

# EFFECTO DE LA ENZIMA PROTEASA Y POLIFENOLOXIDASA EN LA CALIDAD DEL CACAO (*Theobroma cacao L.*) FINO DE AROMA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Juan C. Ponce Ramírez, Hugo Oriundo Mamani, Gerson U. Taype Mucha<sup>1</sup>, Rosaly A. Tenorio Quispe<sup>1</sup>

Unidad de Investigación e Innovación de Ingeniería Química y Metalurgia  
Programa de Investigación en Procesos Industriales - Área de procesos alimentarios y agroindustriales  
E-mail: juan.ponce@unsch.edu.pe

## RESUMEN

Actualmente la región Ayacucho produce derivados del cacao fino de aroma, pero su calidad no alcanza los estándares internacionales, principalmente por su acidez, amargor y astringencia. El **objetivo** de la investigación fue determinar el efecto de la enzima proteasa y polifenoloxidasas en la calidad del cacao (*Theobroma cacao L.*) fino de aroma en el proceso de fermentación", en la **materiales y métodos** se planteó la adición de enzimas como la proteasa (0.25% y 0.5% P) y la polifenoloxidasas (0.25% y 0.5% PPO) para conseguir la mejora de la calidad organoléptica. En **resultados** se determinó las características físicas de los granos del grano de cacao (longitud, diámetro, espesor, peso y testa) resultando inferior a los reportados por (Arango, 2017) y superiores a los reportados por (Andrade, et al., 2019). Asimismo, las características químicas de los granos fueron superiores en humedad, proteínas, grasa, cenizas a los reportados por (Calderón, 2002; López, 2015). El menor índice de fermentación (IF) alcanzo el tratamiento T0 (IF=0.872), y el mejor el tratamiento el T4(IF=1.196), demostrando que este índice se mejora a medida que se incrementó la concentración de enzimas. En la variación del color, el tratamiento T4 ( $\Delta E:44,88$ ) alcanzo la mayor variación del color en comparación con el T0( $\Delta E:23,98$ ). En aceptabilidad el tratamiento T4 (5,80), alcanzo el mayor puntaje; en **conclusión**, la enzima polifenoloxidasas origino mejores características sensoriales al oxidar a los polifenoles y enmascaro el nivel de amargor y la astringencia de las barras de cacao.

Palabra clave: Cacao fino de aroma, proteasas, polifenoloxidasas.

## EFFECT OF THE ENZYME PROTEASE AND POLYPHENOLOXIDASE ON THE QUALITY OF FINE AROMA COCOA (*Theobroma cacao L.*) IN THE FERMENTATION PROCESS

### ABSTRACT

Currently the Ayacucho region produces derivatives of fine aroma cocoa, but its quality does not meet international standards, mainly due to its acidity, bitterness and astringency. The objective of the research was to determine the effect of the enzyme protease and polyphenoloxidase on the quality of fine aroma cocoa (*Theobroma cacao L.*) in the fermentation process ", in the materials and methods the addition of enzymes such as protease was proposed (0.25% and 0.5% P) and polyphenoloxidase (0.25% and 0.5% PPO) to achieve improvement in organoleptic quality. In results, the physical characteristics of the cocoa beans were determined (length, diameter, thickness, weight and seed coat), being lower than those reported by (Arango, 2017) and higher than those reported by (Almeida et al, 2019). Likewise, the chemical characteristics of the grains were higher in humidity, protein, fat, and ash than those reported by (Calderón, 2002; López, 2015). The lowest fermentation index (IF) reached the T0 treatment (IF=0.872), and the best the T4 treatment (IF=1.196), demonstrating that this index improves as the concentration increased of enzymes. In the color variation, the T4 treatment ( $\Delta E:44.88$ ) achieved the greatest color variation compared to the T0 ( $\Delta E:23.98$ ). In acceptability, the T4 treatment (5.80) achieved the highest score; In conclusion, the polyphenoloxidase enzyme produced better sensory characteristics by oxidizing the polyphenols and masking the level of bitterness and astringency of the cocoa bars.

Keyword: Fine aroma cocoa, proteases, polyphenoloxidases.

## INTRODUCCIÓN

---

<sup>1</sup>Colaboradores

El cacao es un alimento rico en minerales, vitaminas y fibra, que ofrece numerosos beneficios. Además, tiene propiedades nutricionales y terapéuticas, aprovechadas para la elaboración de diversos productos. El Perú está clasificado según el Convenio Internacional del Cacao 2010 de la ICCO, como el segundo país productor y exportador de cacao fino después de Ecuador.

Según el MINAGRI, (2016), en la región de Ayacucho existe una buena producción de cacao alrededor del 44% de la producción corresponde a cacao fino (Criollo + Nativo) y el 56% de la producción es cacao corriente o común (CCN-51+Forastero); sin embargo existe dificultades en cuanto a la uniformidad de la calidad de los granos debido a la poca conciencia en mejorar sus buenas prácticas agrícolas y manufactureras en toda la cadena de valor, a pesar de que, desde hace algunos años, empresas chocolateras de todo el mundo visitan el país con el fin de cerrar contratos directamente con los productores de cacao.

Ante este problema la investigación propone como objetivo determinar el efecto de la enzima proteasas y polifenoloxidasas en la calidad del cacao (*Theobroma cacao L.*) fino de aroma en el proceso de fermentación". De esta manera se mejorará la calidad del grano obteniendo una mejor calidad.

## MATERIAL Y METODOS

El trabajo de investigación se realizó en Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y el Centro Experimental de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, del 01 de abril al 15 de setiembre del 2019. Se utilizó como unidad de análisis los granos de cacao fermentados (*Theobroma cacao L.*) tratados con enzimas.

La toma de muestra se realizó del 03 de mayo al 20 de agosto. El lugar donde se tomó la muestra será el laboratorio de análisis de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia.

Se empleó como variable dependiente Y1 = Calidad del cacao y como sus Indicadores

(Y11 = Aceptabilidad, Y12 = Conc. de polifenoles, Y13 =  $\Delta E$ ). Como variables **Independiente** (X1= Conc. de proteasas [P], X2= Conc. de polifenoloxidasa [PPO]) y como indicadores X1 = 0,25 y 0,5%. y X2 = 0,25 y 0,5%

El diseño estadístico empleado correspondiente a un DBCA (Diseño Bloque Completamente al Azar).

### a) Caracterización física

Los granos de cacao fueron seleccionados, tratados, fermentados y secados para luego ser tomados 100 g de granos para ser evaluados longitud, diámetro, espesor, peso y testa.

### b) Caracterización química

Las muestras de cacao fueron molidas y homogenizadas previamente al análisis. Las muestras se analizaron en triplicado. La humedad se determinó con el método oficial AOAC 950.46, de estufa (AOAC, 2007); La proteína con el método oficial AOAC 981.10 (AOAC, 2007), La grasa con el método de Soxhlet método de la A.O.A.C (2007), y las cenizas con el método oficial AOAC 920.153, método de calcinación en mufla (AOAC, 2007).

### c) Determinación de índice de fermentación (IOCCC No 40)

Después de retirar la cáscara, los granos son molidos y tamizados. La muestra es desengrasada con éter de petróleo realizando una posterior extracción de los componentes con una solución de ácido clorhídrico en metanol, en este extracto se determina la Absorbancia a 460 y 525 nm respectivamente con un espectrofotómetro UV-VIS y se establece como índice de fermentación la relación: DO460/DO525

### d) Determinación de polifenoles totales

Los Polifenoles totales del polvo de cacao son extraídos con una solución acuosa de metanol al 70%, con agitación magnética por 45 minutos, el extracto obtenido se filtra, se toma una alícuota del mismo y se realiza una reacción colorimétrica con el reactivo Folin&Ciocalteu obteniendo una coloración azul, la misma que es cuantificada en un Espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de Onda de 760nm.

### e) Determinación del color de los granos

El color de los granos de cacao fue controlado durante todo el proceso de beneficio. Las medidas del color fueron tomadas de tres unidades experimentales, a las que se extraían tres granos de cacao al azar que fueron cortados en forma longitudinal para apreciar el estado interno de cada grano y calificarlo. El promedio de lectura de las nueve muestras fue tomado en cuenta para la comparación. Las lecturas L\*, a\* y b\* fueron registradas por el colorímetro Minolta® CR-400. Los cambios de color  $\Delta E^*$  se calcularon por la ecuación (12):

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

En la operacionalidad de variables se tratará de establecer el grado de correlación que existe entre las variables independiente y dependiente. La variable independiente está representada por (X1: % de proteasa 0,25% y 0.50% y X2: % de Polifenoloxidasa 0,25% y 0.50%). La variable dependiente está representada por Y1 = Calidad del cacao y sus indicadores. (Y11 = Aceptabilidad, Y12 = Concentración de polifenoles y Y13 =  $\Delta E$  variación del color). A estas variables se medirán el efecto de las variables independientes en la mejora de su calidad.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se caracterizó físicamente y químicamente al cacao fino de aroma conocido como cacao criollo procedente del distrito de Sivia, que representa un 70% aproximadamente de la producción de granos de cacao de la región Ayacucho, fue sometido a un proceso de selección, quiebre y desgrane.

En la Tabla 3 se presentan las características físicas de los granos de cacao criollo utilizado en el presente estudio.

**Tabla 3.** Características físicas de los granos de cacao.

Características	Valor	D.S
Longitud (mm)	24.70	1.2898
Diámetro (mm)	13.64	0.7018
Espesor (mm)	8.11	0.3355
Testa (%)	15.51	0.0055
Peso (g)	1.59	0.0343

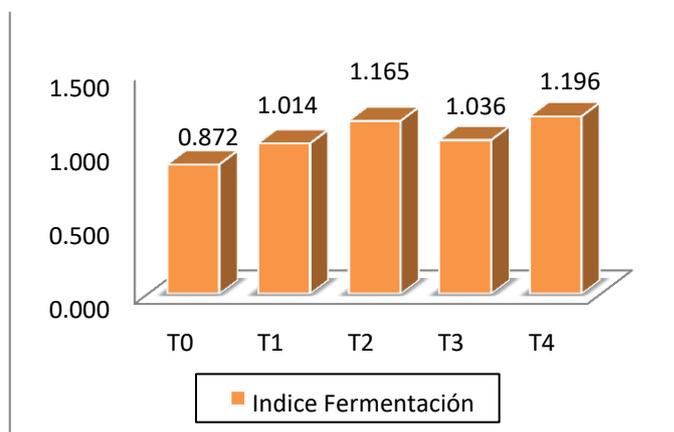
Los valores obtenidos de longitud, diámetro, espesor, peso y testa promedio de los granos de cacao, son inferiores a los reportados por (Arango, 2017); resultando superiores en longitud, diámetro y testa e inferior en espesor a los reportados por (Andrade, et al., 2019).

**Tabla 4.** Composición físico química de los granos de cacao.

Variabes	Unidades	Criollo	DS
Humedad	g	6.49	0.10583
Proteínas	g	12.53	0.05132
Cenizas	g	2.96	0.10536
Fibra	g	3.20	0.39051
Carbohidratos	g	29.73	0.75719
Grasa	g	45.02	0.37072

Los valores obtenidos muestran cierta variabilidad, resultando superiores en el contenido de humedad, grasa y cenizas en comparación a los valores obtenidos por (Calderón, 2002; López, 2015). Resultando el contenido de proteínas y carbohidratos inferior a los obtenidos por (Andrade, et al., 2019).

Los valores del índice de fermentación obtenidos en los tratamientos en estudio nos permitieron determinar el índice de fermentación, cuyos calores se pueden observar en la figura 3.

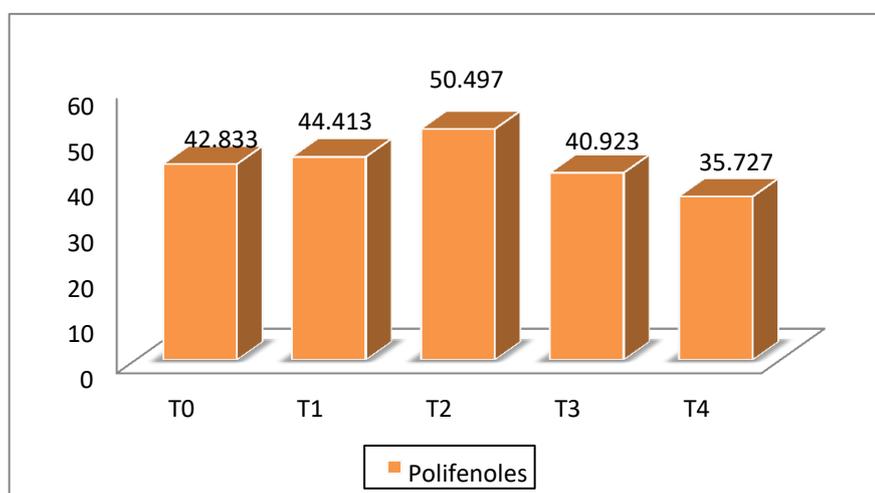


**Figura 3:** Índice de fermentación.

De acuerdo con los resultados se determinó que el tratamiento T0 (IF=0.872), alcanzó el menor índice, sin embargo los tratamientos que se utilizaron enzimas como las proteasas, a medida que se incrementó su concentración estos mejoraron sus valores de IF, sin embargo a medida que se incrementó la concentración de polifenoloxidasas los valores de IF mejoraron, resultando como mejor tratamiento al T4 (IF=1.196), este comportamiento se fundamenta por lo mencionado por (Da Silva, 2001), quien manifiesta que la polifenoloxidasa reduce la astringencia lo que contribuye a mejorar el índice de fermentación.

En la evaluación del contenido de polifenoles se evaluó a los 4 tratamientos, los resultados de las Absorbancias a 760nm se presentan en la figura 4, en ella el tratamiento con mayor concentración de Polifenoles fue el T2 (0.25% [P] y 0.5% [PPO]), y el de menor concentración fue el T4 (0.5% [P] y 0.5% [PPO]), los resultados de ellos se pueden observar en la figura.4.

De acuerdo a los resultados, podemos indicar que las enzimas contribuyen a disminuir el contenido de polifenoles, debido a la posible solubilización en agua de los polifenoles presente en las semillas de cacao (Navia y Pazmiño, 2012).



**Figura 4:** Contenido de polifenoles.

En la evaluación de la variación de color, los granos de cacao luego se sometieron a los tratamientos en estudio, se determinaron los valores en el color (**AE**) de acuerdo a la influencia de los tratamientos.

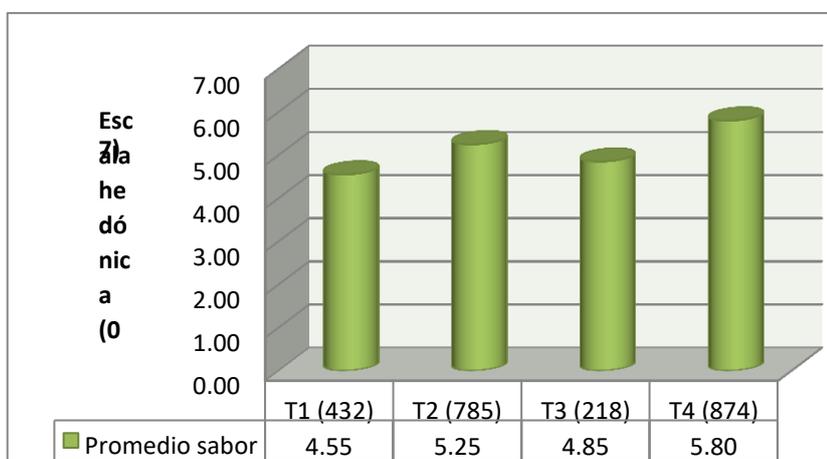
Los resultados obtenidos nos permiten ver el efecto de las enzimas en la mejora del color de las barras de chocolate, especialmente cuando se emplean enzimas, determinándose que las proteasas y la polifenoloxidasas cuando se incrementan su concentración las variaciones de color son más acentuadas, estos resultados se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5:** Color de los granos de haba de cacao.

Tratamiento_T1	L	a	b	AE
	26.87	22.93	12.67	36.61
T2	30.57	26.10	16.40	42.55
T3	37.73	22.77	16.97	47.80
T4	35.73	28.20	17.20	48.88
T0	15.90	17.13	-4.27	23.98

De los resultados obtenidos se puede afirmar que el tratamiento T4 (0.5% [P] y 0.5% [PPO]), alcanzó la mayor variación del color, esto debido al efecto de las enzimas proteasas y polifenoloxidasas en el proceso de fermentación, manifestando que a medida que se emplea mayor concentración de las enzimas el efecto es mayor, debido a la enzima polifenólica oxidasa promueve la oxidación en los granos de cacao, siendo la responsable del color marrón característico del chocolate. (Portillo et al., 2006).

En la evaluación de la aceptabilidad, los panelistas realizaron los respectivos análisis obteniendo un resultado sensorial para cada tratamiento aplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.



**Figura 5.** Evaluación sensorial a los productos obtenidos con los granos de cacao.

La adición de proteasas y polifenoloxidasas en el proceso de fermentación de cacao genera resultados favorables en el sabor y aroma en los granos y derivados de cacao, resultado un mejor efecto el T4(0.5% [P] y 0.5% [PPO]), en él se empleó el 0.5% de polifenoloxidasas, mejorando el sabor, especialmente el amargor en chocolates en tabletas, esto se basa que al adicionarle la enzima polifenol oxidasa (PPO) se está disminuyendo el contenido de amargor al tener la característica de reducir el amargor y astringencia presente en el cacao.(Portillo et al., 2006).



**Figura 6.** Muestras de tabletas de chocolate evaluadas.

Estos resultados fueron superiores a las obtenidas por (Arango, 2017), quien empleo levaduras, así mismo fueron similares a las obtenidas por (Navia y Pazmiño, 2012).

En el análisis estadístico se determinó diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ), por lo que se sometió a la prueba de tuckey, determinando el siguiente resultado (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de tuckey para el atributo aceptabilidad.

Ord.	Tratamiento	Promedio	Significación
1	T4 (874)	5.80	a
2	T2 (785)	5.25	a b
3	T3 (218)	4.85	b c
4	T1(434)	4.55	b c

### AGRADECIMIENTO

A la asociación de productores de cacao de la localidad de Sivia, así como a la UNSCH por su apoyo económico para realizar esta investigación.

### REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AOAC. (2007). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (18th ed.). Gaithersburg: Editorial William Horwitz.
- Andrade A.J., Rivera G.J., Chire G.F., Ureña P.M. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao *Theobroma cacao* L. de Ecuador y Perú.
- UNALM. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Enfoque UTE vol.10 no.4 Quito. oct./dic. 2019.
- Arango A.J. (2017). Evaluación del efecto de técnicas de fermentación en el sabor y aroma de cacao CCN51 (*Theobroma cacao* L.) en la zona de Tumaco-Nariño. Tesis de magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 71 pags.
- Calderon (2002). Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobromacacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad, (Tesis de Lic. En Química), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador, 2002, Pág. 114.
- ICCO, (2014). Informe anual 2007/08-2012/13. Organización Internacional del Cacao ICCO 2014. Londres, Reino Unido.
- González, M., Pérez, S., Palomino, C. (2012). Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. Actualización en nutrición, Venezuela. 13(4):314-331.
- Jiménez A, Gutiérrez G. Color. En: Alvarado J, Aguilera J, editores. (2001). Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Zaragoza: Acribia; 2001. pp. 325-46.
- Lopez O.B. (2015). Materiales de cacao de interés farmacológico (*Theobroma cacao* L.). Universidad Autónoma de Chiapas. 15 pags.
- Navia, O.A., Pazmiño, P.N, (2012). Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación. Tesis de grado. Escuela superior politécnica del litoral. Ecuador.
- Mayer AM. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*. 2006 Nov; 67 (21): 2318-2331.
- MINAGRI. (2016). Estudio del CACAO en el Perú y en el Mundo. Un análisis de la producción y el comercio. DGPA-DEEIA. Lima Peru. 90 pags.
- Portillo, L.; Graziani, L.; Cros, E. 2006. Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). Disponible en: Scielo\serial\fagro\v23n1 \body\art\_05.htm 20/06/2006.
- Teneda W.F. (2016) Mejoramiento del proceso de fermentación del Cacao (*Theobroma cacao* L.). Universidad Internacional de Andalucía. 140 pags.

## FOTOS DE LA INVESTIGACION



Foto 1. Pesado de las mazorcas de cacao.



Foto 2. Granos de cacao con las enzimas en estudio.