



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

**Caracterización microbiana, bioquímica y  
cinética del proceso de fermentación tradicional  
durante el beneficio de cacao**

**Tesis para obtener el grado de  
MAESTRO EN ING. QUÍMICA.**

Presenta:

Pedro García Alamilla

Ingeniero Químico en Procesos.

Asesores:

Dr. Mario Vizcarra Mendoza

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Realizada en la planta piloto de cultivo en medio sólido de Biotecnología, UAM-I, Instituto Tecnológico de Villahermosa, ITVH y en la Beneficiadora No. 1 de Jalpa de Mendez, Tabasco

México, D.F

Diciembre 2000

**Caracterización microbiana, bioquímica y  
cinética del proceso de fermentación durante el  
Beneficio de cacao.**

**Maestría en Ciencias (Ingeniería Química)**

**Ing. Químico: Pedro García Alamilla  
Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**

---

<b>CONTENIDO.</b>	<b>PAG</b>
<b>Índice de figuras</b>	i
<b>Índice de tablas</b>	ii
<b>I - Resumen</b>	iv
<b>II.- Presentación general</b>	v
A Situación del cacao, perspectivas y futuro	vi
B Ingeniería genética.	v
C Investigación aplicada y desarrollo.	vi
D Factores limitantes en la investigación de cacao	vi
E Perspectivas a futuro	vi
<b>1 - Revisión bibliográfica</b>	1
1.1 Generalidades sobre el cacao	1
1.2 Producción de cacao en México	2
1.3 Composición química	4
1.4 Fermentación del cacao	6
1.4.1 Métodos de fermentación	7
1.4.2 Fase anaerobia	8
1.4.3 Fase aerobia	11
1.5 Factores que afectan durante la fermentación	13
1.5.1 Duración de la fermentación	13
1.5.2 Tamaño del lote en el proceso de fermentación	14
1.5.3 Retardo entre cosecha y rompimiento de mazorcas	14
1.5.4 Efecto de mezclado	14
1.6 Evolución de los parámetros físicos	15
1.6.1 pH durante la fermentación	15
1.6.2 Evolución de la acidez	16
1.6.3 Evolución del contenido de agua	16
1.6.4 Evolución de la temperatura	17

1.7 Cambios químicos que suceden durante la fermentación	17
<b>2 - Aspectos de ingeniería de la fermentación de medio sólido. (FMS)</b>	19
2.1 Aspectos de la FMS.	19
2.2 Variables que intervienen en la FMS	20
2.2.1 Efecto de la humedad	20
2.2.2 Efecto de pH	21
2.2.3 Efecto de agitación	21
2.2.4 Efecto de gradientes de temperatura	21
2.2.5 Efecto de gradientes gaseosos	22
2.3 Modelamiento de cinéticas microbianas	22
2.4 Modelamiento matemático	25
<b>3- Justificación</b>	28
<b>4 - Objetivos</b>	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
<b>5 - Materiales y métodos</b>	30
5.1 Análisis microbiológicos	30
5.1.1 Toma de muestras	30
5.1.2 Tratamiento de las muestras	30
5.1.3 Medios de cultivo	32
5.2 Determinación de variación de peso en la fermentación de cacao	33
5.3 Análisis fisicoquímicos	34
5.3.5 Medición de temperatura	34
5.3.1 Humedad	34
5.3.2 pH	34

5.3.3 Análisis de azúcares y ácidos orgánicos.	35
5.3.4 Tratamiento de la muestra para análisis en HPLC	35
5.3.6 Medidas adicionales	36
<b>6 - Análisis microbiológico, bioquímico y fisicoquímico de las diferentes etapas de la fermentación del cacao.</b>	<b>38</b>
6.1 Descripción del método de fermentación de cacao tradicional.	38
6.2 Cinética de la fermentación de cacao.	43
6.3 Comportamiento de la humedad a través del tiempo de fermentación	46
6.4 Efecto de las condiciones climáticas en la evolución de la microflora, consumo de azúcares y formación de productos.	47
6.4.1 Evolución de la microflora	47
6.4.2 Consumo de azúcares	50
6.4.3 Formación de productos	51
6.5 Variación de los constituyentes de estudio para los diferentes productos del cacao: Producto completo, Mucílago + Cáscara y Cotiledón.	51
6.6 Comportamiento del pH a través de la fermentación.	54
6.7 Cantidad de materia eliminada por jugo y evaporación a través del tiempo de la fermentación.	57
6.8 Perfiles de Temperatura a través del tiempo de fermentación.	58
<b>7 - Análisis de la cinética de consumo de sustrato y formación de productos durante la fermentación de cacao.</b>	<b>61</b>
7.1 Expresiones cinéticas propuestas.	61
7.2 Estrategia para la validación del modelo de expresiones cinéticas.	64
7.3 Resultados del modelo cinético	68

<b>8 - Conclusiones</b>	78
<b>9 - Comentarios y sugerencias</b>	80
<b>10 - Apéndices</b>	81
<b>11 - Referencias bibliográficas</b>	84

## **Agradecimientos.**

A mis padres a los cuales amo infinitamente:

Pedro y Luz del Alba.

Por enseñarme siempre que con trabajo, honradez, honor y honestidad no hay imposibles.

A mi hermano con mucho amor y respeto:

Ricardo

Sin el no se habría podido realizar ninguno de mis sueños.

A mis tías:

Zoila y Manuela.

Gracias por estar siempre pendiente de mi.

A mi cuñada Liz por su simpatía sin igual.

A mis grandes amigos: Isidro, Raul, Angel Alfonso, José Angel, Guillermo y José Alfredo.

También muy especial: Fabricio Augier y Felipe Vargas Villamil.

A todos los integrantes de la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido de esta Universidad. Especialmente: Aida Hamdan, Rocio, Tere Lo, Juan Romano, Oscar, Cristobal, Yuri, Philippe y muchos más.

A todos mis compañeros de maestría: Especialmente a Miguel Angel, Cesar, Ever, Celia y Noemi

## **Agradecimientos.**

Al Dr. Mario G. Vizcarra Mendoza por la confianza depositada en un servidor.

Al Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda por sus comentarios, sugerencias y apoyo para que este trabajo pudiera concluirse.

A la Dra. Isabelle Gaimé Perraud por enseñarme el maravilloso mundo de los microorganismos con entusiasmo y disciplina.

Al M. C. Roberto Morales Cruz por su amistad y su inigualable carácter.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que hizo posible mis estudios de maestría.

Al Instituto Tecnológico de Villahermosa (ITVH) por las facilidades prestadas para la realización experimental en campo de este trabajo.

Al Institut de Recherche pour le Développement (IRD-México).

Al CIRAD de Francia.

## Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1.1	Mazorcas de cacao en etapa de maduración	1
1.2	Zona de crecimiento del árbol de cacao perteneciente a la especie forastero	2
1.3	Comportamiento de la acidez durante la fermentación de cacao	16
1.4	Comportamiento del contenido de agua durante la cosecha 1996 - 1997	17
5.1	Diagrama de preparación de muestra para siembra microbiológica	31
5.4	Diagrama esquemático donde se muestran las operaciones para HPLC	36
5.5	Diagrama esquemático de la preparación de muestras para análisis de HPLC	37
6.1	Cajas de madera donde es depositado el cacao, se puede observar la condiciones bajo las cuales se encuentran las cajas, así como la distribución.	39
6.2	Aspecto del cacao al principio de la fermentación, se puede observar granos que pertenecen a diversas especies	39
6.3	Cajas de cacao cubiertas con bolsas en la beneficiadora No. 1 (Jalpa de Mendez, Tabasco, México)	40
6.4	En esta imagen se pueden apreciar cajas vacías hacia las cuales se cambia el caco como método de remoción del mismo	41
6.5	Esquema de difusión y reacción en la fermentación de cacao	42
6.6	Comportamiento del contenido de humedad durante la fermentación	46
6.7	Perfiles del comportamiento de siembra en noviembre y enero	47
6.8	Comportamiento del crecimiento de lactobacilos Vs. La producción de ácido láctico	49

---

6.9	Comportamiento del crecimiento de bacterias acéticas Vs. La producción de ácido acético	49
6.10	Comportamiento de levaduras Vs. La producción de etanol	50
6.11	Comportamiento de los perfiles de azúcares estudiados en noviembre y enero	50
6.12	Productos principales durante la fermentación en noviembre y enero	51
6.13	Evolución del sustrato y formación de productos en producto completo	52
6.14	Evolución del sustrato y formación de productos en el mucílago + cáscara	53
6.15	Evolución del sustrato y productos en el cotiledón	54
6.16	Comparación del perfil de evolución del pH a través del tiempo de fermentación tradicional de cacao	54
6.17	Comparación de la evolución del perfil del pH Vs. Productos de fermentación en producto completo	56
6.18	Comparación de la evolución de los perfiles de pH y los principales productos durante la fermentación en cotiledón	56
6.19	Comparación de la evolución de los perfiles de pH y los principales productos durante la fermentación en mucílago	57
6.20	Perdida de peso de cacao por evaporación y jugo de cacao	57
6.21	Perfiles de temperatura durante la fermentación de cacao. Temperatura del centro, parte inferior y superior.	58
6.22	Perfiles de temperatura durante la fermentación de cacao. Temperatura del centro a la periferia.	59
6.23	Perfiles de temperatura durante la fermentación de cacao. Temperatura de la parte inferior a la periferia.	60
7.1	Diagrama del algoritmo de programación	66

## Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
1.1	Superficie sembrada, volumen de producción y su valor en los estados productores principales en México.	3
1.2	Comparación con otros países del rendimiento en los estados productores de cacao en México.	3
1.3	Composición química del mucilago.	4
1.4	Constituyentes de polisacáridos presentes en el cacao.	5
1.5	Especies aisladas en un estudio en Chiapas, México.	10
1.6	Especies aisladas de bacterias lácticas durante la fermentación.	10
1.7	Especies de <i>Bacillus</i> encontradas durante la fermentación.	12
5.1	Componentes que constituyen el medio MRS.	32
5.2	Componentes que constituyen el medio para crecimiento de Bacterias Acéticas.	32
5.3	Componentes que constituyen el medio para el crecimiento de microorganismos totales.	33
5.4	Condiciones bajo la cuales se operó el HPLC.	34
5.5	Tiempo de retención característicos de los componentes de interés en el HPLC.	35
7.1	Concentraciones iniciales (g/100 g MS) para simulación.	64
7.2	Variables adimensionales empleadas en las ecuaciones cinéticas.	66
7.3	Valores de los parámetros cinéticos de la fermentación de cacao para producto completo y mucilago.	68

## I - Resumen

En el presente trabajo se estudiaron las condiciones de fermentación tradicional del cacao (*Theobroma cacao L*) en Tabasco, el cual consistió en dos etapas principales. La primera etapa se enfocó a estudios microbianos y bioquímicos y la segunda tuvo como finalidad la formulación, evaluación y confirmación de expresiones cinéticas para sustrato y formación de productos. Dentro del marco experimental se trabajó bajo dos condiciones diferentes de mezclado o bien de removido de cacao, además de temporadas diferentes.

Durante la primera parte se estudió el crecimiento de microorganismos como unidades formadoras de colonias (UFC) a nivel grupo, esto de acuerdo a las entidades microbianas de mayor importancia referidas por bibliografía y que tienen repercusiones esenciales en el cacao. En el estudio bioquímico se evaluó la desaparición de sustrato y formación de productos por acción microbiana a través del tiempo de fermentación, su repercusión en el pH, temperatura, pérdida de materia por exudado de cacao.

En la propuesta de expresiones cinéticas se estableció un sistema de cuatro ecuaciones diferenciales no lineales con sus parámetros cinéticos correspondientes, el cual se resolvió numéricamente y se comparó con los resultados experimentales, así mismo se comprobó la capacidad de predicción del sistema.

## II. Presentación general

### A. Situación del cacao, perspectivas y futuro.

En este apartado se presentan las expectativas en el campo de investigación del cacao de una forma global en los principales campos en que se han realizado estudios y el prospecto de investigación a futuro y el papel de México como productor y los campos explotados en el país.

Las exportaciones agrícolas juegan un papel fundamental en los países en vías de desarrollo los cuales por condiciones económicas no permiten competir en el mercado industrial por lo que sus materias primas no son procesadas y requieren ser exportadas o bien, vendidas a empresas transnacionales, por lo que mejoras en el ramo agrícola son de importancia, para este hecho muchos centros de investigación de países desarrollados que procesan cacao invierten en estos países para mejoramiento en cultivos y en procesos unitarios para obtener las mejores condiciones de los productos, así también grupos de investigación en países en vías de desarrollo colaboran para obtener avances significativos en este campo de investigación. El cacao como rama de investigación en México se ha enfocado al mejoramiento en los cultivos y estudios pequeños en aspectos microbiológicos y se ha dado poco énfasis a los procesos unitarios para preparar al cacao como materia prima para la elaboración de chocolate, incluso los estudios enfocados a nivel mundial se centran en grandes productores entre los que se encuentra Brasil, o bien en países africanos y las citas internacionales tienen pocas referencias al cacao mexicano y dado que siendo un producto que depende de muchos factores como condiciones climáticas entre otras, sus condiciones cambian apreciablemente.

### B. Ingeniería genética.

En cuanto a México su planta productiva es relativamente nueva en el material genético empleado, a partir de la introducción de materiales genéticos conocidos como cacaos forastero y trinitario, los cuales han sufrido recombinaciones con el material genético domesticado ya existente. Montoya (1978, *op cit* Ramirez *et al* 1997) lo denominó complejo genético Trinitario.

A través del tiempo el cacao en Tabasco ha sufrido un proceso de hibridación lento dirigido principalmente por los propios agricultores el cual ha dado la formación de una variedad con un alto vigor híbrido, este posee un alto nivel medio productivo y con un material resistente a plagas y enfermedades, por lo que a nivel internacional puede considerarse como uno de los mejores del mundo.

En cuanto a los aspectos de condiciones genéticas se cuenta con suficiente información e investigación, así que si se desea mejorar la calidad genética no es obstáculo para obtener híbridos con un alto valor, sin embargo **el mejoramiento en la calidad industrial del grano, tanto en la presentación como en su contenido, debe cimentarse en un proceso de beneficio que controle la fermentación y secado del grano como la clasificación granulométrica (Ramírez et al. 1997)**

### **C. Investigación aplicada y desarrollo.**

Gran parte de los trabajos de investigación se dedican a estudios en los aspectos de mejoramiento y control tanto biológico como microbiano. Los aspectos de mejoramiento en parámetros de calidad son menos indagados que las enfermedades, esto es mencionado por instituciones de investigación en Malasia, Costa Rica, Francia (CIRAD) y por muchos departamentos de investigación de industrias procesadoras de cacao.

### **D. Factores limitantes en la investigación de cacao.**

El factor limitante es la escasez de continuidad en las investigaciones relacionadas con el cacao, la continuidad de personas es un prerequisite necesario para la investigación básica. La poca relación interinstitucional que implicaría el intercambio de información y experiencia es muy baja, así como las pocas facilidades en los centros de trabajo aunado a la escasez de instalaciones adecuadas merman el trabajo de investigación.

### **E. Perspectivas a futuro.**

Muchas características del cacao son desconocidas o bien poco estudiadas, tales como los aspectos dentro de los que se desarrolla la Fermentación y el Secado, aspectos

fundamentales en la calidad del Cacao, dentro de los que pueden ser destacados las complejas características asociadas a las propiedades organolépticas que dependen de las actividades microbianas y enzimáticas y que involucra la formación de diferentes componentes. Campo donde se puede extraer mucha información para el mejoramiento y crear diversas ramas de investigación. Así también la industria social requiere una transformación en los aspectos ingenieriles donde se debe poner la atención a la optimización de la planta, para bajar costos de producción, invertir en procesos nuevos que la diversifiquen y tener una mercadotecnia adecuada.. Sin embargo existe un grupo de investigadores en México dedicados desde hace poco años a activar la investigación en este ramo y lograr mejoras, el primer paso se ha dado y se esperará tener resultados significantes en un futuro no muy lejano.

## 1. Revisión bibliográfica.

### 1.1 Generalidades sobre el cacao

La planta de cacao es un árbol eterculíaceo, cuyo fruto es una cereza aunque comúnmente se le denomina mazorca o vaina en los países productores, ésta constituye el recubrimiento de las semillas o habas que se encuentran en su interior distribuidas uniformemente (Braudeau, 1974 *op cit* Lehrian y patterson, 1986).



Fig. 1.1 Mazorcas de cacao en etapa de maduración.

El fruto maduro del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L) contiene alrededor de 30-40 semillas o granos de cacao, que a su vez están recubiertas por una capa o especie de pulpa denominada mucílago, rico en carbohidratos (Schwan *et al* 1995). Estas semillas consisten de dos cotiledones y una radícula rodeada por una testa.

Los estudios histológicos del cacao aun no fermentado clasifican a las células presentes en dos tipos:

Las células incoloras que representan el 90 % del peso seco del cotiledón y las células coloridas que son el 10 % restante en peso seco.

Las células incoloras contienen prótidos, glúcidos, grasas y enzimas; en tanto las coloridas poseen polifenoles que son responsables del color del grano, además de alcaloides: teobromina y cafeína.

Cheesman (1944 *op cit* Lehrian y Patterson, 1983) divide todas las variedades de cacao en tres grupos principales, de acuerdo a su forma, tamaño y color externo del fruto, en: Criollo, Forastero y Trinitario.

**Criollo:** La mazorca se caracteriza por 10 surcos profundos, las paredes de las vainas son delgadas y de gran longitud, sus semillas son aproximadamente redondas con cotiledones blancos o violetas pardos.

**Forastero:** Este tipo presenta 10 surcos poco profundos en la mazorca, además de tener paredes gruesas y las semillas suelen ser de color madera y ovaladas. La mayoría del cacao existente en los países productores es de este tipo debido a su resistencia a las enfermedades.

**Trinitario:** Este tipo de cacao es un híbrido entre criollo y forastero. La cantidad de cacao en el mercado es intermedia entre los mencionados.

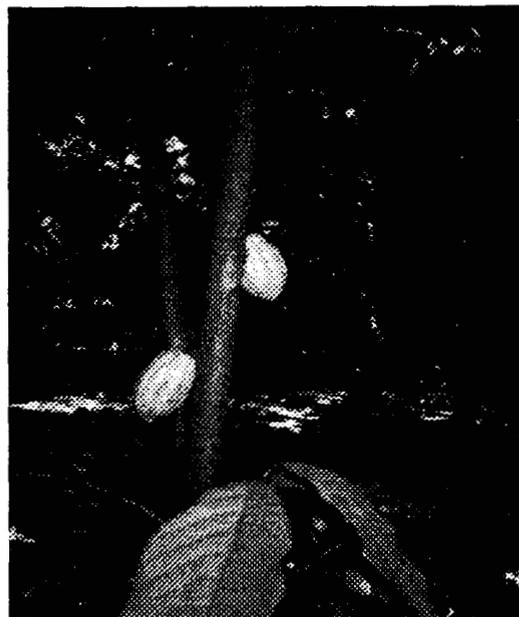


Fig. 1.2 Zona de crecimiento del árbol de cacao, perteneciente a la especie forastero.

## 1.2 Producción de cacao en México

La inmensa mayoría de las zonas cacaoteras se desenvuelven en regiones forestales, de clima cálido - húmedo, que presentan un régimen de lluvias bien distribuido y una estación seca poco rigurosa. Braudeau y Hardy (*op cit* Ramírez, 1998) afirman que las plantaciones son muy exigentes en cuando a condiciones de temperatura, humedad relativa y la disponibilidad de agua en el suelo.

La región del Sureste mexicano por sus condiciones particulares de suelo y clima determinan la principal zona de producción de cacao, particularmente en los estados de Tabasco y Chiapas, los cuales juntos aportan casi el total de la producción nacional, aproximadamente 99.9 %. Sin embargo el cacao, también se encuentra como especie en Veracruz, Oaxaca, Michoacán y Guerrero. La especie de cacao de mayor abundancia por sus características de resistencia en México es el Forastero y en menores cantidades el Criollo y Trinitario.

Dentro de este panorama, Tabasco contribuye aproximadamente dentro del marco nacional con el 70 % de la producción y Chiapas con el restante (Tabla 1.1).

Tabasco tiene una infraestructura bien definida en cuanto a organización social teniendo estimados de producción, sobre los volúmenes producidos de cacao, en tanto que en Chiapas no reporta estadísticas confiables.

Tabla 1.1 Superficie sembrada, volumen de producción y su valor en los principales estados productores en México.

ESTADO	SUPERFICIE SEMBRADA (HECTAREAS)	VOLUMEN DE PRODUCCIÓN (TONELADAS)	VALOR (MILES DE PESOS)
Tabasco	60, 612	33, 050	312483
Chiapas	23, 005	9, 793	104144

Fuente: INEGI TABASCO Y CHIAPAS 1998

Tabla 1.2 Superficie promedio cultivada y rendimientos por producto en diversos países.

PAIS	SUPERFICIE EN HECTAREAS	RENDIMIENTO (KG/HA/AÑO)
Camerún	2.0	278
Ghana	2.0	254
Nigeria	1.4	467
Brasil	30.0	513
México	3.1	546.55

Fuente: INEGI 1998

México tiene mejores condiciones de producción que otros países, en tanto que está colocado en el primer lugar en rendimiento a nivel mundial (Tabla 1.2), además se sitúa en el undécimo lugar en cuanto a producción a nivel mundial.

### 1.3 Composición química del grano de cacao

El grano de cacao se encuentra formado por dos partes en general, denominadas mucílago y cotiledón, separadas por la cáscara que a su vez constituye el recubrimiento del cotiledón. En este punto especificaremos la composición promedio de cada una de estas partes debido a que varían de acuerdo a la época de cosecha, condiciones climatológicas, grado de maduración de la mazorca, región donde se cosecha, etc, (Schwan *et al.*; 1995, Braudeau y Hardy, 1944 *op cit* Lehrian and Patterson *et al.*; 1986).

El medio que rodea al cotiledón (mucílago) es muy favorable para el desarrollo de microorganismos, es rico en agua y carbohidratos y fuentes nutritivas ideales para el desarrollo de los mismos. En la tabla 1.3 se muestra un cuadro que presenta la composición química del mucílago y cotiledón.

Tabla 1.3 Composición química del mucílago en por ciento en peso.

Compuesto	Cotiledón	Mucílago
Agua	35	84.5
Celulosa	3.2	0.0
Almidón	4.5	0.0
Pentosa	4.9	2.7
Sacarosa	0.0	0.7
Glucosa y fructosa	1.1	10.0
Manteca de cacao	31.3	0.0
Theobromina	8.4	0.6
Proteínas	2.4	0.0
Cafeína	0.8	0.0
Polifenoles	5.2	0.0
Acidos	0.6	0.7
Sales minerales	2.6	0.8
TOTAL	100 %	100 %

Fuente: Braudeau, 1970, (*op cit* López *et al* 1997)

Como se puede observar en la tabla 1.3 existe un porcentaje de agua en el mucílago adecuado para el desarrollo de microorganismos, además de contener sustancias esenciales para el sustento de los mismos. El cotiledón en cambio los niveles de humedad son más bajos, y a diferencia del mucílago este presenta una variedad de componentes que serán de importancia para el desarrollo de precursores de aromas, tal es el caso de los polifenoles, así como también en polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos orgánicos y pigmentos.

**Azúcares:** En habas frescas de cacao, el principal constituyente es la sacarosa, encontrándose en menor proporción fructosa y glucosa, además de trazas de pentitol, manitol, sorbosa e inositol. Cabe mencionar que los azúcares presentes en el cacao se presentan en cualquier país productor, diferenciados en cuanto a la concentración de los mismos.

**Polisacáridos:** Los polisacáridos encontrados en estudios de cacao no fermentado africano del oeste seco se muestra en la tabla 1.4:

Tabla 1.4 Constituyentes de polisacáridos presentes en el cacao no fermentado seco.

Constituyentes	% en granos secos
Glucosa	0.30
Sacarosa	0.00
Almidón	6.10
Pectinas	2.25
Fibra	2.09
Celulosa	1.92
Pentosanas	1.27
Mucílago y gomas	0.38

Fuente: Rehm *et al* 1994.

Al comparar la tabla 1.4 con 1.3 es aparente que deben surgir cambios durante el secado debido a que no existe presencia de sacarosa al final del mismo. Además el almidón

parece no tener cambios con o sin fermentación. Además es importante notar que de acuerdo a la región geográfica los porcentajes de concentración varían.

**Proteínas:** Las proteínas se encuentran presentes ampliamente en los granos de cacao. Un punto importante de mencionar es que los altos niveles de proteínas son responsables del incremento del tiempo de fermentación requerido (Lehrian and Patterson *op cit* Rehm 1994) .

**Lípidos:** La manteca de cacao es una grasa simple, constituido principalmente de ácido palmítico, esteárico, oléico y cantidades pequeñas de ácido mirístico, linolénico y araquídico (Rehm *et al.* 1994).

**Los Acidos** presentes en los granos de cacao comerciales se clasifican en volátiles y no volátiles, encontrándose el ácido acético como el principal ácido volátil y principalmente ácido cítrico como no volátil, con cantidades pequeñas de ácido tartárico, láctico, glucónico, oxálico, succínico, málico y fosfórico.

**Polifenoles:** Los de mayor concentración encontrados son las epicatequinas y leucocianidinas.

#### **1.4 Fermentación del cacao**

La fermentación del cacao es una sucesión de diferentes procesos bioquímicos, microbiológicos y enzimáticos, necesarios ya que por ellos ocurren las diferentes reacciones que permiten obtener un cacao de buena calidad (Hashim *et al.*, 1998, Senanayake *et al.*, 1997, Schwan *et al.*, 1995, Sánchez *et al.*, 1985, Roelofsen, 1958 *op cit* Schwan *et al.*, 1995).

Las características que se persiguen con el proceso de fermentación tradicional son las siguientes:

La eliminación del mucílago que cubre al grano de cacao, y la muerte del embrión, para evitar la germinación del grano que deteriora su calidad.

El desencadenamiento de reacciones biológico - enzimáticas que favorecen la reducción del amargor y astringencia del cacao además del desarrollo de las sustancias precursoras del aroma característico y sabor del chocolate.

El cambio de coloración del cotiledón dependiendo de la especie de cacao al característico color café del chocolate.

Durante la fermentación del cacao existen dos tipos de eventos principales (Schwan *et al.* 1995):

1.- La fermentación del mucílago por acción de microorganismos que produce alcoholes, ácidos y libera calor; y

2.- Diferentes reacciones bioquímicas en el cotiledón, que son estimuladas por el transporte de los metabolitos de los microorganismos de la fermentación del mucílago al interior del cotiledón.

La sucesión microbiana es bien conocida durante la fermentación (Rombouts, 1952, Maravalhas, 1966, Ostovar and Keeney, 1973, Carr, 1979, Passos, 1984, Schwan, 1986, *op cit* Schwan *et al.*, 1995). Los primeros colonizadores son las levaduras, seguidas por bacterias lácticas y finalmente por bacteria acéticas. De menor importancia se encuentran bacterias formadoras de esporas aeróbicas y hongos filamentosos. Este proceso presenta una fase anaerobia y otra aerobia, que son reconocidas como fundamentales para el buen desarrollo de las características del cacao. Estas contemplan lo siguiente:

A.- Fermentación durante la fase anaerobia que contempla la formación de etanol y ácido láctico por levaduras y bacterias lácticas,

B.- Fermentación aerobia cuya acción principal es la formación de ácido acético a partir de etanol por bacterias acéticas.

#### **1.4.1 Métodos de fermentación.**

Los granos de cacao pueden ser fermentados de diferentes formas dependiendo del tamaño de los cultivos y de la región geográfica, aunque básicamente se distinguen los siguientes tipos:

\* **En montones:** los granos son apilados y cubiertos por hojas de plátanos, estos montones alcanzan alrededor de 1.5 metros de diámetro y la fermentación se lleva a cabo durante seis días aproximadamente.

\* **En cajas de madera:** este método es usual en grandes plantaciones y es utilizado para grandes cantidades de cacao, estas cajas pueden contener hasta 1.5 toneladas de cacao y además tienen agujeros en la parte inferior y a los costados lo que permite el libre drenado de sustancias que se da durante la fermentación y quizás también proporcionan aeración a la masa fermentativa, las dimensiones usuales son de 1 m<sup>3</sup>.

\* **En cubetas:** estas pueden ser de madera y oscilan en cuanto a tamaño, aunque de diversos estudios se ha visto que la cantidad mínima a fermentar oscila entre 70 y 80 Kg. para obtener un cacao de regular calidad.

#### 1.4.2 Fase anaerobia.

La primera etapa durante la fermentación es la acción de levaduras sobre los substratos presentes en el mucílago del cacao y las cuales predominan principalmente durante las primeras 24 horas, posteriormente comienzan a proliferar las bacterias lácticas y acéticas debido a las condiciones generadas durante el proceso.

El principal papel de las levaduras es la producción de alcohol mediante la degradación de los azúcares totales presentes en el mucílago, sin embargo las cepas presentes de levaduras son muy abundantes y esta no es su única contribución al proceso; ellas contribuyen al rompimiento del ácido cítrico presente en el mucílago lo que permite el incremento del pH de 3.5 a 4.2. Con el desarrollo de las bacterias, tanto lácticas como acéticas, se producen ácidos orgánicos (ácido láctico, acético y en menor presencia oxálico, fosfórico, succínico y málico) y ácidos volátiles, y algunas cepas de levaduras producen pectinasas, lo que permite la reducción de la viscosidad en el mucílago y con ello se obtiene una mayor aeración sobre la masa total del haba.

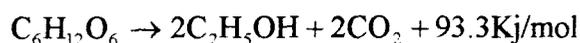
Las levaduras con actividad pectinolítica juegan un papel importante debido a que éstas degradan las pectinas. Esta degradación provoca la formación del jugo o exudado rico en

azúcar, pectinas y ácidos orgánicos volátiles con un pH entre 3.4 y 3.8; esto contribuye también a una mayor aeración, por lo siguiente creando las condiciones para el desarrollo de las bacterias acéticas (Schwan *et al.* 1995).

Las reacciones principales de interés durante esta etapa se muestran a continuación con su respectiva generación de calor:



Ec. 1.1



Ec. 1.2

Las bacterias lácticas proliferan cuando parte del mucílago ha sido drenado y las levaduras comienzan a declinar, la acción principal de las bacterias lácticas es la degradación de carbohidratos para producción de ácido láctico, aunque también metabolizan ácido cítrico contribuyendo con ello a la elevación de la acidez (Passos *et al.* 1984)

Aunada a la producción de alcohol y ácido láctico también existen cantidades menores de otros productos producidos y alteraciones de proteínas, lípidos y otros constituyentes que son importantes pero menos evidentes.

Las cepas de levaduras presentes en la fermentación del cacao son extensas y varían de acuerdo a la situación geográfica. En México Sánchez (*et al.*, 1988) ha aislado las siguientes cepas mostradas en la Tabla 1.5, sin embargo la flora es mucho más abundante.

Estas cepas de levaduras desaparecen en el curso de la fermentación y solamente se ha encontrado ocasionalmente alguna cepa al final del proceso. El decline de las levaduras se debe principalmente a la propia intolerancia de estas al alcohol en proporción de 4 % de v/v (Schwan *et al.* 1995) y al gradual incremento de temperatura que se origina por la acción de bacterias acéticas que comienzan a crecer por las condiciones de pH que se originan por la utilización del ácido cítrico por grupos de levaduras y bacteria lácticas (Roelofsen 1958 *op cit* Schwan *et al.* 1995).

Tabla 1.5 Especies aisladas en un estudio en Chiapas, México.

LEVADURAS	ACTIVIDAD PECTINOLITICA	LEVADURAS	ACTIVIDAD PECTINOLITICA
<i>Debaryomyces hansenni</i>	-	<i>Candida curvata</i>	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	<i>C. famata</i>	+
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	+	<i>C. hellenica</i>	-
<i>Pichia farinosa</i>	-	<i>C. humicola</i>	-
<i>Pichia fluxuum</i>	-	<i>C. kefyri</i>	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	<i>C. pintolopesii</i>	-
<i>S. kluyveri</i>	+	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-
<i>Brettanomyces custersianus</i>	-	<i>Kloeckera apiculata</i>	-
<i>Candida castelli</i>	-	<i>Trichosporon cutaneum</i>	+
<i>C. colliculosa</i>	+		

Usualmente al cuarto día de la fermentación las levaduras no se encuentran presentes en el cacao.

La mayoría de las bacterias lácticas aisladas en la fermentación (Tabla 1.6) del cacao son fermentadoras homolácticas, metabolizan carbohidratos formando más de 85 % en ácido láctico por la ruta Embden-Meyerhof, aunque también en menor proporción se encuentran bacterias heterolácticas utilizando la ruta hexosa monofosfato cuya producción es en un 50 % en ácido láctico y otros metabolitos como ácido acético, etanol, glicerol, manitol y CO<sub>2</sub> (Schwan *et al.*, 1995, Passos *et al.*, 1984).

Tabla 1.6 Especies aisladas de bacterias lácticas durante la fermentación

INVESTIGADORES	BACTERIAS AISLADAS
Ostovar y Keeney ( 1973 ) en Trinidad	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ,
Passos ( 1984 ) en Brasil	Seis especies de <i>Lactobacillus</i> spp, <i>L. casei</i> , <i>L. Plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. Brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , dos especies del genero: <i>Pediococcus</i> , <i>P. dextrinicus</i> y <i>P. Acidilactici</i>

Fuente: Schwan *et al* 1995

### 1.4.3 Fase aerobia.

Después del descenso de la población de levaduras y con la elevación del pH y la viscosidad reducida que surge durante la fase anaerobia, la masa fermentativa queda mucho más aereada, de esta manera se crean las condiciones necesarias para el desarrollo de las bacterias acéticas que actúan estrictamente en medio aerobio, en esta fase se da un elevamiento de la temperatura que contribuye a la eliminación de levaduras y bacterias lácticas. La función primordial de este tipo de bacterias es la oxidación del alcohol a ácido acético y que con las fracciones de ácido láctico son también oxidados a dióxido de carbono y agua.

La producción de acidez en las habas de cacao y el elevamiento de la temperatura que se da en la masa de fermentación, origina la difusión e hidrólisis de proteínas en los cotiledones y esta función se le atribuye al metabolismo de las bacterias acéticas (Forsyth y Quesnel, 1963 *op cit* Schwan *et al* 1995). Por lo tanto la contribución de estas bacterias es de suma importancia para la formación de precursores de sabor, como azúcares reductores, pirazinas y aminoácidos libres.

La reacción que da a lugar a la formación de ácido acético se muestra a continuación con su contribución de calor al sistema:



Ec. 1.3

Las bacterias acéticas aisladas durante la fermentación de cacao, por Carr, Ostovar, Keeney y Passos (*op cit*, Schwan *et al.* 1995) en Ghana, Trinidad y Brasil respectivamente, son las siguientes: *Acetobacter pasteurianus*, *A. Peroxidans*, *A. Aceti*, *A. Aceti subsp. liquefaciens* y *Gluconobacter oxidans subsp. Suboxidans*.

### Bacterias formadoras de esporas aeróbicas

El incremento en la aeración, la elevación de pH (3.5 - 5) y la elevación de temperatura alrededor de 45°C, pueden favorecer el desarrollo de bacterias del género Bacilos (Schwan *et al.* 1986, *op cit* Schwan *et al* 1995). Este tipo de bacterias origina una gama de compuestos químicos bajo estas condiciones, que pueden contribuir a la acidez y quizás con el tiempo produzcan sabores indeseables en las habas.

Otros compuestos orgánicos como el ácido acético, ácido láctico, 2,3 butanediol y tetrametilpirazina, los cuales influyen en el sabor del chocolate, son también producidos por esta especie.

En la tabla 1.7 se muestran los géneros aislados de bacilos por diversos investigadores.

Tabla 1.7 Especies de Bacilos encontradas durante la fermentación.

INVESTIGADORES	BACTERIAS AISLADAS
Ostovar y Keeney (1973), en Trinidad	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. cereus</i> var. <i>Mycoides</i> , <i>B. Coagulans</i> , <i>B. Coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i>
Carr y Davies (1980), en Ghana y Malasia	<i>B. subtilis</i> , <i>B. Licheniformis</i>
Schwan (1986) Brasil	<i>B. subtilis</i> , <i>B. Licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. Pumilus</i> , <i>macerans</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>P. pasteurii</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. laterosporus</i>

Fuente: Schwan *et al* 1995

### Los hongos filamentosos.

Estos no son considerados una parte importante de la sucesión microbiana y se ha encontrado presencia de ellos en la fermentación del cacao en las partes mejor aireadas.

Posiblemente puedan contribuir, no muy marcadamente, al mal sabor del cacao.

Las especies aisladas por Riberio (Schwan *et al.* 1995) en Brasil: *Aspergillus fumigatus*. *A. niger*, *Lasioidiplodia theobroma*, entre otros.

## 1.5 Factores que afectan la fermentación de cacao.

### 1.5.1 Tiempo de fermentación

El tiempo de fermentación es muy variado y depende en gran medida de las regiones de producción y época de cosecha. Por ejemplo, usualmente en temporadas de alta producción, los granos de cacao son parcialmente fermentados, ya que la cantidad a procesar supera la capacidad instalada en los lugares de recepción, lo que obliga a realizar una fermentación incompleta.

Un hecho que causa problemas muy fuertes durante la fermentación es la heterogeneidad en las variedades del cacao, ya que el tiempo de fermentación entre los grupos de cacao no es igual. Por ejemplo, las diferencias entre el criollo y forastero son muy marcadas, en tanto que el criollo requiere entre 2 y 3 días para completar la fermentación, el forastero oscila entre 6 - 8 días. Además un hecho importante es la duración en el tiempo de fermentación que afecta la cantidad de acidez presente en las habas.

Se encuentra seis métodos que deberán ser utilizados para determinar el tiempo de fermentación e iniciar el proceso de secado (Quesnel *op cit* Lehrian y Patterson *et al* 1986):

- 1.- Tiempo calendarizado
- 2.- Pruebas de corte y utilizar el criterio del color del cotiledón
- 3.- Color externo de las habas
- 4.- Olor de la masa fermentativa
- 5.- Descenso de la temperatura
- 6.- Hinchamiento de las habas

Sin embargo resultan muy inapropiados dado que dependen de la capacidad de reconocimiento organoléptico de la persona encargada y esto obviamente no es uniforme.

De las anteriores reglas la número 2 es la que resulta más ampliamente utilizada en las fermentadoras, debido a que los cambios que se presentan en el cotiledón por las diversas reacciones presentes dan el cambio de coloración y marcan de cierta manera la finalización de la fermentación, aunque esto deja mucha incertidumbre también.

### **1.5.2 Tamaño del lote de cacao en el proceso de fermentación.**

Este punto se encuentra íntimamente ligado al grado de aireación y desarrollo del calor de la masa a fermentar.

La cantidad de cacao a fermentar varía considerablemente de acuerdo a la temporada de cosecha principalmente.

El incremento de aireación en la superficie de una gran cantidad de masa resulta en un rápido incremento de temperatura que ocurre en el centro de la masa.

Diversos autores difieren en cuanto a la cantidad menor de masa de cacao a fermentar en condiciones naturales, las cuales fluctúan entre 35 - 450 kg.

Otro factor que afecta también son las dimensiones de las cajas de fermentación debiendo cumplir con dimensiones adecuadas para que el proceso de transferencia de calor sea homogéneo. Las cajas empleadas en el estado de Tabasco, México poseen dimensiones de 1 m<sup>3</sup>.

### **1.5.3 Retardo entre cosecha y rompimiento de la mazorca.**

Un retardo entre la cosecha y apertura de las vainas resulta en una reducción en la concentración de azúcar en el mucílago y una reducción de la razón mucílago / cotiledón de las habas frescas, además se presenta una elevación lenta con mayores rangos de temperatura en las mazorcas almacenadas en el campo por muchos días (Rohan *et al.* 1963 *op cit* Lehrian y Patterson 1986).

### **1.5.4 Efecto de mezclado y aireación durante la fermentación del cacao.**

El mezclado es esencial durante la fermentación debido a que provee de aire a la masa fermentativa. Diversos estudios han mostrado que tiene un efecto significativo sobre los precursores de sabor. También tiene como finalidad asegurar la homogeneidad del tratamiento, evitar aglutinamientos de las habas, inhibir el crecimiento de hongos sobre las partes más aereadas en las cajas de fermentación, etc.

La aireación tiene como finalidad después de la fase anaerobia favorecer la producción de ácido acético por oxidación de etanol, aunque también a la oxidación completa de ácido acético a dióxido de carbono y agua.

El efecto más notorio del mezclado es la elevación de temperatura que se propicia de acuerdo al tiempo de mezclado y la frecuencia del mismo, cuestión que dependerá apreciablemente de la cantidad de la masa fermentativa.

Las frecuencias de mezclado oscilan de acuerdo al área de producción; en algunas regiones las habas de cacao son mezcladas después de 24, 48, 96 e incluso 144 horas y en algunas partes diariamente en seis ocasiones.

El hecho de prolongar el intervalo de mezclado propicia una elevación lenta de temperatura, además de prolongar la fase anaerobia y no causar homogeneidad.

Dependiendo de la cantidad de masa a fermentar el tiempo de mezclado oscila mucho, por ejemplo Hashim *et al.* 1998, estudiaron diferentes cantidades de masa con diferentes tiempo de mezclado encontrando que lo recomendable para una masa de 60 kg son 5 minutos. Esto con la finalidad de obtener concentraciones altas de aminoácidos libres, péptidos-N, azúcares reductores y pirazinas que constituyen los precursores del sabor.

Sobre el tiempo de mezclado en una determinada cantidad de masa requiere un estudio profundo en cada región de producción debido a que la concentración de sustrato varía ampliamente y por lo tanto así también los precursores de sabor.

## **1.6 Evolución de los parámetros físicos.**

### **1.6.1 pH durante la fermentación**

La evolución del pH a la largo de la fermentación varía por diferentes situaciones que se presentan en la fermentación, desde los procesos de degradación por acción de microorganismos, así como también por efectos de mezclado (Senanayake *et al.*, 1997).

Existen significativas diferencias en cuanto a los pH iniciales en el mucílago y cotiledón antes del proceso de fermentación, esto se debe principalmente al contenido de ácido cítrico en el mucílago. La variación de pH en el mucílago se debe principalmente a la degradación de ácido cítrico incrementándose por este hecho y debido a que gran parte del ácido acético formado durante la fase aerobia migra hacia el cotiledón. En el cotiledón el comportamiento de pH en un principio desciende por la presencia de ácido acético y posteriormente se incrementa debido a las reacciones que ocurren entre ácido acético y diferentes fracciones de proteínas.

### 1.6.2 Evolución de la acidez

Cuando el exudado o jugo de cacao escurre de las cajas de fermentación las condiciones de aireación originan más rápidamente la oxidación de ácido cítrico y con ello reduciendo la acidez.

El comportamiento de la acidez total fue medido recientemente por Augier *et al.* (1997) en el estado de Tabasco en base a la cantidad de acético presente por titulación con NaOH y la evolución es muy parecida al encontrado en otros países productores.

La Figura 1.3 nos muestra el comportamiento de acidez total a través de la fermentación tanto en la cascara como en grano (Augier, *et al.* 1999), así también se puede observar que los niveles de mayor concentración de acidez se alcanzan en el cuarto día tanto para cáscara como para grano y posteriormente comienza un decline pronunciado.

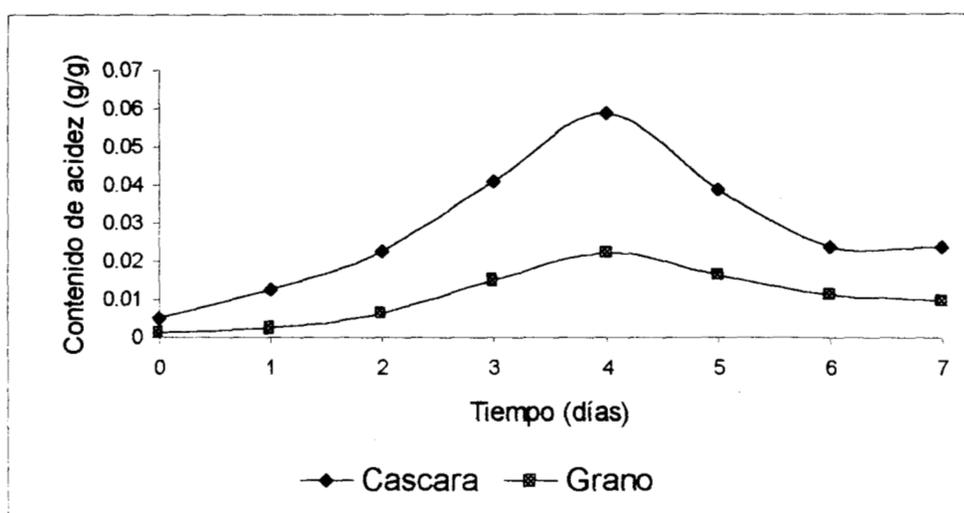


Fig. 1.3 Comportamiento de la acidez durante la fermentación de cacao

### 1.6.3 Evolución del agua.

El contenido de agua presente durante la fermentación fue analizado recientemente por Augier *et al.* (1997) en Tabasco y el comportamiento es mostrado en la Figura 1.4. Al comparar los niveles de humedad en distintas fechas los cuales abarcan temporadas distintas no se aprecian cambios notorios, presentándose el nivel más inferior en febrero y el mayor en el mes de noviembre.

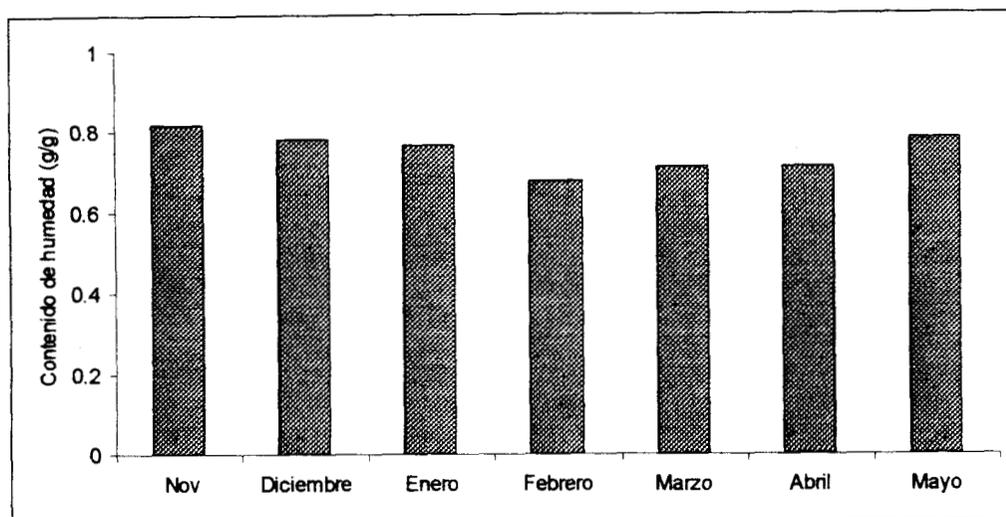


Fig. 1.4 Comportamiento del contenido de agua durante la cosecha 1996-1997

#### 1.6.4 Temperatura durante la fermentación.

El incremento en la temperatura durante el inicio de la fermentación es muy lento. La degradación de azúcares por levaduras genera poca cantidad de calor, los estudios muestran que la elevación de temperatura se da aproximadamente a las 48 horas, esto es por la acción de bacterias acéticas las cuales transforman el alcohol a ácido acético cuya reacción es mucho más exotérmica. El comportamiento de la temperatura se puede ver afectada por la cantidad de masa fermentativa y el tiempo de mezclado como se mencionó anteriormente.

El rango de temperatura observado fluctúa desde 26 a 45°C durante las primeras 48 horas y puede alcanzar los 60°C posteriormente.

#### 1.7 Cambios químicos que suceden durante la fermentación.

Durante la fermentación de cacao suceden una serie de transformaciones químicas y bioquímicas que contribuyen de manera fundamental al buen desarrollo del sabor del cacao. Con anterioridad se mencionó el papel de levaduras y bacterias en la formación de los productos principales (etanol, ácido acético y ácido láctico). Aunado a esta serie de reacciones químicas suceden una serie de reacciones enzimáticas en el interior del haba y muchos cambios debido a ambos tipos de reacciones.

La formación de alcohol, ácido láctico, agua y ácido acético se lleva a cabo en el mucílago y estos se difunden al interior del cotiledón estimulando las complejas reacciones bioquímicas, además de indicar la permeabilidad de estos. Los ácidos también ocasionan la muerte del haba evitando su germinación.

Los cambios en el cotiledón ocurren en dos fases que van de acuerdo con la ausencia y presencia de oxígeno:

**Fase anaerobia - hidrolítica:** Dado que las condiciones al principio son en ausencia de oxígeno los cotiledones están en medio anaerobio y las reacciones hidrolíticas toman lugar, lo cual es manifestado por la absorción de agua y por la difusión de polifenoles (Shwan *et al.* 1995).

En esta fase ocurren la hidrólisis de proteínas en aminoácidos y péptidos y estos son componentes involucrados en la formación de sabor.

**Fase aerobia - oxidativa:** Una vez que la fase anaerobia de fermentación ha finalizado el oxígeno penetra en el tejido y causa reacciones de oxidación, la formación de quinonas es la primera etapa en la oxidación de polifenoles (Shwan *et al.* 1995). Esta fase inicia en esta parte de la fermentación y continúa durante el secado.

También Hashim *et al.* (1997) han encontrado que durante la fermentación de cacao existe formación de pirazinas, siendo éstas de gran importancia, debido a que las mismas representan el 40 % de los compuestos identificados en la fracción aromática del chocolate. También los azúcares reductores juegan un papel importante en el sabor.

## 2 - Aspectos de ingeniería de la fermentación en medio sólido (FMS).

### 2.1 Aspectos de la Fermentación en medio Sólido (FMS)

La Fermentación en medio sólido es un proceso microbiano que ocurre principalmente sobre la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad para absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles. (Viniegra, *et al.* 1997).

Una gran variedad de matrices sólidas o substratos pueden ser utilizadas en FMS y pueden existir diferentes clasificaciones sobre el tipo de materiales utilizados, pero en líneas generales existen tres grandes categorías:

- Materiales orgánicos, los cuales son moléculas poliméricas y solublemente limitadas o insolubles en agua. Las partículas de matriz sólida tienen dos funciones, proveer soporte y nutrientes al mismo tiempo. Ejemplos incluyen materiales de lignocelulosa y almidón tales como bagazo de caña, salvado de trigo, pulpa de café, o casi cualquier desecho agroindustrial, etc.
- Materiales minerales, tales como perlita, gránulos de arcilla, etc., en estos casos los materiales son solamente soportes y tienen que ser humedecidos con las soluciones nutritivas para el microorganismo.
- Materiales sintéticos, tales como poliuretano, esponjas, etc. Estos tienen que ser humedecidos con substratos líquidos para permitir el crecimiento de los microorganismos.

El trabajo de FMS en bioreactores distingue una gran variedad de diseños, sin embargo existen tres tipos básicos basados en regímenes de mezclado y aireación. Estos incluyen:

1. Bioreactores de bandeja, estos reactores son caracterizados por su simplicidad. No existe aeración forzada a través de la capa de substrato y generalmente no poseen mezclado mecánico.
2. Bioreactores agitados, estos incluyen reactores rotatorios, dentro de los cuales destacan los de tipo tambor giratorio con o sin baffles internos y mezclado.

3. Bioreactores de cama empacada, estos incluyen aeración forzada a través de la capa de sustrato. Existe una gran variedad de diseños de este tipo de bioreactores, aunque básicamente son columnas empacadas.

La regulación de temperatura se lleva a cabo a través de baños de agua o bien utilizando chaquetas con circulación de agua.

## **2.2 Variables que intervienen en la FMS.**

Los parámetros que intervienen en la FMS y que influyen directamente en la formación de biomasa o productos metabólicos son las condiciones de humedad del sustrato, la cantidad de inóculo, el control de pH, la agitación del sistema, la temperatura que se desarrolla en el fermentador, la formación de productos metabólicos, condiciones de aireación, espacios vacíos en el soporte, etc, todos estos aspectos contribuyen en cierta medida a generar resistencias de transporte con las reacciones bioquímicas que tienen lugar en este tipo de fermentación (Gowthaman *et al.*, 1993; Ghildyal *et al.*, 1994). Un punto importante en las reacciones de FMS es que el crecimiento de bacterias y levaduras se desarrolla por adhesión a las superficies de las partículas de sustrato, mientras que los hongos filamentosos son capaces de penetrar profundamente en el sustrato y consumir los nutrientes.

### **2.2.1 Efecto de la humedad.**

La humedad es un parámetro de suma importancia en FMS, debido a que la proporción de la misma en el sustrato influye directamente en el crecimiento del microorganismo. La humedad depende del sustrato, del tipo de producto final y del requerimiento del agua por el microorganismo. Un alto contenido de humedad resulta en decremento de la porosidad, una menor difusión de oxígeno y reducción en el volumen de gas principalmente (Lonsane, *et al.* 1985). Bajos niveles de humedad conducen principalmente a bajos niveles de crecimiento.

La humedad presenta cambios durante la fermentación principalmente por la evaporación y la actividad metabólica.

### **2.2.2 Efecto del pH.**

El pH tiene una gran influencia sobre el desarrollo de microorganismos, principalmente sobre su capacidad de crecimiento, debido a que ciertas especies se desarrollan estrictamente a ciertos rangos de pH, por lo que es necesario mantener condiciones de regulación.

### **2.2.3 Efecto de agitación**

La agitación en medio sólido representa cambios positivos en la fermentación (Lonsane, *et al.* 1985), proporcionando homogeneidad, evitando la formación de agregados, promoviendo el crecimiento sobre partículas individuales, aumentando la transferencia de gas y facilitando el intercambio de calor. La velocidad de agitación o rotación estará determinada por los factores de requerimiento de aeración del sistema.

### **2.2.4 Efecto de gradientes de temperatura**

La temperatura es uno de los principales factores asociados que se presentan en la FMS; una gran cantidad de calor es involucrado en este proceso, el cual está directamente asociado a la actividad metabólica de los microorganismos. Es función de la profundidad en los reactores de cama empacada. (Saucedo *et al.*, 1990, Ghildyal *et al.*, 1994, Lonsane *et al.*, 1985). La liberación de calor no es fácilmente disipada en los equipos de fermentación debido principalmente a la pobre conductividad térmica de los sustratos. Con el progreso de la fermentación la cama suele sufrir encogimientos y paralelamente disminuyen los espacios huecos, con lo cual se desarrollan gradientes de temperatura en los mismos, ocasionando zonas de alta y baja temperatura a través de todo el lecho. La temperatura del sustrato es un parámetro muy crítico dado que afecta notablemente a la actividad microbiana, por lo cual es necesaria la remoción de este calor por métodos convectivos principalmente, los cuales sin embargo pueden ocasionar otros problemas, entre los que se puede destacar el secado del sustrato o el arrastre del microorganismo si no se controlan adecuadamente los flujos, entre otros. El principal impacto de la temperatura en FMS es la pobre germinación de esporas, crecimiento, formación de productos y esporulación en general.

### **2.2.5 Efectos de gradientes de concentración en la fase gaseosa**

La transferencia de masa juega un papel preponderante en cualquier proceso ya sea químico o bioquímico, particularmente en la FMS trabajos realizados en bioreactores de bandejas indican la generación de gradientes de concentración gaseosos dentro de la cama del substrato, debido a la resistencia de transferencia de masa, los cuales afectan la buena operación de un bioreactor (Ghildyal., *et al.* 1993). Para la eliminación de estos gradientes convencionalmente se han utilizado reactores de columnas empacadas con aireación forzada. En los procesos de fermentación los componentes gaseosos de interés son el dióxido de carbono y oxígeno. La transferencia de oxígeno se encuentra limitada principalmente por la película de líquido que esta alrededor del substrato sólido.

### **2.3 Modelamiento de las cinéticas microbianas.**

Un factor de suma importancia en los procesos biológicos es conocer las diferentes tasas de reacción con las cuales el organismo consume substrato y produce componentes de interés. La información que se aporta al tener las herramientas cinéticas, es imprescindible para un buen diseño de los reactores y constituyen el primer paso para llevar a cabo el modelamiento de cualquier proceso que involucre una reacción, bien sea microbiana, enzimática o química.

Las fermentaciones pueden dividirse en dos grandes grupos (Levenspiel., *et al.* 1997), aquellas que son promovidas o catalizadas por microorganismo o microbios (levaduras, bacterias, algas, mohos, protozoos) y las catalizadas por enzimas (productos químicos producidos por microorganismos). En general este tipo de reacciones se pueden ver bajo el esquema del consumo de una sustancia orgánica para fines de obtener productos por la actividad de microorganismos o enzimas. La gran diferencia que se presenta entre este tipo de reacciones es que los microorganismos se autorreproducen y las enzimas no, es decir los primeros juegan el papel de un reactante con autoreproducción y las segundas estrictamente el papel de catalizador de la reacción.

De esta manera el sistema de representación de microorganismos se puede esquematizar de manera general como:

(alimentación orgánica)+microorganismos→(Productos químicos)+(microorganismos)

Ec. 2.1

(alimentación orgánica)  $\xrightarrow{\text{Microorganismos}}$  (Productos)+(microorganismos)

Ec. 2.2

Para la acción de enzimas como catalizador el esquema queda representado de la siguiente manera:

(alimentación orgánica)  $\xrightarrow{\text{Enzimas}}$  (Productos)

Ec. 2.3

En todos los bioprocesos, la biomasa constituye un parámetro fundamental en la caracterización del crecimiento microbiano. Los bioprocesos pueden ser divididos en dos tipos: el primero tiene como objetivo la obtención de biomasa y el segundo tipo involucra la producción de metabolitos (primarios o secundarios).

En el primer caso, la biomasa es el principal objetivo en la FMS, y en el segundo caso la producción metabólica es muy frecuentemente correlacionada y es proporcional a la cantidad de biomasa.

El crecimiento microbiano es caracterizado por un incremento en la masa y el número celular, esta rapidez estará caracterizada por las propiedades físicas y químicas del medio.

En los sistemas biológicos existen diferentes expresiones que se emplean para el modelamiento de la cinética microbiana. La expresión más comúnmente utilizada para describir el comportamiento de crecimiento microbiano es la ecuación de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

Ec. 2.4

donde  $\mu$  y  $\mu_{\max}$  son tasas de crecimiento específico,  $K_s$  es una constante de saturación, y  $S$  es la concentración del sustrato.

Otras relaciones que expresan la tasa de crecimiento han sido propuestas con la finalidad de obtener mejores comparaciones con los datos experimentales. Por ejemplo:

Tessier

$$\mu = \mu_{max}(1 - e^{-s/K_s})$$

Ec. 2.5

Moser

$$\mu = \mu_{max}(1 - K_s S^{-\lambda})^{-1}$$

Ec. 2.6

Contois

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{B_x + S}$$

Ec. 2.7

Las primeras dos expresiones dan como resultado expresiones algebraicas más complicadas que el modelo de Monod. La ecuación de Contois contiene aparentemente una constante de Michaelis la cual es proporcional a la concentración de biomasa  $X$ .

Así también la tasa de crecimiento específico puede ser inhibida por los constituyentes del medio tales como sustrato o producto. La fermentación alcohólica provee un ejemplo excelente de inhibición de producto: la fermentación anaerobia de glucosa por levaduras ha sido tratada por Aiba, Shoda, y Nagatna con funciones de crecimiento específico del tipo:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K + S} \frac{K_p}{K_p + P}$$

Ec.2.8

Esto es posible dado que dos o más sustratos pueden simultáneamente ser limitantes al crecimiento.

La aplicación de estas relaciones contempla la cuantificación de biomasa en cualquier sistema, sin embargo existen procesos en los cuales medir este parámetro es muy difícil, por ejemplo el uso de soportes sólidos heterogéneos hace difícil la medición debido a las interferencias del sustrato con análisis químicos actuales y la dificultad en separar la biomasa de la estructura granular o fibrosa del sustrato sólido; otro ejemplo se da en bioreactores que funcionan en línea. Esto no es un caso nuevo, existen ecuaciones modelo que se emplean para estimar las velocidades de sustrato o producto sin contemplar la estimación de biomasa, para este fin, una de las más importantes es el

modelo de curva logística de Gompertz (Ec.2.9) o bien Bovee *et al* (1984), proponen una relación cinética empleada para el control de un reactor biológico en línea. (Ec.2.10).

$$\frac{dP}{dt} = KP \ln(P_{\max}/P)$$

Ec.2.9

Donde: P = producto, K = constante y P<sub>max</sub> es el máximo de concentración de producto.

$$\frac{dS}{dt} = kS^{\alpha}P^{\beta}$$

Ec.2.10

Donde: S = sustrato, K = constante, P = Producto,  $\alpha$  y  $\beta$  son ordenes de reacción promedios.

## 2.4 Modelamiento Matemático

En este apartado se definirán algunos conceptos básicos con el fin de ubicar más ampliamente el contexto bajo el cual se trabajará.

De entre las varias definiciones clásicas que definen el concepto de un modelo matemático se recurrirá básicamente:

**Un modelo es la cuantificación de un proceso físico para predecir su comportamiento o más precisamente es un sistema de ecuaciones cuya solución, dado los datos específicos de entrada, es representativa de la respuesta del proceso a un conjunto correspondiente de entradas, donde el proceso también puede ser biológico, social, etc.(Denn *et al.*, 1986)**

Los científicos e ingenieros emplean tres metodologías para obtener las ecuaciones para un modelo matemático, estas son categorizadas como:

1.- Fundamental: Emplea la teoría aceptada de la ciencia fundamental para derivar ecuaciones. En este caso, la teoría que nosotros aceptamos sobre nuestros axiomas en los procesos lógicos de construcción de modelos.

2.- Empírico: Utiliza observación directa para desarrollar ecuaciones que describen los experimentos.

3.- Analógico: Utiliza ecuaciones que describen el comportamiento de un sistema por analogía, con variables identificadas por analogía sobre una base.

En el modelamiento de sistemas físicos siempre se requiere la aplicación de uno o más de los principios de conservación: conservación de masa, de momentum y de energía. La especificación de estas cantidades en cualquier tiempo y posición contendrá toda la información que nosotros requeriremos para estudiar en cualquier aspecto el comportamiento de un proceso. Estas cantidades y sus equivalentes en procesos no físicos reciben el nombre de variables dependientes fundamentales.

Las variables medibles que caracterizan las cantidades fundamentales y las ecuaciones modelo son denominadas variables dependientes características, tales como temperatura, presión, volumen, etc.

La formulación de un modelo matemático debe contemplar los siguientes pasos (Luyben *et al.* 1973)

- 1) Descripción de las bases del modelo. Es el comienzo de cualquier esquema de trabajo, se analiza el sistema y se definen las variables tanto físicas, químicas o biológicas.
- 2) Proposición de hipótesis de trabajo. Se pretende siempre establecer modelos que sean representativos del sistema con el cual se trabaja y de acuerdo a los resultados experimentales. Además con frecuencia se introducen variables adimensionales que tienen un claro significado físico, útil en la comparación del problema y su solución, bien numérica o mejor aún analítica..
- 3) Análisis de consistencia del modelo. Es conveniente que de acuerdo al número de variables se tenga el mismo número de ecuaciones.
- 4) Solución de las ecuaciones modelo. Las ecuaciones propuestas pueden tener soluciones analíticas o numéricas dependiendo del grado de complejidad del sistema.

5) Verificación. Este punto trata de confrontar los datos calculados con el modelo propuesto con los resultados experimentales y discernir la confiabilidad.

### 3 - JUSTIFICACIÓN.

El cacao (*Theobroma cacao L*) es un producto de origen mexicano que ha sido objeto de diversos estudios, la mayoría encaminado al mejoramiento de las plantas en cuanto a resistencia a plagas y condiciones agronómicas, así como también al de los procesos de fermentación y secado que adecuan al cacao para estar disponible como materia prima de calidad para la elaboración de polvo de cacao, pasta, chocolate y derivados. Sin embargo, a pesar de todos los estudios realizados aun quedan interrogantes por resolver, dado que muchas de las propiedades de cacao varían de acuerdo a la situación geográfica del país productor, dentro de las cuales se encuentran microorganismos involucrados, cantidad (concentración) de sustrato, parámetros de la fermentación (remoción, duración, etc.), cuestiones que influirán en la calidad del mismo.

De la literatura consultada, se ha podido comprobar que los estudios realizados en cuanto a la formación de productos principales durante la fermentación, son tratados de manera descriptiva prácticamente y ninguno tiene un tratamiento matemático.

La finalidad del presente trabajo es plantear cinéticas de formación de los productos principales y consumo de sustrato apoyado en experimentación cuyo beneficio será obtener estimaciones del comportamiento de proceso. De esta forma poder proponer un modelo del sistema de fermentación y estimar ordenes de magnitud de las variables involucradas. Esta información será un apoyo para trabajos posteriores con lo cual se podría simular y diseñar un fermentador con las condiciones de operación adecuadas cuya finalidad será un mejor tratamiento de las semillas de cacao, durante la fases de fermentación.

## **4 - OBJETIVOS.**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL.**

Contribución a la caracterización microbiana, bioquímica y cinética de la fermentación tradicional del cacao en el estado de Tabasco.

### **4.2 OBJETIVOS**

\* Estudiar el comportamiento a nivel grupo de los principales microorganismos involucrados (levaduras y bacterias) en la formación de metabolitos principales durante la fermentación tradicional de cacao.

\* Analizar los perfiles de consumo de sustrato y formación de productos.

\* Proponer, verificar y validar ecuaciones para las cinéticas de consumo de sustrato y formación de productos principales durante la fermentación de cacao.

## 5 Materiales y Métodos

### 5.1 Análisis microbiológico.

#### 5.1.1 Toma de muestras.

Las muestras para análisis microbiológicos y físicoquímicos fueron tomadas de una caja de fermentación cuya capacidad es de aproximadamente de 1 tonelada y dimensiones de 1 m<sup>3</sup> en una beneficiadora del municipio de Jalpa de Mendez, Tabasco. El muestreo fue llevado a cabo en el centro de la caja coleccionando aproximadamente 600 g de materia y almacenadas en hielo para preservación mientras se sembraban en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Villahermosa (ITVH). Las muestras posteriormente fueron congeladas para análisis físicoquímicos.

La caja tuvo remoción a partir de las 24 horas por intercambio de una caja hacia otra, así consecutivamente cada día hasta el final de la fermentación.

#### 5.1.2 Tratamiento de las muestras para siembra microbiológica.

Se toman 10 g aproximadamente de muestra y se diluyen en 90 ml de solución de agua destilada con Tween 80 (1 ml de Tween/lit), esta solución se licúa durante 1 minuto.

A partir de esta solución madre se realizan diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ , sembrándose 20  $\mu$ l por triplicado de cada dilución en tres medios de cultivo selectivos diferentes por cada tiempo de muestreo. A cada tiempo correspondía el empleo de 18 cajas de Petri, sembrándose en cada caja cuatro puntos de dilución.

Los medios empleados son:

1. PBA medio propuesto para el crecimiento de bacterias acéticas
2. MRS para el desarrollo de bacterias lácticas
3. PCA para el conteo total de microorganismos

Se esterilizó todo el material empleado para la siembra. La siembra se llevó a cabo en un cuarto especial que contaba con luz ultravioleta previamente encendida antes de llevar a cabo cualquier manipulación en el mismo.

Las cajas se llevaron a incubación a 30°C durante 24 horas para su posterior conteo. Durante los primeros dos días de muestreo las cajas Petri fueron incubadas anaeróbicamente y posteriormente aeróbicamente de acuerdo a las etapas biológicas que se llevan a cabo en la fermentación de cacao. En la fig. 5.1. se muestra un diagrama que muestra las operaciones que se llevaron a cabo.

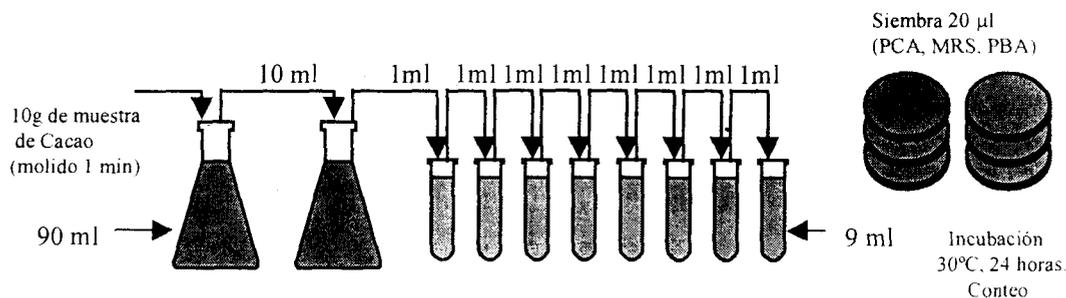


Fig. 5.1 Diagrama de preparación de muestra para siembra microbiológica.

La siembra en cajas se llevó a cabo por puntos de acuerdo a la técnica de Gaimé - Perraud (1995).

Se toma una solución madre, la cual se realiza moliendo 10 g de muestra y licuado durante 1 minuto. Posteriormente se realizan diluciones a partir de la solución madre hasta  $10^{-8}$ . En la figura 5.2 se aprecia la forma de siembra.

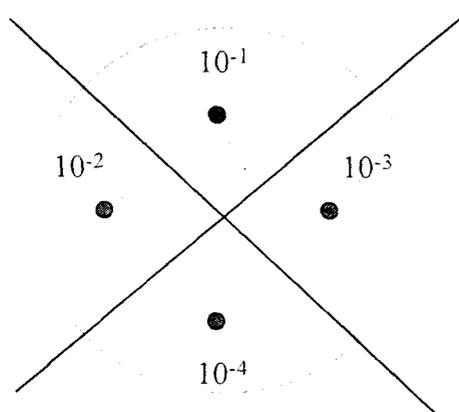


Fig. 5.2 Distribución de la siembra puntual en una caja petri.

### 5.1.3 Medios de cultivo

Los medios empleados para el conteo total microbiano son dos específicos y uno standard. A continuación se detalla la preparación de cada uno de ellos.

Para el crecimiento en medio de lactobacillii MRS se empleó el siguiente medio (DIFCO) cuya composición se señala en la tabla 5.1

Tabla 5.1 Componentes que constituyen el medio MRS

Peptona proteasa	10.00 g
Extracto de carne	10.00 g
Extracto de levadura	5.00 g
Dextrosa	20.00 g
Tween 80	1.00 g
Citrato de amonio	2.00 g
Acetato de Sodio	5.00 g
Sulfato de Magnesio	0.10 g
Sulfato de Manganeso	0.05 g
Fosfato de dipotasio	2.00 g
Agar Bacteriológico	15.00 g
Agua destilada	1000 ml

Para el crecimiento de bacterias acéticas se preparo el siguiente medio cuyó constituyentes se presentan en la tabla 5.2

Tabla 5.2 Componentes que constituyen el medio para crecimiento de Bacterias Acéticas.

Glucosa	3.00 g
Agar bacteriológico	15.00 g
Carbonato de Calcio	10.00 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Alcohol de caña 96°	17.50 ml
Extracto de levadura	10.00 g
Agua destilada	1000 ml

El medio para la cuenta total de microorganismos es indicado en la tabla 5.3

Tabla 5.3 Componentes que constituyen el medio para el crecimiento de microorganismos totales.

Peptona de caseína	5.00 g
Extracto de levadura	2.50 g
Dextrosa	1.00 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 ml

Se pesan y se mezclan todos los componentes y se diluyen en agua destilada e inmediatamente se calientan hasta alcanzar la ebullición, posteriormente se esterilizan en una autoclave, alcanzando una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Una excepción en el tratamiento es con el medio para bacterias acéticas (PBA), para el cual se mezclan todos los componentes excepto el carbonato de calcio y alcohol, la mezcla sin estos componentes se hace ebullicir y posteriormente se coloca a esterilizar también, al igual que el carbonato del calcio; antes de sembrar se mezclan en la campana de flujo laminar y se agrega el alcohol con una pipeta estéril.

## 5.2 Determinación de variación de peso durante el proceso de fermentación tradicional de cacao.

Se emplearon cajas de madera de dimensiones de 50 cm<sup>3</sup> con una cantidad aproximada de 80 kg de cacao fresco, dichas cajas tienen perforación en la parte inferior de la misma para el libre drenado del jugo de cacao que se presenta durante la fermentación.

A partir del primer día se efectúa la remoción de la misma por intercambio de la masa de una caja hacia otra, así sucesivamente durante todo el proceso, también a partir del primer día se cubre la caja completamente hasta el final de la fermentación.

La variación de peso para cuantificar pérdida por jugo y por evaporación fue registrada con una balanza digital con capacidad de 100 kg.

### 5.3 Análisis fisicoquímicos.

#### 5.3.1 Medición de temperatura.

A la caja de fermentación se le acoplan termopares (HANNA INSTRUMENTS, HI 91610C, Thermo-Higrometer) en la parte centro de la caja a la periferia para cuantificar los gradientes de temperatura, así como también a tres diferentes posiciones en altura de la caja.

#### 5.3.2 Humedad

Se toman 10 g aproximadamente de muestra por día y se depositan en charolas de aluminio previamente a peso constante y taradas y se colocan en una estufa a una temperatura de 100°C. Los resultados se reportan como contenido de humedad del proceso.

#### 5.3.3 Determinación de pH

Para mucílago, se tomaron aproximadamente 10 gr de muestra y se diluyeron a 40 ml de agua destilada y se agitó durante 20 minutos y se realizó la medición en un Conductronic pH 20.

Para cotiledón y producto completo se procedió de forma similar que para mucílago a excepción de la agitación, dado que estos fueron molidos en una licuadora cuantificando directamente el pH.

#### 5.3.4 Análisis de azúcares y ácidos orgánicos

Los azúcares presentes y ácidos orgánicos fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En la tabla 5.4 se dan las especificaciones y condiciones del HPLC.

Tabla 5.4 Condiciones de operación del HPLC

Columna	OOH-0138-KO
Forma iónica	Hidrogeno
Dimensiones STD:	300*8.7 mm

Matriz	Estirendivinilbencenosulfonato
"Cross linking"	8%
Tamaño de partícula	8 $\mu$
Presión típica (psi)	350
Presión máxima (psi)	600
Tasa de flujo máxima (ml/min)	0.6
Temp. Máxima (°C)	65
Fase móvil típica (ácido sulfúrico)	0.005 M
Rango de pH	1-3
Eficiencia mínima (p/m)	50,000 (Acido Acético)

Se inyectaron muestras de concentración conocida de los componentes de interés (glucosa, fructosa, etanol, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico y butírico; todos ellos grado reactivo analítico) para comparar las áreas de los picos de las mismas con las de las muestras y así determinar la concentración desconocida.

El volumen de inyección es de 20  $\mu$ l al HPLC y los tiempos de retención se dan a continuación en la tabla 5.5:

Tabla 5.5 Tiempo de retención característicos de los componentes de interés en el HPLC

Compuesto	Tiempo de Retención (minutos)
Glucosa	11.6
Fructosa	12.3
Etanol	24.5
Acido láctico	16.3
Acido acético	18.6
Acido propiónico	22.2
Acido butírico	28.0

### 5.3.5 Tratamiento de la muestra para su inyección al HPLC

Se toman 10 gramos aproximadamente de muestra y se diluyen en 40 ml de fase móvil, se pasó a filtrar en una bomba de vacío con un filtro Whatman No. 41, posteriormente

la muestra colectada se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante es decantado y es pasado a través de un filtro de 0.20  $\mu\text{m}$  para su inyección al HPLC. (Figura 5.4)



Fig. 5.4 Diagrama esquemático donde se muestran las operaciones para HPLC

Es importante expresar que las muestras contemplan tres casos: Producto completo (donde se contempla mucílago, cáscara y cotiledón), mucílago + cascara y cotiledón. La figura 5.5 muestra más detalles sobre la metodología empleando un diagrama de bloques para mostrar los tratamientos.

### 5.3.6 Medidas adicionales.

Durante la preparación de las muestras para HPLC, se estimó la densidad del producto completo a partir del peso del mismo y el desplazamiento que sufría cierta cantidad de agua depositada en una probeta bajo su peso y mediante la relación masa/volumen se llevo a cabo el cálculo.

A partir de un procedimiento análogo al descrito se estimó la densidad de empaque del producto completo, depositándose cacao en una probeta de 500 ml hasta esta capacidad y mediante la relación masa/volumen se estimó la misma.

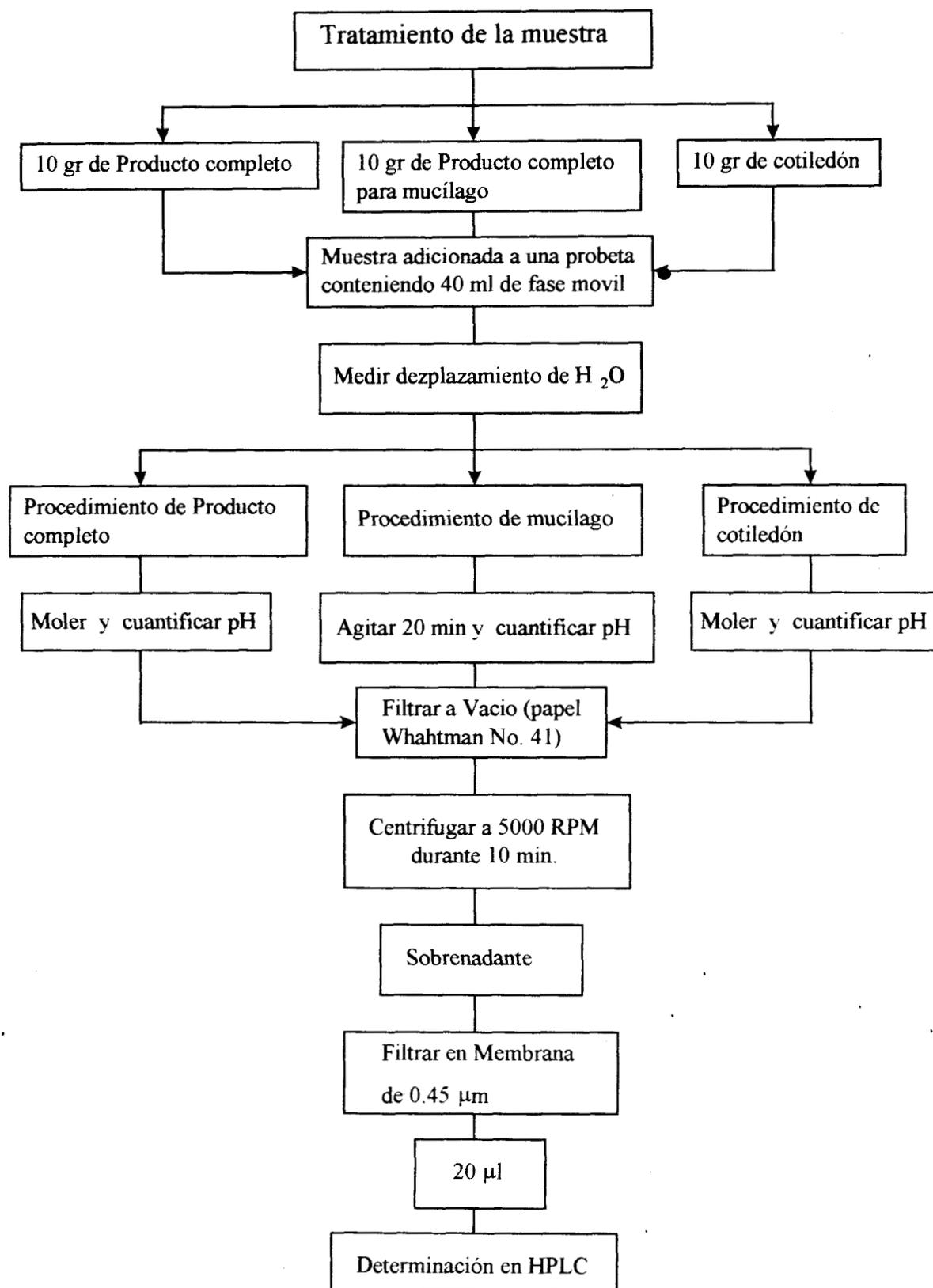


Fig. 5.5 Diagrama esquemático de la preparación de muestras para análisis en HPLC.

## **6 - Análisis microbiológico, bioquímico y fisicoquímico de las diferentes etapas de la fermentación del cacao.**

En el presente capítulo se presenta el análisis y discusión de los resultados experimentales comparando con los datos bibliográficos generados por diversos investigadores a través de los últimos años. Los análisis generados se reportan considerando al cacao conformado de tres partes fundamentales:

- Producto completo (mucílago + cáscara + cotiledón)
- Mucílago (también denominado pulpa, la cual se encuentra envolviendo al grano completamente y separada del cotiledón por la cáscara)
- Cotiledón (la cual constituye la parte elemental del cacao para elaboración de chocolate).

También se presentan análisis realizados en dos fechas distantes. Noviembre de 1999 y Enero del 2000 presentando diferencia en cuanto a intervalos de mezclado. Para noviembre el intervalo de remoción se llevo cada tercer día y para enero cada día. En ambas fechas las cajas fueron cubiertas a partir del primer día.

### **6.1 Descripción del método de fermentación de cacao tradicional.**

El proceso de fermentación de cacao en México es llevado a cabo en cooperativas del estado, denominadas Beneficiadoras las cuales se encuentran localizadas en el estado de Tabasco principalmente y en una proporción menor en el estado de Chiapas. Para el estudio a realizar se contó con la colaboración de la beneficiadora de San Juanito No. 1 en el municipio de Jalpa de Méndez, Tabasco.

El sistema de fermentación es llevado a cabo en cajas de madera con una capacidad aproximada de 1 m<sup>3</sup>, estas cajas tienen perforaciones en el fondo de las mismas, cuya finalidad es el libre drenado del jugo de cacao que se produce durante las primeras 48 horas. (Figuras 6.1 y 6.2).

Se puede observar en la fig. 6.1 se muestran las cajas con manchas blancas, estas sin embargo no constituyen telarañas o mugre de algún tipo, estas manchas son residuos de

mucilago que escurre durante la etapa de anerobiosis y con ello asegura un inculo permanente para las nuevas cargas que se adicionaran a las cajas.



Fig. 6.1 Cajas de madera donde es depositado el cacao, se puede observar las condiciones bajo las cuales se encuentran las cajas, así como la distribución.

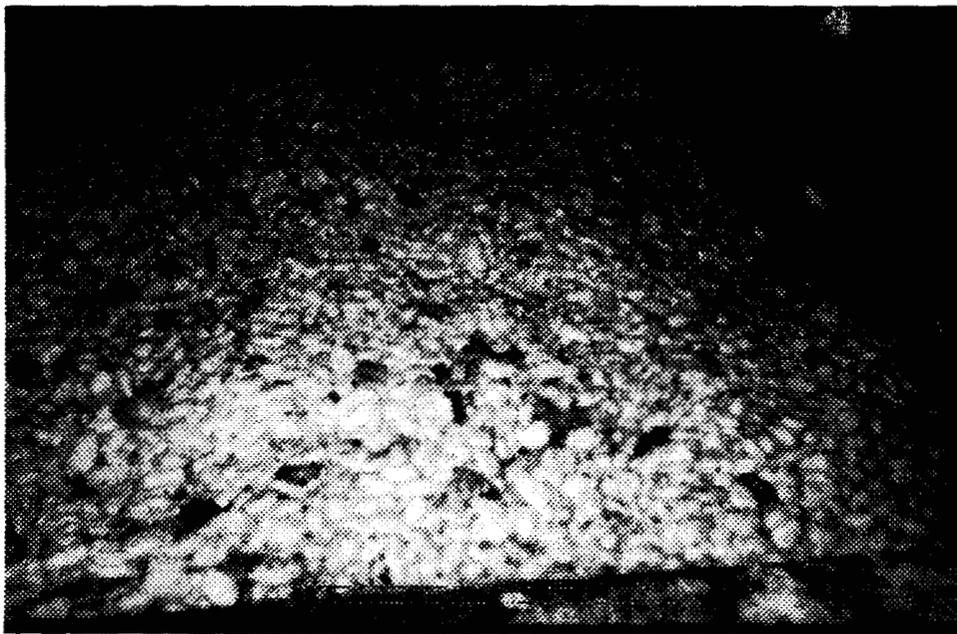


Fig. 6.2 Aspecto del cacao al principio de la fermentación. se puede observar granos que pertenecen a diversas especies (forastero. criollo).

El proceso tradicional toma entre 7 u 8 días de fermentación, cuyo fin esta determinado por la experiencia de las personas que laboran en las beneficiadoras. El cacao es depositado por lotes, directamente a las cajas, cubriéndolas completamente (Fig. 6.3).

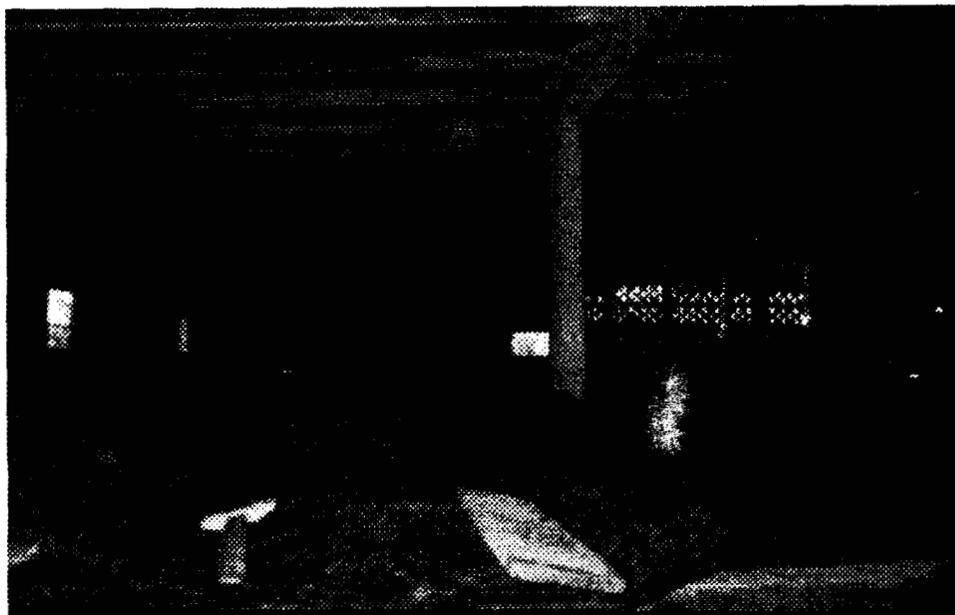


Fig. 6.3 Cajas de cacao cubiertas con bolsas en la beneficiadora No. 1 (Jalpa de Mendez)

El cacao no sufre ninguna alteración durante las primeras 24 horas de fermentación en la caja, ni con mezclado, ni adición de algún inóculo, el proceso es tradicional completamente, la contaminación microbiana esta asociada directamente con el rompimiento de las mazorcas por la manipulación con cuchillos, las propias manos de los trabajadores y por el medio ambiente en general, además que las cajas de madera se encuentran inoculadas con los microorganismos por el uso continuo.

A partir de las 24 horas el cacao es removido de una caja hacia otra colocadas estratégicamente para este fin (Fig. 6.4) una vez terminada esta operación es cubierta con costales de henequén o con bolsas nuevamente, esta secuencia es llevada a cabo hasta el final de la fermentación.



Fig. 6.4 En esta imagen se puede apreciar las cajas vacías hacia las cuales se cambia el cacao como método de remoción del mismo.

Durante el proceso de fermentación se observan las siguientes características considerando a la caja como un reactor biológico:

1. Existe una variedad de grupos microbianos compitiendo entre sí
2. Se presentan dos fases biológicas: anaerobia y aerobia respectivamente
3. El volumen de la masa a fermentar varía durante la fermentación
4. El sistema es por lotes con mezclado intermitente
5. Es un sistema no isotérmico presentándose fluctuaciones de temperatura a través del tiempo durante el proceso de fermentación
6. Existe transferencia de masa y calor con los alrededores
7. El proceso es un sistema heterogéneo completamente

De acuerdo a las características que se mencionaron arriba se aprecia la complejidad del sistema para realizar un modelo matemático que simule el proceso, involucrando todos los efectos, de aquí que al obtener una cinética que permita describir el comportamiento cinético se obtiene un avance eficaz.

A continuación se muestra la figura 6.5 que describe las zonas de reacción que se llevan a cabo durante la fermentación tradicional de cacao.

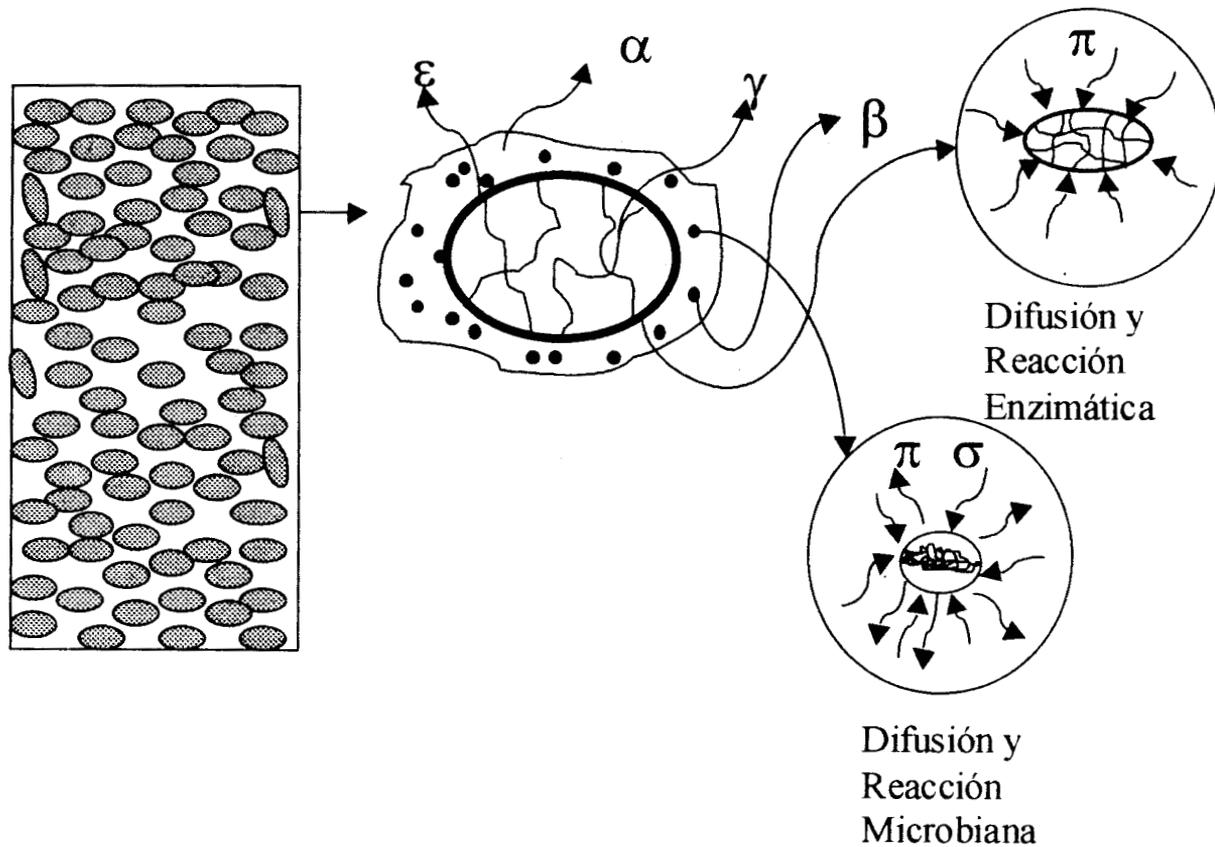


Fig. 6.5 Esquema de difusión y reacción en la fermentación de cacao

La figura 6.5 nos muestra un esquema donde las letras griegas tienen el siguiente significado:

$\alpha + \beta + \gamma + \epsilon$  = Producto completo

$\alpha$  = mucilago

$\beta$  = microorganismo

$\gamma$  = cotiledón

$\epsilon$  = cáscara

$\pi$  = productos metabólicos

$\sigma$  = sustrato

El proceso descrito en la Fig. 6.5 es bastante complejo y en el se trata de describir el sistema de reacción y difusión que se lleva a cabo durante la fermentación, influenciado por las fases biológicas que lo constituyen.

El sistema difusión - reacción se presenta teniendo como punto de apoyo un diagrama que describe a la caja de fermentación (Fig. 6.5), de la cual se extrae un elemento de volumen, donde se muestra al producto completo constituido por diferentes componentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ), de este elemento surgen dos subelementos para describir como se llevan a cabo la difusión y reacción (microbiana o enzimática) y su localización principal. En el esquema superior derecho se muestran como emigran los metabolitos ( $\pi$ ) hacia el interior del cotiledón incidiendo sobre la cáscara y desestabilizando su estructura celular, debido a las condiciones de temperatura y acidez que surgen durante la fermentación. El esquema inferior derecho muestra como se difunde el sustrato ( $\sigma$ ) hacia el interior de un microorganismo y como éste segrega a los metabolitos ( $\pi$ ).

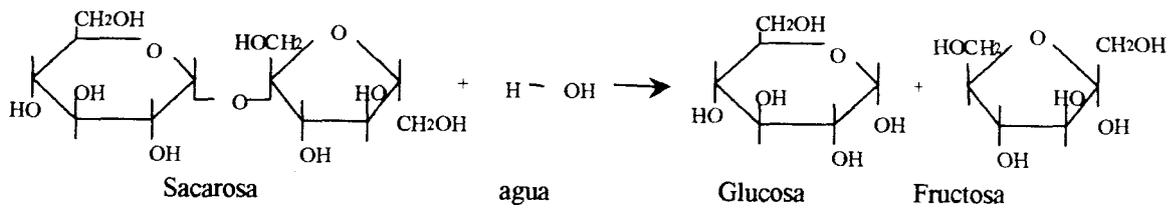
El diagrama mostrado arriba solo es un intento de ubicar las fases donde se lleva a cabo cada proceso, sin embargo para una mayor precisión se tendrían que realizar esquemas de acuerdo a las fases biológicas.

## 6.2 Cinética de la fermentación de cacao.

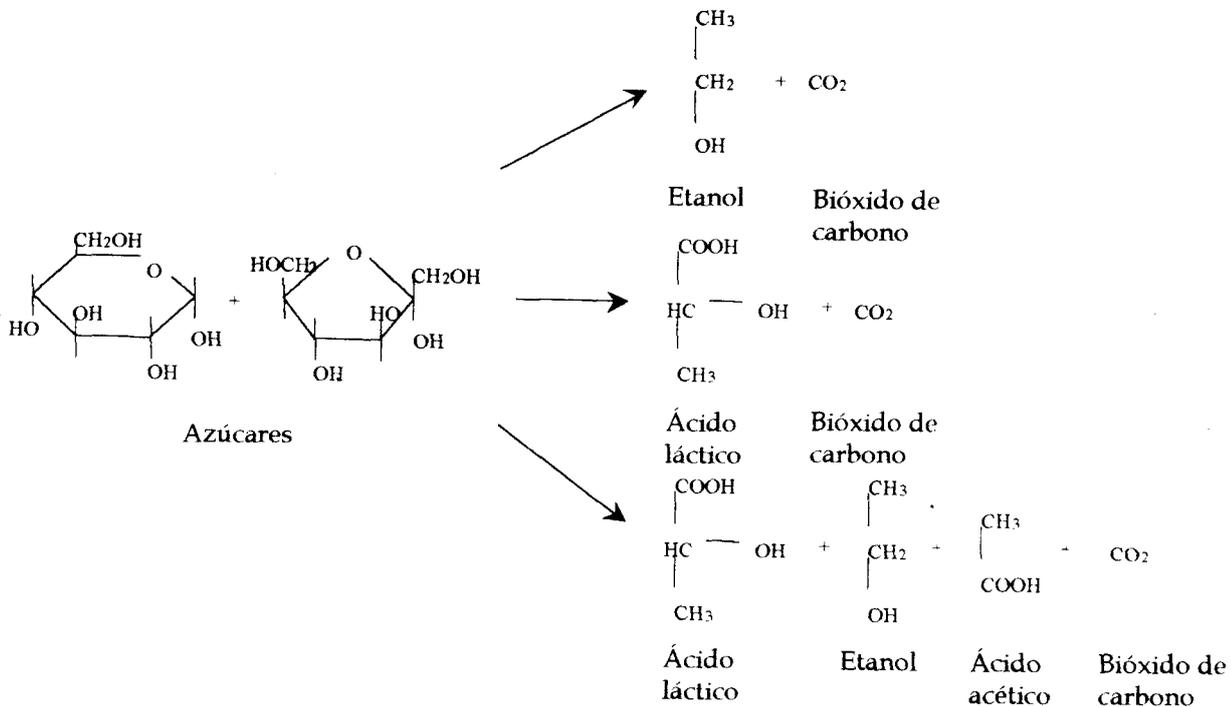
Durante el desarrollo de la fermentación de cacao, la actividad microbiana es bastante extensa, surgen diferentes tipo de reacciones, que conllevan a una gama de metabolitos importantes que influyen de manera determinante en la calidad del grano. Dentro del conjunto de microorganismos endógenos que participan en la fermentación, se ha caracterizado (Rombouts 1952, Maravalhas 1966, Ostovar and Keeney 1973, Carr 1979, Passos 1984, Schwan et al., 1986, Schwan et al., 1995) una sucesión clara y específica a las condiciones que se desarrollan en este proceso ya discutida en la revisión bibliográfica del presente trabajo, sin embargo en este punto se da una breve descripción enfocándose hacia la cinética microbiana.

Durante el periodo de anaerobiosis existen dos grupos dominantes: las levaduras y las bacterias lácticas, cuya actividad se presenta paralelamente degradando azúcares y

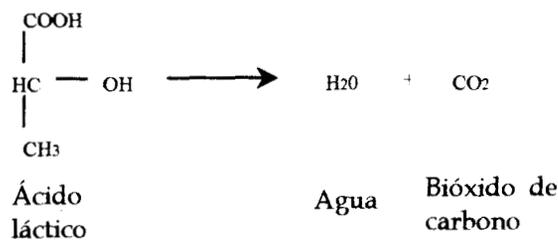
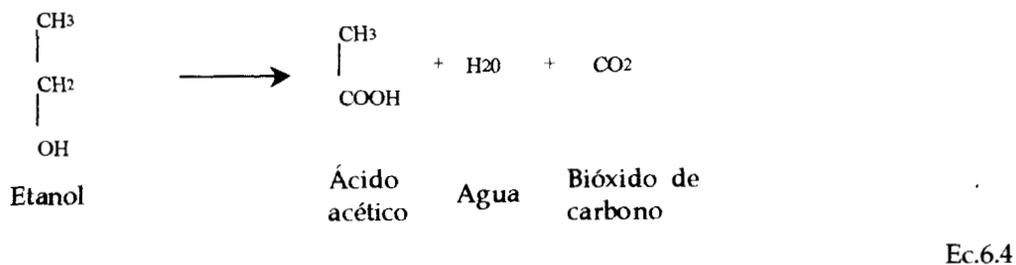
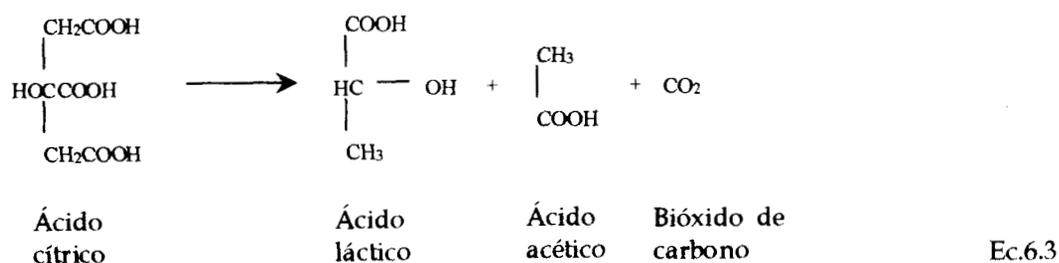
produciendo etanol y ácido láctico respectivamente. Sin embargo, debido a que se presentan diferentes géneros de especies, estos grupos laboran siguiendo rutas metabolitas diferentes, por ejemplo, existen dos grupos de lactobacilos: los homolácticos y heterolácticos, y es un hecho que estos actúan bajo acción de dos rutas: Embder-Meyerhoff y la hexosa monofosfato respectivamente, por lo que su producción no esta orientada hacia un compuesto en común, produciendo algunos intermediarios, además algunos géneros que degradan ácido cítrico contribuyen con otros componentes al sistema. Sobre la base del anterior ejemplo se establece el esquema del conjunto de reacciones de mayor importancia microbiana, las cuales tienen como punto de inicio el consumo de azúcares, hasta la formación de ácido acético como principal producto final de la fermentación de cacao.



Ec. 6.1



Ec. 6.2



Como se puede observar en la secuencia de reacciones 6.1-6.5 es bastante compleja y consecuentemente su medición y cuantificación lo es mucho más.

Bajo la situación expuesta, se contempla una serie de oraciones que describen puntos de importancia:

1 - El planteamiento anterior comprende a los grupos microbianos que se encuentran en mayor proporción en un periodo de fermentación de 6-7 días, posterior a estos pueden surgir otros componentes por la presencia de otras entidades microbianas.

2 - Solamente en la secuencia de reacción se contempla la actividad microbiana y no se hace énfasis en ningún tipo de reacción enzimática, las cuales tienen una repercusión muy fuerte en los componentes de sabor, sin embargo la actividad enzimática es una función dependiente de la actividad microbiana y sus productos, dado que estas

predisponen las condiciones óptimas de trabajo de las enzimas (condiciones de acidez y temperatura principalmente).

3 - En el estudio realizado se cuantifica a los componentes en mayor proporción, no determinándose gases (CO<sub>2</sub> y otros componentes volátiles) que participan durante la fermentación, debido a las condiciones de operación.

4 - No es posible cuantificar la biomasa debido al mismo medio y se optó por estimar UFC las cuales son una guía para establecer ordenes de magnitud de los grupos participantes en la fermentación, aunque estos no se verán involucrados en la secuencia cinética propuesta.

### 6.3 Comportamiento de la humedad a través del tiempo de fermentación.

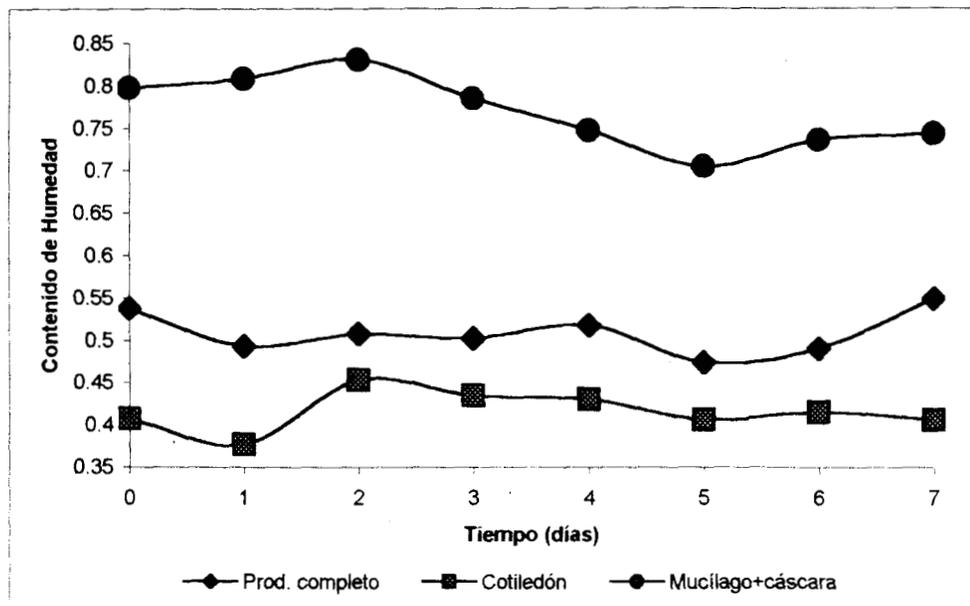


Fig. 6.6 Comportamiento de contenido de humedad (base húmeda) durante la fermentación.

En la figura 6.6 se muestra el perfil de la humedad, reportada en producto completo, mucilago + cáscara y cotiledón. El contenido de humedad en el mucilago + cáscara es prácticamente el doble que en el producto completo y en el cotiledón. Esto no es de sorprender dado que el mucilago contiene alrededor de 80 - 85 % de agua en su composición (Pettipher et al. 1986). El cotiledón es el que muestra perfiles de humedad

más bajos y muestra un perfil de aumento ligero alcanzando su máximo al segundo día y posteriormente un descenso paulatino, este comportamiento coincide paralelamente con el descenso de la humedad en el mucílago + cáscara, sin embargo ésta es mucho más apreciable que en los otros casos presentados dado que principalmente existe migración de gran parte de sustancias líquidas por lixiviado de jugo a través del tiempo y evaporación por las altas temperaturas que se desarrollan, aspecto que se tratará más adelante, los últimos puntos son bastantes dudosos dado que muestran una tendencia al incremento.

## 6.4 Efecto de las condiciones climáticas en la evolución de la microflora, consumo de azúcares y formación de productos.

### 6.4.1 Evolución de la microflora

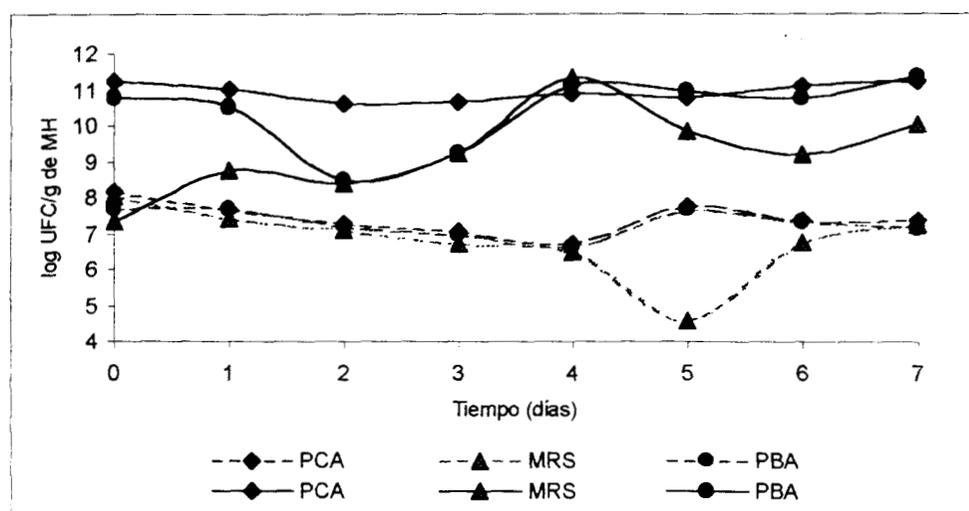


Fig. 6.7 Perfiles de comportamiento de microorganismos en los medios de siembras en noviembre (línea discontinua) y enero (línea continua)

En la figura 6.7 se presenta los perfiles de evolución de los microorganismos entre dos siembras en temporadas diferentes correspondientes a noviembre y enero. Se puede observar claramente que los ordenes de magnitud en unidades formadoras de colonia (UFC) varían apreciablemente entre una temporada y otra, esta variación repercute en el proceso de fermentación debido a que al haber mayor concentración de organismos las tasas de reacción reflejarán comportamientos distintos.

Además cabe enfatizar que las condiciones en noviembre las condiciones de mezclado del cacao son diferentes a las de enero.

En noviembre se maneja el removido de caja cada tercer día, y en enero se mantiene el primer día sin cambio, a partir de los subsecuentes se remueve cada día consecutivamente hasta el final de la fermentación. Esto repercute fuertemente en definir las etapas de anaerobiosis y aerobiosis respectivamente, de tal manera que la primera de las mencionadas puede mantenerse más tiempo en noviembre dado que el nivel de aeración de la masa fermentativa es mucho menor que en enero donde esta etapa se acorta; esta situación influye determinantemente en el proceso, dado que puede desplazar la formación de los productos de fermentación.

En la figura 6.7 también se observa el crecimiento de lactobacilos y grupos de bacterias acéticas, los cuales muestran tendencias uniformes de crecimiento, esto es bastante raro, dado que los grupos de lactobacilos deberían disminuir de acuerdo a la literatura, sin embargo es importante mencionar que el medio MRS se mantuvo dos días en condiciones anaerobias y posteriormente a ello se manipuló aeróbiamente, esto da hincapié para que diferentes grupos de bacilos se presenten dentro de este medio e influyan e interfieran en la magnitud correspondiente, sin embargo, se trabajó de esta manera de acuerdo al proceso de fermentación. Esto implica que el nivel de bacilos es fuerte por lo que debería hacerse un estudio más profundo redefiniendo condiciones de trabajo experimental.

Al igual que el caso del medio MRS, para el medio PBA se presenta diferencia en los ordenes de magnitud desde el inicio de la fermentación, situación que no es muy confiable, porque estos grupos comienzan a crecer paulatinamente, por lo que ello implica que el medio puede no ser lo selectivo que se buscaba y otros grupos microbianos estén creciendo en el mismo.

Un punto también de gran relevancia a comentar en el presente estudio fueron las condiciones de lluvia que agobiaron al estado de Tabasco, las cuales fueron muy intensas provocando inundaciones en muchas áreas de producción, provocando disminución de la producción e induciendo condiciones de excesiva humedad, además probablemente de inducir la proliferación de una mayor cantidad de microorganismos, estas lluvias

comenzaron en los meses de agosto, septiembre y octubre, por lo que los análisis mostrados en noviembre pueden ser un reflejo de las condiciones pluviales.

En las figuras 6.8 - 6.10 se muestra la comparación de los perfiles de productos contra la evolución de la microflora en los datos de enero, los cuales muestran una correlación apreciable entre los medios específicos y los productos. Esto es sumamente interesante desde el punto de vista microbiológico dado que se muestran tendencias claras de crecimiento microbiano asociado a la formación de producto principales lo que da hincapié a establecer que bajo condiciones de buen removido se pueden obtener correlaciones muy buenas.

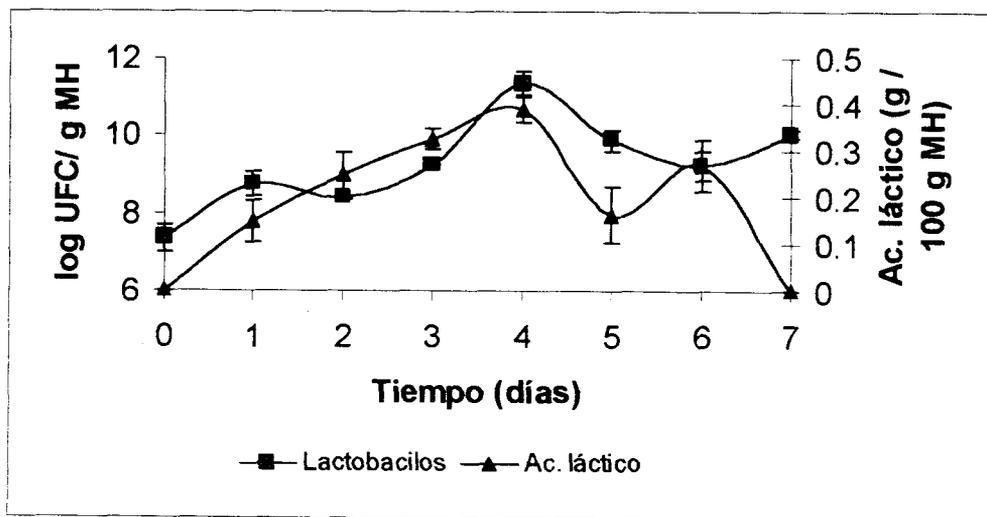


Fig. 6.8 Comportamiento de lactobacilos contra la producción de ácido láctico

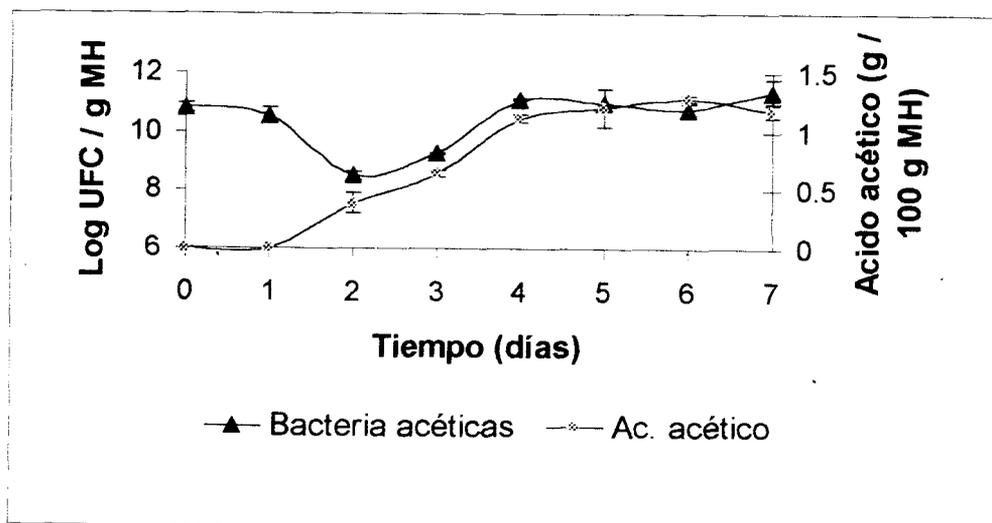


Fig. 6.9 Comportamiento de bacterias acéticas contra la producción de ácido acético

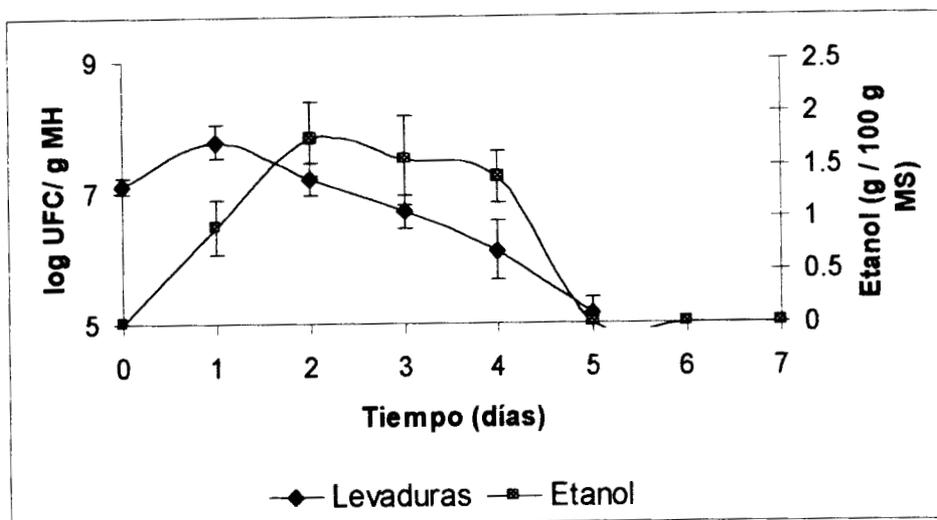


Fig. 6.10 Comportamiento de levaduras contra producción de etanol.

#### 6.4.2 Consumo de azúcares

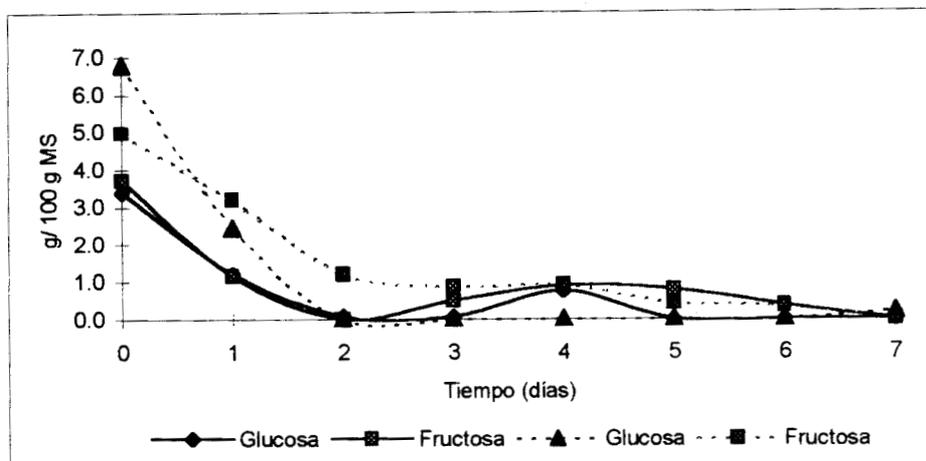


Fig. 6.11 Comportamiento de los perfiles de azúcares estudiados en noviembre (línea discontinua) y enero (línea continua)

En la figura 6.11 se muestra el comportamiento de la fructosa y glucosa como azúcares asimilables por los microorganismos y cuya degradación es el primer paso en la fermentación de cacao.

Nótese que al igual que en las UFC los niveles de azúcares se encuentran en mayor proporción en noviembre que en enero, lo que podría compensar en un momento dado el nivel de concentración de microorganismos entre temporadas.

### 6.4.3 Formación de productos

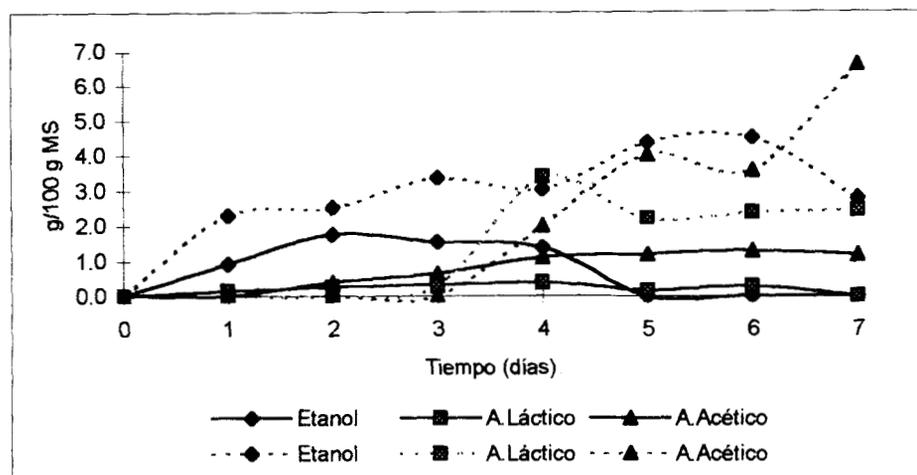


Fig. 6.12 Productos principales durante la fermentación. noviembre (línea discontinua), enero (línea continua)

La figura 6.12 nos muestra la formación de los distintos componentes evaluados en este trabajo, encontrándose fuertes diferencias en cuanto a perfiles, esto puede estar asociado a un factor importante, que es el nivel de aireación de las cajas de fermentación, dado que la mayores diferencias se observan en la fase aerobia para la degradación de etanol y láctico por acción de bacterias acéticas y otros organismos presentes en la fermentación como bacilos. Esta aireación es proporcionada en la beneficiadoras por remover la masa fermentativa de una caja hacia otra, si esta remoción no es adecuada y continua, a los mismos intervalos de tiempo, se encuentran casos como el que se muestra en la figura que se discute.

### 6.5 Variación de los constituyentes de estudio para los diferentes productos del cacao: Producto completo, Mucílago + Cáscara y Cotiledón

En las figuras que se presentarán a continuación se contempla la evolución del sustrato y productos en diferentes constituyentes que conforman al cacao. Al referirnos a azúcar estamos contemplando la suma de glucosa y fructosa.

En la figura 6.13 se presenta la evolución en producto completo tanto de sustrato (azúcar) como de productos, los perfiles muestran tendencias acordes al comportamiento

reportado en literatura (Scwan *et al* 1995), ahora bien, existe degradación del sustrato por dos grupos microbianos para la formación simultanea de ácido láctico y etanol, además que los tiempos de la fase anaerobia reportado fluctúan entre 24 y 36 horas.

Al final de las 48 horas se tiene el pico máximo de etanol por producción, sin embargo la aparición del ácido acético se presenta desde el primer día, sin embargo esto puede estar asociado a ciertos grupos de lactobacilos que degradan sustrato, formando una fracción de acético (por ruta hexosa monofosfato), al igual otros géneros de la mismas especies pueden degradar ácido cítrico y producirlo también, asociado a este grupo específico existe la formación de ácido acético en gran proporción por bacterias acéticas, las cuales se mantienen hasta el final de la fermentación.

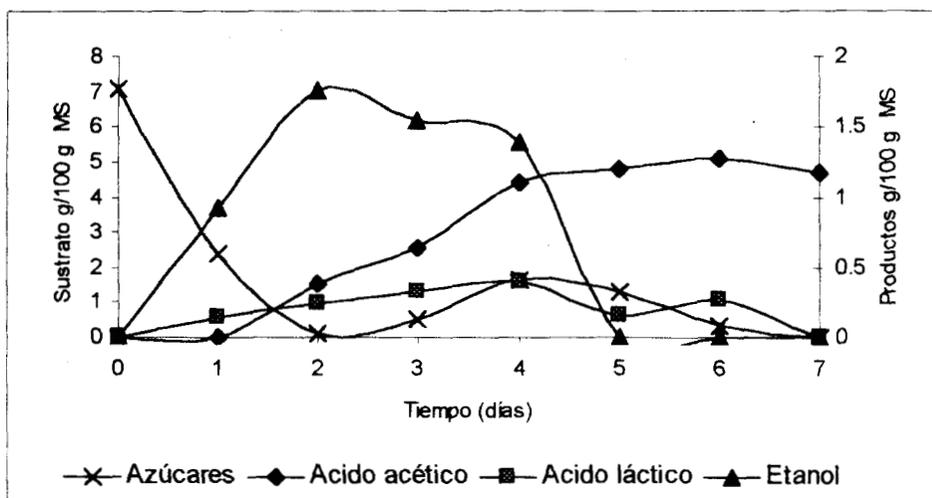


Fig. 6.13 Evolución del sustrato y formación de productos en producto completo

Una vez que la población de levaduras ha disminuido por cambios de temperatura principalmente, los azúcares surgen nuevamente al día tres por hidrólisis de sacarosa, tal y como se observa en la figura 6.13 y desaparecen casi al final de la fermentación de acuerdo a lo reportado por Hashim and co. *et al.*(1998).

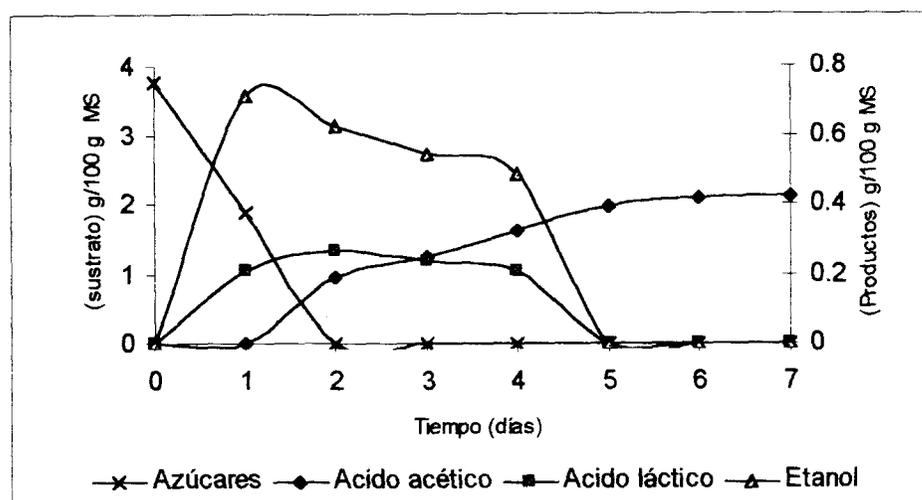


Fig. 6.14 Evolución del sustrato y formación de productos en el mucílago + cáscara.

En la figura 6.14 se presenta el comportamiento en mucílago + cáscara donde se lleva a cabo enteramente el proceso de actividad microbiana, se nota en esta figura a diferencia de las Figs. 6.13 y 6.15 que los azúcares se consumen en los primeros dos días y no se encuentra presencia de ellos en lo sucesivo de la fermentación, es decir que la hidrólisis se puede llevar a cabo enteramente en el cotiledón, recordemos que la figura 6.8 nos mostraba la suma de todos los constituyentes del cacao, en la figura que se presentará más adelante se confirmará esta afirmación. Los perfiles de los demás componentes presentan comportamientos análogos a los del producto completo, presentándose sin embargo perfiles mucho más definidos, en cuanto a que no se presentan cambios bruscos en la tendencia.

En la figura 6.15 se observan nuevamente los perfiles ya definidos en las anteriores gráficas, sin embargo es muy importante este gráfico dado que se confirma la presencia de hidrólisis de azúcares con una mayor incidencia que en producto completo, con lo que se corrobora que la presencia de hidrólisis de sacarosa se lleva enteramente en el cotiledón. En cuanto a los demás componentes, los perfiles tienen el mismo comportamiento, encontrándose el máximo de etanol al día dos al igual que en producto completo a diferencia del mucílago que se presentan a tiempo uno, y de igual manera desplazándose el tiempo de aparición de ácido láctico y acético, esto es bastante

comprensible, dado que la presencia de ellos se debe exclusivamente al proceso de difusión, debido a que en esta parte de estudio no existe reacción.

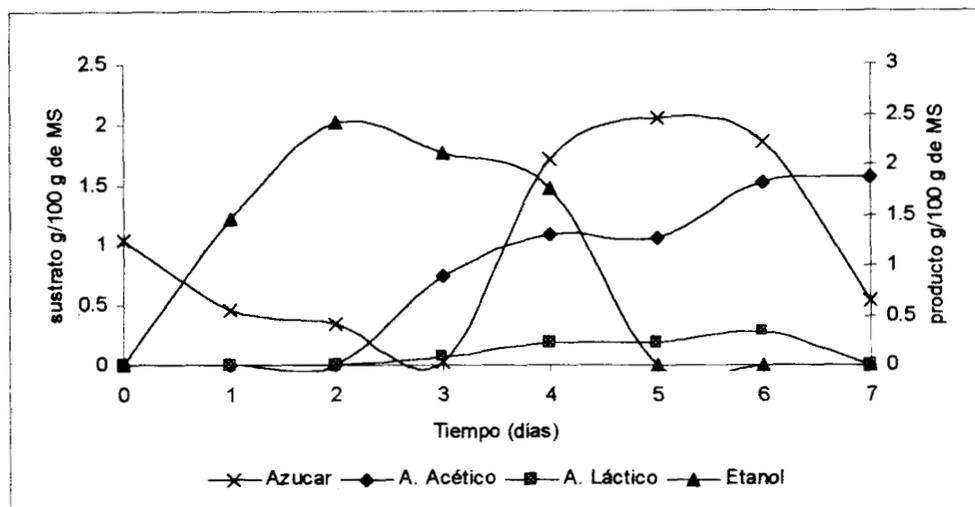


Fig. 6.15 Evolución del sustrato y productos en el cotiledón

## 6.6 Comportamiento del pH a través de la fermentación.

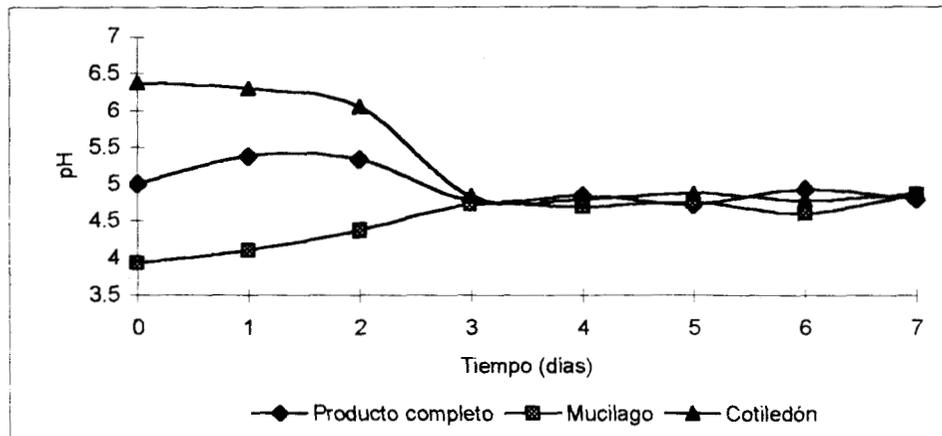


Fig. 6.16 Comparación del perfil de evolución del pH a través del tiempo en la fermentación tradicional de cacao en la beneficiadora No. 1 en Jalpa de Méndez, Estado de Tabasco.

En la figura 6.16 se presenta el comportamiento del pH durante la fermentación y se hace una comparación de la evolución del mismo entre el mucílago y el cotiledón, así como también considerando el producto completo (donde están en conjunto cotiledón y mucílago). Como se puede apreciar al principio el pH difiere ampliamente entre el

cotiledón y mucilago, pero a medida que transcurre el proceso los perfiles terminan igualándose al final de la fermentación.

Este comportamiento es análogo al reportado en la bibliografía, al principio el mucílago se encuentra muy ácido dada la presencia de ácido cítrico y conforme transcurre el tiempo de fermentación se incrementa, esto es debido a la degradación del mismo, así como también a la pérdida del mismo a través del lixiviado o jugo de cacao, además de la migración de productos por difusión hacia el cotiledón, lo que ocasiona que el pH en el mismo se reduzca y al final de la fermentación se encuentren a pH análogos.

Cabe mencionar que al final de la fermentación el mucílago se ha degradado en un gran porcentaje y con ello logrando satisfactoriamente uno de los puntos de la fermentación. Existen diferencias en la acidez del cacao en diferentes países productores (Jinap, S. and Dimick, P.S. *et al.* 1990), por ejemplo, en Brasil y Malasia los granos son considerados bastantes ácidos, comparados con los de América del Sur y Centro América, esta diferencia esta asociada a las concentraciones de ácido acético y ácido láctico en forma combinada.

En la figura 6.17 se presenta el perfil de evolución de pH y de los principales productos durante la fermentación de cacao en el producto completo.

El perfil de pH coincide apreciablemente con la evolución de los productos, al principio existe un incremento correlacionado con el incremento en la formación de etanol y posteriormente disminuye a medida que se forman los ácidos.

La principal contribución a la disminución del pH debe estar asociada a la formación del ácido acético, debido a que este presenta mayores concentraciones (1.20 g/100 g) que el ácido láctico, además de acuerdo a Jinap y Dimick (*et al.* 1990) el principal responsable que reportan es el ácido acético dado que este representa el 95 - 98 % de los ácidos volátiles y la contribución de los demás componentes es mínima.

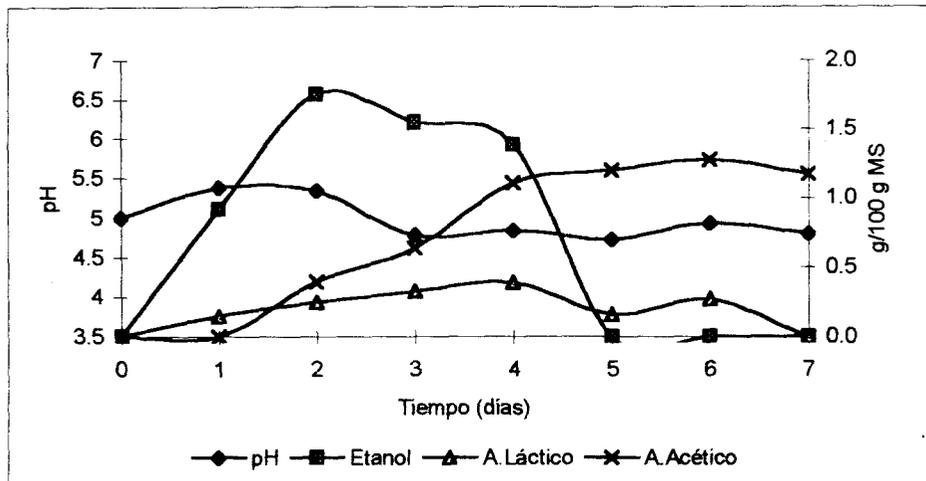


Fig. 6.17 Comparación de la evolución del perfil del pH Vs. Productos de fermentación en producto completo.

En la figura 6.18 se presentan los perfiles en el cotiledón el cual en un principio se presenta en condiciones de basicidad y progresivamente cambia estas condiciones ácidas completamente, esto es debido principalmente a la difusión de ácidos orgánicos tanto de láctico como de acético.

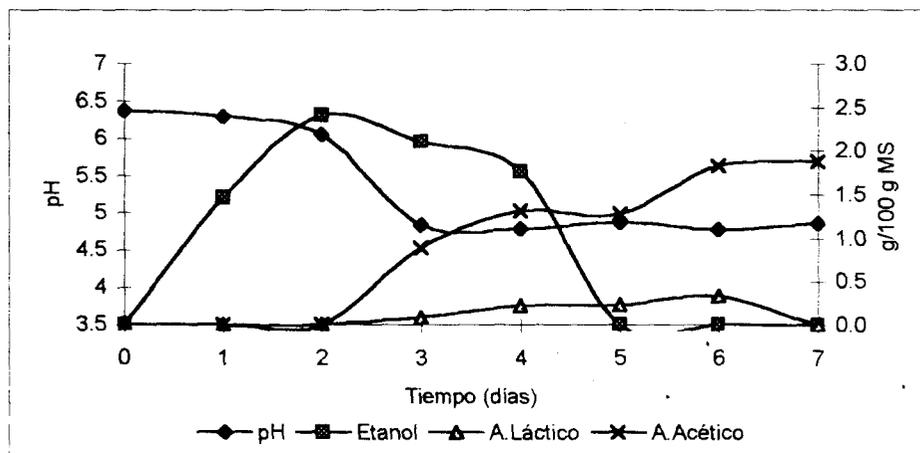


Fig. 6.18 Comparación de la evolución de los perfiles de pH y los principales productos durante la fermentación en cotiledón

El perfil del pH en el mucílago contrariamente a lo que se pensaría, las condiciones de acidez disminuyen ligeramente, pero nótese que la concentración de ácido láctico desaparece al quinto día y que las de ácido acético son muy bajas (.4 g/100 g), hecho que no favorece a crear condiciones de acidez.

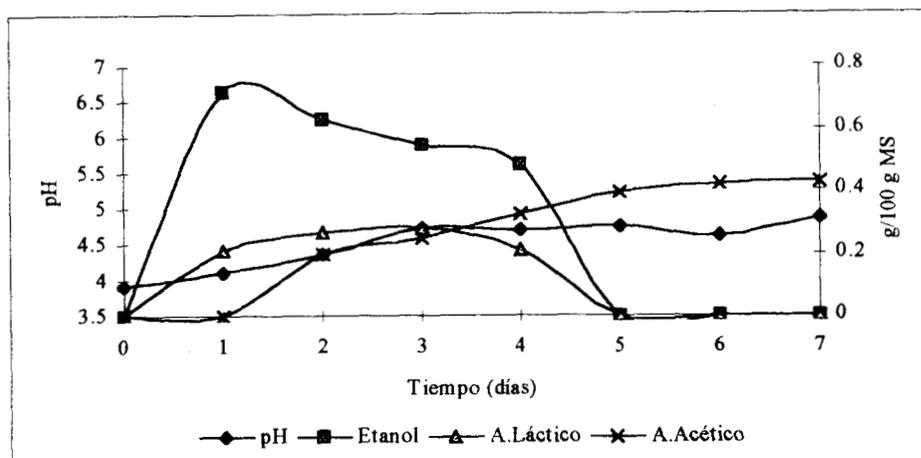


Fig. 6.19 Comparación de la evolución de los perfiles de pH y los principales productos durante la fermentación en mucílago. Etanol (◆), ácido láctico(■) y ácido acético(+)

### 6.7 Cantidad de materia eliminada por jugo y evaporación a través del tiempo de la fermentación.

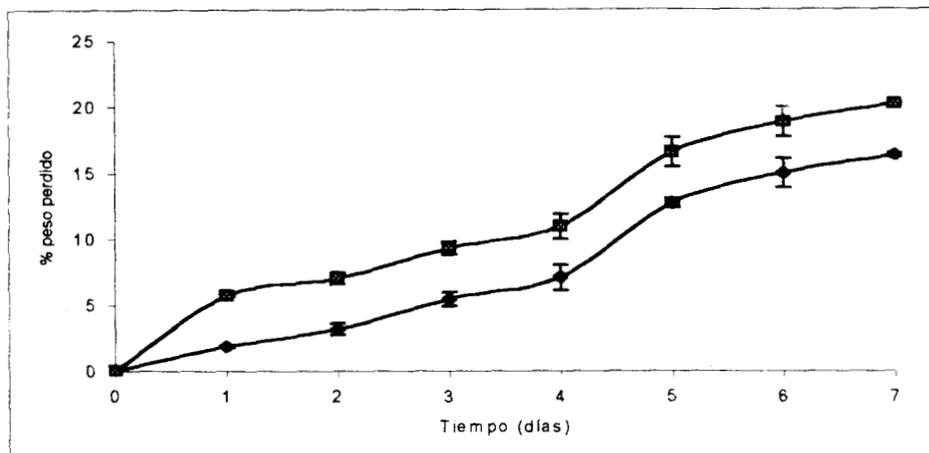


Fig. 6.20 Pérdida de masa de cacao por evaporación + jugo de cacao (■) y evaporación (◆) en porcentaje a través de la fermentación.

En la figura 6.20 se muestra el comportamiento que de la pérdida de materia a lo largo de la fermentación, esta cantidad es considerable y representa el 16.43 % aproximadamente por evaporación y considerando la pérdida por jugo de cacao que representa el 3.86 % se tiene un total de pérdida del 20.39 % en total al final, esta última cifra concuerda con la reportado por Barel (1985). Dado que los principales grupos microbianos son levaduras y bacterias lácticas y acéticas y de acuerdo a los estudios realizados estos siguen rutas metabólicas específicas de acuerdo a las condiciones bajo las cuales se desarrolla la

fermentación, el principal componente en la evaporación es CO<sub>2</sub> con cantidades pequeñas de etanol y ácidos volátiles. Sin embargo no se pudo cuantificar el porcentaje de ellos durante la fermentación. La fuerte reacciones exotérmicas que se llevan a cabo por la actividad microbiana de bacterias acéticas es uno de los factores para la evaporación, esto se verifica por el fuerte olor penetrante durante la fermentación. Esto no implica que sean cantidades considerables en la evaporación.

### 6.8 Perfiles de Temperatura a través del tiempo de fermentación

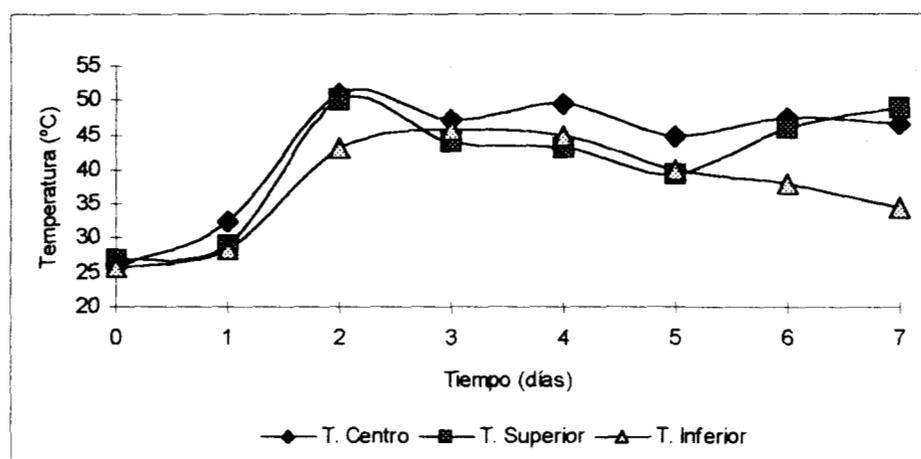


Fig. 6.21 En el presente se muestra los perfiles de temperatura durante la fermentación de Cacao. Temperatura en el centro de la caja. (◆) Temperatura en la parte superior de la caja. (■) Temperatura en la parte inferior de la caja (●).

Es bien caracterizado que en los procesos de fermentación sólida (Ghildyal et al. 1994) se presenten gradientes de temperatura dado la pobre conductividad térmica del substrato lo que no permite la disipación adecuada de calor, así el proceso de fermentación de cacao no es la excepción, dado que estamos tratando con cajas de madera como reactores biológicos y el mezclado no es perfecto se presentan variaciones de temperatura en todo el reactor.

En la Fig. 6.21 se nos muestran los perfiles de temperatura en tres posiciones diferentes del reactor, como se aprecia en la parte inferior de la caja donde se localizan las perforaciones para el libre drenado de jugo la temperatura por intercambio con la pared y aire libre es mucho menor que en el centro, la generación es mucho más intensa en la

parte central de la caja y hacia la periferia de la caja se tendrá un choque térmico más pronunciado, lo que provocara corrientes no uniformes a lo largo de todo el proceso.

Durante la primera etapa biológica de acuerdo a la ecs. 1.1 y 1.2 el calor de reacción es tenue y aumenta progresivamente al irse presentado la segunda etapa biológica, tal y como se observan los perfiles en la figura 6.21, al comienzo la temperatura oscila entre 25 y 27 grados y su elevación el primer día no es muy pronunciado, más sin embargo al segundo día se llegan a lo valores máximos conservándose oscilando dependiendo de la posición en la caja de fermentación, la mayor separación entre perfiles se nota entre la parte inferior y el centro y parte superior de la caja.

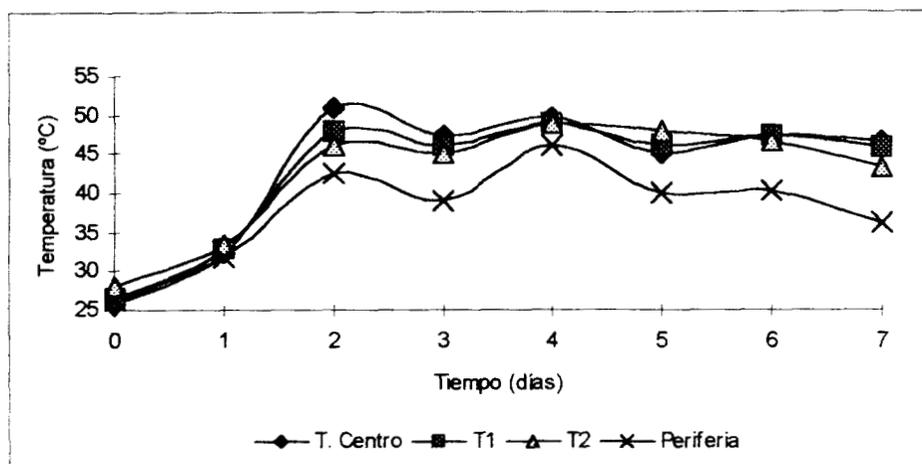


Fig. 6.22 En este gráfico se presentan los perfiles obtenidos del centro a la periferia cuantificándose cuatro lecturas. Temperatura en la parte centro de la caja (◆) Temp. Intermedia 1 (■) Temp. Intermedia 2 (●) Temperatura en la pared tomada a partir a la altura central de la caja (\*).

En las figuras 6.22 y 6.23 se muestran los gradientes que surgen a partir del centro a la periferia y como se puede observar en estos los cambio más rigurosos se observan en las paredes de las cajas, obviamente esto es debido al intercambio de calor con los alrededores, las diferencia más fuertes se observan en la parte inferior de la caja puesto que es esta área la cual se encuentra en más contacto con el aire circundante debido a las perforaciones que se ubican en esta región y que contribuyen a un mayor intercambio.

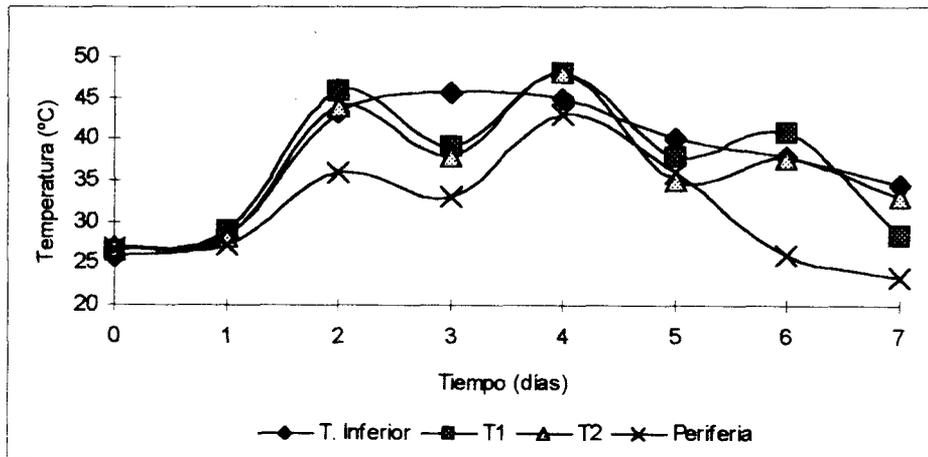
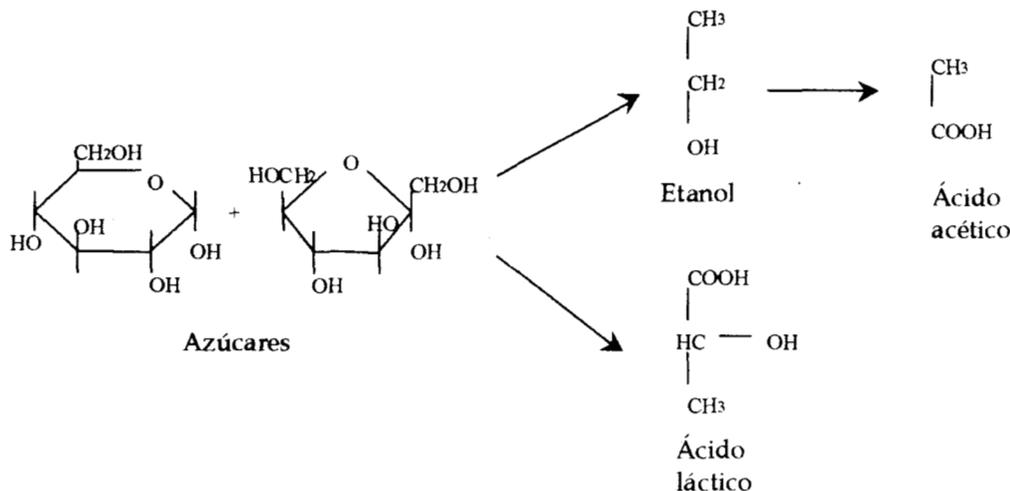


Fig. 6.23 En este gráfico se presentan los perfiles obtenidos de la parte centro inferior a la periferia cuantificándose nuevamente cuatro lecturas. Temperatura en la parte inferior de la caja tomada en el centro (◆) Temp. Intermedia 1 (■) Temp. Intermedia 2 (●) Temperatura en la pared tomada en la parte inferior de la caja (\*).

## 7 - Análisis de la cinética de consumo de sustrato y formación de productos durante la fermentación de cacao.

El análisis de la secuencia cinética propuesta en el capítulo 6 nos muestra la dificultad del sistema de estudio, debido a que el esquema cinético contempla una diversidad de reacciones que se presentan, sin embargo, es posible establecer un esquema cinético sencillo que pueda describirnos aceptablemente el proceso.

Una propuesta simplificada de acuerdo a nuestras posibilidades se establece a continuación, contemplando los principales componentes que influyen de manera determinante en la fermentación de cacao (Shawn *et al.* 1997):



Ec.7.1

Dentro de la secuencia cinética, los microorganismos se contemplan solamente como entidades catalíticas implícitas sin participar más allá en la reacción.

### 7.1 Expresiones cinéticas propuestas.

En este apartado abordaremos la propuesta de establecer una expresión matemática para la ecuación 7.1 de estudio. Es importante mencionar que todas las ecuaciones propuestas obedecen a un modelo no estructurado. Estas expresiones estarán de acuerdo a los datos experimentales para producto completo y mucílago, con la finalidad de establecer una comparación entre los parámetros cinéticos de un caso y otro.

Usualmente en el modelamiento de los procesos biológicos se toma en cuenta, el crecimiento celular y aun más, la tasa de crecimiento, para establecer expresiones cinéticas, las cuales comúnmente son función de la concentración del sustrato limitante, densidad celular o inhibición de producto (Bowie *et al.* 1984). En el presente trabajo se tratan ecuaciones cinéticas que nos relacionan sustrato y productos para la descripción de su evolución a través de la fermentación.

El panorama de reacción se presenta en dos fases, durante la anaerobia existe degradación de azúcares por dos entidades microbianas, el análisis de los mismos se enfoca a dos de ellos asimilables (glucosa y fructosa), entonces como estos azúcares son degradados simultáneamente se suman y se manejan en el modelo como un solo componente.

El perfil de etanol sufre dos cambios importantes, la producción a partir de la degradación del sustrato (azúcar) y el consumo del mismo a su vez para formación de ácido acético, presentándose dos cambios que siguen una cinética de orden cambiante. Del mismo modo para ácido láctico se presenta formación y consumo por lo que la propuesta de una ecuación debe contemplar ambos casos. Para el ácido acético solamente se presenta formación y no existe otro cambio aparente.

Los datos a manejar para obtener expresiones matemáticas serán obtenidos en enero 2000, para producto completo y mucílago, los cuales se muestran en capítulo 6.

Las expresiones para las tasas de reacción se realizarán sobre un balance de materia para un fermentador por lotes considerando un sistema:

1. Isotérmico, Isobárico e Isocórico.
2. Mezcla perfecta.
3. La actividad microbiana como entidades catalíticas sin participar en ellas.

$$\frac{d[\text{Azúcar}]}{dt} = \text{Consumo} = -(k_1 + k_2) * [\text{Azúcar}]$$

Ec. 7.2

$$\frac{d[\text{Etanol}]}{dt} = \text{Producción} - \text{Consumo} = k_1 * [\text{Azúcar}] - k_3 - k_4 * [\text{Etanol}]$$

Ec. 7.3

$$\frac{d[\text{Láctico}]}{dt} = \text{Producción} - \text{Consumo} = k_2 * [\text{Azúcar}] - k_5 - k_6 * [\text{Láctico}]$$

Ec. 7.4

$$\frac{d[\text{Acético}]}{dt} = \text{Producción} = k_7 * [\text{Etanol}]$$

Ec. 7.5

Las ecuaciones 7.2 -7.5 representan los cambios significativos que se presentan, desde un punto de vista clásico de la cinética química, es decir el consumo expresado en las ecuaciones 7.3 y 7.4 tiene en cuenta dos caminos de reacción competitivos y de diferentes ordenes (Levenspiel *et al.* 1997), sin embargo, la información que nos puede proporcionar desde el punto de vista de biología, es muy poco rigurosa, por lo que se decide emplear la ecuación de Michaelis - Menten, la cual nos representa también un cambio de orden de reacción, solamente que este cambio esta involucrado en una sola expresión; así los parámetros cinéticos involucrados en el consumo de etanol así como también del de ácido láctico ( $k_3$ ,  $k_4$ ,  $k_5$  y  $k_6$ ) serán sustituidos por las expresiones de  $V_{max}$  y  $K_m$ , las cuales son constantes con significado biológico en la expresión de Michaelis.

Para facilitar el manejo de las ecuaciones designaremos letras para los componentes con los que se trabajará: Azúcar (Ca), Etanol (Ce), A. láctico (Cl), A. acético (Cac). A continuación se presentarán las ecuaciones cinéticas propuestas con sus condiciones iniciales:

$$\frac{dCa}{dt} = -(k_1 + k_2) Ca$$

$$t = 0 \quad Ca = Ca_0$$

Ec. 7.6

$$\frac{dCe}{dt} = k_1 Ce - \frac{V_{max_e} Ce}{k_m + Ce}$$

$$t = 0 \quad Ce = Ce_0 = 0$$

Ec. 7.7

$$\frac{dCl}{dt} = k_2 Cl - \frac{V_{max_1} Cl}{k_{m_1} + Cl}$$

$$t = 0 \quad Cl = Cl_0 = 0$$

Ec. 7.8

$$\frac{dCac}{dt} = k_7 C_e^n$$

$$t = 0 \quad Cac = Cac_0$$

Ec. 7.9

Para el caso de la ecuación 7.9 se contemplaran dos casos, uno de primer orden y otro de segundo orden con el objetivo de contemplar el tiempo muerto que se presenta, es decir, dado que el acético se cuantifica a partir del primer día.

Para estimar los parámetros cinéticos del modelo se construye un algoritmo de programación, el cual incluye la programación acoplada de la solución simultánea de las ecuaciones 7.6-7.9.

## 7.2 Estrategia para la validación del modelo de expresiones cinéticas.

El proceso de simulación numérica se realizó empleando un programa escrito en lenguaje Matlab 5.31, donde se empleó un algoritmo de solución de ecuaciones diferenciales no lineales, las cuales surgen de las ecuaciones que describen las cinéticas de reacción, involucradas en el proceso de fermentación de cacao.

Los valores con los que se llevó al cabo la simulación son los obtenidos experimentalmente y que contempla las concentraciones de azúcar, etanol, ácido láctico y ácido acético, para producto completo y mucílago. (Tabla 7.1)

Tabla 7.1 Concentraciones iniciales (g/100 g MS) para simulación

Componentes (g / 100 g MS)	Azúcar	Amax	Etanol	Emax	Acido Láctico	Lmax	Acido acético	Ac.max
Producto completo.	7.0831	7.0831	0	1.755	0	0.3905	0	1.2783
Mucílago.	3.9218	3.9218	0	0.6278	0	0.2378	0	0.424

Parámetros ajustados. Los parámetros que se ajustaron para el modelo fueron las constantes cinéticas que están involucradas en las razones de velocidad de reacción y que constituyen 7 parámetros. Para lograr el ajuste, se llevaron a cabo simulaciones numéricas proporcionando valores iniciales de entrada para las constantes en un rango de 0.1-1 d<sup>-1</sup>.

Los datos proporcionados por las ecuaciones modelo de concentración fueron comparados con los datos experimentales, para cada una de las cinéticas realizadas, mediante una función de índice de desempeño (J), la cual se presenta a continuación:

$$J = \sum_{i=1}^N \left[ \left( \frac{A_{ical} - A_{iexp}}{A_{max}} \right)^2 + \left( \frac{E_{ical} - E_{iexp}}{E_{max}} \right)^2 + \left( \frac{L_{ical} - L_{iexp}}{L_{max}} \right)^2 + \left( \frac{Ac_{ical} - Ac_{iexp}}{Ac_{max}} \right)^2 \right]$$

Ec. 7.10

Los valores de A, E y L designan subsecuentemente azúcar, etanol y ácido láctico. Los subíndices cal y exp denotan en orden valores calculados por el modelo y valores experimentales, así también el subíndice max expresa el valor máximo experimental. Dentro de la función de desempeño no se contempla al ácido acético para evitar problemas de tiempos de convergencia por la adición de una variable más, y de esta manera contemplando solo el cálculo de 6 parámetros para la simulación. (apéndice 1)

Una descripción del algoritmo empleado para el programa se presenta en la figura 7:1 resaltando las principales operaciones que se llevan a cabo en el Software .

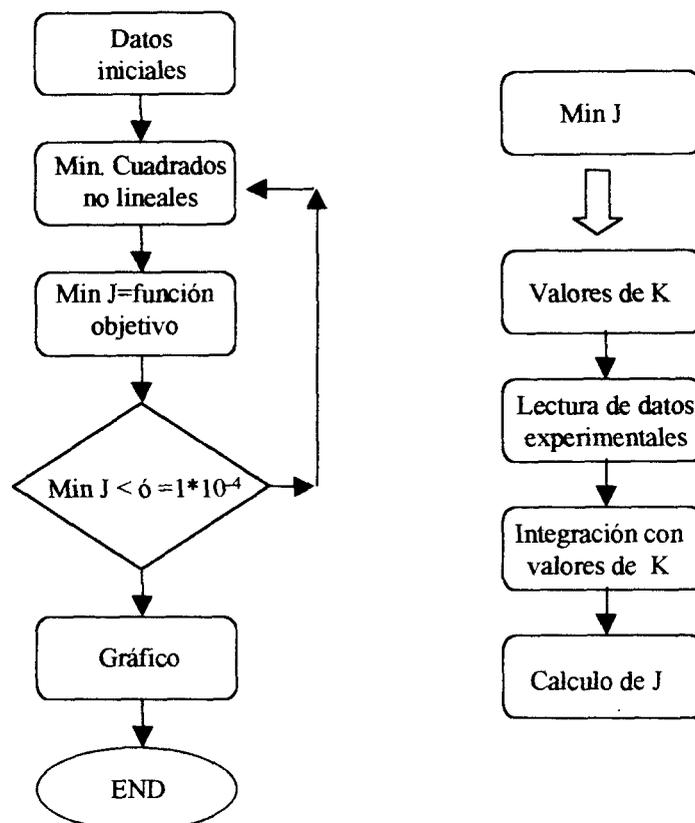


Fig. 7.1 Diagrama que muestra el algoritmo de programación.

Para facilitar la convergencia de las ecuaciones cinéticas se adimensionalizaron para acotarlas en los rangos de cero a uno. Las variables adimensionales que se emplearon se describen en la Tabla 7.2., a los componentes de interés se les asignan también variables que son fáciles de suponer a partir de la tabla.

Tabla 7.2 Variables adimensionales empleadas en las ecuaciones cinéticas

Para el tiempo	Para el azúcar	Para el etanol	Para el ácido láctico	Para el ácido acético
$T = \frac{t}{t_{\max}}$	$A = \frac{Ca}{Ca_{\max}}$	$E = \frac{Ce}{Ce_{\max}}$	$L = \frac{Cl}{Cl_{\max}}$	$AC = \frac{Cac}{Cac_{\max}}$

Las ecuaciones adimensionalizadas se muestran a continuación:

$$\frac{dA}{dT} = -\Phi A$$

$$T = 0 \quad A = 1$$

Ec. 7.10

$$\frac{dE}{dT} = \Theta A - \left[ \Psi \frac{1}{E} + \Omega \right]^{-1}$$

$$T=0 \quad E=0$$

Ec. 7.11

$$\frac{dL}{dT} = \Lambda A - \left[ Z \frac{1}{L} + \Pi \right]^{-1}$$

$$T=0 \quad L=0$$

Ec. 7.12

$$\frac{dAC}{dT} = KAC \quad \text{ó} \quad \frac{dAC}{dT} = KAC^2$$

$$T=0 \quad AC=0$$

Ecs 7.13 a, 7.13 b

donde:

$$\Phi = (k_1 + k_2) * t_{\max}; \quad \Psi = \frac{K m_e}{V_{\max_e} t_{\max}}; \quad \Omega = \frac{C_{\max}}{k m_e t_{\max}}; \quad Z = \frac{k m_i}{V_{\max_i} t_{\max}}$$

$$\Pi = \frac{C_{\max}}{V_{\max_i} t_{\max}}; \quad \Lambda = k_2 \frac{C_{\max}}{C_{\max}} t_{\max}; \quad K = k_7 \frac{C_{\max}}{C_{\max}} t_{\max}$$

### 7.3 Resultados del modelo cinético

En la tabla 7.3 se anexan los valores para los parámetros cinéticos para los casos de estudio durante la fermentación de cacao.

Tabla 7.3 Valores de los parámetros cinéticos de la fermentación de cacao para producto completo y mucílago

Producto completo	Unidades	Caso 1	Caso 2
$K_1$	1/días	0.4638	0.4562
$K_2$	1/días	0.0495	0.0586
$V_{max_e}$	g/100 g MS/días	1.1460	1.1957
$K_{m_e}$	g/100 g MS	0.0046	0.0032
$V_{max_1}$	g/100 g MS/días	0.1453	0.1428
$K_{m_1}$	g/100 g MS	0.1843	0.0876
$K_7$	1/días	0.1868	0.1814
Mucílago	Unidades	Caso 1	Caso 2
$K_1$	1/días	0.3908	0.3980
$K_2$	1/días	0.1301	0.1310
$V_{max_e}$	g/100 g MS/días	0.8418	0.8473
$K_{m_e}$	g/100 g MS	0.2589	0.2565
$V_{max_1}$	g/100 g MS/días	0.1779	0.1768
$K_{m_1}$	g/100 g MS	0.0015	0.0009
$K_7$	1/días	0.1501	0.2350

En la tabla 7.3 se anexan las unidades correspondientes para cada parámetro cinético con el objeto de diferenciar las constantes involucradas en las ecuaciones de Michaelis-Menten. El 1er o 2do orden en las columnas de la tabla se refiere específicamente al orden de la ecuación para ácido acético y no a todo el sistema.

A partir de este momento se hablará de caso 1 donde el sistema contemple ecuaciones absolutas de primer orden y para caso 2 donde la ecuación de velocidad para ácido acético sea de orden 2.

Antes de iniciar cualquier discusión entre los valores de los parámetros cinéticos evaluados se hacen las siguientes observaciones:

1.- El esquema de reacción propuesto involucra constantes de acuerdo a la cinética clásica y parámetros de significado biológico acorde con la ecuación de Michaelis y Menten, mientras los primeros representan constantes de velocidad de reacción, independientes de la concentración, los segundos son dependientes de la concentración cuyo significado representa lo siguiente:

\* El termino de velocidad máxima ( $V_{max_i}$ ) en la ecuación de Michaelis - Menten se encuentra relacionado con la concentración de sustrato y es dependiente de la concentración de enzima.

\* El termino de  $K_{m_i}$  es un índice de afinidad que tiene una enzima por un determinado sustrato, si se presentan valores muy pequeños con respecto al sustrato inicial indican condiciones favorables de reacción y caso contrario si son valores altos.

2.- Si se observan las condiciones iniciales de concentración en la tabla 7.2 se observa que al comienzo de la reacción no hay presencia de etanol y de ácido láctico, puesto que estos comenzaran a formarse con el transcurso de la fermentación y posteriormente se convertirán en sustrato para otra reacción. Es en el punto donde alcanzan su valor máximo concentración donde pasan de producto a sustrato y es donde la ecuación de Michaelis - Menten tendrá significado, por lo cual, para efecto de comparación con los parámetros  $V_{max}$  y  $k_m$  será su valor máximo que se convierte en condición inicial.

Se enuncia las principales características encontradas al comparar los parámetros cinéticos:

- Los valores encontrados de los parámetros cinéticos no muestran grandes desviaciones en producto completo, aun en la constante  $k_7$  de caso 1 y 2. En cuanto a los valores en el mucílago también las desviaciones son muy pequeñas, mostrando una mayor desviación el  $K_7$  entre caso 1 y 2.
- Al comparar los valores de  $K_{m_e}$  de etanol para caso 1 y 2 de producto completo se observa que ambos valores son bastantes pequeños y que no tienen diferencias significativas entre ellos, ahora bien, si se comparan con el valor  $E_{max}$  se puede establecer lo siguiente:

Dado que  $K_{m_e} \ll E_{max}$  por lo tanto la reacción ocurrirá a  $V_{max_e}$  implicando dominio de la reacción de orden cero, y solamente cuando las concentraciones de etanol sean bajas se presentara el cambio de orden. Además esto implica alta afinidad hacia el sustrato.

- En el caso de  $K_{m_e}$  de etanol para caso 1 y 2 de mucílago no existen diferencias, son prácticamente las mismas, sin embargo el valor de las  $K_{m_e}$  no es lo suficiente menor con respecto a  $E_{max}$ , por lo cual, el dominio de la reacción es un esquema completo de Michaelis - Menten. También muestra que en el mucílago la afinidad hacia el sustrato es menor que en producto completo.
- Si se comparan los valores de  $K_{m_l}$  de ácido láctico para caso 1 y 2 en producto completo se notan diferencias entre los mismos y comparando con respecto al valor de concentración máximo de láctico no existen diferencias grandes, mostrando ello una afinidad pequeña.
- Si se compara  $K_{m_l}$  de ácido láctico en el mucílago los valores son suficiente pequeños para despreciarlos con respecto al valor máximo y entonces establecer que la reacción es muy afín al sustrato y que ocurrirá aproximadamente a  $V_{max_l}$

De los puntos de comparación antes tratados destaca lo siguiente:

Para el caso de producto completo y mucílago la afinidad hacia el etanol como sustrato muestran casos contrarios, favoreciendo al producto completo, el cual, representa un proceso de difusión y reacción, y el mucílago es un proceso de reacción principalmente por lo que llama la atención este comportamiento. Una explicación a este comportamiento se debe al proceso de producción de etanol y ácido láctico el cual se presenta como paso previo al consumo de los mismos, es decir el producto completo esta conformado de cotiledón y mucílago, dentro del primero no existe reacción y la presencia de los componentes es debido a la difusión, sin embargo cuando estos comienzan a ser consumidos se llevan a cabo gradientes de concentración del interior al exterior, entonces el proceso difusivo deberá ser muy grande.

A continuación se muestra el desempeño de las ecuaciones modelo (Fig. 7.2-7.17) propuestas con los datos experimentales contemplando dos casos, además se contempla la capacidad de predicción del sistema de ecuaciones proponiendo valores por arriba y por debajo de las condiciones iniciales del sustrato principal (azúcar).

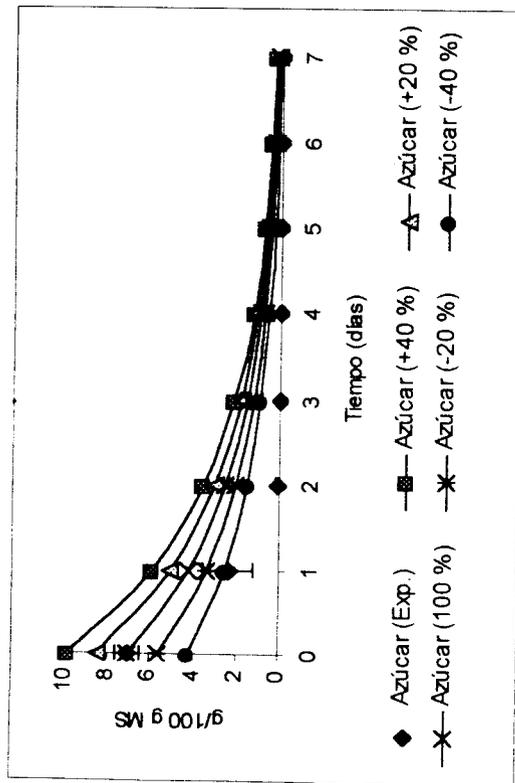


Fig. 7.2 Perfil de la concentración experimental de azúcares (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 1.

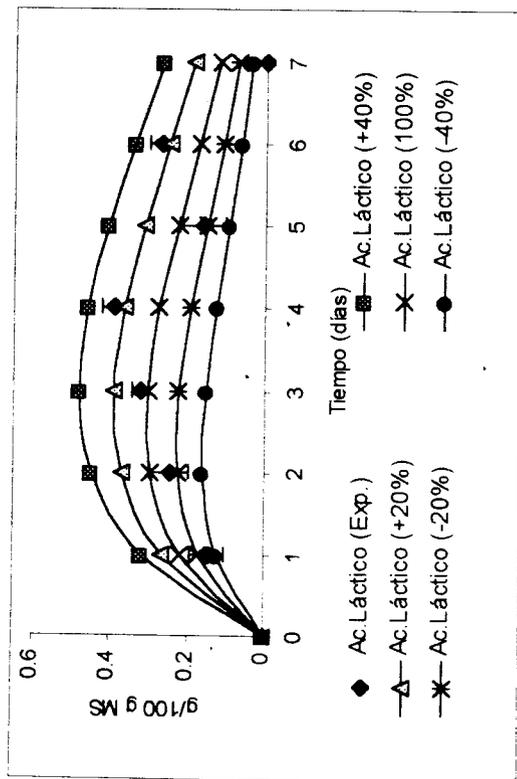


Fig. 7.4 Perfil de la concentración experimental de ácido láctico (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 1.

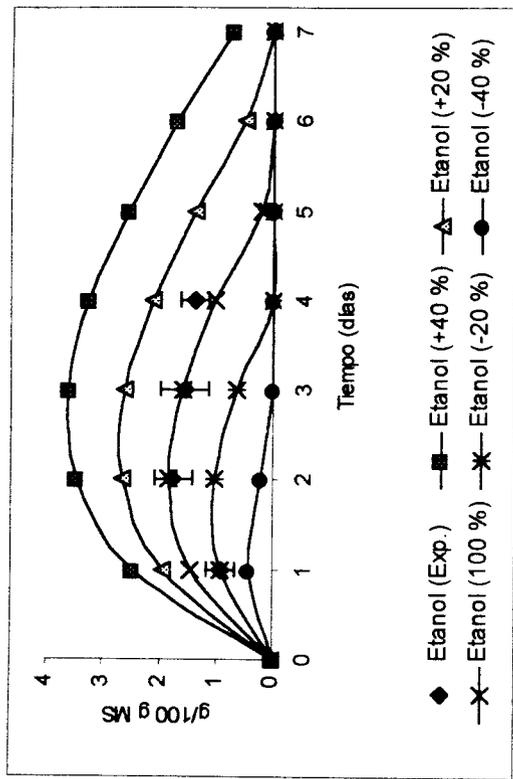


Fig. 7.3 Perfil de la concentración experimental de etanol (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 1.

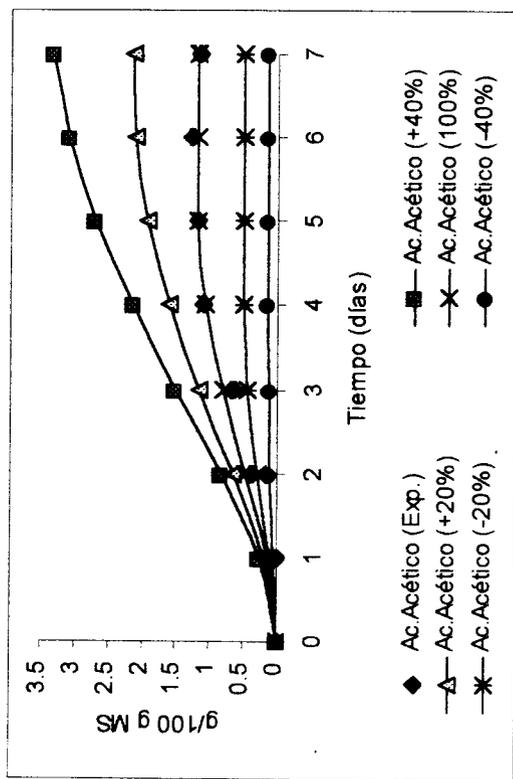


Fig. 7.5 Perfil de la concentración experimental de ácido acético (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 1.

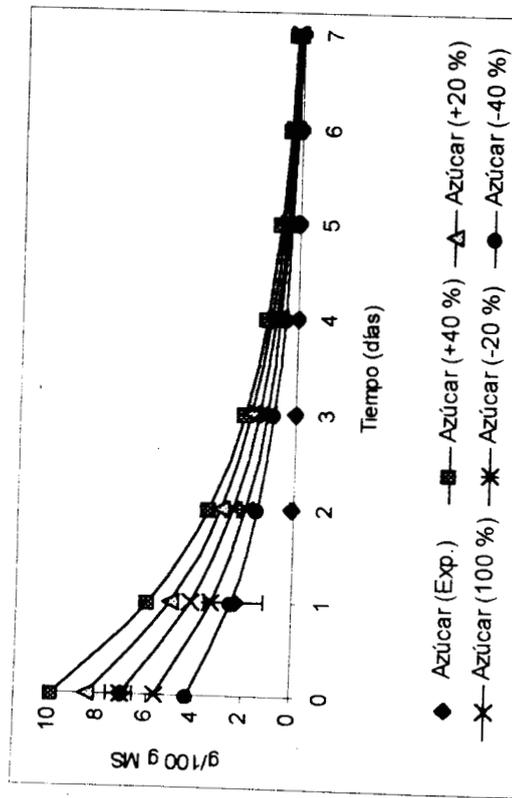


Fig. 7.6 Perfil de la concentración experimental del azúcar (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 2.

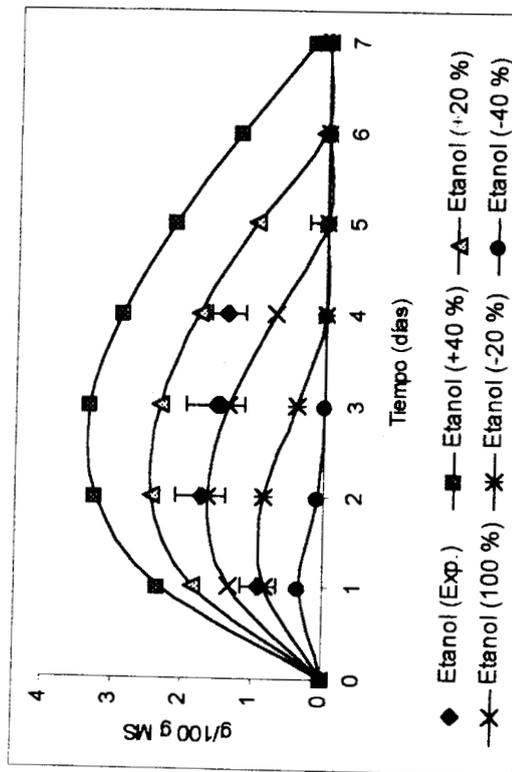


Fig. 7.7 Perfil de la concentración experimental de etanol (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 2.

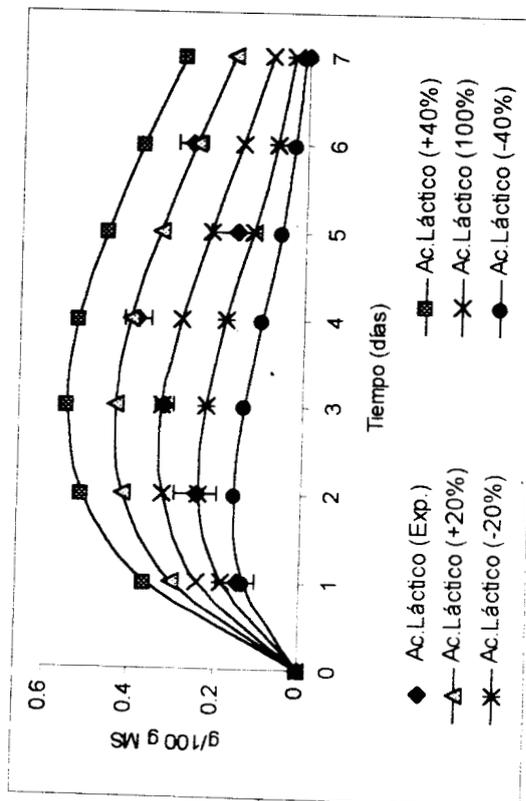


Fig. 7.8 Perfil de la concentración experimental de ácido láctico (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 2.

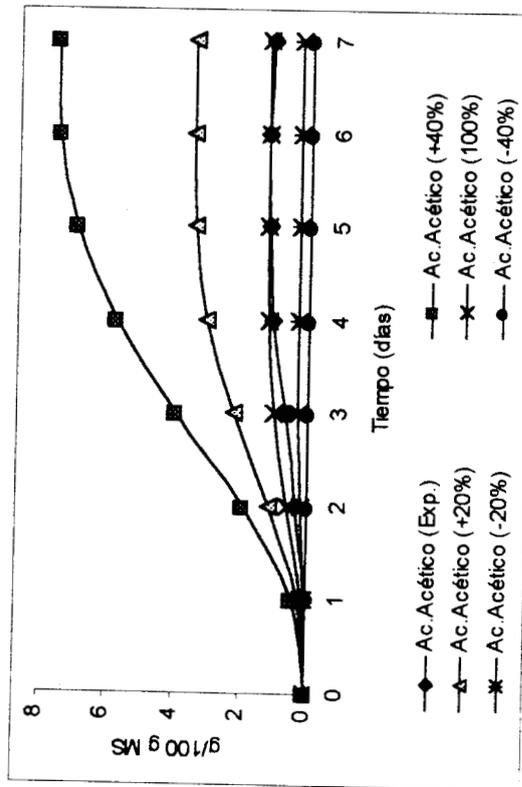


Fig. 7.9 Perfil de la concentración experimental de ácido acético (Símbolos) y del modelo (línea continua) en Producto completo para caso 2.

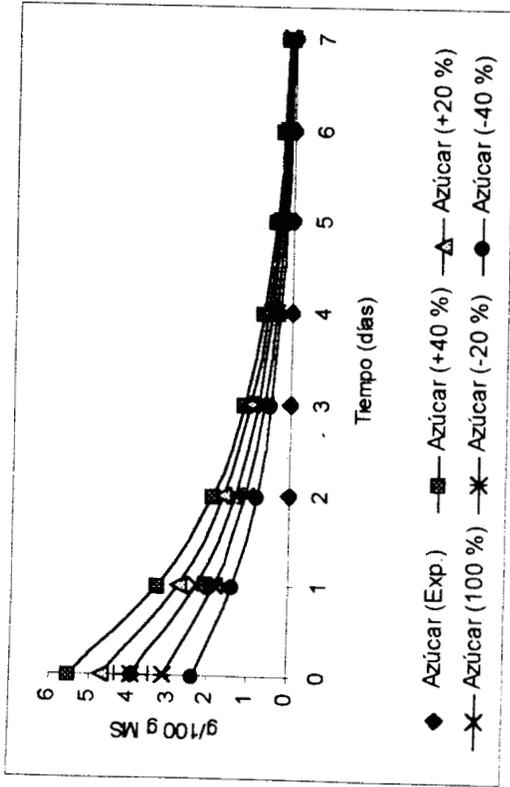


Fig. 7.10. Perfil de la concentración experimental del azúcar (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso I.

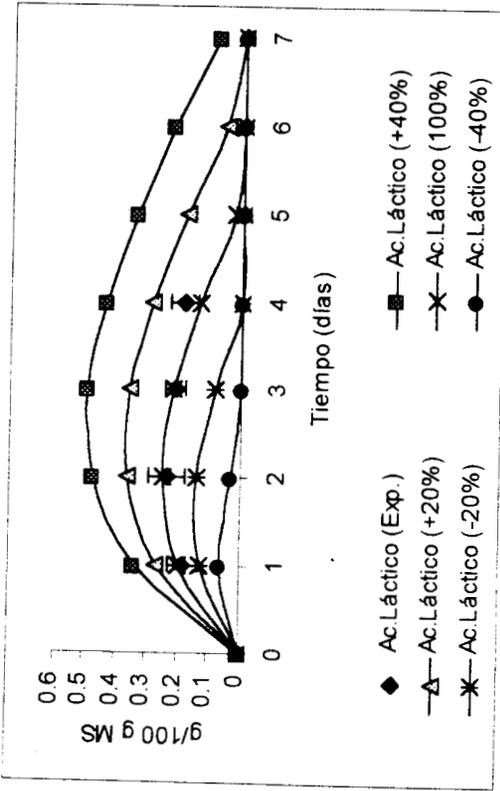


Fig. 7.12 Perfil de la concentración experimental de ácido láctico (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso I.

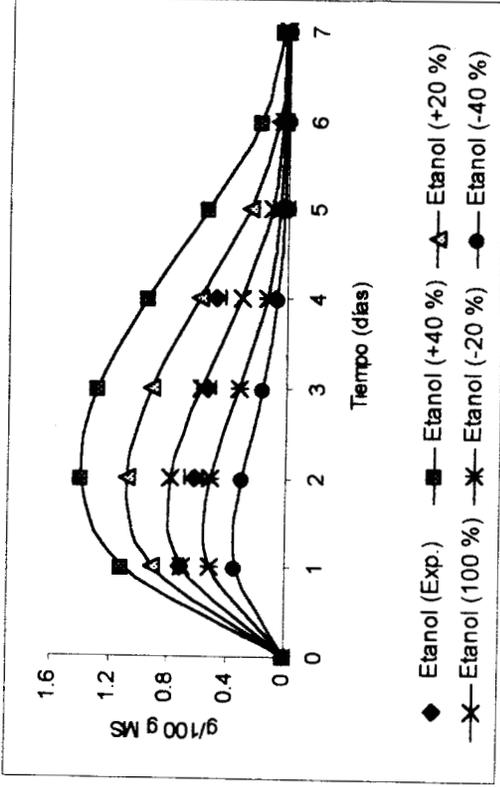


Fig. 7.11 Perfil de la concentración experimental del etanol (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso I.

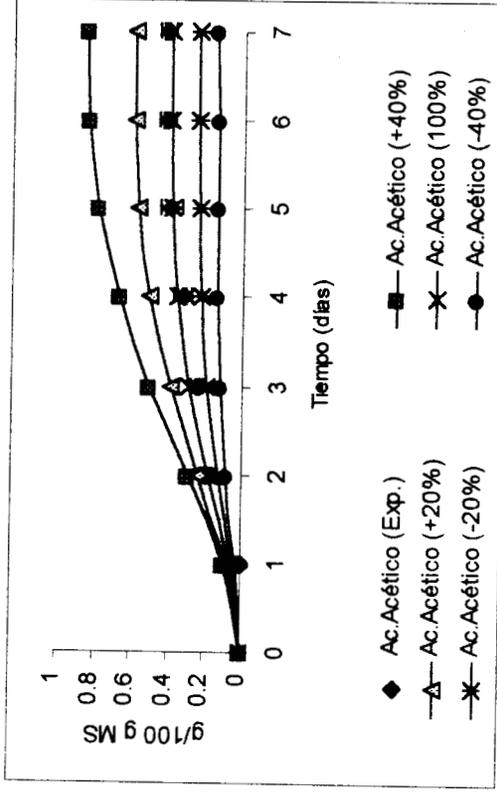


Fig. 7.13 Perfil de la concentración experimental de ácido acético (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso I.

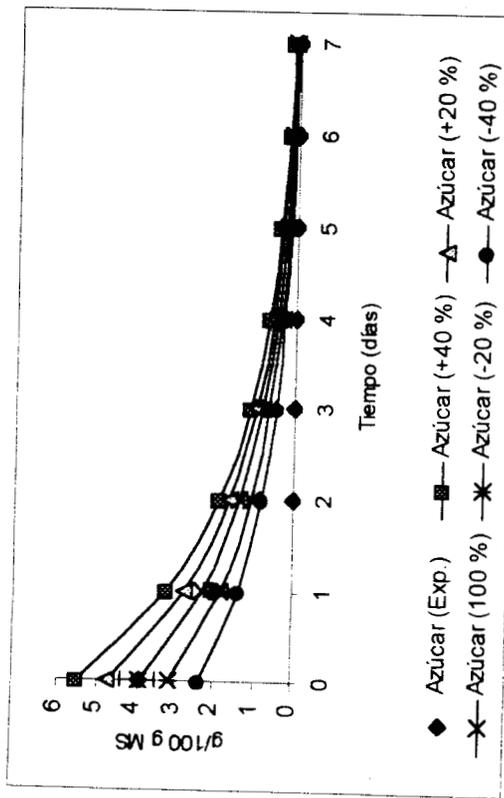


Fig. 7.14 Perfil de la concentración del azúcar experimental (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso 2.

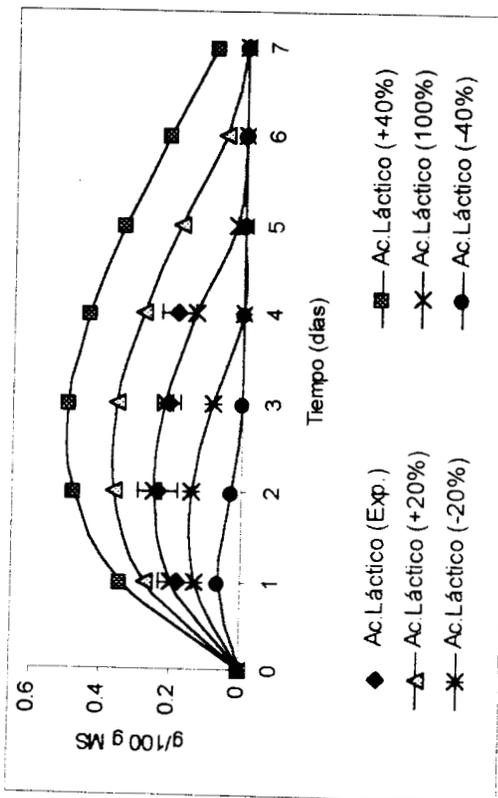


Fig. 7.16 Perfil de la concentración experimental de ácido láctico (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso 2.

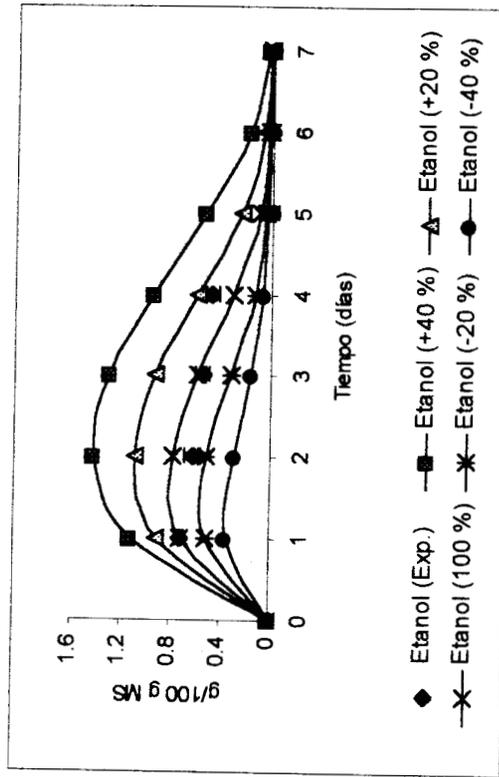


Fig. 7.15 Perfil de la concentración experimental de etanol (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso 2.

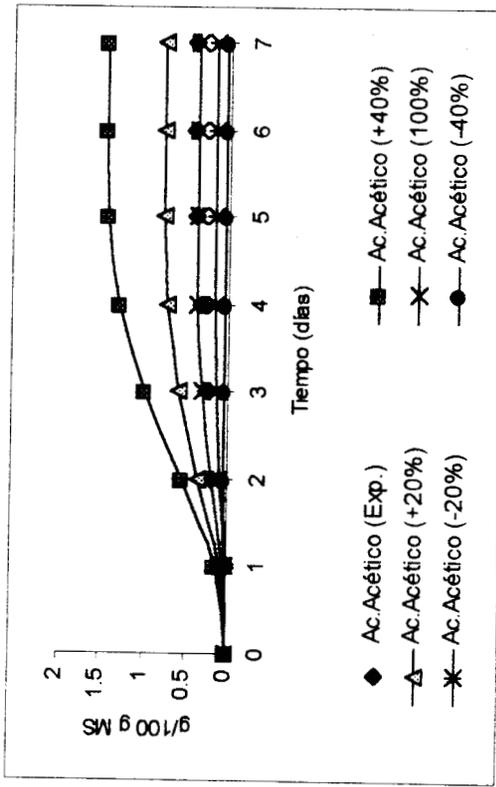


Fig. 7.17 Perfil de la concentración experimental ácido acético (Símbolos) y del modelo (línea continua) en mucilago para caso 2.

En las figuras 7.2-7.5 se comparan los perfiles del modelo con los experimentales para los componentes de estudio para el caso de producto completo, además se contemplan comportamientos para diferentes valores de concentración inicial de azúcar para comprobar la estabilidad del sistema del modelo propuesto. Al referirnos a estabilidad del modelo se da a entender que los valores proporcionados por el modelo no son valores negativos, o bien, que se eleven en rangos de concentración muy altos.

El índice porcentual de 100 % es el valor del modelo ajustado con los datos experimentales, valores en por ciento diferentes indican la proporción en que se disminuyó o aumentó el valor inicial del azúcar considerado como la suma de sacarosa y glucosa.

El comportamiento de los perfiles generados por el modelo es bueno, a excepción del de azúcar que presenta una separación de los datos experimentales, nótese que no se contempla el caso de hidrólisis que se presenta después del tiempo dos (Fig.6.13, Capítulo 6), dado que estos no intervienen en la producción de los componentes evaluados en el presente estudio cinético.

El comportamiento que demuestra el etanol es muy satisfactorio presentando el mejor ajuste con los datos experimentales como puede observarse en la Fig. 7.3

El perfil de ajuste en la situación de ácido láctico presenta un poco de separación entre los tiempos 4 y 6, esto es bastante claro, en cuanto a que el modelo ajusta de acuerdo a mínimos cuadrados, por los que minimiza el error entre estos puntos, además esta diferencia en puntos experimentales puede ser atribuida a errores de análisis o bien a la posible heterogeneidad del sistema, más sin embargo la tendencia del perfil demuestra el comportamiento que sigue el ácido láctico a través del tiempo.

En cuanto al comportamiento del ácido acético al igual que el etanol, demuestra muy buena aproximación con los datos experimentales. El análisis del ácido acético es un caso particular en nuestro estudio, dado que introducimos una misma ecuación con ordenes diferentes en el sistema de ecuaciones cinéticas a resolver (Ec. 7.13), con la finalidad de amortiguar el lapso de aparición de este componente durante la fermentación. Nos enfocamos a plantear dos ecuaciones dada la importancia que tiene el ácido acético durante el secado, debido a que representa el componente que se desea eliminar en gran

proporción durante este proceso, puesto que contribuye a la astringencia y amargura del cacao (Augier *et al.* 1999)

Ahora si comparamos el caso 1 con el caso 2 para producto completo se observará (Fig. 7.6-7.9) que los perfiles de los componentes son muy similares a excepción del ácido acético que muestra un retraso en la aparición con el tiempo, cuya finalidad era amortiguar ese tiempo con una ecuación de orden 2, sin embargo, las concentraciones por arriba de la concentración inicial en la Fig. 7.9 muestran valores muy elevados comparados con los de la fig. 7.5, así mismo, para valores por debajo de la concentración inicial se observa una disminución bastante drástica, es decir, aunque se logra amortiguar el tiempo de aparición se sacrifica concordancia del modelo.

El comportamiento mostrado en las figuras 7.10 - 7.13 nos muestra los perfiles para mucílago para caso 1, en estos se observa un mejor comportamiento del modelo que para el caso de producto completo, esto es debido a que los datos experimentales contemplan perfiles muy buenos y el ajuste resulta más adecuado, además el modelo resulta muy estable. Para este caso resulta también que el azúcar presenta el peor ajuste y todos los demás observan buenos ajustes.

En las figuras 7.14 - 7.17 se observa el comportamiento para mucílago, caso 2, de igual manera que para producto completo, la finalidad es tratar de amortiguar el tiempo de aparición del ácido acético, lo cual se logra, aunque se presenta el mismo problema, es decir se presenta un aumento (arriba de 100 %) desproporcionado comparado con el caso 1, el cual es mucho más consistente. Sin embargo las diferencias no son tan marcadas como para la situación de producto completo.

Existe una diferencia apreciable al evaluar el sistema de ecuaciones actuando sobre producto completo y mucílago, en cuanto al perfil de ácido láctico, es decir se observa claramente que en producto completo no se presenta un ajuste al final del tiempo de fermentación, cuestión que no se presenta en mucílago donde éstos se ajustan bastante bien.

Por lo anteriormente comentado el sistema es adecuado para describir el sistema real de fermentación de estudio, presentándose un mejor ajuste del sistema en el caso 1 tanto en

producto completo o mucílago y encontrándose los mejores perfiles en cuanto al comportamiento del modelo en el mucílago.

## **8. Conclusiones y comentarios**

### **8.1 Sobre aspectos microbiológicos y bioquímicos.**

La variabilidad entre muestras de siembras microbiológicas en el lugar y congeladas muestras diferencias claras en ordenes de magnitud, mostrando una disminución apreciable en muestras conservadas en congelación, no siguiendo las mismas perfiles paralelos de las muestras en el lugar.

Los perfiles de evolución de microflora se encuentran fuertemente correlacionados con la temperatura, siendo este ultimo parámetro un factor esencial para el desarrollo de la etapa de aerobiosis.

Existe un factor esencial para definir la fase anaerobia, el cual consiste en el removido de las cajas de fermentación. A un incremento de removido o mezclado, las cajas se encuentran con mayores niveles de aireación lo cual, acorta la fase anaerobia, y lo opuesto, se aprecia con un menor removido lo que incrementa la fase, debido a los menores índices de aireación.

El removido de cacao afecta de forma determinante los perfiles de los componentes de reacción de estudio, presentándose altos niveles de concentración de todos los productos microbianos al final de la fermentación.

Se presentan diferencias significativas en cuanto a niveles de concentración de azúcares entre temporadas de cosecha, las cuales se ven influenciadas por factores climáticos y en menor proporción puede contribuir el almacenamiento.

Los procesos de difusión durante la reacción microbiana son difíciles de evaluar entre el cotiledón y el mucilago. Además el proceso difusivo en los primeros días se presenta del mucilago hacia el interior del cotiledón y posteriormente del cotiledón hacia la periferia.

La elevación de temperatura durante la fermentación contribuye a la evaporación y la pérdida de una fracción de ácidos volátiles y etanol. Perdiéndose por gases y evaporación y jugo de cacao hasta 20 % de materia total húmeda.

## **8.2 Sobre los aspectos del modelamiento de reacción cinética**

Se desarrollo un esquema cinético reducido de las reacciones microbianas que participan en la fermentación de cacao, para el cual se propuso un sistema matemático con parámetros cinéticos de valor biológico, los cuales son fáciles de interpretar.

El modelo reproduce aceptablemente los perfiles experimentales durante el desarrollo de la fermentación microbiana.

El modelo presenta capacidad de predicción al suministrarle valores mayores o menores a las condiciones iniciales de simulación numérica.

Este modelo presenta la ventaja de no requerir la determinación de la biomasa para la descripción de los componentes de interés, así como también de gases y componentes perdidos por evaporación.

## **9 - Comentarios y sugerencias.**

Dentro de un estudio microbiológico en la fermentación de cacao se debe realizar en el lugar donde se llevan a cabo las fermentación, para de esta manera eliminar posibles errores por almacenamiento de muestras.

Estudiar el comportamiento de los microorganismos involucrados de una manera rigurosa y a través de las distintas temporadas de cosecha.

Se debe ligar el proceso de fermentación junto con el de secado para ver como fluctúan los niveles de acidez durante este último.

Si se quiere modelar ecuaciones cinéticas se debe tener en cuenta la contribución de ácido cítrico el cual se encuentra de manera importante y es degradado por grupos de bacterias lácticas.

Dado que las condiciones de remoción de cacao de una caja hacia otra tiene una repercusión en los productos de la fermentación, se debe estudiar cuales son las condiciones adecuadas del mismo.

## Apéndice 1

```
function f2=fun5(t,x,flag,z)

tmax=7.0;

% caso1
Camax=7.0831
Cemax=1.7550;
Clmax=0.3905;
Cacmax=1.2783

% caso2
% Camax=3.9218;
% Cemax=0.7159;
% Clmax=0.2655;
% Cacmax=0.4240

tmce=tmax/Cemax;
tmcl=tmax/Clmax;
tmcac=tmax/Cacmax;

f(1)=-(z(1)+z(2))*tmax;
f(2)=tmce*(z(1)*Camax*x(1)-(z(3)*x(2)*Cemax)/(z(4)+x(2)*Cemax));
f(3)=tmce*(z(2)*Camax*x(2)-(z(5)*x(3)*Cemax)/(z(6)+x(2)*Cemax));
f(4)=z(7)*tmcac;

f2=f';
```

## Apéndice 1

```
function f=fun6(z)
```

```
options = odeset('RelTol',1e-4,'AbsTol',[1e-4 1e-4 1e-4 1e-4]);  
[t y]=ode45('fun5',[0 0.1428 0.2857 0.4285 0.5714 0.7142 0.7142 0.8571 1  
],[1,0,0,0],options,z);
```

```
% caso1
```

```
y1 = [1; 0.3367; 0.0127; 0; 0; 0; 0; 0];  
y2 = [0; 0.5248; 1; 0.8830; 0.7897; 0; 0; 0];  
y3 = [0; 0.3771; 0.6321; 0.8340; 1; 0.7171; 0.6888; 0];  
y4 = [0; 0.3035; 0.4995; 0.8679; 0.9388; 1; 0.9164]
```

```
% caso2
```

```
y1 = [1; 0.4971; 0; 0; 0; 0; 0; 0];  
y2 = [0; 1; 0.877; 0.7642; 0.6779; 0; 0; 0];  
y3 = [0; 0.7779; 1; 0.8957; 0.7855; 0; 0; 0];  
y4 = [0; 0; 0.4515; 0.5849; 0.7620; 0.9307; 0.9880; 1];
```

```
y1max=max(y1);  
y2max=max(y2);  
y3max=max(y3);  
y4max=max(y4);
```

```
f1=y1-y(:,1);  
f2=y2-y(:,2);  
f3=y3-y(:,3);  
f4=y4-y(:,4);
```

```
f1=f1./y1max;  
f2=f2./y2max;  
f3=f3./y3max;  
f4=f4./y3max;
```

```
% caso1
```

```
f3=f3*10;
```

```
f = [f1; f2; f3;f4];
```

## Apéndice 1

```
clear all
close all

%Z=[5.2650e-001 6.7359e-002 -4.2012e+001 -4.7415e+001 8.9102e-002 -1.7987e-002];
caso 1
%Z=[4.1160e-001 1.3211e-001 8.5112e1001 2.3605e-001 1.7390e-001 2.6973e-004];
caso 2

optionms=optimset('TolX', 1e-4, 'TolFun',1e-4,'MaxFunEvals',1000);
k=lsqnonlin('fun6',z,[0 0 -inf -inf -inf -inf], [],options)

options = odeset('Reltol',1e-4,'AbsTol',[1e-4 1e-4 1e-4]);
tt=[0 0.1428 0.2857 0.4285 0.5714 0.7142 0.7142 0.8571 1];
[t y] =ode45('fun5', tt, [1, 0, 0], options, k);

%caso1
y1 = [1; 0.3367; 0.0127; 0; 0; 0; 0; 0];
y2 = [0; 0.5248; 1; 0.8830; 0.7897; 0; 0; 0];
y3 = [0; 0.3771; 0.6321; 0.8340; 1; 0.7171; 0.6888; 0];

%caso2
y1 = [1; 0.4971; 0; 0; 0; 0; 0; 0];
y2 = [0; 1; 0.877; 0.7642; 0.6779; 0; 0; 0];
y3 = [0; 0.7779; 1; 0.8957; 0.7855; 0; 0; 0];

hold on

subplot (2,2,1)
plot (t,y(:,1))
hold on
plot (tt,y1,'sk-');

subplot (2,2,2)
plot (t,y(:,2))
hold on
plot (tt,y2,'ok-');

subplot (2,2,2)
plot (t,y(:,3))
hold on
plot (tt,y3,'+k-');
```

## 11. Lista de referencias Bibliográficas.

1. Anuario Estadístico del Estado de Tabasco, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), Edición 1998.
2. Anuario Estadístico del Estado de Chiapas, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), Edición 1998.
3. Augier, F. (1999), Tesis Doctoral, Estudio de Secado sobre equilibrio agua-ácido acético, Universidad de Montpellier.
4. Bovee, J.P. Strehaiano, P. Goma, G. and Sevely, Y. (1984) Alcoholic Fermentation: Modelling Based on Sole Substrate and Product Measurement. *Biotechnology and Bioengineering*. 26, 328 - 334
5. Braverman, J.B.S. Nueva edición por Z. Berk. (1998) Introducción a la Bioquímica de los Alimentos Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 7ma. Reimpresión.
6. Buamah, R. Dzagbefia, V.P. and Oldman, J.H. (1997) Pure Yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma Cacao L*): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, 457 - 462
7. Denn, M (1994 ), Modelamiento de sistemas de reacción
8. Ghildyal, N.P. Gowthaman, M.K. Raghava Rao, K.S.M.S and Karanth N.G. (1994) Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermenters: Effect of Temperature Gradients. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 253 - 257
9. Gotsch, N (1997) Cocoa biotechnology: status, constraints and future prospects. *Biotechnology Advances*, 15, 2, 333-352
10. Gowthaman, M.K. Ghildyal, N.P. Raghava rao, K.S.M.S. and Karanth, N.G. (1993) Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermenters: The Effect of Gaseous Concentration Gradients. *Journal Chem. Tech. Biotechnol* 56, 233 - 239
11. Hansen, C.E. Olmo, M. Burri, C. (1998) Enzyme activities in Cocoa Beans During Fermentation. *J. Sci food Agric* 77, 273 - 281
12. Hashim, P. Selamat, J. Muhammad, S.K.S. and Ali, A. (1998) Changes in Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. *J. Sci Food Agric* 78, 535 - 542

13. Hashim, P. Selamat, J. Muhammad, S.K.S. and Ali, A. (1998) Effect of Mass and Turning Time on Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. *J Sci Food Agric* 78, 543 - 550
14. Hashim, P. Selamat, J. Muhammad, S.K.S. and Ali, A. (1997) Pyrazines Formation in Cocoa Beans: Changes During Fermentation. *J. Food Sci Technol* 34, 483 - 487
15. Jinap, S. And Dimick, P.S. (1990) Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin. *J. Of Food Science*. 55, 2, 547 - 550
16. Lee, M.P. Lee, K.H. Karim, M.I.A. (1991) Biochemical Studies of Cocoa Bean Polyphenol Oxidase. *J Sci Food Agric* 55, 251 - 260
17. Levenspiel, O. (1997) *Ingeniería de las Reacciones Químicas*. Editorial Reverte, S.A. Segunda Edición. 7ma. Reimpresión.
18. Lonsane, B.K. Ghildyal, N.P. Budiartman, S. and Ramakrishna, S.V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 258 - 265
19. López A, P.A, Delgado N, V.H, Azpeitia, M.A. (1996) *El CACAO Theobroma cacao L. EN TABASCO*. Libro Técnico Núm. 1, Campo experimental Huimanguillo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
20. Luyben, W. L (1973). *Process modelling, simulation and control for chemical engineers*, Int. Student Ed. McGraw-Hill. 558 p.
21. Passos M.L.F. Silva, D.O. Lopez, A. Ferreira, C.L.L.F. and Guimaraes W.V. (1984) Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cocoa Bean Fermentations in Bahia. *Journal of Food Science* 49, 205 - 207
22. Ramírez Díaz F.J. 1998 *Sistema Agroindustrial Cacao en México y su comportamiento en el mercado*. Universidad Autónoma de Chapingo. Colección Estructura y dinámica de los sistemas Agroindustriales.
23. Ravelomanana, R. Guiraud, J.P. Vincent, J.C. and Galzy, P. (1985) The Yeast Flora of Cocoa Bean Fermentation in the Ivory Coast. *Mircen Journal* 1, 319 - 326
24. Rehm et al. 1994. (Lehrman and Patterson capítulo 12) *Cocoa Fermentation*. Pag 529 - 575
25. Sanchez, J.E. (1989) Tentative Pratique D'amélioration de la fermentation du Cacao per Inoculation directe de micro-organismes. *Café Cacao The* 3, 157 - 164

26. Sanchez, J.E. Guiraud, J.P. Galzy, P. (1988) Recherche de Levures Capables de fermenter le cacao par voie triphasique. *Café Cacao Thé* 2, 141 - 148
27. Sanchez, J.E. Daguinet, G. Guiraud, J.P. Vincente, J.C. and Galzy, P. (1985) A study of the Yeast Flora and the Effect of Pure Culture Seeding During the Fermentation Process of Cocoa Beans. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 18, 69 -75
28. Sanchez, J.E. Guiraud, J.P. Galzy, P. (1984) A study of the Polygalacturonase Activity of Several Yeast Strains Isolated from Cocoa. *Appl Microbiol Biotechnol* 20, 262 - 267
29. Sangsurasak, P. and Mitchell D.A. (1998) Validation of a Model Describing Two-dimensional heat Transfer During Solid-State Fermentation in Packed Bed Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 60, 739 - 749
30. Saucedo Castañeda, G. and Gómez J. (1989) El effect of glucose and ammonium sulfate on kinetic acidification by heterogeneous mixed culture. *Biotechnology Letters*. 11, 121 - 124.
31. Saucedo Castañeda, G. Gutierrez Rojas, M. Bacquet, G. Raimbault, M. and Viniegra Gonzalez, G. (1990) Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 802 - 808
32. Schwan, R.F., Cooper R. M and Wheals A.E. ( 1997 ) Endopolygalacturonase Secretion by *Kluyveromyces marcianus* and other Cocoa pulp - degrading yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 21, 234 - 240.
33. Schwan, R.F. Rose, A. H. And Board, R. G. (1995) Microbial fermentation of Cocoa Beans, With Emphasis on Enzymatic Degradation of the Pulp. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 79, 965 - 1075
34. Schwan, R.F. (1998) cocoa Fermentations Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1477 - 1483
35. Senanayake, M. Jansz, E.R. and Buckle, K.A. (1995) Effect of Variety and Location on Optimum Fermentation Requirements of Cocoa Beans: An aid to Fermentation on a Cottage Scale. *J Sci Food Agric*. 69, 461 - 465
36. Senanayake, M. Jansz, E.R. and Buckle, K.A. (1997) Effect of Different Mixing Intervals on the Fermentation of Cocoa Beans. *J Sci Food Agric* 74, 42 - 48
37. Smits, J.P. Rinzema, A. Tramper, J. Van Sonsbeek, H.M. Hage, J.C. Kaynak, A. and Knol, W. (1998) The influence of temperature on Kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 50 - 57

38. Starzak, M., Krzystek, Nowicki and Michalski (1994) Macroapproach Kinetics of ethanol fermentation by *Saccaromyces cerevisiae*: experimental studies and mathematica modelling, 54, 221 - 240
39. Rajagopalan , S and Modak, J.M (1994) Heat and mass transfer simulation studies for solid-state fermentation processes. *Chemical Engineering Science* 49, 2187 - 2193