

## Determinación de azúcares en cacao durante la fermentación y torrefacción

### Determination of sugars in cocoa the fermentation and roasting

Zambrano, Alexis<sup>1</sup>; Romero, Carlos<sup>2</sup>; Gutiérrez, Marino<sup>3</sup>.

1. Laboratorio de Investigaciones y Análisis Químicos, Industriales y Agropecuarios (LIAQIA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela. E-mail: [alexisz@ula.ve](mailto:alexisz@ula.ve)

2. Laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

3. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) Mérida, Venezuela. Av. Urdaneta. Apartado Postal 425 Ipostel, Mérida estado Mérida, 5101-A, Venezuela.

Fecha de Inicio de la investigación: 09/2002

Fecha de terminación de la investigación: 04/2006

#### RESUMEN

En esta investigación, se presenta un estudio del contenido de glucosa, fructosa y azúcares totales en semillas de cacao Criollos, Forasteros e híbridos. Se consiguió que los azúcares simples representan 3 % del peso total. En las semillas frescas, el contenido de glucosa + fructosa no superó el 20 %. Los cacao Criollos exhibieron un descenso de azúcares totales ( $\geq 25$  %) y un aumento de glucosa + fructosa ( $\geq 40$  %) en el segundo día de fermentación, en los híbridos y Forasteros éste fenómeno comienza a partir del cuarto día.

**Palabras clave:** cacao Criollo, fermentación, torrefacción, azúcares, glucosa, fructosa.

#### ABSTRACT

In this researching, a study of the glucose, fructose, and total sugars contents of the cocoa beans from Criollo, Forasteros, and hybrid varieties was reported. Results have indicating that the simple sugars represented 3 % of the dry weight of mature cotyledons. The roasting process caused an additional loss up 50 %. In fresh seeds, the glucose and fructose contents did not exceed 20 % of the total. Criollos cacao exhibited a decline in total sugars ( $\geq 25$  %) and an increase in of glucose + fructose ( $\geq 40$  %) at the end of the second day of fermentation; while in hybrids and outsiders, this phenomenon starts from the fourth day.

**Keywords:** criollo cocoa, fermentation, roasting, sugar, glucose, fructose.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años el mercado del cacao resulta cada vez más exigente en cuanto a la uniformidad y las características aromáticas de la almendra de cacao. De este modo se abren nuevas oportunidades para los productores e investigadores de este rubro. A los primeros, les permitirá ofrecer un producto de calidad definida, capaz de satisfacer las necesidades del cliente y a los segundos les brinda un campo que aunque no es nuevo, aún requiere estudios detallados que definan criterios de calidad reproducibles en el cacao. La fermentación incluye dos fenómenos distintos pero no independientes: una fermentación microbiana de la pulpa que contribuye a eliminar la pulpa mucilaginoso presente alrededor de los granos y un conjunto de reacciones bioquímicas internas en las almendras (López y Quesnel 1971; Ziegler 1982), que llevan entre otras cosas a una profunda modificación de la composición fenólica (Villeneuve et al., 1989), la formación de los precursores de aroma que se consumirán en el tostado (Seiki, 1973; Voigt y Biehl 1995) y la formación de una fracción volátil (Gill *et al.*, 1985).

El análisis del cacao fermentado hasta ahora (por motivos técnicos), se realiza en granos secos, los procesos de fermentación y secado se evalúan por lo tanto conjuntamente sabiendo que siguen siendo difíciles de determinar sus influencias respectivas. El contenido de azúcares reductores, fructosa y glucosa, no representa después de la fermentación más que aproximadamente el 25 % del contenido inicial de sacarosa, el contenido de fructosa (0,2 - 0,4 %) siendo superior a la glucosa (0,07 - 0,1 %). Los contenidos de fructosa y glucosa son bajos pero equivalentes (0,02 - 0,04 %) para granos poco o no fermentados (Reineccius et al., 1972 citado por Cros, 1997). Generalmente, el contenido máximo de azúcares reductores se alcanza al cuarto día de fermentación (en cacaos Forasteros y Trinitarios), permanece constante y luego disminuye levemente al terminarse la fermentación (Bracco *et al.*, 1969). La cinética de estos compuestos indica que la sacarosa disminuye rápidamente hasta el cuarto día de fermentación y que entre los días 3 y 5 de fermentación, período durante el cual la acidez del medio es importante, son máximos los contenidos de precursores (Jeanjean 1995 citado por Cros, 1997). Sin que se hayan demostrado estos mecanismos aún, resulta verosímil que los azúcares reductores sean formados por la hidrólisis de los poliholosidos y de la sacarosa (Ziegler y Biehl, 1988).

El consumo de los precursores es función del nivel de fermentación del cacao, ya que son consumidos como sustrato por los microorganismos que intervienen en la fermentación. En el caso del cacao no fermentado, el tostado produce un consumo de los azúcares reductores de aproximadamente 50 %, un consumo de sacarosa muy variable según los cacaos y un consumo de aminoácidos libres del 10 al 30 %. El tostado del cacao bien fermentado lleva en cambio a un consumo prácticamente total de los azúcares reductores y del 30 al 40 % de los aminoácidos libres. Para un mismo grado de tostado, las cantidades máximas de precursores consumidas corresponden a cacaos fermentados, entre el tercer y cuarto día en lo

que concierne los azúcares reductores y entre cuatro y cinco días en lo que concierne los aminoácidos libres (Cros, 1997).

En este sentido, se han evaluado los niveles de azúcares en diferentes tipos de cacao, con el fin de evaluar tanto la calidad del cacao como el proceso post cosecha, en todos los casos, los parámetros químicos fueron corregidos en función de la humedad de la muestra durante el proceso de fermentación y relacionados con una muestra de cacao fermentado de Ghana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los frutos maduros se cosecharon de árboles sanos, pertenecientes a los siguientes tipos agronómicos de *Theobroma cacao L.*

**Criollos:** Porcelana (Estación Local Chama, Corpozulia Zulia), Guasare (Campo Experimental San Juan de Lagunillas, INIA – Mérida).

**Híbridos:** IMC-67 (Estación Experimental Ocumare de la Costa, INIA – Aragua) e ICS-1 (Estación Experimental Ocumare de la Costa, INIA – Aragua).

**Forasteros:** Cacao de Ghana (Muestra referencial).

### Preparación de la muestra

Las fermentaciones se realizaron en el Campo Experimental San Juan de Lagunillas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Mérida), parcela de localización del cacao Criollo CMSJ, en la población de San Juan de Lagunillas, municipio Sucre del estado Mérida, situada entre los 8° 28' 30'' y 8° 32' 00'' de latitud norte y entre los 71° 19' 00'' y los 71° 22' 30'' de longitud oeste, a una altitud de 1.150 m.s.n.m. y una temperatura media de 25 °C.

Las almendras se extrajeron de las mazorcas y se colocaron en cajones de madera dulce de 60 cm<sup>3</sup>, la masa de almendras se extendieron uniformemente dentro de éstos y se taparon con hojas de musáceas. Durante la fermentación se tomaron lecturas horarias de pH y temperatura en superficie, a 20 cm y 40 cm de profundidad. El volteo de la masa fermentante se realizó cada 24 horas (Criollos) y cada 48 horas (Forasteros y Trinitarios), durante tres y siete respectivamente. Al finalizar la fermentación, se inició el proceso de secado exponiendo las almendras al sol en plataformas de madera, preferiblemente durante las horas de la mañana, volteando el cacao cada hora, en forma homogénea todos los días.

Para la torrefacción, se tomaron 400 g de almendras y se dejaron tostar en una estufa de aire forzado cuyo tiempo y temperatura de tostado depende de las características de las semillas, tales como tipo de cacao (Criollo, Trinitario y Forastero), tamaño, aplicaciones industriales y evaluación sensorial por un panel de catadores (Ghizzoni, et al., 1995; Counet, *et al.*, 2004 y Sukha y Butler, 2006), de éste modo en este caso las características de torrefacción son:

- ✓ ICS-1, IMC-67 en este caso se tiene una combinación a 145 °C por 25 y 30 min.
- ✓ Guasare, Porcelana, se preparan licores a 110 °C por 25 min.

✓ Cacao de Ghana sólo se realizan licores a 145 °C por 30 min.

Las muestras son molidas y tamizadas ( $\leq 42$  mehs). Seguidamente las muestras son desengrasadas con éter de petróleo (Método analítico N° 37 IOCCC, 1996). Para la determinación de fructosa y glucosa se utilizó el método enzimático para análisis de alimentos Boehringer Mannheim R-Biopharm, 1984 y la concentración de azúcares totales a través del método propuesto por Dubois *et al.*, 1956, el cual consiste en la hidrólisis y deshidratación de los azúcares a furfurales en medio de  $H_2SO_4$  concentrado, los cuales al condensarse con fenol forman un cromóforo amarillo-naranja que absorbe entre 480 – 490 nm.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de evaluar la relación fructosa/glucosa en los diferentes tipos de cacao estudiados, se determinó la concentración de fructosa, glucosa y azúcares totales en los cotiledones frescos antes de la fermentación. En éste sentido, se consiguió que los azúcares totales oscilas entre 40-56 mg por gramo de muestra y experimenta fluctuaciones inferiores al 20 % entre las cosechas. Por otra parte, el contenido neto de glucosa más fructosa representa menos del 11 % y suelen encontrarse en proporciones similares (1,1) en las almendras sin fermentar. Del mismo modo, como se observa en la cuadro 1, los azúcares reductores tampoco representan un criterio para discriminar los tipos de cacaos estudiados.

Tabla 1. Contenido de azúcares en cotiledones frescos de dos tipos de cacao durante 3 cosechas.

Tipo	Cultivares	Cosecha	Glucosa (mg/g)	Fructosa (mg/g)	Azúcares totales (mg glucosa/g)	G+F (%)	F/G
Criollos	Porcelana	2002	1,39	1,48	40,6	7,2	1,1
		2003	2,72	3,49	56,0	11,1	1,3
		2004	1,86	2,38	41,2	10,3	1,3
		Media	1,99	2,45	45,9	9,5	1,2
		C.V (%)	± 34	± 41	± 19	± 19	± 9
	Guasare	2003	0,97	1,70	41,4	6,4	1,8
		2004	2,21	2,42	55,9	8,4	1,1
		Media	1,59	2,06	48,7	7,4	1,5
		C.V (%)	± 55	± 25	± 20	± 19	± 16
		Híbridos	ICS-1	2002	1,03	1,10	47,6
2003	1,41			1,49	41,1	7,0	1,1
2004	1,71			1,72	47,4	7,3	1,0
Media	1,38			1,44	45,4	6,3	1,1
C.V (%)	± 25			± 22	± 8	± 25	± 5
IMC-67	2003		0,94	0,76	53,3	3,2	0,8
	2004		0,94	0,95	50,7	3,7	1,0
	Media		0,94	0,86	52,0	3,5	0,9
	C.V (%)		± 0	± 16	± 4	± 10	± 16

En el tabla 2, se observa que durante la fermentación el contenido de azúcares totales disminuye al menos 25 %, dicha pérdida supera el 50 % cuando se trata de los híbridos que fueron sometidos a un periodo de fermentación más prolongado (IMC-67 e ICS-1). Resultados similares señalan Nogales et al., (2006) al evaluar los cambios físicos y químicos durante el secado al sol de granos de cacao híbridos fermentados en dos diseños fermentadores de madera diferentes.

Paralelamente, los niveles de glucosa y fructosa se incrementaron dos y ocho veces dependiendo del tipo de cacao. Circunstancialmente, la proporción de fructosa tiende a incrementarse (1,5 veces) sobre la glucosa mientras avanza el proceso fermentativo. Por otra parte, cabe destacar el predominio casi absoluto de los azúcares reductores ( $\geq 45$  %) en las almendras fermentadas. De acuerdo con estos resultados, el porcentaje de azúcares reductores serviría como un criterio objetivo para evaluar el grado de fermentación del cacao, independientemente de su origen. Éste parámetro ya fue examinado por Rohan y Stewart, (1967) pero su alcance y versatilidad viene a confirmarse ahora, abriendo la posibilidad de clasificar el cacao comercial según la calidad del beneficio en forma rápida y sencilla. A diferencia del índice de color rojo, cuya validez se restringe a cacaos pigmentados (híbrido y Forastero), el porcentaje de azúcares reductores puede aplicarse también a los cacaos claros (Criollo). De aquí se desprende que el uso de este parámetro podría generalizarse en el futuro.

En las figuras 1 y 2, se observa como varían las concentraciones de fructosa y glucosa durante la fermentación de las almendras de cacao, sin embargo, no presentan un criterio que permita discriminar entre los diferentes tipos de cacao estudiados. No obstante, la representación de la relación fructosa/glucosa en función del tiempo de fermentación puede ser usada como un criterio para evaluar la fermentación del cacao, ya que dicha relación se incrementa al transcurrir el tiempo de fermentación como consecuencia del aumento de concentración de los azúcares reductores.

Tabla 2: Variación del contenido de azúcares en los cotiledones de tres tipos de cacao durante la fermentación del primer ciclo de cosecha del 2004.

Tipo	Cultivares	Tiempo (días)	Glucosa (mg/g)	Fructosa (mg/g)	Azúcares totales (mg glucosa/g)	G+F (%)	F/G
Criollos	Porcelana	0	1,86	2,38	41,2	10,3	1,3
		1	3,24	2,89	30,6	20,0	0,9
		2	4,38	5,47	30,0	32,8	1,2
		3	6,77	7,64	30,6	47,1	1,1
		$\Delta x/x_i$	+ 2,6	+ 2,2	- 26 %	+ 3,6	- 15 %
	Guasare	0	2,24	2,46	55,9	8,4	1,1
		1	2,28	2,48	45,4	10,5	1,1
		2	6,70	11	34,3	51,6	1,6
		3	11,70	19,09	35,7	86,2	1,6
		$\Delta x/x_i$	+ 4,2	+ 6,8	- 36 %	+ 9,3	+ 60 %

Híbridos	ICS-1	0	1,71	1,72	47,4	7,3	1
		2	3,81	4,39	35,2	23,3	1,2
		4	8,04	12,34	23,4	87,1	1,5
		7	8,84	8,81	23,6	74,9	1
		$\Delta x/x_i$	+ 4,2	+ 4,1	- 50%	+ 9,3	+ 45%
	IMC-67	0	0,94	0,95	50,7	3,7	1
		2	2,97	3,41	41,2	15,5	1,2
		4	6,38	9,12	22,7	68,4	1,4
		7	5,49	8,40	17,3	80,4	1,5
		$\Delta x/x_i$	+ 4,8	+ 7,8	- 66 %	+ 20,7	+ 50%
Forastero	Ghana*	2002	0,84	7,20	17	47,4	8,6
		2003	1,06	8,96	23,4	42,8	8,4
		C.V (%)	$\pm 16$	$\pm 15$	$\pm 22$	$\pm 7,2$	$\pm 1,7$

\* Muestra del séptimo día fermentación.

Como se indica en la tabla 3, el contenido de azúcares totales disminuye cerca de 35 % durante la fermentación, seguido por un 31 % después de la torrefacción, el cual puede variar de acuerdo a las exigencias de la industria, es decir, el tiempo y temperatura de tostado determinaran dicha reducción en función de la concentración de compuestos de aroma deseados. En conjunto ambos procesos ocasionan un descenso neto superior a la 50 % en el contenido inicial, éstos resultados contrastan con los reportados por Brito *et al.*, (2000) como consecuencia del incremento de azúcares libres durante el secado, lo cual no se consiguió en esta investigación. No obstante, la reducción final durante la torrefacción se debe exclusivamente a las diferentes reacciones de Millar (Brito *et al.*, 2000 y Cros, 1997).

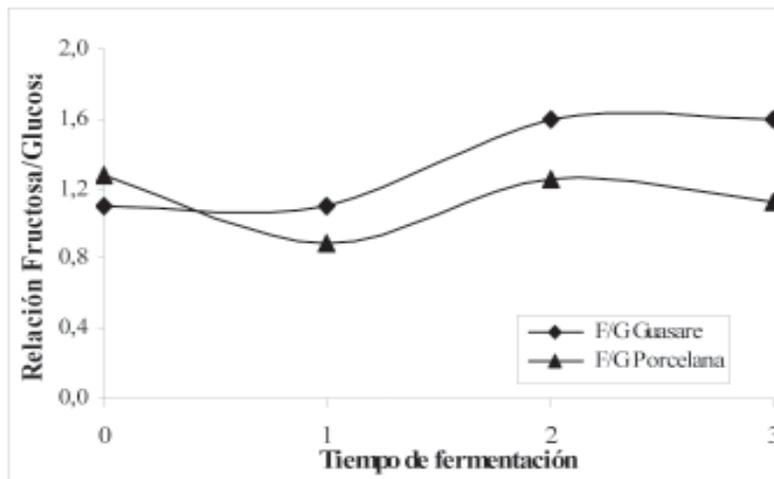


Figura 1. Variación de la relación F/G durante la fermentación de cacao criollo

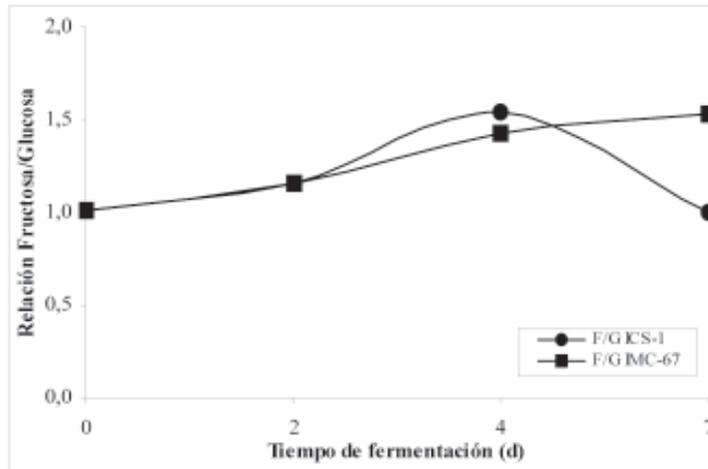


Figura 2. Variación de la relación F/G durante la fermentación de cacaos híbridos

Tabla 3: Variación del contenido de azúcares totales en los cotiledones de dos tipos de cacao durante la fermentación y torrefacción.

Tipo	Cultivares	Tiempo de tostado (min)	Fresca (mg glucosa/g)	Fermentada (mg glucosa/g)	Tostada (mg glucosa/g)	$\Delta X$ (%)
Criollo	Porcelana	25	60	38,4	30,2	-29,8
		$\Delta x/x_i$	100	-36	-21	-50
	Guasare	25	56	38	23,4	-32,6
		$\Delta x/x_i$	100	-32	-38	-58
Híbrido	ICS-1	25	50,2	31,8	20,8	-29,4
		30			21,2	-29
		$\Delta x/x_i$	100	-37	-35	-58
					-33	-58

Comparando los resultados de azúcares totales con otras investigaciones realizadas en Venezuela y considerando que en ambos casos la fermentación ha sido completa se tiene que los cacaos Criollos antiguos (Porcelana y Guasare), al igual que los clones ICS-1 e IMC-67, presentan mayores contenidos de azúcares que algunos híbridos de la región de Cuyagua, estado Aragua (Álvarez *et al.*, 2007), no obstante la variabilidad entre genotipos parece mantenerse constante tanto para híbridos como Criollos.

Se requiere continuar con las investigaciones en este sentido, la creación de una base de datos de contenidos de azúcares en las diferentes etapas post

cosecha y torrefacción del cacao así como el desarrollo de un algoritmo que permita describir el comportamiento de los azúcares podría usarse como criterio de calidad en el cacao.

### CONCLUSIONES

Los cacaos Criollos presentan mayores contenidos de azúcares al final de la fermentación que los cacaos híbridos (Trinitarios) y Forasteros.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la almendra fresca de cacao posee bajos niveles de fructosa y glucosa, que se incrementan de manera desigual durante el proceso fermentativo, constituyendo los azúcares mayoritarios al finalizar dicho proceso.

La relación fructosa/glucosa en función del tiempo de fermentación y un alto porcentaje de azúcares reductores podrían ser usados para determinar el grado de fermentación del cacao comercial.

### REFERENCIAS

- Álvarez C., Pérez, E. y Lares, M. 2007. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. *Agronomía Trop.* 57(4): 249-256.
- Bracco, U., Grailhe N., Rostagno, W. y Egli, R.H. 1969. Analytical evaluation of cocoa curing in the ivory coast. *J. Sci. Food Agric.*, 20, 713-715.
- Brito, E., N. Pessoa, M. Gallao, A. Cortelazzo, P. Feveiro y M. Braga. 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation, drying and roasting. *J. Sci. Food Agric.* 8: 281-288.
- Cros, E. 1997. Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. Maracay, Venezuela. CD, Maracay estado Aragua - Venezuela.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D. y Collin, S. 2004. Relationship between Procyanidin and Flavor Contents of Cocoa Liquors from Different Origins. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6243-6249
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Robers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-355.
- Ghizzoni, C.; Del Popolo, F.; Colombo, E.; Porretta, S. 1995. Composition of volatile fraction of industrial chocolate. *Ital. Food BeVerage Technol.* 5, 3-13.
- Gill, M. S., MacLeod A. J. y Moreau M. 1985. Aroma components of cocoa beans. Proceedings of the 4th Weurman Flavour Research Symposium, ADDA J. Ed. Dourdan (France). In: *Development in Food Science (1985)*, Elsevier, Amsterdam, 10, 261-266.

- International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionary. 1996. Determination of the Fat Content of Cocoa Powder by Soxhlet Extraction. IOCCC. Analytical Method N° 37.
- López, A. y Quesnel V.C. 1971. An assesment of claims relantry to the production and composition of chocolate aroma. *Rev. Int. Choc.*, 26, 19-24.
- Nogales, J., Graziani de Fariñas, L. y Ortiz de Bertorelli, L. 2006. Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. *Agronomía Trop.* 56 (1): 5-20.
- Rohan, T. y Stewart, T. 1967. The precursors of chocolate aroma: production of reducing sugars during fermentation of cocoa beans. *J. Food. Sci.* 32: 399-401.
- Seiki, K. 1973. Chemical changes during cocoa bean fermentation using the tray method in Nigeria. *Rev. Int. Choc.*, 28, 38-42.
- Sukha, D. y Butler, D. 2008. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology.* 226 (3): 405-413
- Villeneuve, F., Cros, E. y Macheix J.J. 1989. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. III. Evolution des flavan-3-ols de la fève. *Café, Cacao, Thé*, 33, 165-170.
- Voigt J. y Biehl B. 1995. Precursors of the cocoa-specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolitic processing. *Rev. Bot. Acta*, 108, 299-307.
- Ziegleder, G. 1982. Highly volatile cocoa flavour constituents as indicator during cocoa processing. *Review of Chocolate, Confectionnary and Bakery*, 7, 17-22.
- Ziegleder, G. y Biehl, B. 1998. Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. En: *Analysis of non alcoholic beverages*. Ed: Linskens H.F. y Jackson J.F. *Modern methods of plant analysis-New series*, Springer - Verlag, Berlin, pp 321 - 393.