbial succession.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>
<b>5 RECOMENDACIONES .....</b>	<b>17</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>18</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>21</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Promedio de la temperatura y pH de la pulpa de la masa de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	6
2. Porcentaje de grasa total en granos al inicio y final de la fermentación que fueron sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	9
3. Contenido de polifenoles totales en granos de cacao a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación, expresado en mg/g equivalente de ácido gálico.....	10

Figuras	Página
1. Promedio de la temperatura según el tiempo de almacenamiento medida diariamente durante la fermentación.....	7
2. Promedio del pH según el tiempo de almacenamiento medida diariamente durante la fermentación.....	8
3. Recuento de levaduras en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	11
4. Recuento de bacterias ácido lácticas en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	12
5. Recuento de bacterias ácido acéticas en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	13
6. Porcentaje de granos de cacao bien fermentados que fueron sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	14

Anexos	Página
1. Resumen ANDEVA de análisis realizados a granos de cacao que fueron sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	21
2. Recuento de levaduras en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación .....	22
3. Recuento de bacterias ácido lácticas en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación .....	22
4. Recuento de bacterias ácido acéticas en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	23
5. Cambios en la pigmentación de las semillas de cacao que fueron almacenadas durante tres días en mazorca y sometidas a tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	24
6. Cambios en la pigmentación de las semillas de cacao que fueron almacenadas durante tres seis días en mazorca y sometidas a tres frecuencias de volteo durante la fermentación.....	25

# 1. INTRODUCCIÓN

*Theobroma cacao* es una planta de hoja perenne originaria en los trópicos húmedos que crece principalmente en países de África y Latinoamérica (Enríquez 1985). Los frutos son muy variables en cuanto a forma, tamaño y color, esto se debe a sus diferencias genéticas por lo tanto se clasifican en tres variedades: criollo, forastero y una mezcla de estos denominada trinitario (Urquhart 1963). Cada fruto contiene de 30 a 40 semillas, las cuales están compuestas por dos cotiledones y un embrión rodeados por una testa que cubre la semilla, y estas envueltas en una blanca, azucarada, pulpa mucilaginosa que comprende el 40% del peso fresco de la misma (Schwan y Wheals 2004).

El proceso de fermentación consiste en extraer las semillas y colocarlos en depósitos especiales en condiciones adecuadas para que se produzcan cambios físicos y químicos con el objetivo de mejorar la calidad, facilitar el secado y alargar su conservación. Este proceso es considerado necesario, ya que el sabor y aroma desarrollados en el tostado no se producirán si el cacao no ha sido fermentado correctamente (Enríquez 1985).

Durante la primera fase de fermentación ocurre una sucesión de poblaciones de microorganismos, los cuales se encargan de transformar la semilla a grano mediante calor y ácido acético generado durante el proceso, estos penetran los tejidos de los cotiledones impidiendo la germinación al provocar la muerte del embrión (Portillo *et al.* 2009). El sustrato por el cual se denomina a este proceso fermentación es la pulpa mucilaginosa que es un medio rico para el crecimiento microbiológico, ya que contiene 82-87% agua, 10-15 % azúcar, 2-3% pentosas, 1-3% ácido cítrico y 1-1.5% pectina (Schwan y Wheals 2004).

La acidez inicial de la pulpa (pH 3.6) debido al ácido cítrico, la poca cantidad de oxígeno y la alta viscosidad de la pulpa favorece el crecimiento de levaduras durante las primeras 24 horas de fermentación. Estas degradan los azúcares simples de la pulpa como glucosa (5.4-6.6%) y fructosa (6.3-7.4%) en etanol y anhídrido carbónico, así como también metabolizan el ácido cítrico causando una disminución en acidez y producen enzimas pectinolíticas que rompen la pared celular de las células de la pulpa produciendo un líquido azucarado que se escurre como exudado, lo que permite la penetración de oxígeno dentro de la masa fermentante permitiendo el crecimiento microbiano (Nielsen 2006). Estas condiciones favorecen el desarrollo de bacterias ácido lácticas, mostrando su crecimiento más rápido durante las 16 y 48 horas. Estas bacterias fermentan los carbohidratos residuales, utilizando glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof produciendo más del 85% de ácido láctico y continúan el consumo del ácido cítrico, lo cual causa una disminución general de la acidez y la subida del valor del pH a las 88 horas de fermentación las poblaciones de levaduras y bacterias ácido lácticas disminuyen, creando un ambiente aireado, ideal para el crecimiento de las bacterias ácido acéticas.

La segunda fase de la fermentación inicia después de la muerte de las almendras ya que aumenta la permeabilidad de las paredes celulares, lo que permite la interdifusión de los componentes del jugo celular, ocasionando que las enzimas se pongan en contacto con los polifenoles y proteínas, oxidando estos compuestos por medio de la enzima principal de grano de cacao que es la polifenol oxidasa (PPO), la cual es activada cuando el oxígeno penetra la masa que se está fermentando (Enríquez 1985). Los compuestos polifenólicos son los que dan sabores astringentes y son de color violeta, como cateínas, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas, los cuales tienden a difundirse fuera del grano durante la fermentación y son oxidados en compuestos taninos insolubles como quinonas produciendo cambios en la pigmentación interna y transformación del sabor astringente de los cotiledones, ya que son los principales indicadores de calidad comercial (Beckett 2000).

Existen varios estudios sobre prácticas para mejorar la calidad final del grano de cacao, como por ejemplo Afoakwa *et al.* (2012a, 2012b), concluyeron que el incremento en el tiempo de almacenaje del fruto y del tiempo de fermentación influyó significativamente en la calidad fermentativa y apariencia de los granos de cacao Ghaniense, demostrándose que el almacenamiento de mazorcas de 7 a 14 días incrementa la calidad final del grano del 15 al 38% respectivamente durante una fermentación de seis días y reduce la cantidad de polifenoles totales, dando como resultado en una reducción significativa en la astringencia y amargor en sus productos derivados chocolates durante la fabricación industrial. De igual manera se han realizado varias investigaciones en torno a los microorganismos que influyen durante la fermentación en Ghana (Nielsen 2006), Malasia (Meersman *et al.* 2013), Indonesia (Ardhana y Graham 2003), y su rol en la calidad del chocolate (Schwan y Wheals 2004).

En la Música, el tiempo de almacenamiento de las mazorcas es muy variable, ya que la cantidad depende de la época y de la disponibilidad de fruto del productor, por lo tanto se cosecha de lunes a miércoles para acumular un número apropiado de mazorcas y poder realizar el desgrane el mismo día para dar inicio a la fermentación, proceso que realizan por cinco o seis días en cacaos trinitarios, sin considerar el tiempo de almacenamiento de los frutos. Por tal razón se determinó el objetivo de este estudio y se evaluó características físico-químicas, microbiológicas y la calidad final del grano durante el proceso de fermentación, con el propósito de obtener información que permita estandarizar la calidad del cacao y obtener una mayor retribución económica al vender el cacao.

Los objetivos del estudio fueron:

- Determinar si el almacenamiento previo y remoción de la pulpa durante la fermentación de cacao influyen en la calidad final del grano.
- Establecer los cambios en la sucesión bacteriana durante el proceso de fermentación expuesto a tres y seis días de almacenamiento con distintos números de volteos.
- Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento y frecuencia de volteo en la cantidad de polifenoles totales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las fermentaciones se realizaron con mazorcas de la variedad Trinitario, cosechadas de un bosque húmedo tropical con una altitud de 18 msnm, administrado por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), llamado centro experimental y demostrativo del cacao (CEDEC), ubicado en La Música departamento Atlántida en Honduras. Las mazorcas de cacao fueron seleccionadas de acuerdo a su nivel de madurez y enviadas ala Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, a 30 km sur este de Tegucigalpa por la ruta CA-6, municipio de San Antonio de Oriente en el departamento de Francisco Morazán. Las fases experimentales del estudio se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) y Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), ubicados en el complejo industrial del Departamento Agroindustria Alimentaria.

Para el proceso, 36 mazorcas fueron divididas en dos lotes de 18 cada uno. El primer lote fue desgranado con tres días de almacenamiento previos a la fermentación, variando en la cantidad de volteos realizados durante la fermentación. El primero se volteó una vez (48 horas), el segundo tres veces (48, 96 y 120 horas) y el tercero cinco veces (24, 48, 72, 96 y 120 horas). El segundo lote se desgrano con seis días de almacenamiento y con la misma frecuencia de volteos que el primer lote.

Se utilizó el método descrito por Pereira *et al.* (2012a), en el cual 500 g de masa de cacao se depositó en fermentadores, previo a la inoculación con el mucílago de la cáscara de cacao, con dimensiones 15x10x7 cm elaborados de plástico, poli estireno, y varias perforaciones de 0,8 cm de diámetro en el fondo. Los contenedores de plástico se colocaron en incubadoras, y la temperatura se ajustó cada 24 horas para simular la temperatura de una fermentación a gran escala: 0 h (28 °C), 24 h (32 °C), 48 h (38 °C), 72 h (46 °C), 96 h (48 °C), 120 h (48 °C), 144 h (48 °C). Cada 48 horas, muestras de 20 g se recolectaron asépticamente de cada unidad fermentadora y fueron colocadas en bolsas estériles. Las muestras para las pruebas químicas fueron selladas y guardadas a temperatura ambiente para su posterior análisis y las pruebas microbiológicas se realizaron inmediatamente después del muestreo.

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (BCA) con un arreglo factorial 2x3 con medidas repetidas en el tiempo para los análisis microbiológicos, con seis tratamientos y tres repeticiones, dando un total de 18 unidades experimentales.

**Análisis físicos.** La temperatura se midió diariamente a 6 cm de la superficie del bote fermentador, utilizando un termómetro de mercurio con una apreciación de  $\pm 0.1$  °C.

**Análisis químicos.** Durante el proceso de fermentación fueron tomadas muestras de granos con mucílago a las 0, 48, 96 y 144 horas para determinar cambios en el pH según la AOAC 970.21. En la cual se colocó la superficie del potenciómetro directamente en la pulpa del grano.

Para determinar el porcentaje de grasa en la muestra de cacao se utilizó el método AOAC 936.15, utilizando el equipo FOSS Soxtec 2050 en el cual se utilizó el reactivo éter de petróleo (40-60 °C) como disolvente.

Se analizó la concentración de polifenoles totales de los granos de cacao. Para la dilución de la muestra se utilizó el ensayo realizado por Afoakwa *et al.* (2012b) con ciertas modificaciones, en el cual se diluyó 0.2 g de extracto etéreo en 5 ml de HClmetanólico (80% Metanol conteniendo 1% HCl) mezclando durante dos horas a temperatura ambiente mediante un agitador orbital. Se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos y se tomó 1 ml del sobrenadante para determinar el contenido de polifenoles. El extracto se analizó mediante el procedimiento Folin-Ciocalteu (EEC 1990) en el cual se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (0.25 N) como fuente de iones metálicos oxidativos, y una solución de carbonato de sodio (1 N). Se agregó 1 ml del extracto en tubos de ensayo y a este se agregó 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu, se agitó y dejó reposar por tres minutos. El extracto redujo los iones metálicos en la medida de su contenido de polifenoles. Posteriormente, se agregó 1 ml de carbonato de sodio, nuevamente se agitó y dejó reposar por siete minutos. El carbonato de sodio fue agregado para reducir el pH. Luego se agregaron 7 ml de agua, se agitó y dejó reposar por dos horas. Finalmente se agitó y se midió absorbancia en el espectrofotómetro a 726 nm. Este procedimiento se realizó al principio y al final de la fermentación en cada tratamiento para determinar el cambio en el contenido de polifenoles. Se aplicó el mismo procedimiento para realizar una curva estándar de ácido gálico a concentraciones de 800 y 0 ppm de ácido gálico en lugar del extracto de cacao. Se registraron los datos de absorbancia de cada muestra y se realizó un ajuste con la pendiente de la curva estándar de ácido gálico para obtener un valor final de concentración de polifenoles. A los valores de la curva estándar se les sacó la pendiente. Con estos valores se utilizó una fórmula que permitió calcular la concentración de polifenoles. Los datos se reportaron como mg/kg de equivalente de ácido gálico.

$$\text{Concentración}_{\text{ppm}} = \frac{\text{Abs}^{726}}{\text{Pendiente}} * \text{Factor de dilución} \quad [1]$$

**Análisis microbiológicos.** Para los análisis microbiológicos se utilizó el procedimiento descrito por Pereira (Pereira *et al.* 2012b) realizando ciertas modificaciones, en el cual se añadió 90 ml de buffer de fosfatos a 10 g de almendras de cacao y se homogenizó mediante una mesa giratoria por cinco minutos (dilución  $10^{-1}$ ). Se realizó diluciones en serie mediante buffer de fosfatos y se colocó sobre tres platos con diferente medio de cultivo. Para analizar el crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas (LAB) mediante la técnica de vaciado en placa se utilizó el medio de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) con 20 g/l agar, suplementado con 1 g/l de cicloheximida y 2 g/l de ácido sórbico para inhibir el crecimiento de levaduras, se colocó una doble capa del medio para obtener condiciones anaeróbicas durante incubación. Para analizar el crecimiento de bacterias Ácido Acéticas se utilizó el medio agar GYC mediante la técnica siembra por superficie, el cual contiene 50 g/l de glucosa, 10 g/l extracto de levadura, 30 g/l carbonato de calcio, 20 g/l agar y suplementado con 1 g/l de cicloheximida para inhibir el crecimiento de levaduras y 50 mg/l penicilina para inhibir el crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas. Levaduras fueron analizadas mediante la técnica de vaciado en placa en el medio Agar Papa Dextrosa (APD) suplementado con ácido tartárico al 10% (1 ml/100 ml). Se colocó 0.1 ml de inóculo con la técnica siembra por superficie y 1 ml en vaciado en placa. Después de la siembra, se incubó los platos a 28 °C durante tres días para los cultivos en crecimiento en el medio MRS y APD, los cultivos en agar GYC a 28 °C durante cinco días. Finalmente después de la incubación se contó el número de unidades formadoras de colonia (UFC).

**Prueba de corte.** Se evaluó la calidad del grano según el método internacional descrito por Guehi *et al.* (2008) realizando ciertas modificaciones por el tamaño de muestra, la cual se redujo la cantidad de granos muestreados. Esta norma establece la clasificación y los requisitos de calidad que debe cumplir el cacao en grano beneficiado y los criterios que deben aplicarse para su clasificación. Un total de 50 granos de cacao con menos del 8% de humedad fueron cortados longitudinalmente por el medio con la finalidad de exponer al máximo la superficie de sus cotiledones. Estas se clasificaron en las siguientes categorías: Almendras de color violeta, violeta/café, café, pizarroso, germinado y mohoso.

Todos los análisis fueron realizados por triplicado y los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1). Se realizó un análisis de varianza complementado con una comparación de medias por la prueba de rangos múltiples Duncan y LSMENS.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Características físico-químicas

**Temperatura.** Respecto a la temperatura se observó que hubo diferencias estadísticas ( $P=0.0002$ ) para el tiempo de almacenamiento (Cuadro 1). Los datos presentados son los promedios de los resultados de la medición diaria de la temperatura durante los seis días de fermentación. Se mostró que al incrementar el tiempo de almacenamiento de tres a seis días se obtiene valores más elevados, como lo indicó la prueba Duncan a las 24 horas (Figura 1) lo que podría atribuirse a la pérdida de agua durante el almacenamiento lo cual favorece a la elevación de la temperatura durante la fermentación (Wood y Lass 1985). Estos resultados corroboran con lo señalado por otros investigadores (Bertorelli *et al.* 2009), quienes señalan beneficioso el incremento de la temperatura durante el proceso, ya que es uno de los factores determinantes para la muerte del embrión y también para la inhibición de ciertos grupos de microorganismos (Enríquez 1985).

Cuadro 1. Promedio de la temperatura y pH de la pulpa de la masa de cacaosometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

Tiempo almacenamiento (días)	Frecuencia volteo	Temperatura (°C)	pH
3	FV1	35.90 ± 0.72 <sup>c</sup>	4.20 ± 0.04 <sup>cd</sup>
	FV3	36.27 ± 0.14 <sup>c</sup>	4.15 ± 0.04 <sup>d</sup>
	FV5	36.33 ± 0.30 <sup>bc</sup>	4.07 ± 0.03 <sup>e</sup>
6	FV1	37.27 ± 0.89 <sup>ab</sup>	4.53 ± 0.10 <sup>a</sup>
	FV3	37.67 ± 0.81 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.12 <sup>b</sup>
	FV5	37.90 ± 0.44 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.01 <sup>c</sup>
CV%		1.48	1.27

Medias con letras diferentes en cada columna (a, b, c) indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

En cuanto a la frecuencia de volteo se determinó que no hubo diferencias estadísticas ( $P=0.2652$ ) con respecto a la temperatura (Cuadro 1), lo cual es contrario a lo reportado en otros estudios (Portillo *et al.* 2005), ya que la remoción causa una mayor aeración, ocasionando un ambiente favorable para el desarrollo de bacterias aerobias ácido acéticas cuyo metabolismo es generador de reacciones exotérmicas que ocasionan un incremento de la temperatura (Senanayake *et al.* 1997). Sin embargo, el volumen de la masa en fermentación es una fuente de variación, ya que se ha reportado que para volúmenes pequeños no es necesario realizar volteos (Rohan 1964).

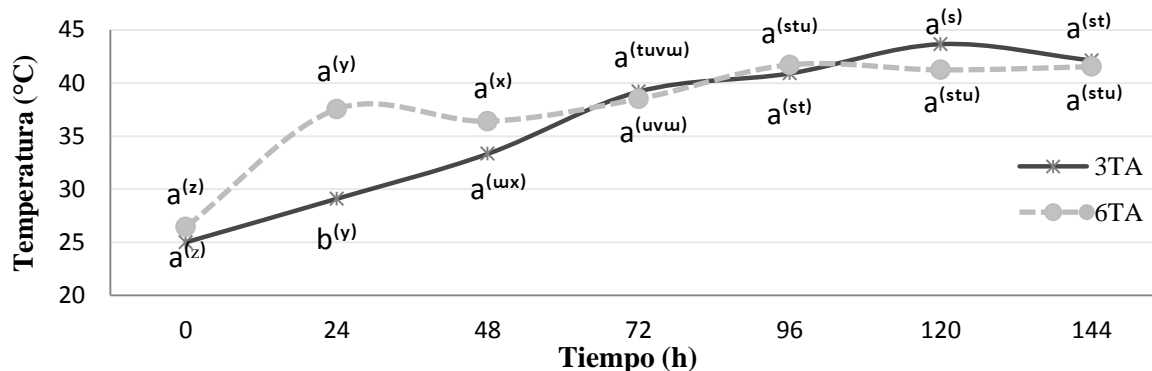


Figura 1. Promedio de la temperatura según el tiempo de almacenamiento medida diariamente durante la fermentación.

Medias con letras diferentes cada 24h (a, b) indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P<0.05$ ). Medias con letras diferentes en cada tratamiento (s, t, u, v, w, x, y, z) indican diferencias significativas a través del tiempo ( $P<0.05$ ). 3TA= Tres días de almacenamiento en mazorca y fermentado durante 144 horas. 6TA= Seis día de almacenamiento en mazorca y fermentado durante 144 horas.

**Análisis de pH.** El pH final de los granos, la velocidad de difusión de los ácidos orgánicos adentro de los cotiledones y la duración del periodo óptimo del pH son parámetros muy importantes para el desarrollo óptimo del posterior sabor a chocolate (Beckett 2000). De igual manera el pH es un factor determinante para el crecimiento de las levaduras durante la primera fase de fermentación con una acidez inicial de 3.4–4.0 en la pulpa del grano, ya que la pulpa contiene ácido cítrico que posteriormente es degradado por las levaduras y bacterias lácticas que lo metabolizan y lo sustituyen por ácido láctico y acético menos disociados (Rohan 1964) y como consecuencia disminuye la acidez.

El análisis de varianza para el pH detectó diferencias altamente significativas para el tiempo de almacenado ( $P<0.0001$ ), lo cual podría atribuirse a una cierta prefermentación ocurrida durante el tiempo de almacenamiento en el interior de la mazorca (Torres *et al.* 2004). Todos los tratamientos que fueron almacenados durante seis días presentan valores mayores (Cuadro 1), lo cual coincide con estudios previos que han demostrado que al incrementar el tiempo de almacenamiento disminuye el volumen de la pulpa debido a la evaporación del agua y la inversión de la sacarosa, lo que a su vez ocasiona una disminución en el azúcar total, influyendo en la cantidad de bacterias productoras de ácido reduciendo la producción durante la fermentación (Biehl *et al.* 1989).

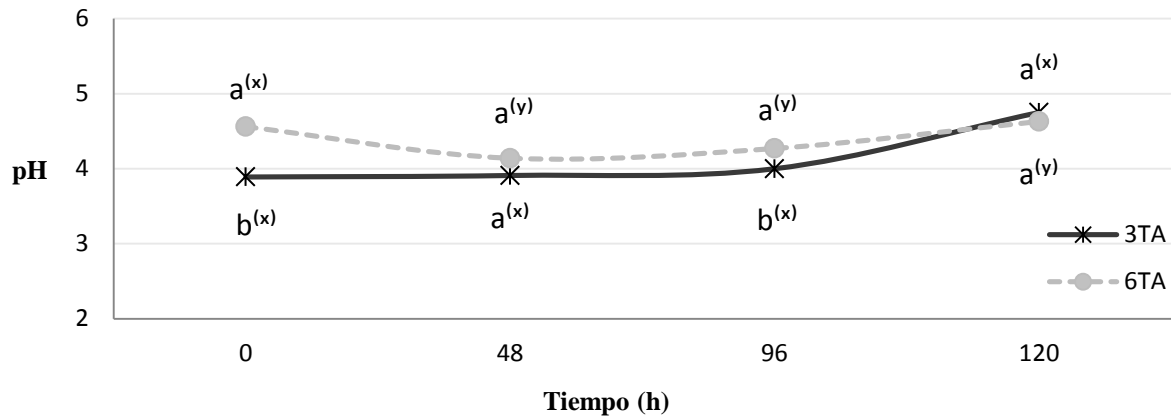


Figura 2. Promedio del pH según el tiempo de almacenamiento medida diariamente durante la fermentación.

Medias con letras diferentes en cada tiempo (a, b) indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Medias con letras diferentes en cada tratamiento (x, y) indican diferencias significativas a través del tiempo ( $P < 0.05$ ). 3TA= Tres días de almacenamiento en mazorca y fermentado durante 144 horas. 6TA= Seis día de almacenamiento en mazorca y fermentado durante 144 horas.

En cuanto a los resultados obtenidos al fermentar con distintas frecuencia de volteo, el análisis de varianza determinó diferencias estadísticas ( $P = 0.0004$ ), por lo tanto se concluye que al aumentar la frecuencia de remoción se obtienen menores valores de pH (Cuadro 1), ya que al voltear se airea la masa ocasionando un incremento de microorganismos aerobios que después de aproximadamente 36 horas de haber iniciado la fermentación, reducen la acidez de la pulpa (Figura 2), debido a que las levaduras han transformado los azúcares simples del mucílago a etanol, degradando la pectina y eliminando el ácido cítrico. Estas condiciones favorecen el desarrollo de las bacterias ácido lácticas, que fermentan los carbohidratos residuales y continúan el consumo del ácido cítrico (Wacher 2011).

**Grasa total.** El tiempo de almacenamiento afectó significativamente ( $P > 0.0001$ ) en el porcentaje total de grasa de los granos. En el cuadro 2 se observa que conforme aumenta el tiempo de almacenado de tres a seis días los valores incrementan de 37.92 a 40% respectivamente para granos al inicio de la fermentación, lo cual puede ser atribuido a que al aumentar el tiempo de cosecha se obtiene mayor porcentaje de grasa (González *et al.* 1999), debido a que la humedad disminuye por lo tanto la cantidad de sólidos totales aumentan, conteniendo la mayor parte de los nutrientes en forma de grasa que supone más de la mitad del peso seco del haba (Beckett 2000).

El tiempo de fermentación influyó significativamente ( $P < 0.0001$ ) en el porcentaje de grasa de los granos a lo largo de la fermentación, con reducciones alrededor de 9 y 10% para granos almacenados durante tres y seis días respectivamente (Cuadro 2), lo cual es atribuido a los compuestos lipídicos que se degradan por acción de enzimas metabolizadas por microorganismos intrínsecos a la fermentación (Nielsen 2006).

Cuadro 2. Porcentaje de grasa total en granos al inicio y final de la fermentación que fueron sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

Tiempo almacenamiento (días)	Frecuencia volteo	Tiempo de fermentación (horas)	
		0	144
3	FV1	37.92 ± 0.41 <sup>b(x)</sup>	29.11 ± 0.18 <sup>bc(y)</sup>
	FV3	37.92 ± 0.41 <sup>b(x)</sup>	28.90 ± 0.45 <sup>c(y)</sup>
	FV5	37.92 ± 0.41 <sup>b(x)</sup>	29.52 ± 1.09 <sup>abc(y)</sup>
6	FV1	40.00 ± 1.66 <sup>a(x)</sup>	30.32 ± 1.27 <sup>abc(y)</sup>
	FV3	40.00 ± 1.66 <sup>a(x)</sup>	30.83 ± 1.59 <sup>ab(y)</sup>
	FV5	40.00 ± 1.66 <sup>a(x)</sup>	31.32 ± 0.79 <sup>a(y)</sup>
CV%		3.27	

Medias con letras diferentes en cada columna (a, b, c) indican diferencias significativas (P<0.05). Medias con letras diferentes en cada fila (x, y) indican diferencias significativas a través del tiempo (P<0.05).

FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

**Polifenoles totales.** Se realizó el ensayo de polifenoles totales al inicio y al final de la fermentación, en donde los resultados de cada tratamiento se analizaron por separado. Se obtuvieron los datos mediante la aplicación de los valores obtenidos de espectrometría en la Ecuación [1]. En el cual se observó un patrón, determinando que el incremento del tiempo de almacenado y frecuencia de volteo influyó directamente en la reducción de la cantidad total de polifenoles.

Los compuestos polifenólicos, comprenden del 12 al 18% del total del peso del grano, y se les atribuye colores violetas y sabores amargos o astringentes que determinan la calidad (Beckett 2000), por lo tanto se atribuyó un efecto positivo al incrementar los días de almacenamiento de tres a seis días ya que en granos que no fueron fermentados mostraron una disminución de 19.89 a 18.69 mgGAE/g (Cuadro 3) respectivamente con una diferencia estadística significativa (P<0.0001).

El análisis estadístico determinó diferencias significativas para la frecuencia de remoción (P<0.0001), obteniendo la menor cantidad de polifenoles los tratamientos volteados cinco veces (Cuadro 3), por lo tanto es aconsejable voltear cada 24 horas ya que incrementa la aireación en la masa favoreciendo la actividad de la enzima polifenol oxidasa ya que cuando el oxígeno penetra a las células de los cotiledones los compuestos polifenólicos se oxidan en productos complejos insolubles que tienen color pardo, por lo tanto al incrementar la frecuencia de volteo incrementa el porcentaje de granos cafés (Kongor *et al.* 2013).

Cuadro 3. Contenido de polifenoles totales en granos de cacao a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación, expresado en mg/g equivalente de ácido gálico.

Tiempo almacenamiento (días)	Frecuencia volteo	Tiempo de fermentación (horas)	
		0	144
3	FV1	19.34 ± 0.12 <sup>a(x)</sup>	17.75 ± 0.12 <sup>a(y)</sup>
	FV3	19.34 ± 0.12 <sup>a(x)</sup>	17.25 ± 0.22 <sup>b(y)</sup>
	FV5	19.34 ± 0.12 <sup>a(x)</sup>	16.77 ± 0.06 <sup>cd(y)</sup>
6	FV1	18.69 ± 0.06 <sup>b(x)</sup>	17.26 ± 0.21 <sup>b(y)</sup>
	FV3	18.69 ± 0.06 <sup>b(x)</sup>	16.92 ± 0.18 <sup>c(y)</sup>
	FV5	18.69 ± 0.06 <sup>b(x)</sup>	16.51 ± 0.33 <sup>d(y)</sup>
CV%		0.83	

Medias con letras diferentes en cada columna (a, b, c) indican diferencias significativas (P<0.05). Medias con letras diferentes en cada fila (x, y) indican diferencias significativas a través del tiempo (P<0.05).

FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

La disminución en el contenido de polifenoles al término de la fermentación presentó una clara diferencia estadística (P<0.0001) para todos los tratamientos (Cuadro 3), esto se debe a la actividad enzimática que ocurre durante la fermentación ocasionando una oxidación y condensación oxidativa de los compuestos polifenólicos (Enríquez 1985). Lo cual coincide con los resultados reportados por Afoakwa *et al.* (2012b) quien determinó a mayor tiempo de fermentación la concentración de polifenoles disminuye, dando como resultado granos más oscuros.

**Análisis microbiológicos.** El análisis de varianza de los resultados microbiológicos reveló diferencia estadísticas (P<0.0001) a través del tiempo para los tres microorganismos evaluados. Se observa un patrón que muestra una disminución en log(UFC/g) a partir de las 96 horas de fermentación en todos los microorganismos, esto ocurre debido a reacciones exotérmicas de las bacterias ácido acéticas, ya que transforman el etanol a ácido acético incrementando la temperatura de la masa fermentante cerca de 45 °C (Figura 1), de igual manera ocurre un incremento en el pH (Figura 2) por el aumento de ácido acético que se hace evidente por su fuerte olor, con lo cual se concluye la primera fase de la fermentación (Beckett 2000).

**Levaduras.** En la cuadro 4 se observó que el tiempo de almacenamiento no influyó estadísticamente en el contenido de levaduras (P=0.1338), posiblemente por el control de la temperatura durante la fermentación ya que un factor limitante para el desarrollo de los grupos de microorganismos es la temperatura (Schwan y Wheals 2004). El comportamiento de las levaduras a lo largo de la fermentación presentó diferencias estadísticas (P<0.0001) lo cual lo podemos observar en la figura 3, en la cual se observa una tendencia donde las levaduras alcanzan su mayor crecimiento exponencial a las 48

horas lo cual es contrario a lo reportado por Schwan y Wheals (2004) y Wacher (2011) quienes señalan que las levaduras son predominantes a las 12 y 36 horas respectivamente, sin embargo en estos estudios no fueron almacenadas las mazorcas por lo tanto se atribuye a una prefermentación ocurrida en el tiempo de almacenamiento que ocasiona que la sucesión microbiológica se acelere durante el proceso fermentativo.

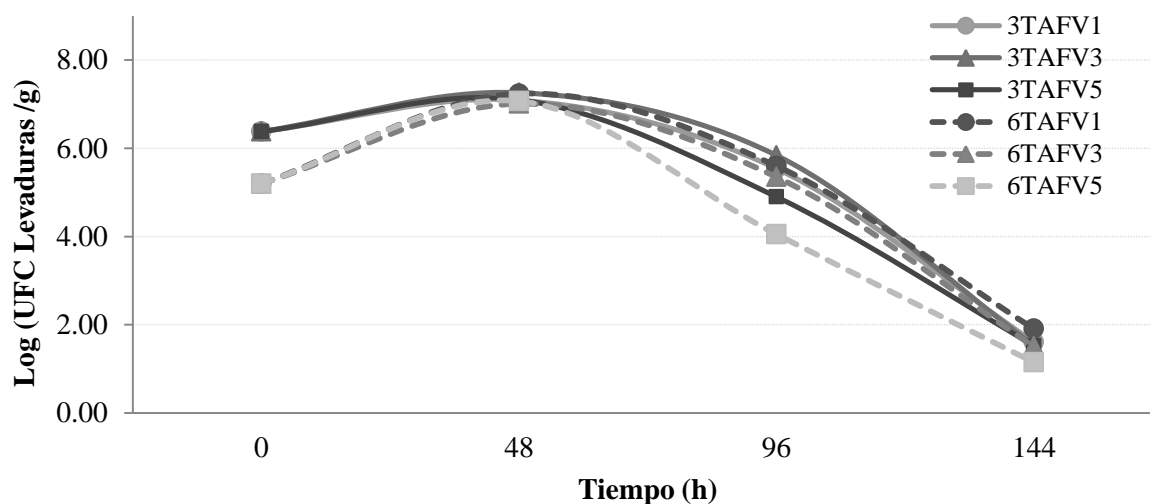


Figura 3. Recuento de levaduras en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

3TAFV1 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 1 vez (48h) durante la fermentación. 3TAFV3 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 3 veces (48,96 y 120h) durante la fermentación. 3TAFV5 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 5 veces (24,48,72,96 y 120h) durante la fermentación. 6TAFV1 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 1 vez (48h) durante la fermentación. 6TAFV3 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 3 veces (48,96 y 120h) durante la fermentación. 6TAFV5 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 5 veces (24,48,72,96 y 120h) durante la fermentación.

El bajo pH de la pulpa y la poca cantidad de oxígeno en la masa al inicio de la fermentación favorece el desarrollo de las levaduras al inicio de la fermentación, donde aparecen entre cinco y seis especies diferentes de levaduras en especial *Hanseniasspora guillermondii* durante la fase inicial y *Saccaromyces cerevisiae* al final de la fermentación (Wacher 2011). A las cuales se les atribuye el consumo de azúcares simples que son transformados a etanol, metabolización del ácido cítrico que contiene la pulpa causando un decrecimiento en la acidez del medio (Figura 2) y la producción de enzimas pectinolíticas que rompen la pared celular de las células de la pulpa, por lo tanto se produce un drástico decrecimiento a partir de las 48 horas hasta llegar a una población final de tan solo 10 células viables por gramo de pulpa al final de la fermentación (Figura 3) (Schwan y Wheals 2004).

No se observó diferencias estadísticas para la frecuencia de volteo en todos los tratamientos ( $P=0.4757$ ), posiblemente porque no se obtuvieron diferentes temperaturas al realizar los distintos volteos, por lo tanto el comportamiento fue similar para todos los tratamientos, lo cual coincide con estudios previos que reportan incrementos de 12 a las 48 horas de fermentación, debido a su tolerancia a bajos pH y a sus características metabólicas, siendo los dominantes durante este tiempo (Daniel *et al.* 2009), por lo tanto

las siguientes horas independientemente el número de volteos la cantidad de levaduras disminuyó hasta llegar al término de la fermentación (Figura 3), debido a que metabolizan ácido cítrico causando un aumento de pH de la pulpa que inhibe su crecimiento creando un medio favorable para las bacterias lácticas (Beckett 2000).

**Bacterias Ácido Lácticas.** Las variaciones observadas en la población de bacterias ácido lácticas coinciden con las detectadas por Schwan y Wheals (2004). Ya que en el presente estudio el mayor período de crecimiento celular se observó de las 0 a las 48 horas de fermentación (Figura 4) y el mayor crecimiento reportado fue de las 16 a las 48 horas. Esto es atribuido a la temperatura, ya que a pesar que el tiempo de almacenamiento en mazorca no mostro diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P=0.5965$ ) se obtuvo el ambiente adecuado para el crecimiento celular, ya que no sobrepaso los 37 °C durante las primeras 48 horas (Figura 2), siendo esta una barrera para el crecimiento de las mismas.

La población de bacterias lácticas aumento debido a la modificación de ciertas condiciones ocasionadas por las levaduras durante las primeras horas de fermentación, como la disminución del pH (Figura 2) y el aumento en aireación en la masa debido a la degradación de la pulpa que se escurrió como exudado (Enríquez 1985). Diferentes especies se han aislado en distintos países pero de las principales especies encontradas son *Lactobacillus fermentum*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus (Streptococcus) lactis*, quienes continúan la fermentación de los azúcares residuales y el consumo del ácido cítrico (Schwan y Wheals 2004).

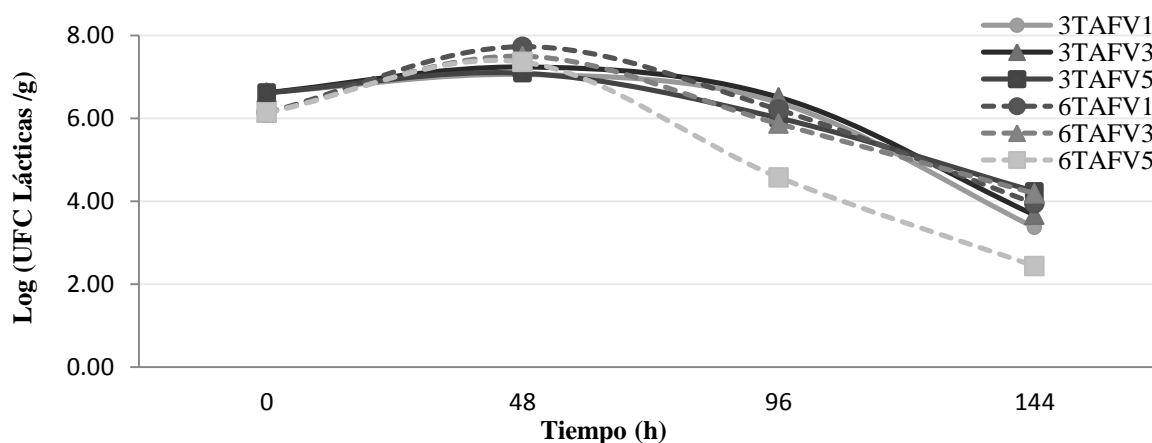


Figura 4. Recuento de bacterias ácido lácticas en granos de cacao sometidos a distintos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

3TAFV1 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 1 vez (48h) durante la fermentación. 3TAFV3 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 3 veces (48,96 y 120h) durante la fermentación. 3TAFV5 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 5 veces (24,48,72,96 y 120h) durante la fermentación. 6TAFV1 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 1 vez (48h) durante la fermentación. 6TAFV3 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 3 veces (48,96 y 120h) durante la fermentación. 6TAFV5 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 5 veces (24,48,72,96 y 120h) durante la fermentación.

El análisis de varianza para la frecuencia de volteo tampoco presentó diferencias estadísticas ( $P=0.7596$ ) en el recuento de bacterias ácido lácticas, contrario a lo reportado por Castro (2010), en la cual el tratamiento con menor número de remociones (tres volteos a las 48,96 y 120 horas) no alcanzó la temperatura de 40 °C, por lo tanto se observó diferencias, pero como en este ensayo la temperatura fue regulada manualmente mediante una incubadora los distintos volteos no modificaron la temperatura de la masa obteniendo resultados similares.

**Bacterias Ácido Acéticas.** Las bacterias acéticas más importantes que se han aislado son: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, las cuales causan un incremento en acidificación junto con rápidos incrementos de temperatura en la pulpa (Wacher 2011). En las cuales se observó un crecimiento variable para los dos tiempos de almacenamiento con diferencias estadísticas ( $P=0.0392$ ), obteniendo mayor cantidad de bacterias ácido acéticas en granos que se almacenaron en mazorca durante seis días (Figura 5), lo cual es atribuido a la mayor temperatura obtenida a las 24 de fermentación (Figura 1) en dichos granos, ya que se propició el medio óptimo para su crecimiento, con una mayor aireación en la masa, alta temperatura y baja acidez (Wacher 2011). Sin embargo no coincide con estudios anteriores que presentan que la etapa donde dominan estas bacterias es a las 88 horas (Schwan y Wheals 2004) y no a las 0 y 48 horas que se reporta en el presente estudio para granos almacenados durante tres y seis días respectivamente, lo cual es atribuido al tiempo de almacenamiento ya que se asume que se inició una prefermentación en el interior de la mazorca después de haber sido cosechada la mazorca lo cual adelantó el ciclo microbiológico.

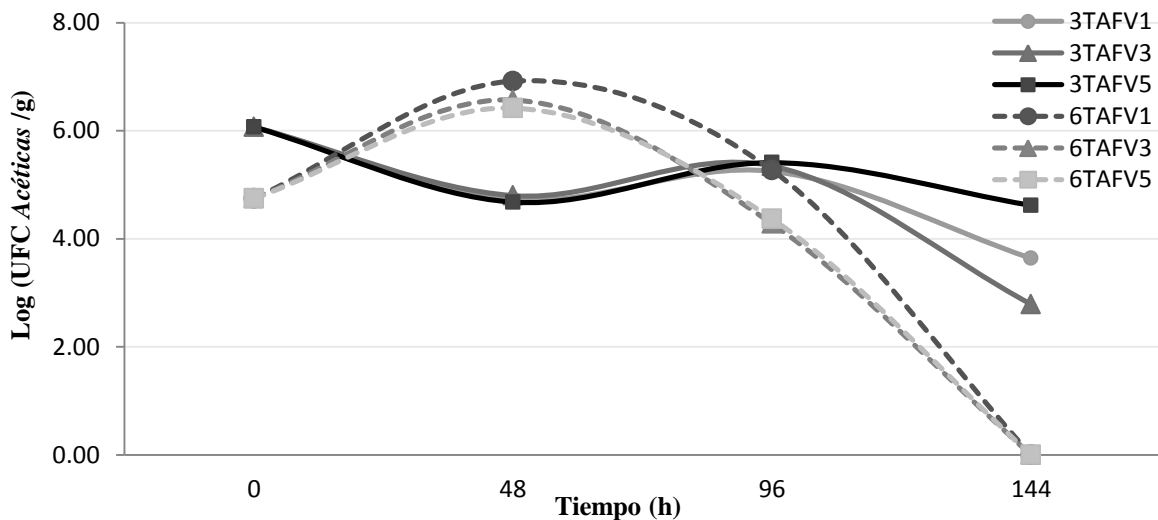


Figura 5. Recuento de bacterias ácido acéticas en granos de cacao sometidos a distintos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

3TAFV1 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 1 vez (48h) durante la fermentación. 3TAFV3 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 3 veces (48,96 y 120h) durante la fermentación. 3TAFV5 granos almacenados durante 3 días en mazorca y volteados 5 veces (24,48,72,96 y 120h) durante la fermentación. 6TAFV1 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 1 vez (48h) durante la fermentación. 6TAFV3 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 3 veces (48,96 y 120h) durante la fermentación. 6TAFV5 granos almacenados durante 6 días en mazorca y volteados 5 veces (24,48,72,96 y 120h) durante la fermentación.

La frecuencia de volteo no mostró diferencia estadística entre los distintos tratamientos ( $P=0.7673$ ), lo cual es contrario a lo reportado por Biehl *et al.* (1989) quien argumenta que al aumentar la frecuencia de volteo incrementa la aireación de la masa junto con la temperatura, ya que llevan a cabo la transformación del etanol que produjeron las levaduras en ácido acético, y debido a que esta es una reacción exotérmica las bacterias ácido acéticas se convierten en los organismos dominantes, sin embargo se atribuye al control de la temperatura que todos los tratamiento se hayan comportado de la misma forma (Figura 5).

### Calidad final.

**Prueba de corte.** Los resultados de la prueba de corte realizados a los granos después de cada tratamiento fueron evaluados y analizados estadísticamente, para el cual el tiempo de almacenado influyó significativamente en la calidad final con alta diferencia estadística ( $P<0.0001$ ). Se observó que para los tratamientos FV1 y FV3 resultó en un aumento de granos bien fermentados, de 18 a 30% y de 40 a 72% respectivamente (Figura 6), caso contrario para el tratamiento FV5 donde se observó una disminución en el porcentaje de granos bien fermentados al aumentar el tiempo de almacenamiento, con una reducción de 74 a 60% posiblemente debido a una sobrefermentación de los granos.

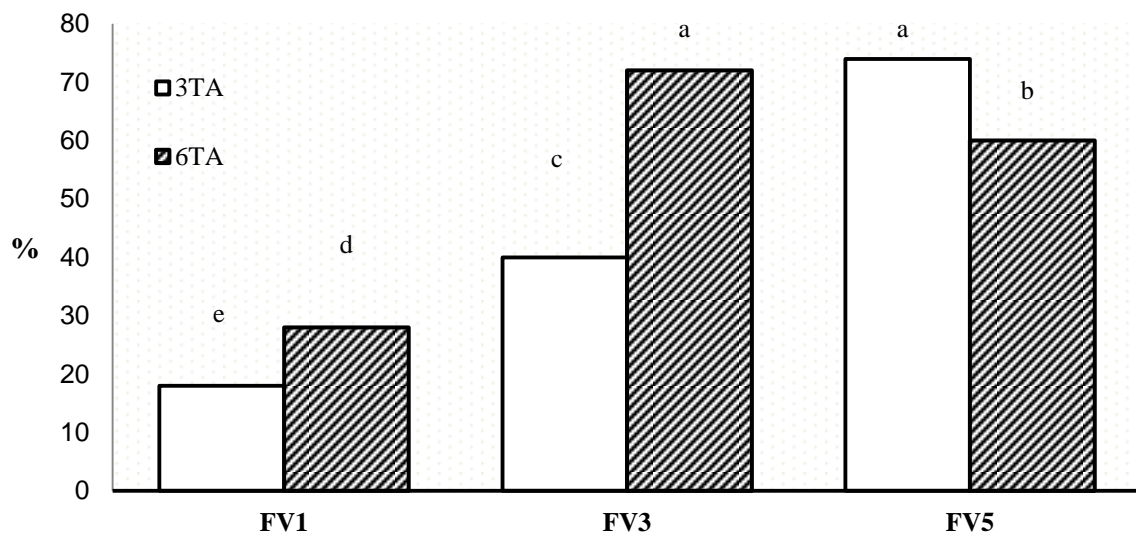


Figura 6. Porcentaje de granos de cacao bien fermentados que fueron sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

3TA Granos almacenados durante 3 días en mazorca. 6TA Granos almacenados durante 6 días en mazorca. FV1 granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas. FV3 granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas. FV5 granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas. Medias con letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Este patrón se puede atribuir a la reducción del volumen de la pulpa por semilla ocasionada por una evaporación del agua contenida, lo cual influye de manera directa a la actividad de la enzima polifenol oxidasa durante la fermentación y su posterior secado, observando modificaciones notorias en la concentración de polifenoles (Cuadro 3) y concentraciones de antocianinas (Kongor *et al.* 2013) a quienes se les atribuye la coloración violeta de los granos. Lo anterior coincide con los estudios realizados por Afokwa *et al.* (2012a) donde se determina que el tiempo de almacenamiento incrementa la cantidad de granos cafés, con aumentos de 15 y 38% para granos almacenados durante 7 y 14 días durante una fermentación de 6 días.

Resultados obtenidos por Álvarez *et al.* (2010) registraron que muestras volteadas en distintas frecuencias fueron significativamente diferentes, ya que el mayor grado de fermentación se obtuvo para una frecuencia de volteo cada 24 horas con un 86% de granos bien fermentados, lo cual coincide con los resultados presentados en este estudio donde se observó un patrón que determina que a mayor número de volteos se obtienen mayor cantidad de granos bien fermentados excepto para el tratamiento FV5 en el cual disminuye la cantidad de granos bien fermentados (Figura 6), lo cual puede ser atribuido a una sobrefermentación en los granos debido al tiempo de almacenamiento (Afoakwa 2012a).

## 4. CONCLUSIONES

- Incrementar el tiempo de almacenado de las mazorcas y frecuencia de volteo durante la fermentación tuvo un efecto positivo en la calidad fermentativa y apariencia de los granos que fueron sometidos a un volteo y tres volteos ya que incrementaron el porcentaje de granos bien fermentados por 10 y 32% respectivamente, sin embargo fue negativo para los granos que se voltearon cinco veces ya que prestaron una disminución de 14%.
- Solo las bacterias ácido acéticas presentaron cambios significativos en cuanto a tiempo de almacenamiento, sin embargo no se presentó diferencias microbiológicas en ninguno de los tratamientos sometidos a distintas frecuencias de remoción debido al control de la temperatura y poca cantidad de masa.
- El tiempo de almacenamiento de tres y seis días afecto positivamente el contenido de polifenoles, presentando reducciones del 9 y 10% respectivamente a lo largo de la fermentación.
- Se debe de reducir la cantidad de volteos al aumentar el tiempo de almacenado para obtener mayor porcentaje de granos bien fermentados.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Realizar un estudio microbiológico en el lugar de fermentación a gran escala en el Centro demostrativo del cacao (CEDEC) para evaluar las diferencias con las micro fermentaciones realizadas a menor escala en un laboratorio.
- Almacenar las mazorcas durante 6 días y reducir la frecuencia de volteo a 3 veces (48, 96 y 120 horas) en los meses de baja producción (Julio, agosto y septiembre) con el objetivo de recolectar mayor cantidad de frutos y obtener la cantidad adecuada para fermentar.

## 6. LITERATURA CITADA

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC international.15 ed. Maryland, USA.AOAC 936.15

AOAC. 1997. Official Methods of Analysis of AOAC international.16 ed. Maryland, USA.AOAC 970.21. pH of Cacao Products Potentiometric Method First Action 1970 Final Action 1974.

Afoakwa, E.O., Q. Jennifer, S.B. Agnes, S.T. Jemmy y K.S Firibu. 2012a. Influence of pulp-preconditioning and fermentation on fermentative quality and appearance of Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*. 19(1):127-133.

Afoakwa, E.O., J. Quao, F.S. Takrama, A.S. Budu y F.K. Saalia. 2012b. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp preconditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*. 19(3):1071-1077.

Ardhana, M. y H. Graham. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*. 86(2003) 87-99.

Beckett, S. 2000. *La Ciencia del chocolate*. España. Acribia. 201 p.

Bertorelli, L.O., G. Rovedas, L. Graziani. 2009. Influencia de varios factores sobre índices físicos del grano de cacao en fermentación. *Agronomía Trop*. 59(1):81-88.

Biehl, B., B. Meyr, G. Crone, L. Pollmann, M.B. Said. 1989. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and post-harvest storage of cocoa pods. *Journal Science Food Agriculture*. 48:189-208.

Castro, Z.R. 2010. Caracterización del proceso de fermentación del grano de copoazú (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng). *Ing. Agr. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia*. 47 p.

Daniel, H.M., G. Vracken, J.F. Takrama, F. Camu y P. Vuyst. 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*. 9:774-783.

Enríquez, G.A. 1985. *Curso sobre el cultivo del cacao*. Ed. Jaime Rojas. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 240 p.

EEC 1990. Folin-Ciocalteu index. *Official Journal of European Communities* 41:178-179.

Gonzales, F., L. Bertorelli, L. Graziani, E. Monteverde-Penso. 1999. Influencia del índice de cosecha de la mazorca sobre características de la grasa de dos cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista Facultad Agronomía (Maracay)*. 25:159-171.

Guehi, T.S., N.D. Yao, N.P. Manizan, K.R. Nevry, L.B. Koffi y Y.M. Konan. 2008. Comparison of the degree of fermentation and fungal profiles of raw cocoa beans sourced from three Ivorian main producing regions. *African Journal of Food Science* 2: 112-118.

Kongor, J.E., J.F. Takrama, A.S. Budu, H. Mensah-Brown, E.O. Afoakwa. 2013. Effects of fermentation and drying of the fermentation index and cut test of pulp pre-conditioned Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of food science and engineering* 3:625-634

Meersman, E., J. Steensels, M. Mathawan, P. Wittcx, V. Saels, N. Strufy, H. Bernaert, G. Vrancken y k.J. Verstrepen. 2013. Detailed Analysis of the Microbial Population in Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals a Core and Variable Microbiota. *PLOS ONE* 8(12): e81559.

Nielsen, S.D. 2006. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations. Tesis Ph.D. Denmark, The Royal Veterinary and Agricultural University. 111 p.

Pereira, G.V., K. Teixeira, E. Gonzaga, I. Silva y R. Shwan. 2012a. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*. 161 (2013) 121-133.

Pereira, G.V., M. Cruz, C. Lacerda, y R. Schwan. 2012b. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains for the development of a defined starter culture. *American society for microbiology*. 10.1128/AEM.0144-12.

Portillo, E., L. Graziani, E. Betancourt. 2005. Efecto de los tratamientos post-cosecha sobre la temperatura y el índice de fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del lago de Maracaibo. *Revista de la facultad de agronomía*. ISSN 0378-7818.

Portillo, E., M. Labarca, L. Grazziani, E. Cros, S. Assemat, F. Davrieux, R. Boulanger y M. Marcano. 2009. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique (CIRAD)*. 80/16 34398.

Rohan, T. 1964. El beneficiado del cacao bruto destinado al mercado. Roma. FAO. 79p.

Schwan, F.R. y A.E. Wheals. 2004. The microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44:4 205-221.

Senanayake M., E.R. Jansz y K.A. Buckle. 1997. Effect of Different Mixing Intervals on the Fermentation of Cocoa Beans. *Journal Science Food Agriculture* 74:42-48.

Torres, O., L. Graziani, L. Bertorelli, A. Trujillo. 2004. Efecto del tiempo trascendido entre la cosecha y el desgrano de la mazorca del cacao tipo forastero de cuyagua sobre características del grano en fermentación. *Agronomía Trop.* 54(4):481-495.

Urquhart, D.H. 1963. Cacao. Ed. Fernando Monge, Edilberto Camacho. Turrialba, Costa Rica, Editorial SIC. 311 p.

Wacher. M.C. 2011. Microorganismos y chocolate. *Revista digital Universitaria*. ISSN: 1067-6079.

Wood, G.A.R. y Lass, R.A.1985. Cacao. Tropical Agriculture Series. London G.B. Longman Group Limited. 620 p.

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Resumen ANDEVA de análisis realizados a granos de cacao que fueron sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

Análisis	Fracción	Valor F	Probabilidad	R <sup>2</sup>	Coefficiente de variación
<b>Temperatura</b>	TA	31.45	0.0002	0.80	1.48
	FV	1.52	0.2652	0.80	1.48
	TA*FV	0.06	0.9443	0.80	1.48
<b>pH</b>	TA	106.41	<0.0001	0.94	1.27
	FV	19.48	0.0004	0.94	1.27
	TA*FV	1.92	0.1963	0.94	1.27
<b>Grasa total</b>	TA	24.56	<0.0001	0.96	3.27
	FV	0.33	0.7216	0.96	3.27
	TIEMPO	567.64	<0.0001	0.96	3.27
	TA*FV*TIEMPO	0.19	0.9842	0.96	3.27
<b>Polifenoles totales</b>	TA	100.64	<0.0001	0.98	0.83
	FV	25	<0.0001	0.98	0.83
	TIEMPO	1496.23	<0.0001	0.98	0.83
	TA*FV*TIEMPO	8.62	<0.0001	0.98	0.83
<b>Levaduras</b>	TA	2.33	0.1338	0.84	23.99
	FV	0.76	0.4757	0.84	23.99
	TIEMPO	74.1	<0.0001	0.84	23.99
	TA*FV*TIEMPO	0.33	0.9919	0.84	23.99
<b>Ácido Lácticas</b>	TA	0.28	0.5965	0.44	34.39
	FV	0.28	0.7596	0.44	34.39
	TIEMPO	9.74	<0.0001	0.44	34.39
	TA*FV*TIEMPO	0.17	0.9999	0.44	34.39
<b>Ácido Acéticas</b>	TA	4.51	0.0392	0.72	29.39
	FV	0.27	0.7673	0.72	29.39
	TIEMPO	26.01	<0.0001	0.72	29.39
	TA*FV*TIEMPO	2.08	0.0258	0.72	29.39
<b>Calidad</b>	TA	39.14	<0.0001	0.98	6.57
	FV	305.35	<0.0001	0.98	6.57
	TA*FV	79.72	<0.0001	0.98	6.57

TA=Tiempo de almacenamiento en mazorca. FV=Frecuencia de volteo durante la fermentación.

Anexo 2. Recuento de levaduras en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

Tiempo almacenamiento (días)	Frecuencia volteo	Log UFC/g ± Desviación Estándar			
		0 h	48 h	96 h	144 h
3	FV1	6.38 ± 1.13 <sup>a(y)</sup>	7.09 ± 0.90 <sup>a(x)</sup>	5.54 ± 1.08 <sup>a(y)</sup>	1.61 ± 1.59 <sup>a(z)</sup>
	FV3	6.38 ± 1.13 <sup>a(y)</sup>	7.26 ± 0.46 <sup>a(x)</sup>	5.84 ± 0.75 <sup>a(y)</sup>	1.53 ± 1.45 <sup>a(z)</sup>
	FV5	6.38 ± 1.13 <sup>a(y)</sup>	7.10 ± 1.02 <sup>a(x)</sup>	4.90 ± 1.18 <sup>a(y)</sup>	1.53 ± 1.04 <sup>a(z)</sup>
6	FV1	5.20 ± 2.44 <sup>a(y)</sup>	7.24 ± 1.51 <sup>a(x)</sup>	5.60 ± 0.76 <sup>a(y)</sup>	1.91 ± 1.08 <sup>a(z)</sup>
	FV3	5.20 ± 2.44 <sup>a(y)</sup>	7.01 ± 1.35 <sup>a(x)</sup>	5.35 ± 0.59 <sup>a(y)</sup>	1.51 ± 0.75 <sup>a(z)</sup>
	FV5	5.20 ± 2.44 <sup>a(y)</sup>	7.07 ± 1.22 <sup>a(x)</sup>	4.05 ± 0.91 <sup>a(y)</sup>	1.15 ± 0.80 <sup>a(z)</sup>
CV%		23.99			

Medias con letras diferentes en cada columna (a, b, c) indican diferencias significativas (P<0.05). Medias con letras diferentes en cada fila (x, y,z) indican diferencias significativas a través del tiempo (P<0.05).

FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

Anexo 3. Recuento de bacterias ácido lácticas en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

Tiempo almacenamiento (días)	Frecuencia volteo	Log UFC/g ± Desviación Estándar			
		0 h	48 h	96 h	144 h
3	FV1	6.62 ± 1.15 <sup>a(x)</sup>	7.06 ± 1.28 <sup>a(x)</sup>	6.38 ± 1.38 <sup>a(x)</sup>	3.37 ± 2.65 <sup>a(y)</sup>
	FV3	6.62 ± 1.15 <sup>a(x)</sup>	7.24 ± 0.94 <sup>a(x)</sup>	6.51 ± 0.80 <sup>a(x)</sup>	3.67 ± 3.09 <sup>a(y)</sup>
	FV5	6.62 ± 1.15 <sup>a(x)</sup>	7.09 ± 0.95 <sup>a(x)</sup>	6.01 ± 0.72 <sup>a(x)</sup>	4.24 ± 3.48 <sup>a(y)</sup>
6	FV1	6.14 ± 2.03 <sup>a(x)</sup>	7.73 ± 1.64 <sup>a(x)</sup>	6.21 ± 1.22 <sup>a(x)</sup>	3.95 ± 4.60 <sup>a(y)</sup>
	FV3	6.14 ± 2.03 <sup>a(x)</sup>	7.50 ± 1.34 <sup>a(x)</sup>	5.87 ± 1.21 <sup>a(x)</sup>	4.19 ± 4.95 <sup>a(y)</sup>
	FV5	6.14 ± 2.03 <sup>a(x)</sup>	7.36 ± 1.51 <sup>a(x)</sup>	4.58 ± 0.40 <sup>a(x)</sup>	2.44 ± 3.03 <sup>a(y)</sup>
CV%		34.39			

Medias con letras diferentes en cada columna (a, b, c) indican diferencias significativas (P<0.05). Medias con letras diferentes en cada fila (x, y) indican diferencias significativas a través del tiempo (P<0.05).

FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

Anexo 4. Recuento de bacterias ácido acéticas en granos de cacao sometidos a dos tiempos de almacenamiento en mazorca y tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

Tiempo almacenamiento  (días)	Frecuencia volteo	Log UFC/g ± Desviación Estándar			
		0 h	48 h	96 h	144 h
3	FV1	6.07 ± 0.25 <sup>a(x)</sup>	4.73 ± 1.10 <sup>b(x)</sup>	5.25 ± 2.11 <sup>a(x)</sup>	3.64 ± 0.87 <sup>a(x)</sup>
	FV3	6.07 ± 0.25 <sup>a(x)</sup>	4.80 ± 0.92 <sup>ab(xy)</sup>	5.35 ± 2.01 <sup>a(x)</sup>	2.79 ± 1.83 <sup>a(y)</sup>
	FV5	6.07 ± 0.25 <sup>a(x)</sup>	4.68 ± 1.63 <sup>b(x)</sup>	5.41 ± 2.24 <sup>a(x)</sup>	4.62 ± 1.33 <sup>a(x)</sup>
6	FV1	4.75 ± 1.86 <sup>a(x)</sup>	6.92 ± 0.54 <sup>a(x)</sup>	5.27 ± 1.56 <sup>a(x)</sup>	<1 <sup>b(v)</sup>
	FV3	4.75 ± 1.86 <sup>a(xy)</sup>	6.57 ± 0.58 <sup>ab(x)</sup>	4.28 ± 0.91 <sup>a(y)</sup>	<1 <sup>b(z)</sup>
	FV5	4.75 ± 1.86 <sup>a(x)</sup>	6.42 ± 0.51 <sup>ab(x)</sup>	4.37 ± 0.85 <sup>a(x)</sup>	<1 <sup>b(z)</sup>
CV%		29.39			

Medias con letras diferentes en cada columna (a, b, c) indican diferencias significativas (P<0.05). Medias con letras diferentes en cada fila (x,y,z) indican diferencias significativas a través del tiempo (P<0.05).

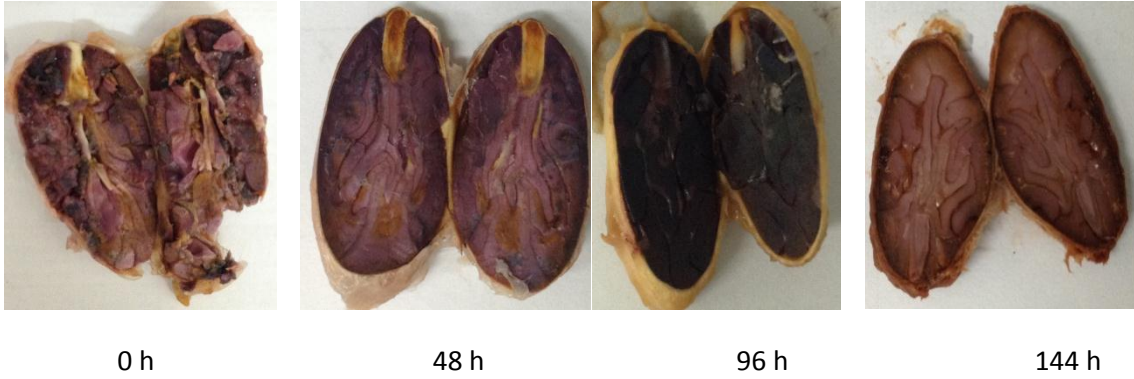
FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

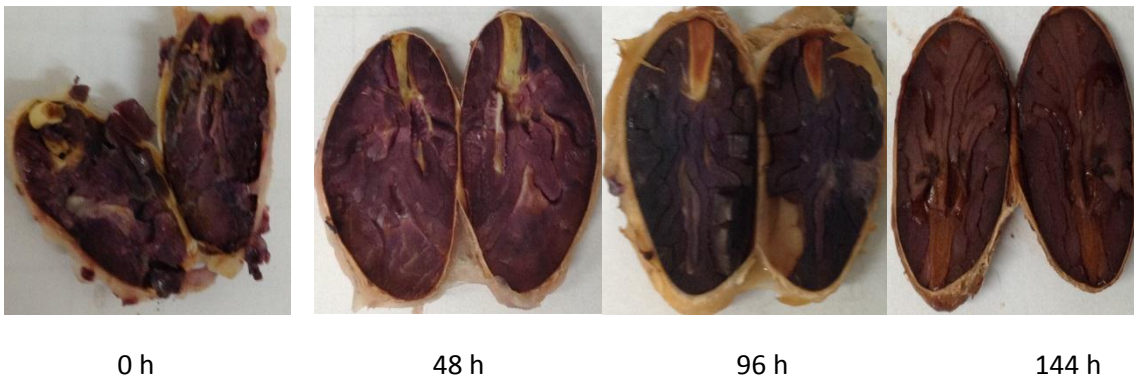
FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

Anexo 5. Cambios en la pigmentación de las semillas de cacao que fueron almacenadas durante tres días en mazorca y sometidas a tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

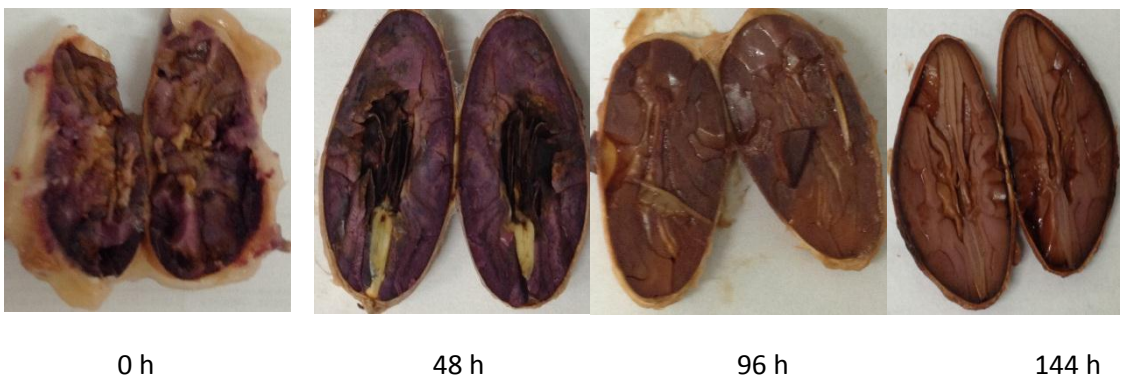
FV1



FV3



FV5



FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.

Anexo 6. Cambios en la pigmentación de las semillas de cacao que fueron almacenadas durante seis días en mazorca y sometidas a tres frecuencias de volteo durante la fermentación.

FV1



0 h

48 h

96 h

144 h

FV3



0 h

48 h

96 h

144 h

FV5



0 h

48 h

96 h

144 h

FV1 Granos fermentados durante 144 horas con 1 volteo a las 48 horas.

FV3 Granos fermentados durante 144 horas con 3 volteos a las 48,96 y 120 horas.

FV5 Granos fermentados durante 144 horas con 5 volteos a las 24,48,72,96 y 120 horas.