

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL PROYECTO

*DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LOS
LIXIVIADOS DE LA FERMENTACIÓN DE CACAO OBTENIDOS DE UN BIORREACTOR
PILOTO A DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.*

PRESENTA

DIEGO ARMANDO CÁRDENAS ESPAÑA

N° CONTROL

13270715

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL
ESTADO DE JALISCO A.C. UNIDAD SURESTE

ASESOR INTERNO

DRA. ROSA ISELA RODRÍGUEZ

ASESOR EXTERNO

DRA. TERESA DEL ROSARIO AYORA TALAVERA

MÉRIDA, YUCATÁN (ENERO-JUNIO 2018)

Índice

1. Lista de figuras.....	4
2. Lista de tablas	5
3. Introducción	6
4. Justificación	8
5. Objetivo general.....	9
5.1 Objetivos específicos.....	9
6. Descripción del área de trabajo.....	10
6.2 Misión.....	10
7. Marco teórico.....	11
7.1.1 Las fermentaciones espontáneas	11
7.1.2 Levaduras	12
7.1.3 Bacterias Lácticas	12
7.1.4 Bacterias Acéticas.....	12
7.1.5 Fermentaciones alcohólica, láctica y acética	13
7.2 El cacao (<i>Teobroma cacao</i> L.).....	14
7.2.1 Descripción de la especie <i>Teobroma cacao</i>	14
7.2.3 Fermentación del cacao.....	15
8. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.....	16
8.1 Obtención de lixiviados de cacao	16
8.2 Crecimiento microbiano	16
8.3 Determinación del pH, Grados Brix e Índice de Refracción	16
8.4 Determinación de azúcares reductores	16
8.5 Determinación de azúcares totales	17
9. Resultados	18
9.1 Condiciones de cultivo	18
9.2 Aspectos generales de la mazorca de cacao	18
9.3 Propiedades fisicoquímicas	19
9.4 Cuantificación de azúcares reductores	20
9.5 Cuantificación de azúcares totales.....	21
9.6 Crecimiento microbiano	23
9.7 Análisis de muestras de fermentación	26

10. Conclusiones	29
11. Recomendaciones y limitaciones	30
11.1 Recomendaciones	30
11.2 Limitaciones	30
12. Competencias desarrolladas y/o aplicadas	31
13. Bibliografía	32
14. Anexos	36
Anexo A: Curva patrón de azúcares reductores (Método de Dubois).....	36
Anexo B: Curva patrón de azúcares totales (Método de Fenol-Sulfúrico).....	36
Anexo D: Incubadora FELIZA FE-133	37
Anexo E: ThermoScientific HERAtherm, Oven	37
Anexo F: Potenciometro Hanna pH HI 3222	38
Anexo G: Refractómetro portátil Abbe marca Atago.....	38

1. Lista de figuras

Figura 1. Fermentación alcohólica a partir de una molécula de glucosa.	13
Figura 2. Cambios en el contenido de azúcares reductores en las fermentaciones.	21
Figura 3. Cambios en el contenido de azúcares totales en las fermentaciones.	22
Figura 4. Cinética de crecimiento de levaduras (WL), BAL (MRS) y BAA (GYC), durante la fermentación del cacao.	26
Figura 5. Cociente total de materia seca (°Bx), Índice de refracción (IR) y potencial de hidrógeno (pH) producidos y su transformación con respecto al tiempo durante la fermentación de los granos de cacao en biorreactor piloto.	28

2. Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de cultivo en un biorreactor piloto.	18
Tabla 2. Características generales de la mazorca de cacao.	19
Tabla 3. Valores del potencial de hidrógeno (pH), grados Brix (°Bx), e índice de refracción (IR), durante la fermentación por lotes.	20

3. Introducción

La aplicación de microorganismos tiene gran relevancia en lo que respecta a la fermentación desde un nivel industrial hasta nuestros hogares. De tal manera que los microorganismos son de gran importancia y tienen sus raíces en las áreas de la nutrición, la medicina, la producción de alimentos, la agricultura, la biorremediación y todos aquellos procesos biológicos de productos naturales. La fermentación es uno de los procesos alimenticios tecnológicos más antiguo del mundo. En la producción de chocolate, la fermentación microbiológica del cacao juega un papel muy importante en el proceso y tiene un impacto en la calidad y valor de los granos finales. El cacao es uno de los alimentos producidos a nivel mundial donde su fermentación ocurre de manera espontánea (Pereira, Soccol, & Soccol, 2016). En México, uno de los productos agrícolas con mayor potencial de cultivo en las regiones tropicales es el cacao. De hecho, *Theobroma cacao* L. se cultiva ahora en un área de aproximadamente 60,000 hectáreas, distribuidas principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas, y produce un volumen de producción de 27,000 toneladas de granos de cacao (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2015).

El cacao pertenece a la familia de Sterculiaceae y su especie es *Theobroma cacao* L. Las plantas de cacao son cultivadas en plantaciones ubicadas en regiones tropicales alrededor del mundo, Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Camerún, Indonesia y Brasil, son los principales productores a nivel mundial. (Magalhães et al., 2013).

La fermentación de los granos de cacao se lleva a cabo en dos etapas. La primera de ellas son aquellas reacciones que dan lugar a la eliminación de la pulpa del grano. La segunda etapa involucra muchas reacciones hidrolíticas que ocurren dentro del grano de cacao (en los cotiledones) (Biehl, Brunner, Passern, Quesnel, & Adomako, 1985; Schwan & Wheals, 2004). La actividad microbiológica en la pulpa de cacao está bien definida como una sucesión ecológica la cual está dominada por levaduras durante las primeras horas, seguido por bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales tienen un declive después de 48 horas de fermentación, y después intervienen bacterias ácido acéticas (BAA) (Ardhana & Fleet, 2003; Schwan, Rose, & Board, 1995; Schwan & Wheals, 2004). Durante la fermentación, el etanol y el ácido acético producidos por la sucesión ecológica de microorganismos difunden hacia dentro de los granos, y esto combinado con las altas temperaturas generadas por la conversión del etanol a ácido acético, matan al embrión de la semilla; consecuentemente, la estructura interna del grano de cacao se destruye, liberando componentes y pigmentos que interaccionan bioquímicamente con hidrolasas activadas endógenamente para desarrollar el color y sabor de los precursores. (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008; Schwan & Wheals, 2004).

Muchos productos se pueden hacer con granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) desde una barra de chocolate hasta jabones, lo que explica por qué este cultivo ha adquirido gran importancia

económica en todo el mundo. Hay aproximadamente 50 millones de personas en la población mundial que dependen económicamente de producción de cacao (semillas) y productos derivados del consumo (Fundación, 2010) (Kongor, et al., 2016). La variedad de cacao criollo de la que se elabora solo entre el 5% y el 10% de chocolate produce notas más aromáticas y florales que otras variedades. Sus semillas son menos amargas y más suaves que los frijoles Forastero y son muy apreciadas (Aprotosoie, Luca & Miron, 2016). Sin embargo, la importancia de los granos de cacao está creciendo en la cultura moderna debido a su valor económico y la nueva investigación de los posibles beneficios para la salud que se encuentran en sus compuestos químicos (De Araujo et al., 2016). Los estudios epidemiológicos indican que el cacao tiene un efecto cardioprotector y potencia los inmunomoduladores. Estudios in vitro han demostrado que el cacao ejerce efectos antitumorales y antiinflamatorios y la evidencia clínica sugiere que el consumo de cacao puede afectar la microbiota intestinal como prebiótico y regula el estado de ánimo, las respuestas cerebrales y mejora la función cognitiva en personas mayores (Castell, Pérez-Cano y Bisson, 2013; De Araujo, et al., 2016).

El paso para empezar la fermentación es con el crecimiento de microorganismos, los cuales contribuyan a las actividades de la degradación de mucilago de la pulpa presente alrededor del grano, en consecuencia, esto produce una serie de productos finales (alcoholes, ácidos orgánicos). La fase principal de la fermentación del grano de cacao, es la fermentación alcohólica por levaduras el cual convierten el azúcar de la pulpa en etanol. La fermentación láctica convierte el azúcar en ácido láctico, estas fermentaciones se llevan principalmente por BAL. En la última etapa de la fermentación, las BAA transforman el alcohol producido ya por BAL en ácido acético (Camu et al., 2007; Nielsen et al., 2007a; Schwan, Rose, & Board, 1995). Los microorganismos juegan un rol crucial en la calidad del cacao durante el paso de la fermentación. (Nielsen et al., 2007; Schwan et al., 1995). Este estudio investiga las comunidades microbiológicas y sus cambios químicos a partir del lixiviados de los granos de cacao durante la fermentación espontanea del árbol de cacao cultivados en Yucatán, México.

4. Justificación

La calidad de los productos derivados del cacao está estrechamente relacionada con diversos factores como son el medio ambiente, la naturaleza de las mazorcas del cacao, las condiciones de cultivo y también elementos tecnológicos. Entre estos factores se sabe que, en las fermentaciones, los microorganismos desempeñan un papel muy importante para el desarrollo de características del producto final. El empleo de los residuos de la fermentación del cacao puede tener un valor muy significativo tanto ecológico como económico debido a que su utilidad, puede ser aplicada en sectores que van desde la medicina, cosmética y la alimentación.

Aunque estos residuos no representen el valor principal de la transformación pueden ser la materia prima para otro producto. Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento (Saval, 2012).

El lixiviado de cacao es el líquido amarillento pálido que se drena de montones de cacao en fermentación y es el producto de la descomposición del mucílago que rodea los granos de cacao frescos. Es causada por la acción de las enzimas pectolíticas durante la fermentación de los granos de cacao. Esta actividad de la enzima pectolítica se produce principalmente por microorganismos (Ansah y Dzogbefia, 1991). El lixiviado de cacao, uno de esos subproductos, se produce en grandes cantidades durante el método tradicional de fermentación (Agyemang, 1978). Sin embargo, se ha demostrado que es un medio ideal para la producción de alcohol (Agyemang, 1978), vino (Adesioye, 1993), pectina (Adomako, 1979), mermeladas (Dodoo, 1992) y jarabes (Togbe, 1992). Sin embargo, la utilización económica de la sudoración del cacao requerirá su disponibilidad en altos rendimientos y buena calidad.

Con el fin de obtener el máximo beneficio del cacao, la utilización de subproductos de desecho se fomenta cada vez más. Mejorar la calidad y darles una aplicación a los residuos de las fermentaciones dando un énfasis en las características de calidad de la producción tanto un uso comercial como alimenticio.

Por ello nace el interés de estudiar el cambio que afecta a los lixiviados en la fermentación como una oportunidad para aprovechar los residuos y cómo el consorcio microbiano interactúa con su ambiente dando lugar a cambios bioquímicos que suceden en el proceso y de estos subproductos de la fermentación ya que hasta la fecha sigue teniendo muy poca atención en su utilización.

5. Objetivo general

Evaluar la dinámica poblacional de los microorganismos presentes en los lixiviados que se obtienen durante la fermentación de cacao en un biorreactor piloto a diferentes condiciones de cultivo.

5.1 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto de diferentes condiciones de fermentación en la dinámica poblacional de levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en lixiviados de cacao durante el proceso de fermentación en un biorreactor piloto.
- ✓ Evaluar la dinámica de los azúcares reductores y azúcares totales en lixiviados de cacao durante el proceso de fermentación en un biorreactor piloto.
- ✓ Evaluar la dinámica del pH y los grados Brix en lixiviados de cacao durante el proceso de fermentación en un biorreactor piloto.

6. Descripción del área de trabajo

El lugar donde se realizó el trabajo experimental fue en las instalaciones del Laboratorio de Tecnología y Conservación de Alimentos, perteneciente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco A.C, Unidad Sureste (CIATEJ).

Dirección: Calle: Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto. Mérida, Yucatán. Código postal: 97302.

Teléfono / Fax: 018002632428 / +52 999 920 26 71

CORREO: direccion.sureste@ciatej.mx

6.2 Misión

El CIATEJ es un Centro Público de investigación que sirve con dedicación e integridad al sector agroindustrial a través de la innovación y servicios tecnológicos y de la formación de recursos humanos con el objeto de contribuir a incrementar su ventaja competitiva en un mercado global, con productos y servicios innovadores y de calidad.

7. Marco teórico

7.1.1 Las fermentaciones espontáneas

La fermentación de frutas y verduras es una de las tecnologías más antiguas conocidas por el hombre. Da como resultado la mejora de la calidad y la seguridad de los alimentos, debido a la biosíntesis microbiana de vitaminas y aminoácidos esenciales, y la preservación del ácido ascórbico, los compuestos fenólicos y los pigmentos (Galvez et al., 2007). Los alimentos a fermentar transportan una carga microbiana dependiente del suelo, el agua, el aire y el tipo de producción, con valores reportados de 103-105 UFC / g de aerobios totales (Rodríguez et al., 2009). El tipo de microorganismos y su desarrollo son factores determinantes de la fermentación y la calidad del producto final (Rodríguez et al., 2009).

Durante la fermentación espontánea de los cultivares de aceituna verde, ocurren cambios fisicoquímicos importantes. Los compuestos solubles en agua tales como carbohidratos, compuestos fenólicos principalmente oleuropeína e hidroxitirosol glucósido y otros nutrientes se difunden de las aceitunas a la salmuera, mientras que la sal pasa de la salmuera a la pulpa hasta que alcanza un estado estable al final del proceso. Los sustratos fermentables (glucosa, fructosa, manitol, sacarosa, etc.) son la principal fuente de energía de los microorganismos fermentativos, que proporcionan ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico) esenciales para la estabilidad y conservación de las aceitunas de mesa durante la fermentación y el almacenamiento. Sin embargo, los compuestos fenólicos experimentan transformaciones cuantitativas y cualitativas durante el procesamiento de la aceituna, principalmente la hidrólisis alcalina y/o la degradación microbiana de la oleuropeína en hidroxitirosol y glucósido de ácido elenólico durante los procesos de desnatado y salmuera (Brenes y de Castro, 1998; Servili et al., 2006).

Por otra parte, la fermentación del jugo de uva en el vino es una reacción microbiana compleja que tradicionalmente involucra el desarrollo secuencial de varias especies de levadura y bacterias de ácido láctico. Las levaduras son las principales responsables de la fermentación alcohólica del jugo. Tradicionalmente, el vino ha sido producido por la fermentación natural del jugo de uva por levaduras que provienen de uvas (Ribereau-Gayon et al., 2000). La calidad del vino está estrechamente relacionada con la ecología microbiana de la fermentación. Las diversas especies de levaduras y cepas que se desarrollan durante el proceso fermentativo global metabolizan los componentes del jugo de uva, principalmente los azúcares, a una amplia gama de productos finales volátiles y no volátiles, que influyen y determinan los tipos y concentraciones de muchos productos que contribuyen a las características de aroma y sabor del vino. Los principales productos volátiles del metabolismo de la levadura, el etanol y el dióxido de carbono, hacen una contribución relativamente pequeña al sabor del vino. Por el contrario, los ácidos orgánicos, los alcoholes superiores y los ésteres, y en menor medida el acetaldehído, constituyen el principal grupo de compuestos que forman el "ramo de fermentación" (Romano et al., 2003).

7.1.2 Levaduras

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas (Carlile, 2001). Muchas levaduras se pueden encontrar en el suelo, (suelos arenosos, arcillosos, permafrost, etc.) insectos, (escarabajos) plantas, (hojas, flores, polen, raíces) árboles, (frutos), animales (pájaros, camarones, peces, algas). Las levaduras también se producen en agua dulce, barro y pantanos, y la atmósfera. Las levaduras son hongos que se reproducen unicelularmente por gemación o fisión (Boekhout & Phaff, 2003).

Debido a sus actividades diversas y dinámicas, se han utilizado para la producción de muchos productos interesantes, como cerveza, vino, pan, biocombustibles y productos biofarmacéuticos. *Saccharomyces cerevisiae* (cerveza o levadura de panadería) es la especie de levadura que sin duda es la más utilizada por el hombre. *Saccharomyces* es un organismo de primera elección para aplicaciones industriales (Gerald.R, 1973).

7.1.3 Bacterias Lácticas

El término bacterias ácido lácticas, surgió a principios del siglo XX para describir un grupo heterogéneo de bacterias que actualmente se definen como esféricas (coccos) o en forma de bastón (bacilos), grampositivas, catalasa-negativas, inmóviles, no esporuladas, anaeróbicas, aerotolerantes y productores de ácido láctico (el principal metabolito generado durante la fermentación de azúcares por estas bacterias) (Muñoz, Moreno-Arribas, & Rivas, 2011).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son bacterias clave en la mayoría de los ecosistemas de fermentación de alimentos (Bourdichon, 2012; Hutkins, 2006). El género *Lactobacillus* representa el grupo más grande entre las BAL, que abarca más de 200 especies (Giraffa, 2010; Holzappel, 2014). Como este género posee una amplia diversidad metabólica, se producen lactobacilos y se han utilizado como cultivos iniciales funcionales en una gran variedad de alimentos fermentados, incluyendo queso, alimentos fermentados derivados de plantas, carnes fermentadas, producción de vino, cerveza y masas fermentadas (Leroy, 2004).

7.1.4 Bacterias Acéticas

Las bacterias de ácido acético son bacterias gram-negativas o gram-variables, elipsoides o cilíndricas que aparecen bajo el microscopio como células individuales, en pares, en cadenas o en grupos. Son aeróbicos y generalmente muestran un metabolismo respiratorio con oxígeno que funciona como un aceptor de electrones terminal. Estas bacterias se encuentran en sustratos que contienen azúcar y / o etanol, como jugos de fruta, vino, sidra, cerveza y vinagre. En estos sustratos, el metabolismo bacteriano implica la oxidación incompleta de los azúcares y alcoholes y conduce a la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. (Guillamón & Mas, 2011)

La producción de ácido acético en sustratos que contienen etanol representa el nombre común atribuido a estas bacterias. Sin embargo, estos microorganismos también pueden oxidar glucosa a ácido glucónico, galactosa a ácido galactónico y arabinosa a ácido arabónico. Algunas de estas

reacciones son de gran interés para la industria de la elaboración del vino. La aplicación industrial tradicional de las bacterias del ácido acético se encuentra en la producción de vinagre; sin embargo, las aplicaciones menos conocidas incluyen la producción de celulosa y la conversión de sorbitol en sorbosa. (Guillamón & Mas, 2011)

7.1.5 Fermentaciones alcohólica, láctica y acética

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite convertir a los azúcares en alcohol y dióxido de carbono. Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, pero la utilización a nivel industrial es mínima. Se producen dos moléculas de CO₂ y etanol a partir de una molécula de glucosa (Figura 1). Este proceso, realizado principalmente por las levaduras y por algunos otros microorganismos, es idéntico a la glucólisis en cuanto a la producción de dos moléculas de ácido pirúvico a partir de una molécula de glucosa. Sin embargo, en la fermentación alcohólica el ácido pirúvico es convertido en etanol y en CO₂ en lugar de ser convertido en ácido láctico (Conn, 2012).

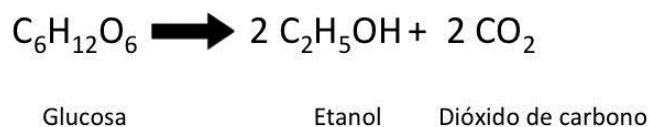


Figura 1. Fermentación alcohólica a partir de una molécula de glucosa.

El proceso fermentativo del ácido láctico, se basa en una serie de reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo celular de los microorganismos o bacterias ácido- lácticas, responsables de llevar a cabo la degradación de los carbohidratos. Los *Lactobacillus*, son bacterias que utilizan la fermentación láctica para obtener energía: estos organismos transforman la lactosa de la leche en glucosa y posteriormente en ácido láctico. La lactosa se hidroliza hasta la glucosa, mediante la lactasa, posteriormente a través de la glucólisis, se obtiene ácido pirúvico. En condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobias), la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD⁺, que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD⁺ que actúan como receptores de electrones y se reducen a NADH. Para que puedan tener lugar las reacciones de los glucólisis productores de energía es necesario reoxidar el NADH; esto se consigue mediante la cesión de dos electrones del NADH al ácido pirúvico, que se reduce a ácido láctico. (Melisa, 2007)

Es un proceso aerobio la cual necesita de microorganismos como son las bacterias que llevan a cabo la oxidación y transformación de alcohol etílico (obtenido de la fermentación alcohólica) en

ácido acético. La fermentación acética del vino proporciona el vinagre debido a un exceso de oxígeno y es considerado uno de los fallos del vino. *Acetobacter* es de particular importancia comercialmente, debido a que es usada en la producción de vinagre (Intencionalmente convirtiendo el etanol del vino en Ácido acético). El ácido acético también es mejor conocido como ácido metilencarboxílico, se puede encontrar en forma de ion acetato. Éste es un ácido que se encuentra en el vinagre, siendo el principal responsable de su sabor y olor agrios. El ácido acético es utilizado como un conservante previniendo el crecimiento de las bacterias y los hongos. (Melisa, 2007)

7.2 El cacao (*Theobroma cacao* L.)

7.2.1 Descripción de la especie *Theobroma cacao*.

El árbol de cacao pertenece al género *Theobroma cacao* L. Dentro de esta especie se pueden identificar diferentes variedades. Según la literatura, estas subespecies se pueden clasificar en cuatro cultivares: criollo, forastero, trinitario y nacional (Counet, Ouwerx, Rosoux y Collin, 2004). Sin embargo, en la literatura los granos de cacao pueden ser nombrados de manera diferente, dependiendo del origen, nombres comerciales, hábitos, etc. A continuación, resumimos los diferentes nombres utilizados en la literatura en los cuatro cultivares principales según de Muijnck (2005), Baker, Tomlin y Gay (1994), Lainé (2001), Sukha, Butler, Umaharan y Boulton (2008) y Looor et al. (2009).

- Criollo: el más comúnmente cultivado en el centro-sur de América. Una variedad de nicho llamada Sanchez se produce en la República Dominicana. Se sabe especialmente que esta variedad se produce con un paso de fermentación muy corto o ausente. Otros nombres: Bahía, Sanchez.
- Forastero: típicamente de la región amazónica. El cultivar Forastero incluye dos subgrupos, Amelonado y Amazon, estos últimos podrían dividirse aún más en el Bajo Amazonas y el Alto Amazonas, dependiendo de su origen. Sin embargo, según Tomlins, Baker, Daplyn y Adomako (1993), no existen diferencias químicas significativas entre estos subgrupos del cultivar Forastero. Otros nombres: Amelonado, Amazonas, Bajo Amazonas, Alto Amazonas, cacao a granel, Accra.
- Trinitario: es un cultivar híbrido originado por Criollo y Amelonado Forastero. Otros nombres: cacao fino, sabor cacao, híbrido.

Hoy en día, la demanda global de granos de cacao está cubierta principalmente por tres variedades. Los árboles de la variedad Forastero son resistentes a enfermedades y ataques de plagas y proporcionan granos de cacao clasificados como precursores de notas ordinarias y "básicas"; es la materia prima principal utilizada en el 80% de la producción mundial de chocolate. La variedad de cacao Criollo de la que se elabora solo entre el 5% y el 10% de chocolate produce notas más aromáticas y florales que otras variedades. Sus semillas son menos

amargas y más lisas que las semillas del Forastero (Aprotosoaié, Luca y Mirón, 2016) y finalmente, la variedad Trinitario de cacao, un híbrido resultante de la polinización cruzada entre las variedades Criollo y Forastero, se utiliza en aproximadamente 10-15% de producción de chocolate y produce algunas notas de sabor del vino (Kongor et al., 2016, Rusconi y Conti, 2010).

7.2.3 Fermentación del cacao

El proceso de fermentación se caracteriza por una sucesión microbiana sistemática bien conocida. El bajo pH inicial de la pulpa (3.6) causado por la presencia de ácido cítrico, junto con bajos niveles de oxígeno favorecen la colonización de las levaduras. La proliferación de levadura conduce a la producción de etanol y a la secreción de enzimas pectinolíticas. Por lo tanto, la población de levadura aumenta considerablemente dentro de las primeras 24 h, después de lo cual se observa una disminución lenta. Las condiciones restantes favorecen el crecimiento de bacterias de ácido láctico (BAL), que alcanzan su pico después de aproximadamente 36 h desde el comienzo de la fermentación. La principal actividad de BAL es degradar glucosa a ácido láctico. El pH general aumenta debido al metabolismo del subproducto no ácido. Después de 48 h de fermentación, la población de BAL disminuye y da lugar al crecimiento de bacterias de ácido acético (BAA). Las reacciones exotérmicas de BAA aumentan la temperatura hasta aproximadamente 50°C. Las reacciones consisten principalmente en oxidación de etanol a ácido acético y posterior oxidación de este último a dióxido de carbono y agua. Se cree que las condiciones provocadas por BAA son la causa de la difusión e hidrólisis de proteínas, por lo tanto, BAA podría jugar un papel clave en la formación de precursores de sabor. BAA son aeróbicos obligatorios, por lo que aumentar la aireación durante la fermentación incrementa su actividad. Después de aproximadamente 5-6 días de fermentación, se ha observado que la población de BAA disminuye, y las bacterias aeróbicas formadoras de esporas aumentan su población. Estas bacterias producen una variedad de compuestos químicos durante el proceso de fermentación que pueden contribuir a la acidez y al desarrollo de sabores desagradables (Lima, Kamphuis, et al., 2011; Schwan & Wheals, 2004; Sengun & Karabiyikli, 2011).

8. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas

8.1 Obtención de lixiviados de cacao

Las mazorcas de cacao fueron colectadas en la Plantación de Ticul, ubicada al sur del Estado de Yucatán y trasladadas en sacos a las instalaciones del CIATEJ, sin dañar a las semillas se abrieron con un corte transversal, se retiraron todas las semillas sanas y se colocaron en un recipiente hasta juntar 20 Kg de semillas con pulpa para ser posteriormente colocados en el biorreactor piloto. Todo el procedimiento se realizó dentro de la planta piloto en un ambiente abierto en condiciones no asépticas para propiciar la fermentación espontánea de los granos. Se tomaron 100 mL de lixiviado y se almacenaron en un envase de vidrio para su análisis fisicoquímico y microbiológico.

8.2 Crecimiento microbiano

Las BAL fueron contadas en placas inoculadas en agar MRS (De man Rogosa Sharpe, Merck, Darmstadt, Germany) la cual contiene 0.36 mg/L de nistatina y 2.5 mg/mL de cicloheximida para inhibir el crecimiento de levaduras y hongos. Las BAA fueron contadas en placas en agar GYC (50 g/L de glucosa, 5 g/L de carbonato de calcio, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar) suplementado con 0.36 mg/L de nistatina y 2.5 mg/mL de cicloheximida para la inhibición de levaduras y hongos. Las levaduras fueron registradas en placas inoculadas en agar WL (Sigma-Aldrich) conteniendo 2.5 mg/mL de cloranfenicol y cicloheximida, para la inhibición de bacterias y hongos. Las placas inoculadas de MRS fueron incubadas a 30° C (Feliza FE-133, anexo D) a 2-3 días en un medio anaerobio; las placas GYC fueron incubadas a 40 °C (ThermoScientific HERAtherm, Oven, anexo E) de 2-3 días; y las placas WL fueron incubadas a 30 °C (Feliza FE-133, anexo D) a 2-3 días. Después del periodo de incubación, las unidades formadoras de colonias fueron registradas de acuerdo a la ecuación 1.

$$\text{UFC/mL} = \text{Número de colonias} * \text{Dilución} \quad (1)$$

Todas las muestras de análisis microbianos fueron realizadas por triplicado y se calculó la desviación estándar en el programa de Microsoft Office Excel 2016.

8.3 Determinación del pH, Grados Brix e Índice de Refracción

El pH de la muestra se determinó usando el medidor de pH (Hanna pH HI 3222, Anexo F). Los grados Brix e índice de refracción del lixiviado se determinó utilizando el refractómetro (Refractómetro portátil Abbe marca Atago, Anexo G).

8.4 Determinación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores (glucosa) en los lixiviados se realizó por el método de DNS (Miller, 1959), con algunas modificaciones. La concentración de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de calibración de absorbancia en función de su concentración. Se pesaron 0.1006 g de glucosa la cual fue aforada a 100 mL y posteriormente se prepararon 5

estándares de glucosa de (0.1 - 0.9) g/L en tubos de ensaye donde se agregaron 1.5 mL de DNS. Inmediatamente se calentaron en un recipiente a baño María por 15 min a 90 °C, posterior a ello se colocaron en agua fría por 5 min y se adicionaron 8 mL a cada tubo de agua destilada.

8.5 Determinación de azúcares totales

Para la determinación de azúcares totales se aplicó la técnica de fenol sulfúrico (DuBois et al., 1956) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de fenol al 5% (p/v).

La curva de calibración de azúcares totales (Anexo B), se realizó de (1.0 – 8.0) mg/L. Tomando 1 mL de glucosa de cada estándar y adicionando 200 µL de fenol al 5%, posteriormente se agregaron 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, se llevó a vortex para mezclar y se dejaron reposar por 10 min. Después, se puso en un baño maría a 30 °C por 15 min.

9. Resultados

9.1 Condiciones de cultivo

Durante las 4 fermentaciones realizadas en el biorreactor piloto, se realizaron las siguientes modificaciones. La fermentación 1 (F1) se realizó con una temperatura inicial de 29.5 °C y sin agitación durante todo el proceso. En la fermentación 2 (F2) la temperatura inicial fue de 28.6 °C y se realizó por primera vez una agitación a 30 rpm a las 32 h de fermentación durante 20 min. La fermentación 3 (F3) inicio con una temperatura de 29.1 °C y no se efectuó ninguna agitación en todo el proceso. Por último, la fermentación 4 (F4), con un comienzo de 31.1 °C en la temperatura y una agitación de 30 rpm a las 20 h de fermentación por 40 min. En la tabla 1, se representa las condiciones de cultivo en cada lote de fermentación.


Tabla 1. Condiciones de cultivo en un biorreactor piloto.

Fermentación	Temperatura inicial (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura final (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
1	29.5	50	30	-	-
2	28.6	50	30	30	20
3	29.1	50	30	-	-
4	31.1	50	30	30	40

9.2 Aspectos generales de la mazorca de cacao

La fermentación fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de Tecnología y Conservación de Alimentos en Mérida, Yucatán, México. Las mazorcas maduras del cacao fueron cosechadas durante el periodo de Enero-Mayo. Las mazorcas fueron abiertas con un cuchillo y las semillas se transportaron al biorreactor piloto. Las características de la mazorca del cacao son expresadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Características generales de la mazorca de cacao.

Especie*	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Peso total (g)	Semillas por fruta	Peso de semillas (g)	Foto
Criollo	16.6	7.7	506	40	0.118	

*Valor promedio de las fermentaciones.

9.3 Propiedades fisicoquímicas

La temperatura ambiental registrada en los meses de enero-mayo con la mínima de 19.6 °C y una máxima de 33.8 °C durante la fermentación del cacao, pero la temperatura inicial en la fermentación dentro del biorreactor fue diferente.

Grados °Brix, Índice de refracción y potencial de hidrogeno (pH), fueron indicadores fundamentales para la exploración en la dinámica poblacional. Estas características físicas fueron evaluadas según fueron tomados los lixiviados del biorreactor piloto a cada tiempo correspondiente (cada 24 h), los resultados se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores del potencial de hidrógeno (pH), grados Brix (°Bx), e índice de refracción (IR), durante la fermentación por lotes.

Lote	parámetro	T0	T1	T2	T3
1	°Brix	14.5	13.50	7.0	7.6
	IR	1.355	1.353	1.343	1.344
	pH	3.38	3.96	4.34	4.48
2	°Brix	16.5	15.25	9.5	4.0
	IR	1.358	1.356	1.347	1.339
	pH	3.17	3.27	4.0	4.24
3	°Brix	17.0	12.3	7.2	5.5
	IR	1.359	1.352	1.344	1.341
	pH	3.29	3.31	3.8	3.61
4	°Brix	18.5	11.5	7.4	4.5
	IR	1.362	1.35	1.344	1.339
	pH	3.26	3.38	3.75	4.06

9.4 Cuantificación de azúcares reductores

El contenido de azúcares (glucosa) del cacao cultivados se evaluaron durante su fermentación espontánea. El consumo de azúcares reductores durante las fermentaciones se muestra en la Figura 2. El valor más bajo de azúcares reductores que se registró fue la fermentación 1 (F1), conteniendo 63.73 mg de glucosa, y el valor más alto registrado fue la fermentación 3 (F3) con 150.11 mg de glucosa. Los azúcares fueron consumidos rápidamente durante las primeras horas (0 – 24 h) (Figura 2). En las fermentaciones 1 y 2 (F1 y F2), a partir del tiempo 1 (24 – 48 h) hubo un incremento de los azúcares reductores debido al consumo del mucilago de las semillas del cacao, lo cual dio lugar a un aumento de azúcares más simples donde el pico más alto fue de 85.42 mg de glucosa a las 24 h y 51.31 mg de glucosa en 48 h. Después de las últimas 24 h (48 – 72 h), el consumo de los azúcares reductores fue casi total en las fermentaciones 1, 3 y 4 (F1, F3 y F4) con 10.83, 7.59 y 4.78 mg de glucosa respectivamente. La fermentación 2 (F2) a las 72 h de consumo fue el más alto de las demás fermentaciones teniendo un consumo final de 23.12 mg de glucosa. Igor et al, 2013, reporta valores similares a las 72 h de consumo de glucosa en las fermentaciones. En la figura 4, se muestra un incremento de levaduras al inicio de la fermentación, a lo cual dio lugar a un consumo rápido de azúcares en las primeras horas de fermentación. El anexo A, se muestra la curva de calibración de los azúcares reductores que da por formula lineal $Abs = 0.3612x - 0.0118$. La curva se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

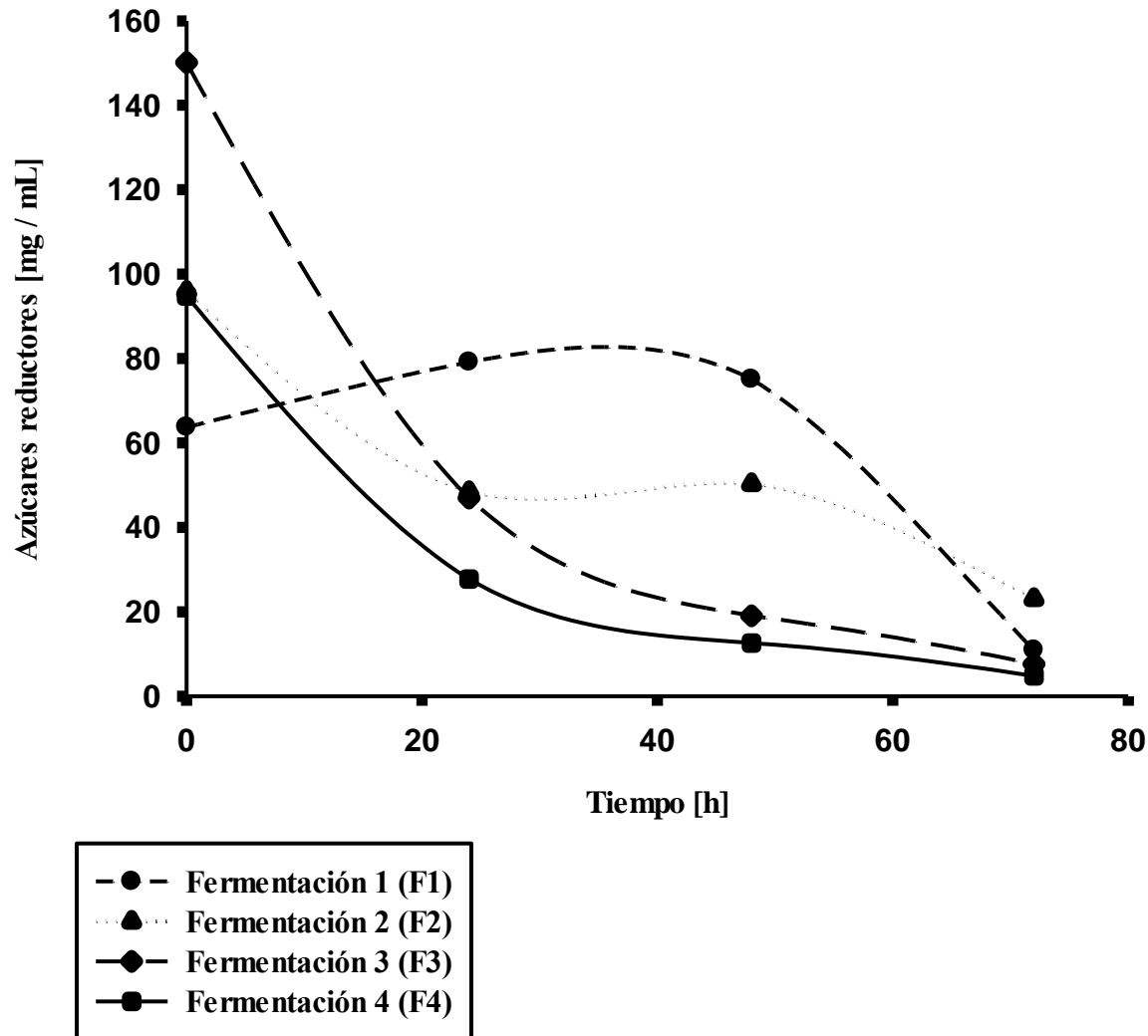


Figura 2. Cambios en el contenido de azúcares reductores en las fermentaciones.

9.5 Cuantificación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales (glucosa) del lixiviado del cacao cultivados se evaluaron durante la fermentación espontánea (Figura 3), los carbohidratos fueron rápidamente metabolizados en la fermentación espontánea en las primeras 24 h. Al comienzo de la fermentación (Figura 3, 0 h), el registro más alto del contenido de azúcares fue en la fermentación 2 (F2) con 927.04 mg de glucosa, mientras que las fermentaciones 1 y 3 (F1 y F3) alcanzaron valores similares 763.80 y 745.95 mg de glucosa respectivamente. En cuanto a la fermentación 4 (F4) se alcanzó el valor más bajo de azúcares con respecto a las demás fermentaciones a las 0 h, con 657.27 mg de glucosa. El consumo de carbohidratos al final de las fermentaciones (72 h) 2, 3 y 4 se obtuvieron valores similares (78.79, 64.93 y 61.00 respectivamente), solo en la primera fermentación (F7) el consumo de los azúcares no fue tan bajo con respecto a las demás fermentaciones. En el anexo b

se representa la curva de calibración de azúcares totales, que tiene por fórmula lineal $Abs = 1.1427x - 0.0404$. Se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

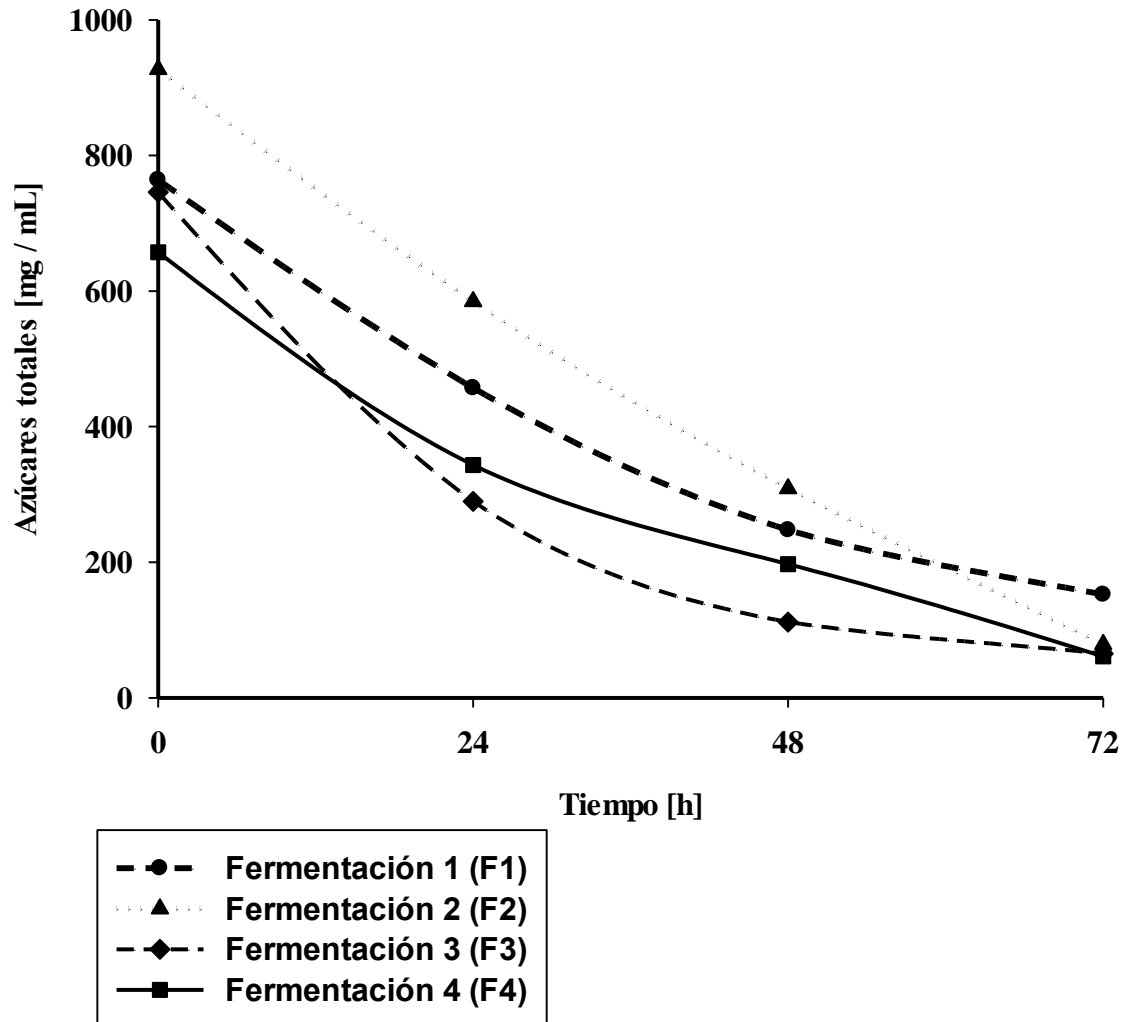
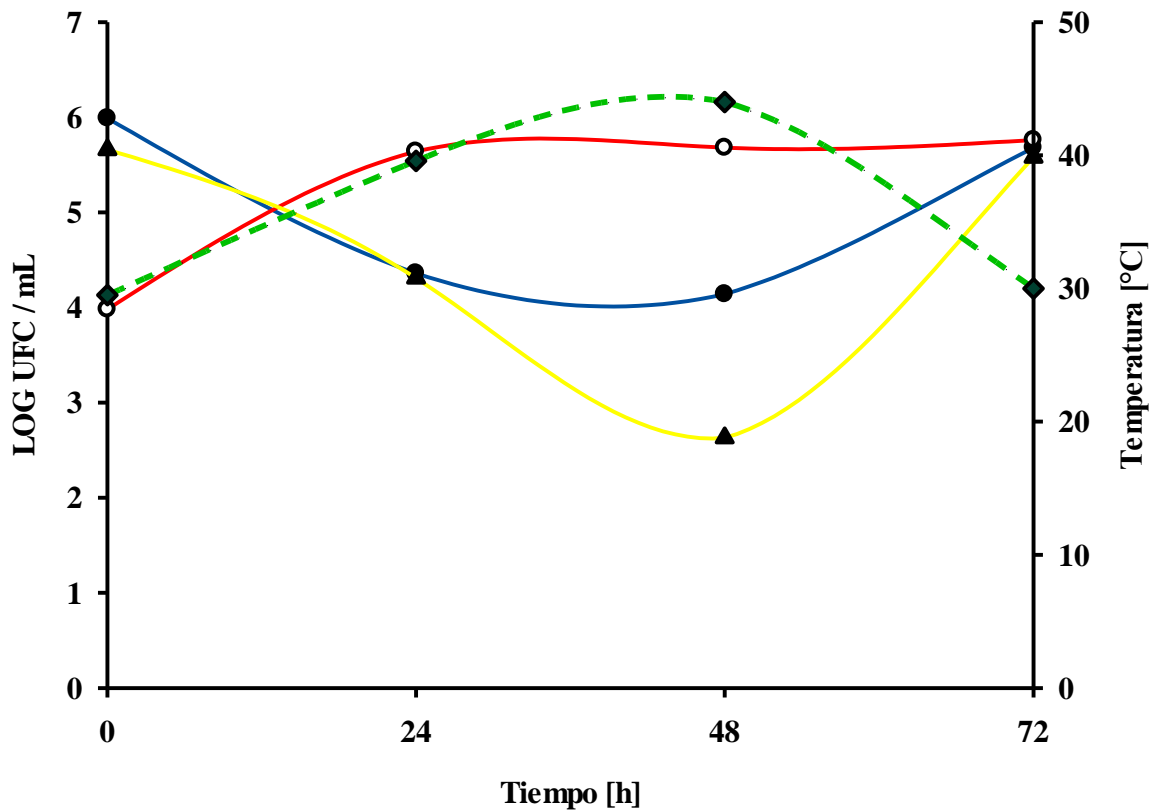


Figura 3. Cambios en el contenido de azúcares totales en las fermentaciones.

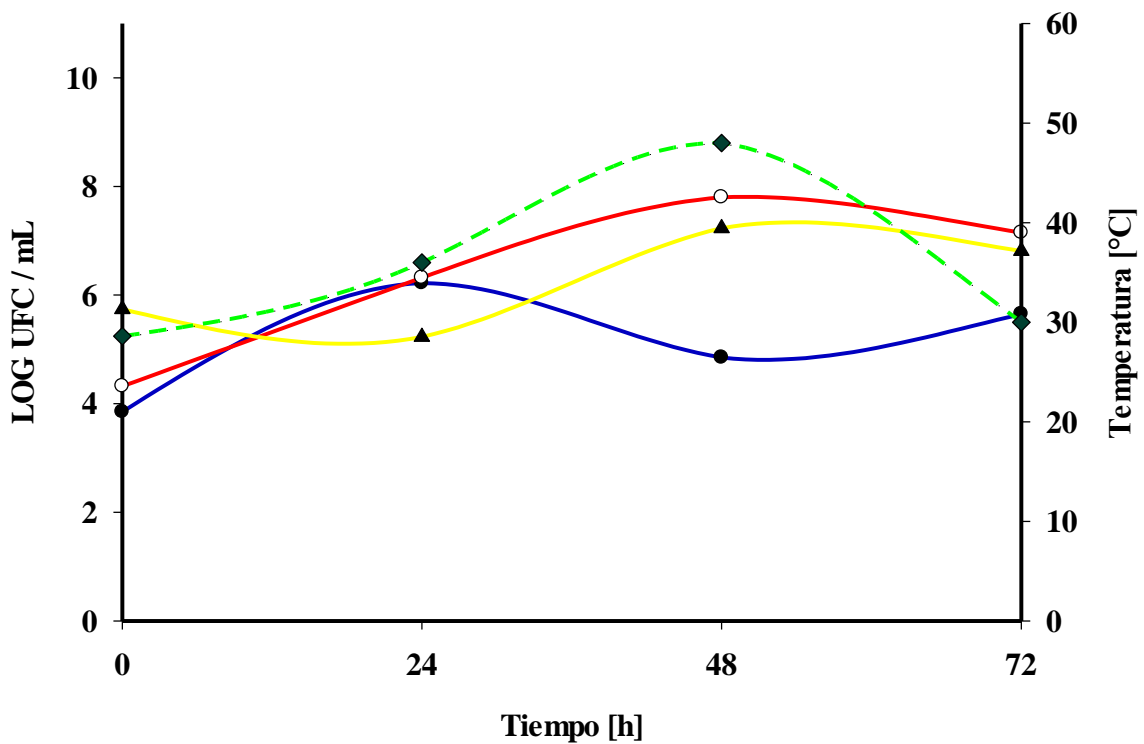
9.6 Crecimiento microbiano

La cinética de crecimiento que se llevó a cabo resultó en la típica sucesión microbiana de levaduras, BAL y BAA. En las fermentaciones 2 y 3 (Figura 4, F2 y F3) las levaduras (Medio WL) tuvieron un decrecimiento en las primeras 24 h de la fermentación (0 – 24 h) 3.69 log UFC/mL y 3.53 log UFC/mL respectivamente, a partir de las 24 h, se registró el valor más alto de su crecimiento con 5.5 log UFC/mL y 5.81 log UFC/mL respectivamente. Similarmente sucedió con las fermentaciones 1 y 4 (Figura 4, F1 y F4), en donde la poblacional más baja registrada fue en las 48 h de la fermentación (24 – 48 h) 4.26 log UFC/mL y 3.0 log UFC/mL, volviendo a aumentar de nuevo hasta el último periodo de la fermentación (48 – 72 h, 5.68 log UFC/mL) en lo que respecta a la fermentación F1, y en lote 2, el registro fue a las 24 de la fermentación (5.5 log UFC/mL). La fermentación F1, a pesar de que tuvo una disminución a partir de las 24 h, al final de la fermentación se mantuvo la misma prevalencia de 5.68 log UFC/mL similar de al inicio de la fermentación. Se observaron diferencias en las poblaciones de grupos de BAL (Medio MRS) en todos los experimentos de la fermentación (Figura 4). El crecimiento inicial más bajo en todos los lotes a las 0 h, con 4.24 log UFC/mL aproximadamente en todas las fermentaciones. La población más grande encontrada a las 48 h (7.57 log UFC/mL), seguido por el lote 2 (48 h) (7.39 log UFC/mL). El recuento de BAA (Medio GYC) alcanzó su pico más alto con 7.19 log UFC/mL (Figura 4, lote 2) a 48 h de la fermentación. Al final de la fermentación (72 h) se obtuvieron los valores más altos (5.57 log UFC/mL, A, 6.32 log UFC/mL, C y 6.83 log UFC/mL, D) a excepción de la segunda fermentación como se mencionó anteriormente. La población más baja se obtuvo en F1 (48 h) con 2.51 log UFC/mL, seguida por la fermentación 3 (48 h) con 4.30 log UFC/mL, mientras que la población en F2 y F4 a las 24 h fue de 5.12 log UFC/mL y 5.18 log UFC/mL respectivamente. Durante las fermentaciones a las 48 h, usualmente las BAL y BAA se encontraban próximas al final de su crecimiento, indicando la presencia de ambas al final de la fermentación.

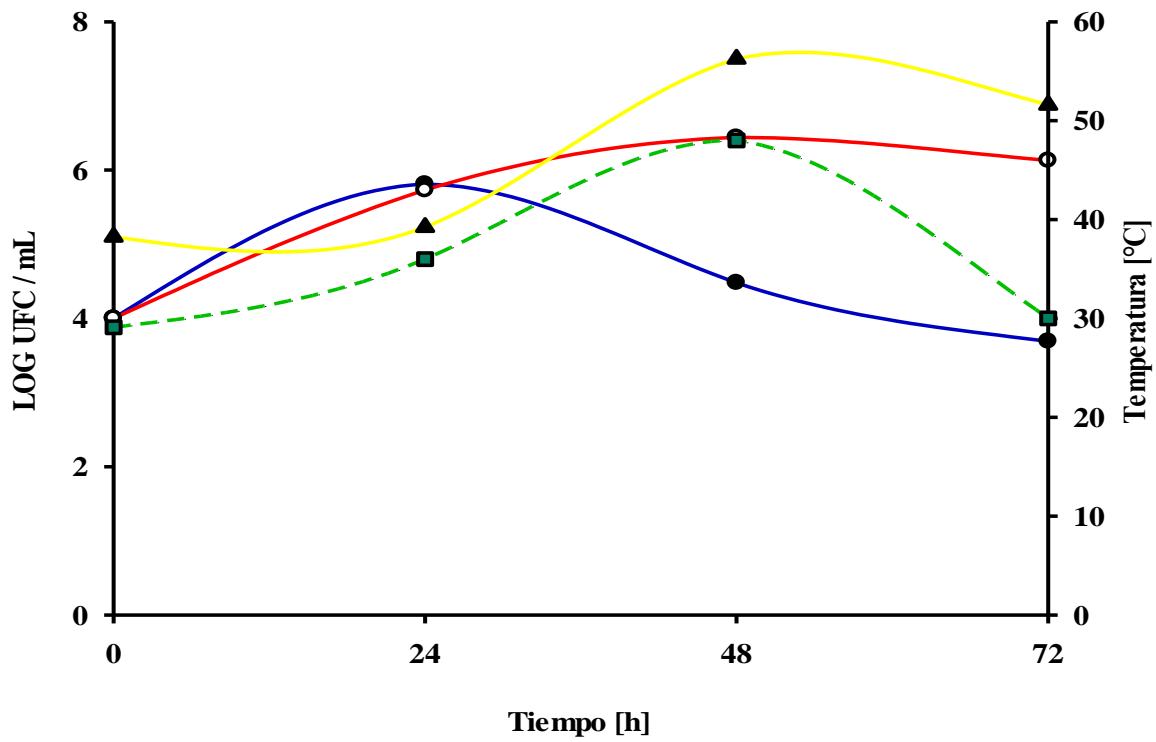
F1



F2



F3



F4

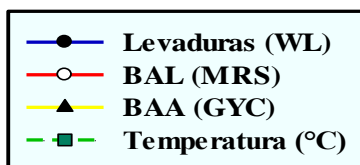
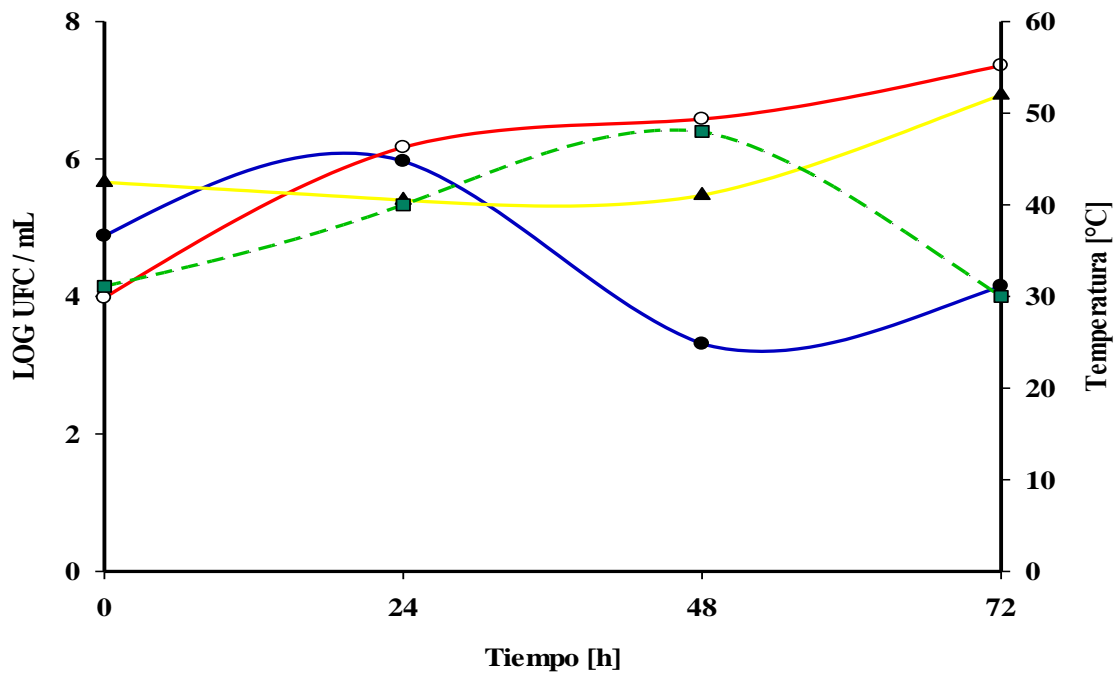
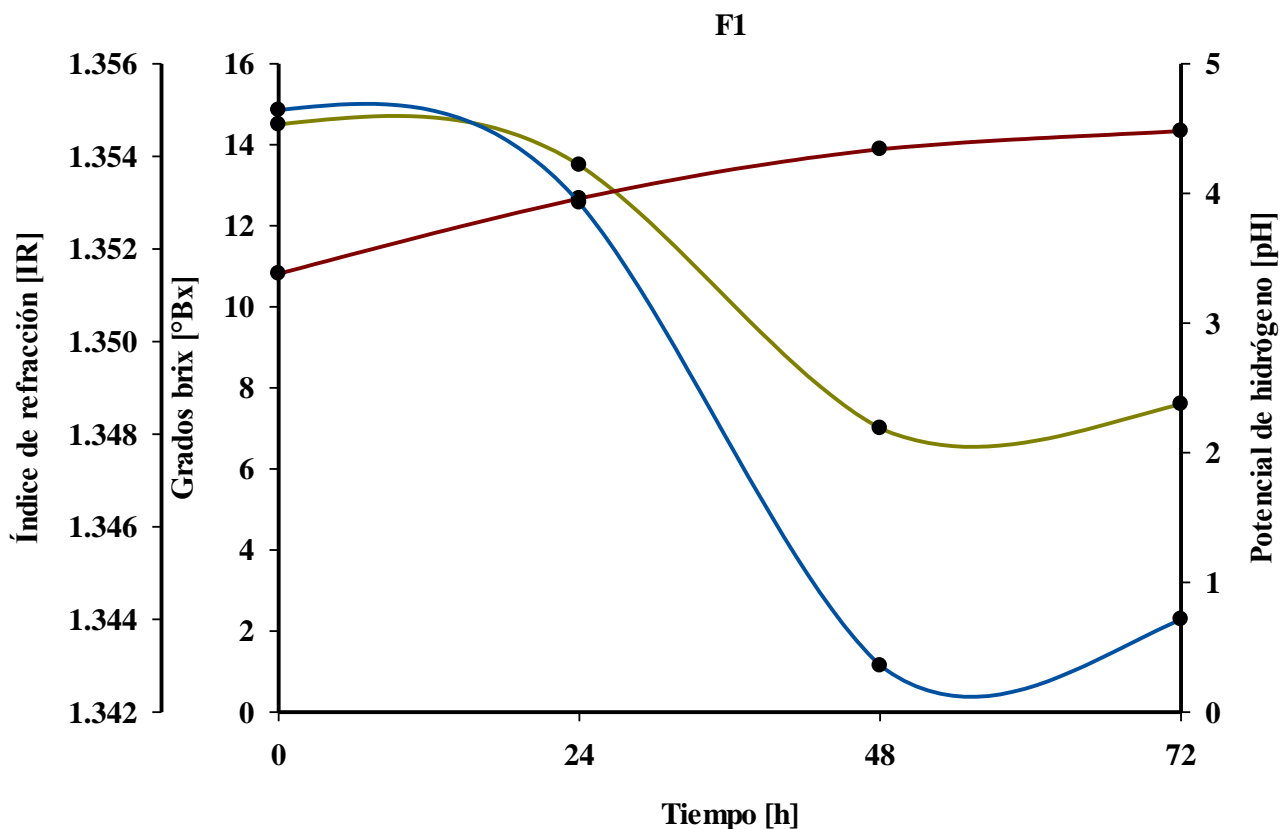


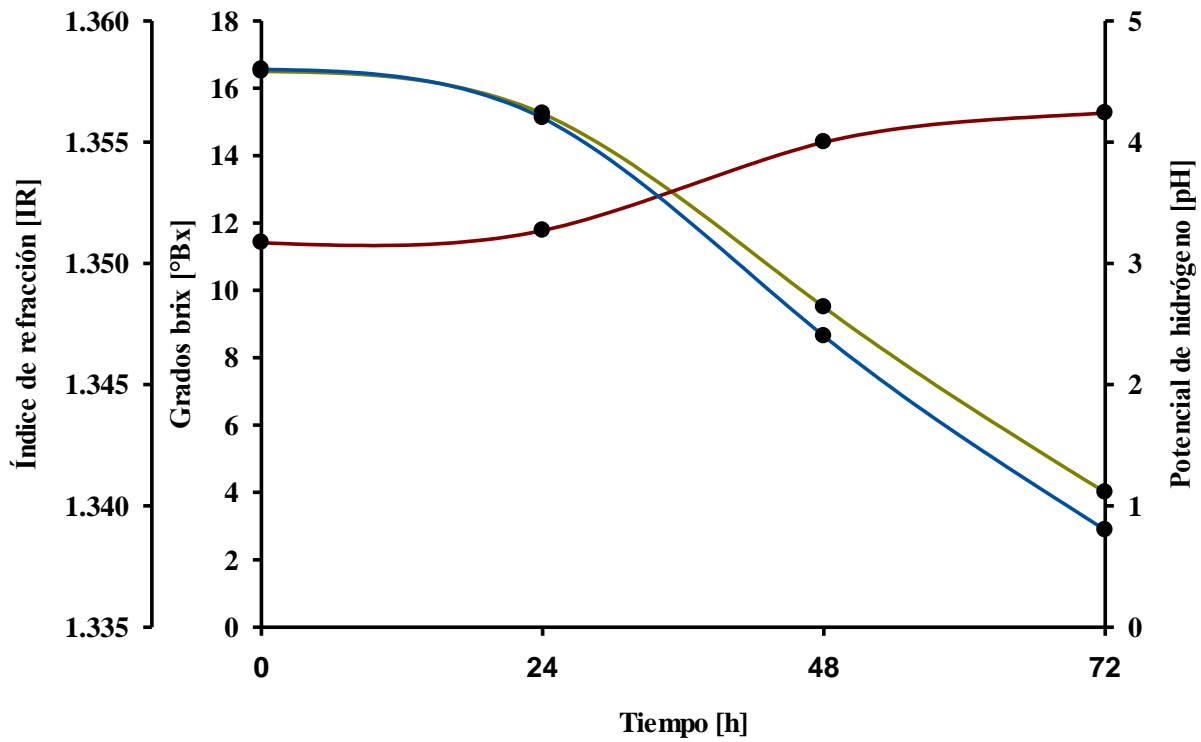
Figura 4. Cinética de crecimiento de levaduras (WL), BAL (MRS) y BAA (GYC), durante la fermentación del cacao.

9.7 Análisis de muestras de fermentación

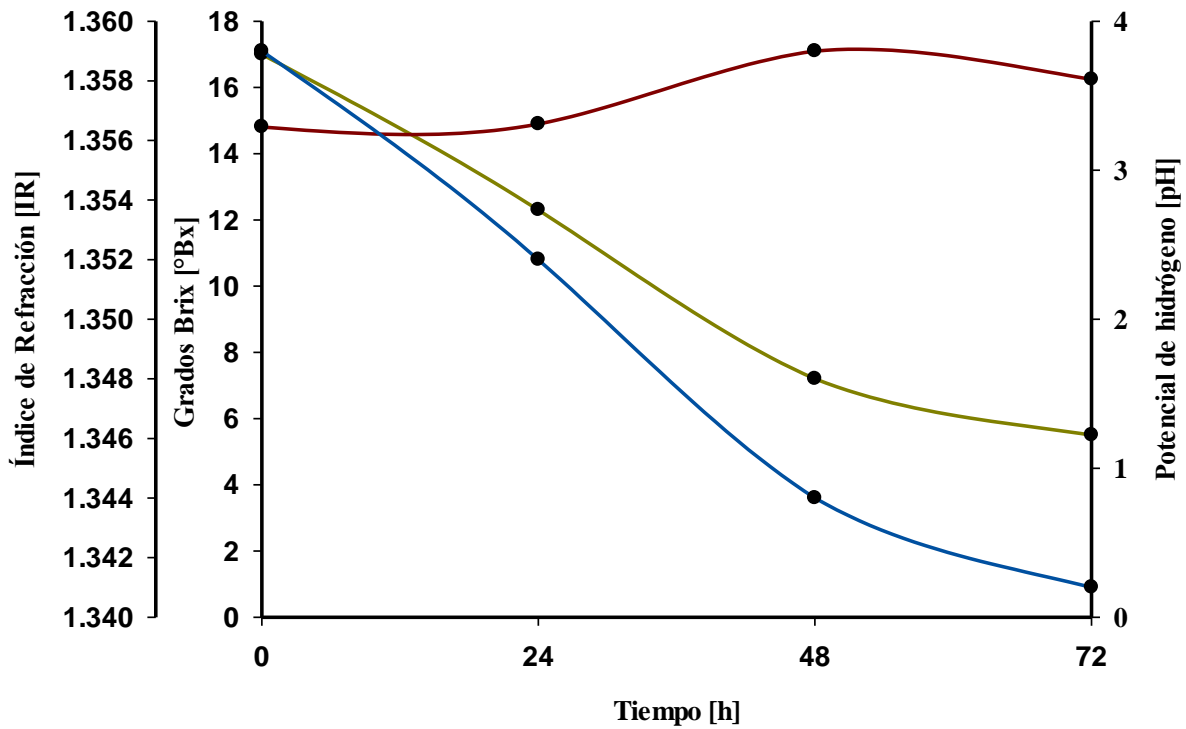
Con respecto a la sucesión microbiana de levaduras, BAL y BAA durante las cuatro fermentaciones de cacao en el biorreactor piloto, el crecimiento microbiano resulto en un consumo o la conversión de los principales componentes de la pulpa fresca del cacao. La Figura 5 incluye gráficas representativas del consumo del cociente total de materia seca ($^{\circ}$ Brix), y el cambio fisicoquímico presente en los tiempos de lixiviados (potencial de hidrogeno e índice de refracción) durante las 4 fermentaciones llevadas a cabo. El incremento en el pH en las fermentaciones fue de aproximadamente 3.2 hasta 4.6. Debido a que el Índice de refracción y los grados Brix están relacionados entre sí, en la Figura 5 se muestra un patrón semejante en las fermentaciones. El contenido de azúcares al inicio de las fermentaciones fue de aproximadamente 16.2 ($^{\circ}$ Bx), después de 72 h de fermentación, el descenso fue de 5.8 $^{\circ}$ Bx aproximadamente. El consumo de azúcares se relaciona en función de la sucesión microbiana que esté presente en ese tiempo.



F2



F3



F4

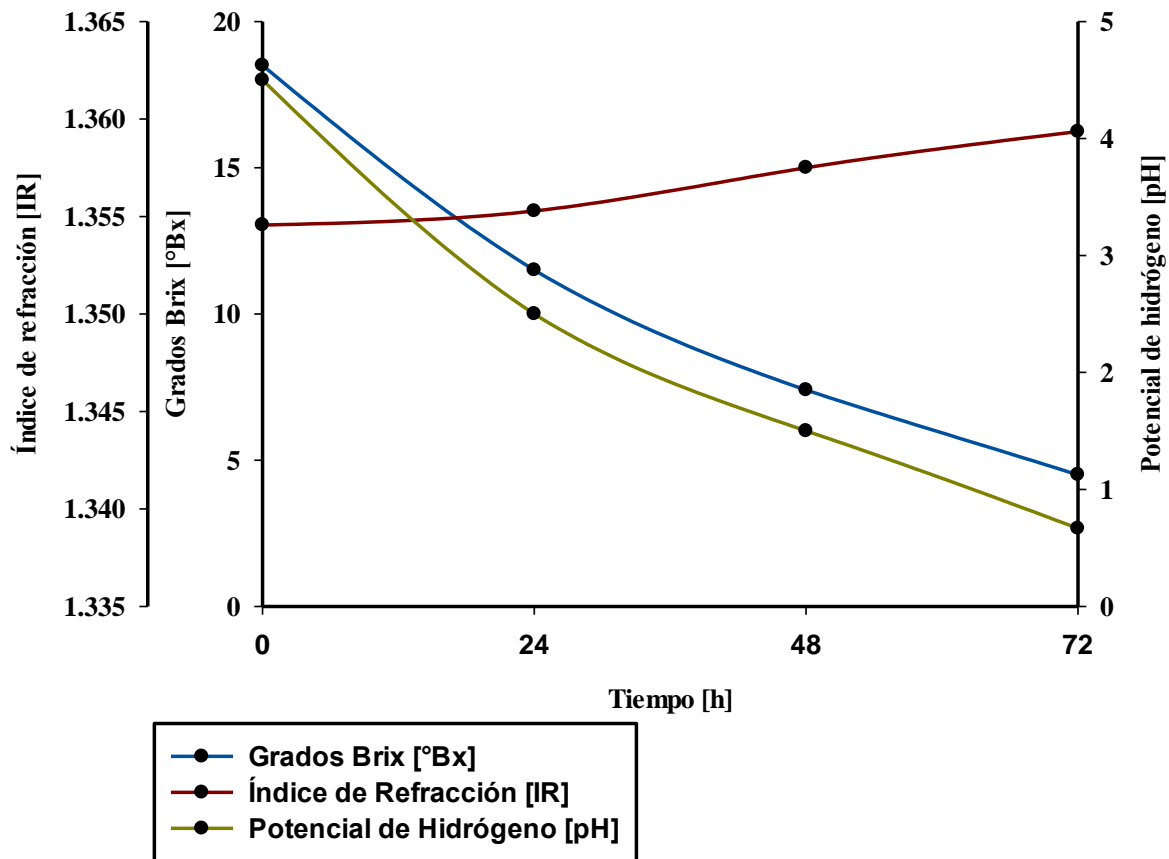


Figura 5. Cociente total de materia seca (°Bx), Índice de refracción (IR) y potencial de hidrógeno (pH) producidos y su transformación con respecto al tiempo durante la fermentación de los granos de cacao en biorreactor piloto.

10. Conclusiones

Al tratarse de una fermentación espontánea, en algunas etapas de la fermentación tanto la cinética de crecimiento como los cambios físico-químicos que actúan fueron cambiantes, a estos cambios se le atribuye en parte a que la materia prima (mazorcas) fueron cultivadas en diferentes épocas del año dando lugar a diferentes condiciones climáticas y por ende variación en la carga microbiana.

En la dinámica poblacional, las levaduras fueron las que más tuvieron un descenso en su crecimiento debido a las altas temperaturas, mientras que la agitación en las fermentaciones (F2 y F4) hicieron favorable el crecimiento de BAA debido a la agitación ya que estas bacterias necesitan oxígeno para un óptimo crecimiento. En cuanto al consumo de azúcares reductores se trata, se observó al inicio de la fermentación una cantidad moderada de glucosa, sin embargo, la hidrólisis realizada por ciertos microorganismos en la pectina que rodea a los granos de cacao, hizo que la concentración de glucosa aumentara después de las 24 horas, posteriormente fue consumido por los microorganismos circundantes en el medio. El incremento del pH en todas las fermentaciones fue muy similar en todos los lotes de fermentación, se cree que fue causado por el consumo de metabolitos como los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos. El consumo de materia seca (°Brix) fue disminuyendo esto gracias a los microorganismos que consumieron los metabolitos.

11. Recomendaciones y limitaciones

11.1 Recomendaciones

Para desarrollar más a fondo la investigación se recomienda identificar las cepas aisladas en las fermentaciones, estudiar los cambios físicos que afectan al lixiviado a lo largo de la fermentación (reología) y mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) identificar compuestos (ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes) para un estudio más completo en la dinámica poblacional del lixiviado del cacao.

11.2 Limitaciones

Entre las limitantes que se tuvieron para desarrollar el proyecto se puede mencionar que el consumo de lixiviado es casi total a las 72 horas de la fermentación, lo cual dificulta el análisis de ciertas pruebas bioquímicas debido a la escasa muestra que se obtiene.

12. Competencias desarrolladas y/o aplicadas

El uso de nuevos instrumentos para análisis cuantitativos fue desarrollado en su totalidad en Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco A.C, Unidad Sureste (CIATEJ), los análisis fisicoquímicos como el pH, índice de refracción, grados Brix, cuenta en placas, etc. Técnicas nuevas llevadas a cabo para el área de microbiología fueron aplicadas para la obtención de cepas aisladas de levaduras y BAA y BAL. El conocimiento aprendido en las clases como en los laboratorios del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG), ayudo para la realización y del procedimiento de los análisis mencionados, como también a comprender y analizar de mejor manera las competencias desarrolladas. Todas las tareas fueron llevadas a cabo de manera individual lo que diferencia al trabajo en equipo que se realizaba en ITTG. La organización, la planeación y las destrezas aprendidas fueron de gran ayuda para poder lograr los objetivos del proyecto.

13. Bibliografía

- Ardhana, M., Fleet, G., 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 87-99.
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V. C., & Adomako, D. (1985). Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 583–598.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 205–221.
- Ardhana, M., & Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87–99.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 840–857.
- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Camu, N., 2010. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, pp. 301-326.
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Hønholt, S., Jakobsen, M., 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.*5, 441-453
- Camu, N., De Winter, T., Verbrughe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., et al. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1809–1824.
- Schwan, R. F., Rose, A. H., & Board, R. G. (1995). Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *Journal of Applied Bacteriology—Symposium Supplement*, 79, 96S–107S.
- Humberto, R. E., Jorge V., Alfredo, R. (2000). La calidad del cacao: II. Cosecha y fermentación, FONAIAP.1.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 168–186.
- Conn, Eric. *Bioquímica fundamental/ Eric Conn—4a ed.-México* : Limusa, 2012. Pag. 366
- Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol.* 2012;154:87–97.

- Hutkins RW. Microbiology and technology of fermented foods. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
- Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res Microbiol.* 2010;161:480–7.
- Holzapfel WH, Wood BJB. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. 1st ed. Hoboken: Wiley; 2014.
- Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Tech.* 2004;15:67–78.
- Lima, L. J. R., Kamphuis, H. J., Nout, M. J. R., & Zwietering, M. H. (2011). Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant sporeformers *Food Microbiology*, 28, 573-582.
- Sengun, I. Y., & Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22(5), 647-656. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.008.
- Fagbenro, O. A. (1988). Results of preliminary studies on the utilization of cocoa-pod husks in fish production in South-west Nigeria. *Biological Wastes*, 25, 233–237.
- ICCO (International Cocoa Organization). (2010). Harvesting cocoa. Available on <<http://www.icco.org/about/Harvesting.aspx>>
- Brito, E. S., García, N. H. P., Gallão, M. I., Cortelazzo, A. L., Fevereiro, P. S., & Braga, M. R. (2001). Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 281–288.
- Mbajiuka, Chinedu S, Ifediora A.C, Onwuakor C.E, and Nwokoji L.I, “Fermentation of Pods of Cocoa (*Theobroma cacao* L) Using Palm Wine Yeasts for the Production of Alcohol and Biomass.” *American Journal of Microbiological Research*, vol. 3, no. 2 (2015): 80-84. doi: 10.12691/ajmr-3-2-7.
- Ansah, F. and Dzugbefia, V. P. 1990. The role of microbial and endogenous pectolytic enzymes in cocoa fermentation. *Journal of the University of Science and Technology, Kumasi, Ghana* 10(2): 69-74.
- Agyemang, K.O-G, Bediako, M.K.B. and Oldham, J. H. (1976). Pilot plant studies on collection of cocoa sweatings. *Ghana J. Agric* 9:65-69.
- Adesioye, H.O. 1993. Production of wine from cocoa mucilage and preliminary evaluation of its physico-chemical properties and consumer acceptability. In: Proc. 11th Int. Cocoa Res. Conf. Cocoa Producers Alliance. Lagos pgs 18-24.
- Adomako, D. 1974. Chemical characterization of cocoa pectin. *Chem. Ind.* 879-874(Nov. 1974)
- Togbe, E. 1992. Preparation of syrup from cocoa sweatings. BSc. Thesis from Department of Biochemistry, University of Science and Technology Kumasi, Ghana.
- Afoakwa, E., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate e a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(6), 290e298. doi:10.1016/j.tifs.2007.02.002.

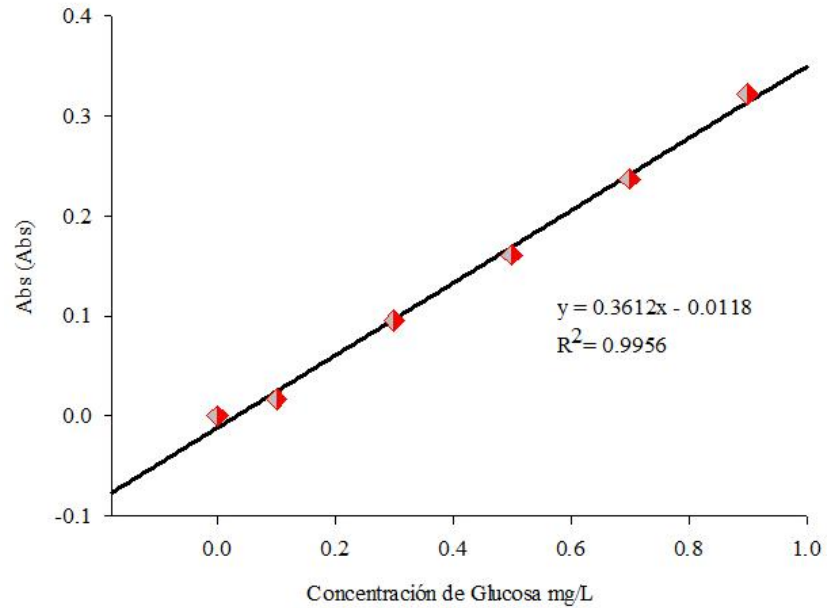
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. V., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavor profile – A review. *Food Research International*, 82, 44–52. Dodoo, C. 1992. Formulation of jams and marmalades with cocoa sweatings - B.Sc. Thesis from Department of Biochemistry, University of Science and Technology Kumasi, Ghana.
- Castell, M., Pérez-Cano, F. J., & Bisson, J. F. (2013). Clinical benefits of Cocoa: An overview. In V. R. P.a. S. Z. Ronald Ross Watson (Ed.). *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 265–276). New York, Heidelberg, Dordrecht London: Humana Press.
- De Araujo, Q. R., Gattward, J. N., Almoosawi, S., Silva, M., Dantas, P. A., & De Araujo Junior, Q. R. (2016). Cocoa and human health: From head to foot–A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), 1–12.
- 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.
- Foundation, W. C. (2010). Cocoa market update. World cocoa foundation published reports and resources.
- Crafac, M., Keul, H., Eskildsen, C.E., Petersen, M.a., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand- Larsen, M., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S., 2014. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Res. Int.* 63, 306–316.
- Ho, V.T.T., Zhao, J., Fleet, G., 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 72–87.
- Galvez, S. L., Loisen, 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, 124-130.
- Baker, D. M., Tomlins, K. I., & Gay, C. (1994). Survey of Ghanaian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. *Food Chemistry*, 51(4), 425e431. doi:10.1016/0308-8146(94)90197-X
- Lainé, K. (2001). Survey of farming practices on farms in Côte d’Ivoire e Field study Development. (pp. 1e28).
- Tomlins, K. I., Baker, D. M., Daplyn, P., & Adomako, D. (1993). Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. *Food Chemistry*, 46, 257e263.
- Melissa Torres. (2007). Fermentación acética. *Industrias de alimentos-nutrición*. <https://alimentos.blogia.com/2007/112901-fermentaci-n-ac-tica.php>.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., & Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6243-6249. doi:10.1021/jf040105b.

- Lima, L. J. R., Kamphuis, H. J., Nout, M. J. R., & Zwietering, M. H. (2011). Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant sporeformers *Food Microbiology*, 28, 573-582
- DUBOIS, M.; GILLES, K. a.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.; SMITH, F. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Anal Chem.* 1956, 28 (3), 350–356. DOI 10.1021/ac60111a017.
- MILLER, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* 31: 426-428
- Boekhout, T., & Phaff, H. J. (2003). Yeast biodiversity. In *Yeasts in Food* (pp. 1–38). <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-706-8.50006-X>
- Gerald.R, H. J. P. (1973). Yeast Biotechnology, 6–8. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010006>
- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2011). Acetic Acid Bacteria. In *Molecular Wine Microbiology* (pp. 227–255). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10009-8>
- Magalhães, I., Gabriela, M., Miguel, P., Ferreira, W., Ribeiro, D., & Freitas, R. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L .) hybrids. *FRIN*, 54(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V., & Rivas, B. de las. (2011). *Lactic Acid Bacteria*. *Molecular Wine Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10008-6>
- Pereira, D. M., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). ScienceDirect Current state of research on cocoa and coffee fermentations, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro. *BioTecnologia*, 16(2), 14–46.
- Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, López de Felipe F, Gómez-Cordovés C, Mancheño JM, Muñoz R. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;132 (2–3):79–90.
- Carlile MJ et al. 2001. *The Fungi*. 2^a ed. Academic Press, San Diego, p 70

14. Anexos

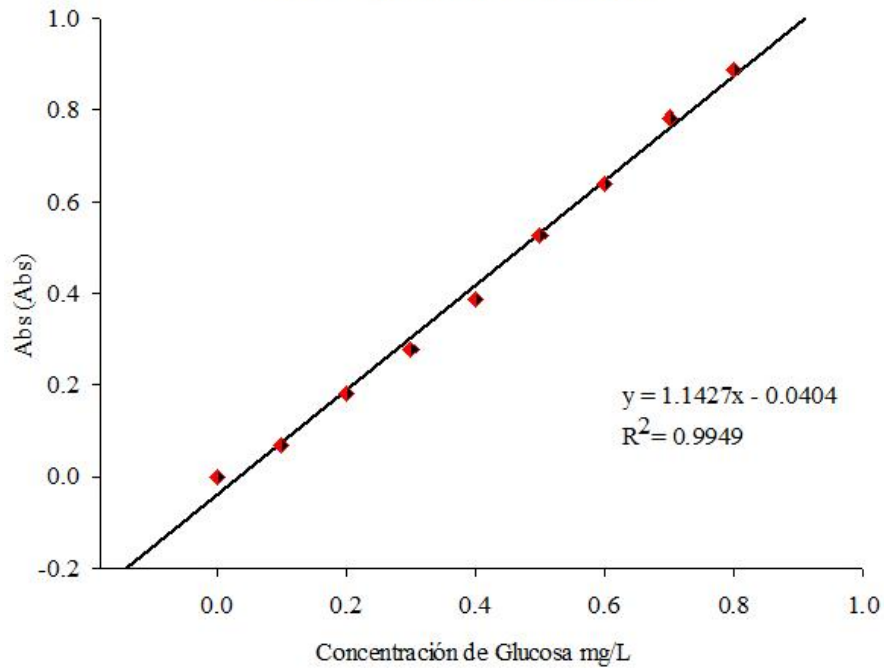
Anexo A: Curva patrón de azúcares reductores (Método de Dubois)

Curva de Calibración de Azúcares Reductores



Anexo B: Curva patrón de azúcares totales (Método de Fenol-Sulfúrico)

Curva de Calibración de Azúcares Totales



Anexo D: Incubadora FELIZA FE-133



Anexo E: ThermoScientific HERAtherm, Oven



Anexo F: Potenciometro Hanna pH HI 3222



Anexo G: Refractómetro portátil Abbe marca Atago





Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

