UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE GRANOS DE CACAO CCN-51 FERMENTADO CON BROMELINA Y LACCASA: APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS Y PERFILES ESPECTRALES

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Autoras:

Bach. Yohana Guevara Irigoin

Bach. Karla Jennifer Martinez Santos

Asesor:

Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce

Co-asesor:

Dr. Wilson Manuel Castro Silupu

Línea de investigación: LI_IIA_ 03 Ingeniería de Procesos Alimentarios

JAÉN, PERÚ

2026

Guevara Irigoin Yohana Y Martinez Santos Karla J.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE GRANOS DE CACAO CCN- 51 FERMENTADO CON BROMELINA Y LACCASA: APLICACIÓN DE...

Quick Submit

Quick Submit

Universidad Nacional de Jaen

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid:::1:3680513927

Fecha de entrega
15 oct 2026, 3:25 p.m. GMT-5

Fecha de descarga
15 oct 2026, 3:32 p.m. GMT-5

Nombre del archivo
ENNIFER_INFORME_FINAL_TESIS_-_KARLA_JENNIFER_MARTINEZ_SANTOS.pdf

Tamaño del archivo
5.9 MB

80 páginas

18.474 palabras

97.947 caracteres

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN
Dra. María Marleni Torres Cruz
Responsable de la Unidad de Investigación
de la Facultad de Ingeniería

turnitin Página 1 de 83 - Portada Identificador de la entrega trn:oid:::1:3680513927

3% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

3%	Fuentes de Internet
1%	Publicaciones
1%	Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

Caracteres reemplazados
43 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN
Dra. María Marleni Torres Cruz
Responsable de la Unidad de Investigación
de la Facultad de Ingeniería

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN

Ley de Creación N° 29304

FORMATO 03: ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Jaén, el día 01 de octubre del año 2026, siendo las 12:00 horas, se reunieron los integrantes del Jurado:

Presidente : Dr. Hubert Luzdemio Arteaga Miñano
Secretario : Dra. Eliana Milagros Cabrejos Barrios
Vocal : Dr. Gary Charly García Guevara

para evaluar la Sustentación de:

( ) Trabajo de Investigación
(X) Tesis
( ) Trabajo de Suficiencia Profesional

Titulado: **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE GRANOS DE CACAO CCN-51 FERMENTADO CON BROMELINA Y LACCASA: APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS Y PERFILES ESPECTRALES"** presentado por las tesistas **Yohana Guevara Irigoin y Karla Jennifer Martínez Santos** de la Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Jaén.

Después de la sustentación y defensa, el Jurado acuerda:

(X) Aprobar ( ) Desaprobar ( ) Unanimidad (X) Mayoría

Con la siguiente mención:

a)	Excelente	18, 19, 20	( )
b)	Muy bueno	16, 17	( )
c)	Bueno	14, 15	( )
d)	Regular	13	(13)
e)	Desaprobado	12 ó menos	( )

Siendo las 13 : 20 horas del mismo día, el Jurado concluye el acto de sustentación confirmando su participación con la suscripción de la presente.

Jaén, 01 de octubre de 2026

Dr. Hubert Luzdemio Arteaga Miñano
Presidente

Dra. Eliana Milagros Cabrejos Barrios
Secretario

Dr. Gary Charly García Guevara
Vocal

“Año de la Esperanza y el Fortalecimiento de la Democracia”

ANEXO N°06:

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

DE LA TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)

Yo, Yohana Guevara Irigoin, egresado de la carrera Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Jaén, identificado (a) con DNI 72239583.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy Autor del trabajo titulado:

   “EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE GRANOS DE CACAO CCN- 51 FERMENTADO CON BROMELINA Y LACCASA: APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS Y PERFILES ESPECTRALES”
   Asesorado por Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce y Dr. Wilson Manuel Castro Silupu.
   El mismo que presento bajo la modalidad de Tesis para optar; el Título Profesional/Grado Académico de Ingeniero en Industrias Alimentarias.

2. El texto de mi trabajo final respeta y no vulnera los derechos de terceros, incluidos los derechos de propiedad intelectual. En el sentido, el texto de mi trabajo final no ha sido plagiado total ni parcialmente, para la cual he respetado las normas internacionales de citas y referencias de las fuentes consultadas.
3. El texto del trabajo final que presento no ha sido publicado ni presentado antes en cualquier medio electrónico o físico.
4. La investigación, los resultados, datos, conclusiones y demás información presentada que atribuyo a mi autoría son veraces.
5. Declaro que mi trabajo final cumple con todas las normas de la Universidad Nacional de Jaén.
6. Soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones universitarias y/o legales.

El incumplimiento de lo declarado da lugar a responsabilidad del declarante, en consecuencia; a través del presente documento asumo frente a terceros, la Universidad Nacional de Jaén y/o la Administración Pública toda responsabilidad que pueda derivarse por el trabajo final presentado. Lo señalado incluye responsabilidad pecuniaria incluido el pago de multas u otros por los daños y perjuicios que se ocasionen.

Fecha: Jaén, 14, octubre y 2026.



Bach. Yohana Guevara Irigoin

“Año de la Esperanza y el Fortalecimiento de la Democracia”

ANEXO N°06:

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

DE LA TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)

Yo, Karla Jennifer Martinez Santos, egresado de la carrera Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Jaén, identificado (a) con DNI 75908903.

Declaro bajo juramento que:

7. Soy Autor del trabajo titulado:

   “EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE GRANOS DE CACAO CCN- 51 FERMENTADO CON BROMELINA Y LACCASA: APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS Y PERFILES ESPECTRALES”
   Asesorado por Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce y Dr. Wilson Manuel Castro Silupu.
   El mismo que presento bajo la modalidad de Tesis para optar; el Título Profesional/Grado Académico de Ingeniero en Industrias Alimentarias.

8. El texto de mi trabajo final respeta y no vulnera los derechos de terceros, incluidos los derechos de propiedad intelectual. En el sentido, el texto de mi trabajo final no ha sido plagiado total ni parcialmente, para la cual he respetado las normas internacionales de citas y referencias de las fuentes consultadas.

9. El texto del trabajo final que presento no ha sido publicado ni presentado antes en cualquier medio electrónico o físico.

10. La investigación, los resultados, datos, conclusiones y demás información presentada que atribuyo a mi autoría son veraces.

11. Declaro que mi trabajo final cumple con todas las normas de la Universidad Nacional de Jaén.

12. Soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones universitarias y/o legales.

El incumplimiento de lo declarado da lugar a responsabilidad del declarante, en consecuencia; a través del presente documento asumo frente a terceros, la Universidad Nacional de Jaén y/o la Administración Pública toda responsabilidad que pueda derivarse por el trabajo final presentado. Lo señalado incluye responsabilidad pecuniaria incluido el pago de multas u otros por los daños y perjuicios que se ocasionen.

Fecha: Jaén, 14, octubre y 2026.



Bach. Karla Jennifer Martinez Santos

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN 11
ABSTRACT 12
I. INTRODUCCIÓN 13
II. MATERIAL Y MÉTODOS 17
2.1. Lugar de ejecución 17
2.2. Materiales 17
2.3. Procedimientos 17
2.3.1. Método de análisis 21
2.3.1.1. Porcentaje de Humedad 21
2.3.1.2. Análisis de pH 22
2.3.1.3. Determinación del color instrumental y de la diferencia total de color 22
2.3.1.4. Adquisición y procesamiento de imágenes hiperespectrales 24
2.3.2. Diseño de la investigación 28
2.3.3. Análisis estadístico de datos 31
III. RESULTADOS 32
3.1. Determinación de características fisicoquímicas 32
3.2. Perfiles de datos a través de la aplicación del espectro NIR 33
3.3. Validación de modelo predictivo 34
3.3.1. Modelo predictivo PLSR 34
3.3.2. Modelo predictivo de Redes Neuronales (Perceptrón multicapa) 36
IV. DISCUSIÓN 41
4.1. Efecto de enzimas oxidativas y proteolíticas sobre características fisicoquímicas del grano fermentado 41
4.2. Sensibilidad espectral y capacidad informativa de perfiles Vis-NIR preprocesados 46
4.3. Comparación quimiométrica entre los modelos lineales y los no lineales 49
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 51
5.1. Conclusiones 51
5.2. Recomendaciones 52
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
AGRADECIMIENTO 63
ANEXOS 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de enzimas en la fermentación del cacao previo al estudio .. 20
Tabla 2. Esquema del diseño completamente aleatorizado (DCA) para la evaluación de bromelina y laccasa en la fermentación del cacao CCN-51 28
Tabla 3. Perfiles espectrales suavizados-normalizados para pH, humedad y color L* a* b* en el día 4 33
Tabla 4. Gráficos de dispersión para entrenamiento y validación de los parámetros predichos por PLSR 35
Tabla 5. Gráficos de dispersión para entrenamiento y validación de los parámetros predichos por red neuronal perceptrón multicapa. 37
Tabla 6. Comparación de desempeño PLSR vs ANN 40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del punto de recolección de mazorcas de cacao CCN-51 en Potrerillo, Las Lomas, Piura, Perú. 18
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso fermentativo. 19
Figura 3 Arquitectura de la red neuronal de ajuste de funciones (FITNET) empleada para predecir las propiedades fisicoquímicas del cacao CCN-51 a partir de perfiles espectrales preprocesados. 27
Figura 4 Esquema metodológico completo del diseño completamente aleatorizado (DCA) aplicado a la fermentación enzimática del cacao CCN-51 y su modelado hiperespectral mediante PLSR y ANN..... 30
Figura 5. pH y contenido de humedad al final de la fermentación de cacao en respuesta a diferentes combinaciones de bromelina y laccasa en el sexto día de fermentación. 33

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Diseño y construcción de los cajones fermentadores 64
Anexo B: Obtención y preparación de los granos de cacao para la fermentación 66
Anexo C: Fichas técnicas de las enzimas 69
Anexo D: Incorporación de enzimas y monitoreo fisicoquímico del proceso fermentativo 72
Anexo E: Adquisición y procesamiento de imágenes hiperespectrales 77
Anexo F: Registro de las temperaturas promedio de la masa de cacao CCN-51 durante la fermentación 79
Anexo G: Análisis estadístico 80

RESUMEN

La fermentación tradicional del cacao presenta variabilidad que dificulta la estandarización de la calidad del grano. El objetivo fue evaluar el efecto de la bromelina y la laccasa sobre las características fisicoquímicas de granos de cacao CCN-51 y determinar la capacidad de los perfiles espectrales para predecir dichas propiedades. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos: cuatro combinaciones enzimáticas de bromelina y laccasa a concentraciones de 0.36 y 1.14 %, y un control sin adición enzimática. Durante los 0, 2, 4 y 6 días se determinaron pH, humedad, color instrumental, y se adquirieron las imágenes con una cámara hiperespectral. Los perfiles espectrales fueron preprocesados haciendo uso del filtro Savitzky-Golay y normalización SNV, donde los modelos de regresión se desarrollaron mediante el modelado de mínimos cuadrados parciales y redes neuronales artificiales. Los tratamientos que presentaron mayor concentración de laccasa (1.14 %) lograron menores resultados de pH en el día 6 (5.90), y la luminosidad (L*) fue diferente entre tratamientos durante el día 4 (menor valor en A2B2, 50.41) mientras que la variación total de color (ΔE, 1.78-6.05) no obtuvo diferencias significativas. Por su parte, las redes neuronales lograron excelentes resultados con los coeficientes de determinación de validación 0.919, 0.942, 0.766, 0.837 y 0.790 tanto para pH, humedad, luminosidad, intensidad de rojo y amarillo. Se concluye que la adición enzimática cambió el pH y el color del grano, donde el análisis espectral NIR mostró un buen potencial para el monitoreo no destructivo en el grano de cacao CCN-51.

Palabras clave: aprendizaje automático, monitoreo no destructivo, oxidación enzimática, procesamiento postcosecha, propiedades fisicoquímicas.

ABSTRACT

Traditional cocoa fermentation exhibits variability that hinders the standardization of bean quality. The objective was to evaluate the effect of bromelain and laccase on the physicochemical characteristics of CCN-51 cocoa beans and to determine the ability of spectral profiles to predict these properties. A completely randomized design with five treatments was applied: four enzymatic combinations of bromelain and laccase at concentrations of 0.36% and 1.14%, and a control without enzyme addition. pH, moisture content, and instrumental color were determined, and images were acquired using a hyperspectral camera, at 0, 2, 4, and 6 days. Spectral profiles were preprocessed using the Savitzky-Golay filter and SNV normalization, while regression models were developed using partial least squares modeling and artificial neural networks. Treatments with the highest laccase concentration (1.14%) yielded lower pH values on day 6 (5.90), and lightness (L*) differed among treatments on day 4 (lowest value in A2B2: 50.41), whereas total color variation (ΔE: 1.78–6.05) showed no significant differences. Neural networks achieved excellent results, with validation coefficients of determination of 0.919, 0.942, 0.766, 0.837, and 0.790 for pH, moisture, lightness, and red and yellow intensity, respectively. It is concluded that enzymatic addition altered the pH and color of the bean, and that NIR spectral analysis demonstrated good potential for the non-destructive monitoring of CCN-51 cocoa beans.

Keywords: machine learning, non-destructive monitoring, enzymatic oxidation, postharvest processing, physicochemical properties.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) forma parte de uno de los cultivos agroindustriales de mayor relevancia económica y social a nivel mundial. En el contexto peruano, el cultivo de cacao es una fuente de ingresos para millones de pequeños productores en diversas regiones tropicales, destacando mayormente el clon Castro naranjal (CCN-51) por su elevada productividad y resistencia agronómica (Guzmán et al. 2023). De acuerdo con los datos del International Trade Centre (TradeMap, 2025), las exportaciones mundiales de cacao (comercio internacional de granos de cacao HS 1801) alcanzaron 11.96 millones de toneladas en 2024, mientras que el Perú exportó 102590 toneladas, equivalentes al 0.86 % del total global, su participación más alta en el último quinquenio. La competitividad a nivel nacional continúa limitada por la variabilidad en la calidad del grano asociada a prácticas de postcosecha.

La fermentación es un punto crítico en la determinación de la calidad del grano del cacao, porque durante el proceso se producen transformaciones bioquímicas que influyen directamente en los parámetros fisicoquímicos como pH, humedad y color interno del grano, induciendo la muerte del embrión, permitiendo el cambio del color y reduciendo el amargor (Ibrahim et al. 2024; ISO, 2018; Kouamé et al. 2021). En métodos tradicionales de fermentación, el control es limitado generando procesos heterogéneos (Balcázar et al. 2023), produciendo fermentaciones incompletas o excesivas y defectos de color que afectan negativamente al grano final (Caporaso et al. 2018).

El control de la fermentación del cacao se basa en técnicas destructivas como la prueba de corte y análisis fisicoquímicos convencionales, que demandan tiempo, son laboriosas y poco eficientes para evaluaciones continuas (ISO, 2018). La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) y visible (Vis-NIR) permite monitoreo rápido mediante análisis en línea, preparación mínima de muestra, métodos no destructivos y sin reactivos químicos (Cruz et al. 2020; Pinto et al. 2024). Las herramientas quimiométricas como la regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares Regresion – PLSR) y las redes neuronales artificiales (Artificial Neural Networks – ANN) forman métodos no destructivos y objetivos para evaluar la calidad del grano de cacao, creando relaciones entre las prácticas postcosecha y los perfiles fisicoquímicos (Krähmer et al. 2015; Velásquez et al.

2025). Las técnicas aclaran datos complejos e identifican patrones en el proceso de fermentación, superando las deficiencias de los métodos tradicionales siendo subjetivos y consumen bastante tiempo.

Las enzimas de interés tecnológico ayudan la degradación del mucílago y la acidificación del cotiledón durante la fermentación (Morales et al. 2024), la bromelina (DIS-2016), es una proteasa vegetal extraída del tallo de la piña (*Ananas comosus*) que optimiza el pardeamiento interno del grano de cacao y brinda el color estable y uniforme (Biocatalysts, 2023; Kumar et al. 2024). Por su parte, la laccasa (EC 1.10.3.2), es una enzima oxidativa de la familia del polifenol oxidasas, que transforma compuestos fenólicos produciendo el color marrón característico de los granos bien fermentados mediante la oxidación del cotiledón, iniciando colores firmes de púrpura a marrón (Conigliaro et al. 2023; Couto y Herrera, 2006; Hahn, 2023; Hilgers et al. 2018; Sondhi et al. 2023). Pese al potencial de cada enzima, existe evidencia científica limitada sobre la adición combinada de bromelina y laccasa durante el proceso fermentativo del cacao CCN-51.

Ruiz et al. (2024) evaluaron la fermentación del cacao por 120 horas, registrando un descenso del pH y alza térmica. Durante la fase 1, el pH bajó de 7.0 a 6.5 debido a la actividad de bacterias y levaduras. En la etapa intermedia, la acidificación se intensificó alcanzando valores de pH entre 5.3 y 5.5. En la última etapa, se estabilizó el pH entre 5.0 y 5.3, un rango considerado óptimo para la calidad, lo cual facilitó la muerte del embrión y la activación del polifenol oxidasa.

Mougang et al. (2024) en su investigación determinó que el metabolismo microbiano redujo el pH del grano de cacao, convirtiendo los azúcares en ácidos orgánicos. Señalan que al pasar las 155.87 horas de fermentación y secado térmico, lograron un pH de 5.06, ubicandose en el rango ideal de 5.0 a 5.5 mejorando el potencial aromático. Disminuyeron la humedad del 60% al 7.49%, representando niveles inferiores al 7.5%.

Al Riza et al. (2023) usaron un modelo PLSR para predecir el pH y el Índice de Fermentación (IF) mediante colorimetría digital. Donde obtuvieron un porcentaje de humedad menor al 7.5% y el cambio cromático del color el marrón, característica de granos bien fermentados. En sus resultados concluyeron un pH

de 5.2-5.5 y un IF de 1.0, con una precisión del 99% en las predicciones. Al aplicar ese modelo evidenciaron errores mínimos (pH: 0.007 y IF: 0.0047), indicando de que es una alternativa justa a las estimaciones manuales.

Purbaningrum et al. (2023) en su investigación utilizaron enzimas de bromelina a través de hidrólisis en granos de cacao no fermentados. Dicha enzima brindo una actividad óptima a una temperatura de 50 °C y un pH de 6.0. Aplicaron concentraciones de 10.5 U/mL, logrando un grado de hidrólisis máximo del 42.95 %. Por otro lado, mencionan que los tiempos prolongados con dosis bajas conseguían la eficacia de concentraciones mayores.

Hariyadi et al. (2024) en su estudio aplico bromelina con la finalidad de acelerar el proceso fermentativo en el mucílago en café. Utilizaron concentraciones de enzima con una cantidad de 80% (p/v), incubaron las muestras de café por un tiempo de 24 horas a 4 °C. aplicaron el método Kunitz, establecieron una actividad enzimática total de 36 U/mL con un pH de 7.

En su investigación Morales et al. (2024) realizo el análisis del impacto de las enzimas polifenoloxidasa y *S. cerevisiae* durante la fermentación del cacao. La adición enzimática propició una acidificación más homogénea, logrando un pH ideal de 5.0 a 5.5. Lograron una transición cromática de la púrpura al marrón. La humedad se redujo por debajo del 7.5%, cumpliendo con los estándares internacionales de exportación.

Teye et al. (2015) examinaron la espectroscopía FT-NIR y modelos quimiométricos para calificar la fermentación del cacao. Utilizaron análisis convencionales de pH e índice de fermentación para validar estimaciones rápidas y no destructivas. Al optimizar datos espectrales con pretratamientos, compararon el desempeño de modelos lineales contra redes neuronales. Los sistemas no lineales lograron una precisión superior en la clasificación de calidad.

Cruz et al. (2020) aplicaron imágenes hiperespectrales NIR para evaluar la calidad de grano de cacao, utilizando 5 híbridos de cacao forastero fermentados durante 6 días y secados al sol por 4 días, almacenados a 25°C. La aplicación del modelo de SVM mostró una mejora significativa en la predicción de calidad respecto a los modelos PLS-DA que presentaron un error de 4.4 al 34.4%, logrando una correcta clasificación del 50-100%.

Velásquez et al. (2025) establecieron que las herramientas quimiométricas resultan fundamentales para establecer relaciones entre las prácticas postcosecha y los perfiles químicos del cacao. Estas técnicas permiten obtener una comprensión global e integrada de los factores que determinan la calidad del grano, facilitando la interpretación de datos complejos mediante análisis metagenómico y quimiométrico en la etapa de fermentación.

Caporaso et al. (2018) aplicaron la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) utilizando imágenes hiperespectrales para predecir de manera cuantitativa el índice de fermentación, polifenoles totales y la actividad antioxidante en granos de cacao fermentados secos individuales. El escaneo de granos evidenció que es una técnica no destructiva y rápida que permite la cuantificación de tres parámetros relacionados con la calidad.

El objetivo general de la investigación fue evaluar la calidad de granos de cacao CCN-51 fermentados con bromelina y laccasa mediante la aplicación de herramientas quimiométricas y el análisis de perfiles espectrales. Para lograr esto, se buscó: 1) determinar las características fisicoquímicas (humedad, pH, color instrumental) del grano de cacao CCN-51 fermentado con bromelina y laccasa, 2) obtener los perfiles de datos a través del espectro NIR de las muestras de los granos de cacao CCN-51 fermentados y aplicar los pretratamientos espectrales, y 3) desarrollar y validar un modelo predictivo usando herramientas quimiométricas (PLSR y ANN) y perfiles espectrales en base a las características fisicoquímicas determinadas en la calidad del grano de cacao.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

El proceso experimental respecto a la fermentación del cacao se realizó en la vivienda ubicada en Nuevo Horizonte – Nueva Sullana. Para los análisis fisicoquímicos de Humedad, pH y color instrumental se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Inocuidad de Alimentos en la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias y Biotecnología de la Universidad Nacional de Frontera - Sullana. La evaluación de granos frescos fermentados se realizó mediante la cámara hiperespectral Pika NIR – 640 – Resonon en el Laboratorio de imágenes y para la extracción de datos de los perfiles espectrales en el Laboratorio de Software en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Inocuidad de Alimentos de la misma Universidad.

2.2. Materiales

Las mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L., clon CCN-51) fueron cosechadas en el caserío de Potrerillo, distrito Las Lomas, Piura, Perú (UTM WGS84, Zona 17S: 532,847 m E; 9,483,621 m N; 240 m s. n. m.) (Figura 1). Se emplearon bromelina y laccasa, en presentación comercial en polvo (Creative Enzymes, Shirley, Nueva York, EE. UU.), incorporadas al inicio de la fermentación (fichas técnicas en Anexo C1 y Anexo C2, respectivamente).

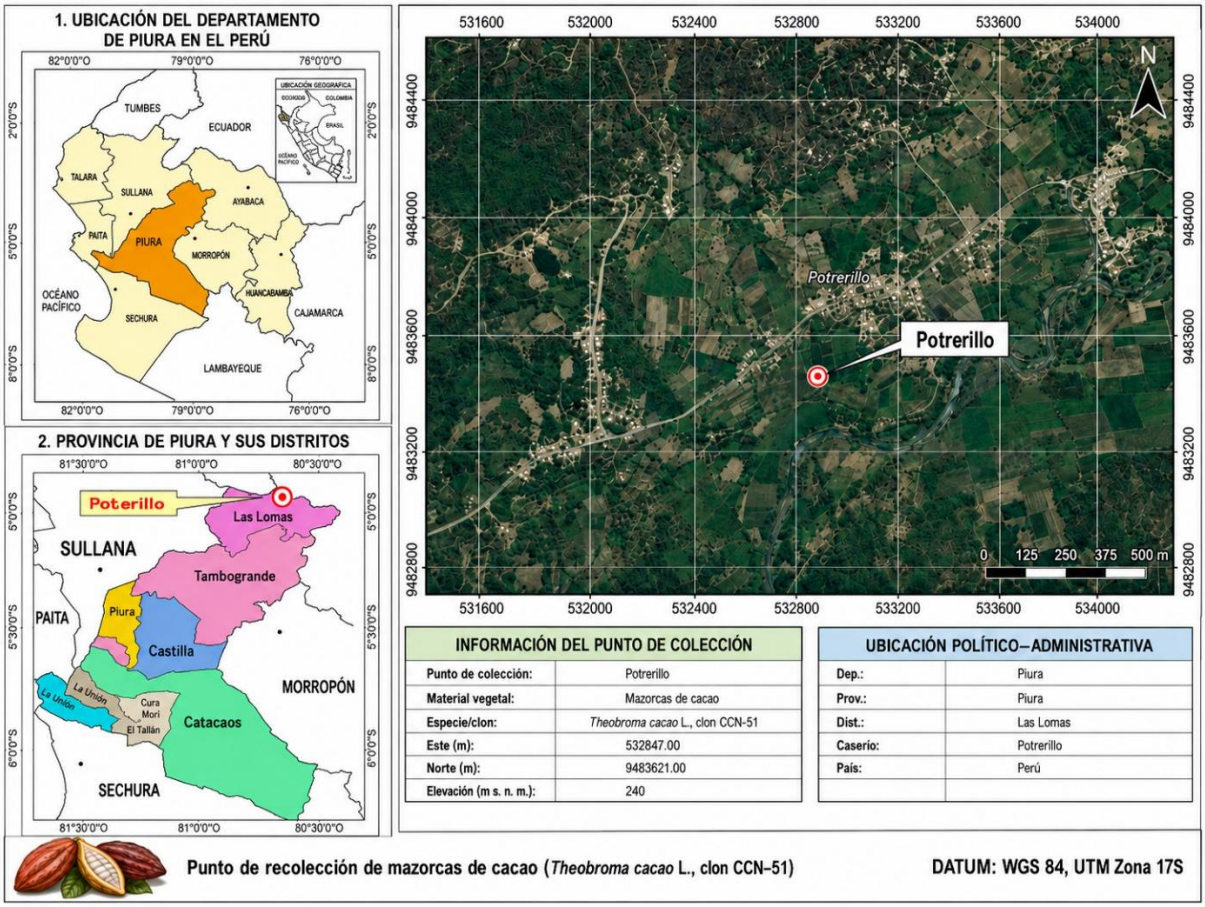
2.3. Procedimientos

a. Cosecha y selección de la materia prima

Se cosecharon 400 mazorcas de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* L.) en óptimas condiciones de madurez, seleccionadas con base en la ausencia de daños físicos o causados por plagas y en una coloración de cáscara uniforme entre rojo-anaranjado y rojo intenso, criterio visual indicativo de madurez plena en este clon (Guzmán et al. 2023; Hartuti et al. 2020), dado que el estado fisiológico del fruto determina la eficiencia fermentativa de la variedad (Vásquez et al. 2025). Las mazorcas seleccionadas se colocaron en sacos de yute y se trasladaron hasta Nueva Sullana (Nuevo Horizonte) (Figura B1, Anexo B). El proceso completo se ilustra en la Figura 2.

Figura 1.

Ubicación geográfica del punto de recolección de mazorcas de cacao CCN-51 en Potrerillo, Las Lomas, Piura, Perú.



Nota: Ubicación del punto de recolección de las muestras de cacao (*Theobroma cacao* L., clon CCN-51) ubicado en Potrerillo, distrito de Las Lomas, Piura, Perú. La imagen satelital se utilizó como referencia cartográfica del área de estudio.

b. Recepción en el laboratorio

400 mazorcas fueron recepcionados semanalmente (03 semanas, una por repetición) y trasladadas al Laboratorio de Investigación en Inocuidad de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias y Biotecnología de la Universidad Nacional de Frontera, Sullana, donde se realizaron las etapas subsiguientes del proceso.

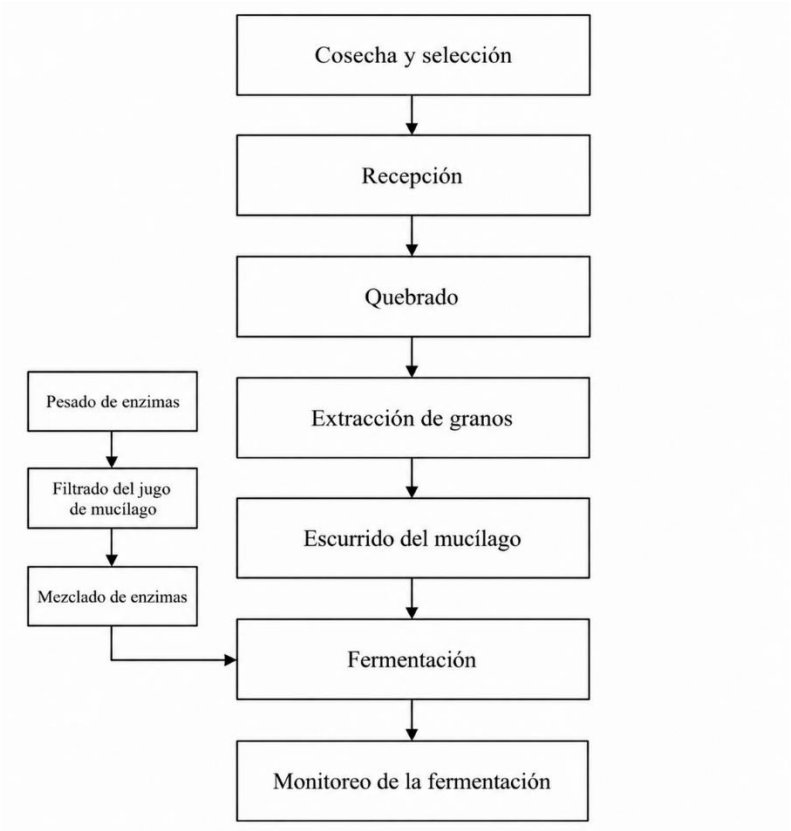
c. Quebrado, extracción de granos y escurrido del mucílago

Las mazorcas se quebraron con un cuchillo limpio y desinfectado, mediante un corte diagonal que evitó dañar los granos, y estos se extrajeron manualmente

separándolos de la cáscara. Se obtuvieron 25 kg de granos frescos con mucílago (Figura B2, Anexo B), los cuales se colocaron en sacos de poliestireno limpios y secos, protegidos del ingreso de insectos, y se dejaron reposar durante 10 horas para permitir el escurrido natural del mucílago excedente previo a la fermentación, de la semana correspondiente.

Figura 2.

Diagrama de flujo del proceso fermentativo.



d. Fermentación

Los granos escurridos se sometieron al proceso fermentativo en cajones de madera de bolaina blanca (*Guazuma crinita*), con dimensiones de 20 cm de largo, 25 cm de ancho y 20 cm de alto, y una capacidad de 5 kg cada uno (Figura A1, Anexo A, un cajón por tratamiento). Los cajones se ensamblaron mediante unión de piezas (Figura A2, Anexo A). Se emplearon cinco cajones: cuatro correspondientes a los tratamientos con adición de bromelina y laccasa, de acuerdo con el diseño experimental (Tabla 1), y un quinto cajón sin adición enzimática, que constituyó el tratamiento control. El ensayo se repitió en tres semanas consecutivas, con los

cinco tratamientos fermentando simultáneamente en cada semana; cada semana constituyó una repetición independiente (15 unidades experimentales en total).

Tabla 1

Concentraciones de enzimas en la fermentación del cacao previo al estudio

Tratamiento	Bromelina (%) A	Laccasa (%) B
Control	—	—
A1B1	0.36	0.36
A2B1	1.14	0.36
A1B2	0.36	1.14
A2B2	1.14	1.14

Nota: Las concentraciones (0.36 % y 1.14 %) se expresan en porcentaje p/p respecto a la masa de granos frescos por cajón (5 kg), equivalentes a 18 g y 57 g de enzima por cajón, respectivamente, manteniendo un factor de escala de 3.17 entre ambos niveles. Cada dosis se disolvió en 100 mL de jugo de mucílago filtrado, utilizado solo como vehículo de aplicación.

El nivel inferior se aproxima al rango funcional reportado por (Purbaningrum et al., 2023) para bromelina en hidrólisis de cacao no fermentado (hasta 10.5 U/mL, con grado de hidrólisis máximo de 42.95 % a 50 °C y pH 6.0), mientras que el nivel superior se sustenta en la concentración empleada por (Hariyadi et al. 2024) para bromelina en remoción de mucílago de café (80% p/v, actividad de 36 U/mL). Para laccasa, ambos niveles se establecieron por analogía funcional con las concentraciones de polifenol oxidasa empleadas por Morales et al. (2024) en fermentación de cacao fino, dado que ambas enzimas comparten mecanismo oxidativo sobre sustratos fenólicos (Couto y Herrera, 2006).

La actividad enzimática específica (U/g o U/mL) de los lotes comerciales utilizados en este estudio no fue determinada experimentalmente antes de su aplicación, por lo que las concentraciones se reportan en base p/p comercial.

e. Preparación de las enzimas

Las enzimas bromelina y laccasa, adquiridas en presentación comercial en polvo, se pesaron según las dosis correspondientes a cada tratamiento (Tabla 1; Figura B3, Anexo B): 18 g y 18 g (T1), 18 g y 57 g (T2), 57 g y 18 g (T3), y 57 g y 57 g (T4), respectivamente. En su respectivo matraz de vidrio de 250 mL, previamente limpio y desinfectado, cada dosis se incorporó en 100 mL de jugo de cacao extraído del mucílago durante las primeras 10 horas de fermentación, previamente

filtrado para eliminar impurezas (Figura D1, Anexo D). La mezcla se agitó manualmente, con una varilla de vidrio, de forma constante y uniforme durante 4 minutos hasta lograr la disolución completa, asegurando una dispersión homogénea de las enzimas en el medio líquido, sin formación de grumos, y favoreciendo su contacto directo con los granos.

f. Adición de las enzimas y homogenización

Con ayuda de una jeringa hipodérmica de primer uso, la mezcla enzimática se adicionó por goteo controlado en la zona central y en las partes laterales de cada cajón (Figura D2, Anexo D). A continuación, se realizaron 20 remociones manuales para asegurar una distribución homogénea de las enzimas y optimizar su contacto con los granos. A partir del segundo día de fermentación, la remoción de los granos se repitió cada 20 horas, homogenizando los granos de la parte superior con los del fondo del cajón.

g. Monitoreo de la fermentación

Durante los 6 días de fermentación, la temperatura de la masa se registró cada 12 horas desde el inicio del proceso hasta las 152 horas, con un termómetro digital de varilla (Model TP101, stainless steel probe; rango: −50 a 300 °C; precisión: ±1 °C; Shenzhen, China), introducido en el punto céntrico de cada cajón fermentador a profundidad constante. Los registros se organizaron por tratamiento y tiempo de fermentación, constituyendo la curva térmica del proceso para los cinco grupos evaluados, cuyo seguimiento permitió verificar el progreso fermentativo y contextualizar la evolución de las variables fisicoquímicas evaluadas en los días 0, 2, 4 y 6. Los valores registrados se presentan en la Tabla F1 y su evolución gráfica en la Figura F1 (Anexo F).

2.3.1. Método de análisis

2.3.1.1. Porcentaje de Humedad

El contenido de humedad de los granos de cacao se determinó mediante un método gravimétrico de secado en estufa, adaptado del método AOAC 931.04 para productos de cacao (AOAC International, 2023a). Para cada tratamiento y tiempo de fermentación días 0, 2, 4 y 6 se analizaron tres repeticiones, empleándose tres granos de cacao por repetición. Las muestras se pesaron

inicialmente en una placa Petri utilizando una balanza analítica (FA2204E, Drawell, China) y posteriormente se trituraron para favorecer la eliminación uniforme del agua. Las muestras fueron secadas en estufa a 105 °C durante 3 h. Finalizado el secado, se retiraron de la estufa, se enfriaron durante 10 min y se registró la masa final. Debido a que las condiciones de temperatura y tiempo fueron ajustadas respecto del procedimiento oficial, el método se consideró una adaptación de AOAC 931.04. El porcentaje de humedad en base húmeda se calculó mediante la ecuación:

$$H(\%) = \frac{m_h - m_s}{m_h} \times 100 \quad (1)$$

donde $m_h$es la masa inicial de la muestra húmeda y $m_s$la masa de la muestra después del secado. El procedimiento se ilustra en la Figura D4 del Anexo D.

2.3.1.2. Análisis de pH

El pH de los granos de cacao se determinó mediante un método potenciométrico adaptado de AOAC 970.21 para productos de cacao (AOAC International, 2023). Para cada tratamiento y tiempo de fermentación se trituraron 3 g de muestra y se colocaron en un vaso de precipitados. Posteriormente, se añadieron 50 mL de agua destilada y la mezcla se homogeneizó durante 2–3 min. La suspensión obtenida se filtró para separar la fase sólida del extracto acuoso. El pH del filtrado se midió utilizando un pH-metro digital de mesa (HI5521, Hanna Instruments, Estados Unidos), previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4.00, 7.00 y 10.00. El electrodo se introdujo en el extracto y la lectura se registró una vez alcanzada la estabilidad de la señal. Debido a que la relación muestra: agua y la etapa de filtración fueron establecidas según las condiciones experimentales del estudio, el procedimiento se consideró una adaptación de AOAC 970.21. Las mediciones se realizaron en los días 0, 2, 4 y 6 de fermentación, equivalentes a 0, 48, 96 y 144 h, respectivamente. El procedimiento se ilustra en la Figura D3 del Anexo D.

2.3.1.3. Determinación del color instrumental y de la diferencia total de color

El color instrumental de los cotiledones de cacao se determinó en el espacio de color CIE 1976 $L^*a^*b^*$, conforme a la norma ISO/CIE 11664-4:2019

(ISO/CIE, 2019). Para cada tratamiento, tiempo de fermentación días 0, 2, 4 y 6 y repetición experimental, se seleccionaron tres granos de cacao. Cada grano fue cortado longitudinalmente para exponer la superficie interna del cotiledón y las mitades fueron colocadas sobre una placa de vidrio, con la cara de corte orientada hacia el sensor.

Las mediciones se realizaron con un colorímetro digital de reflectancia (FRU, WR-10QC, China), operado con la configuración predeterminada del fabricante. En cada grano se efectuaron cuatro lecturas, dos por mitad (una en la zona central y otra en la lateral del cotiledón), con el propósito de representar la variabilidad cromática interna. El valor de cada repetición experimental se obtuvo como el promedio de las 12 lecturas (3 granos × 4 lecturas).

Se registraron los parámetros L^*, a^* y b^*. El parámetro L^* representa la luminosidad, en una escala de 0 negro a 100 blanco; a^* corresponde al eje cromático verde - rojo, donde los valores negativos indican tonalidades verdes y las positivas tonalidades rojas; y b^* corresponde al eje azul - amarillo, donde los valores negativos indican tonalidades azules y las positivas tonalidades amarillas.

La diferencia total de color respecto del día 0 de fermentación de cada tratamiento se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

donde:

$$\Delta L^* = L^*_t - L^*_0$$
$$\Delta a^* = a^*_t - a^*_0$$
$$\Delta b^* = b^*_t - b^*_0$$

En estas expresiones, L_t, a_t y b_t corresponden a los valores medios de cada repetición medidos en los días 2, 4 y 6 de fermentación, mientras que L_0, a_0 y b_0 corresponden a los valores de esa misma repetición en el día 0 del mismo tratamiento. ΔL^*, Δa^* y Δb^* representan los cambios en luminosidad y en las coordenadas cromáticas respecto del valor inicial, y ΔE^*_{ab} expresa la magnitud total del cambio de color. Un valor mayor de ΔE^*_{ab} indica una diferencia cromática más elevada respecto del día 0. El ΔE se calculó por repetición (n =

3 por tratamiento y día). Los datos se organizaron en Microsoft Excel y el procedimiento se ilustra en la Figura D5 del Anexo D.

2.3.1.4. Adquisición y procesamiento de imágenes hiperespectrales

La evaluación espectral de los granos de cacao CCN-51 fermentados se realizó mediante una cámara hiperespectral Pika NIR-640 (Resonon, Estados Unidos), instalada en el Laboratorio de Imágenes de la Universidad Nacional de Frontera (Figura E1, Anexo E). El sistema operó en el rango espectral de 900–1700 nm, con 336 bandas y una resolución espectral de 2.5 nm por banda, bajo modo de adquisición pushbroom (barrido), con una resolución espacial de 640 píxeles y una velocidad de escaneo de 3.141 cm/s. La adquisición se realizó utilizando el software Resonon Spectronon versión V1 (Figura E1, Anexo E). Este procedimiento permitió la obtención de cubos hiperespectrales para el análisis no destructivo de las muestras, integrando información espacial y espectral en cada adquisición.

Obtención de las muestras

Previo a la adquisición hiperespectral, de acuerdo a la semana de fermentación, los granos de cada tratamiento fueron extraídos manualmente del cajón fermentador en los días 0, 2, 4 y 6, muestreando de manera distribuida en la parte céntrica superior, media, del fondo y de los laterales del cajón, evitando el borde, con el fin de representar la heterogeneidad espacial de la masa fermentativa. La manipulación se realizó con guantes quirúrgicos, secando cada grano con papel toalla y cortándolo longitudinalmente por la mitad con cuchillo de acero limpio y desinfectado, exponiendo la cara interna del cotiledón sobre la cual se realizó el escaneo hiperespectral.

Adecuación de muestras

Los granos correspondientes a los días 0, 2, 4 y 6 de fermentación fueron dispuestos de manera ordenada sobre la superficie de adquisición del sistema hiperespectral, con la cara de corte expuesta hacia la cámara, evitando superposición entre unidades y garantizando separación física suficiente para impedir interferencias espectrales entre muestras adyacentes. La distancia cámara–muestra fue de 25 cm, empleándose iluminación halógena y calibración radiométrica mediante corrección blanco/negro previo a cada

sesión de captura (Figura E1, Anexo E). Las adquisiciones se realizaron bajo condiciones ambientales controladas de laboratorio (temperatura: 18–22 °C, humedad relativa: 50–60 %). Se dispusieron 25 granos por adquisición, realizándose la extracción automatizada de regiones de interés (ROI) (Figura E2, Anexo E).

Adquisición de imágenes hiperespectrales

Las imágenes fueron capturadas generando cubos hiperespectrales tridimensionales (x, y, λ) (Figura E1, Anexo E). Cada cubo contiene información espacial (x, y) y espectral (λ), permitiendo la extracción de perfiles espectrales individuales. Se obtuvieron aproximadamente 1500 perfiles espectrales totales, extrayéndose la mediana espectral de cada grano para minimizar la influencia de píxeles atípicos o fondo (Figura E2, Anexo E).

Extracción de perfiles espectrales

Los datos hiperespectrales fueron procesados mediante extracción automática de ROI, generando vectores espectrales representativos a partir de la mediana de cada grano. Posteriormente, se realizó un recorte espectral eliminando extremos ruidosos, conservándose el rango de 975–1363 nm (159 bandas finales), lo cual permitió eliminar regiones con baja relación señal/ruido en los extremos del intervalo inicial (900–975 nm y 1363–1700 nm). La selección por mediana permitió reducir la influencia de valores atípicos, constituyendo la matriz final de variables independientes para el modelamiento quimiométrico. Los perfiles espectrales fueron organizados de acuerdo con tratamiento experimental (A1B1, A1B2, A2B1, A2B2) y el control, día de fermentación (0, 2, 4 y 6), y variable fisicoquímica asociada (pH, humedad, color instrumental).

Preprocesamiento espectral

Para los perfiles espectrales los datos pasaron a un pretratamiento haciendo uso del filtro Savitzky-Golay de segundo orden (polinomio de orden 2), con ventana de 15 puntos, donde se aplicó el suavizado sin derivadas, conservando la información espectral original mientras se atenúa el ruido de alta frecuencia (Savitzky y Golay, 1964). También, se aplicó normalización SNV (Variación Normal Estándar) para corregir efectos de dispersión de luz relacionados con

diferencias en tamaño de partícula y distancia entre muestra y detector, reduciendo además variabilidad instrumental (Barnes et al. 1989; Figura E2, Anexo E). La mezcla de pretratamientos ha sido aplicada en la predicción de pH y humedad de granos de cacao mediante espectroscopía NIR portátil, mostrando mejoras consistentes en el desempeño de los modelos predictivos (Mardjan et al. 2025). Este proceso permitió obtener perfiles espectrales suavizados, normalizados y optimizados para el análisis predictivo, generando matrices espectrales de dimensión 1500 × 159 para análisis posterior mediante modelado de PLSR y ANN (Perceptrón multicapa).

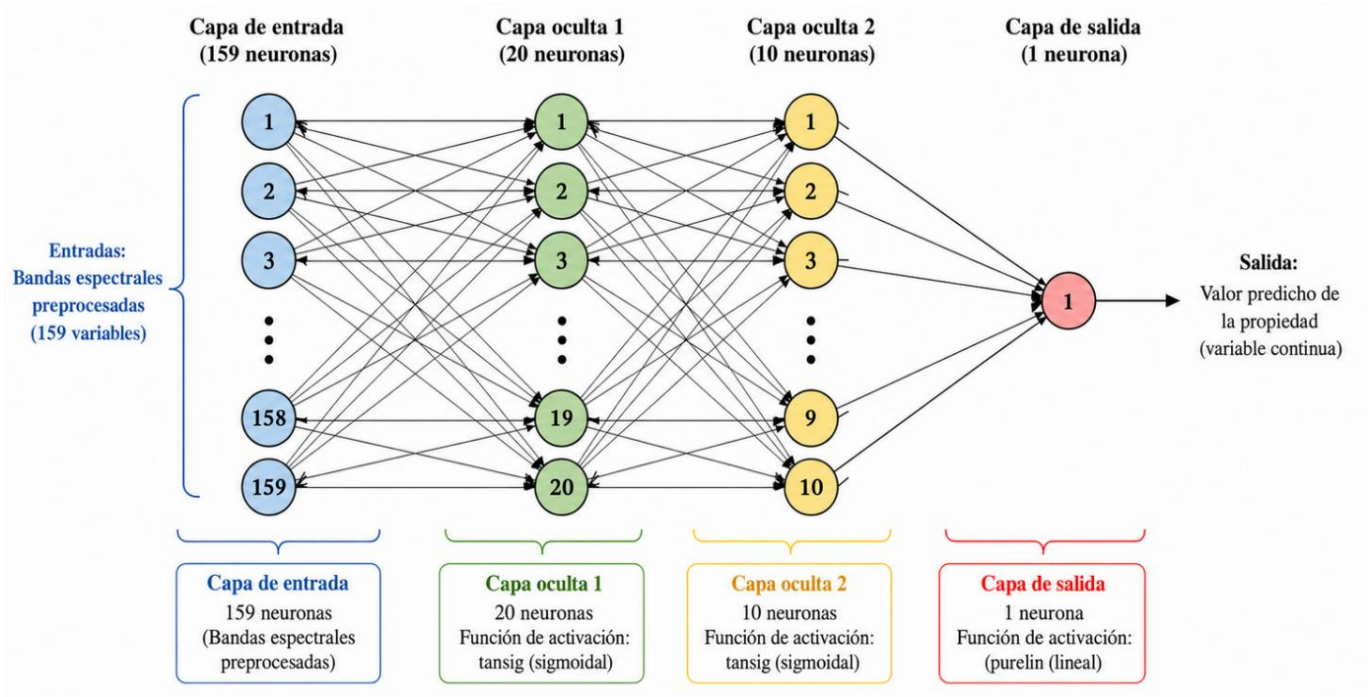
Modelado quimiométrico

Luego de obtener los perfiles espectrales preprocesados (159 variables), se validaron los datos para realizar los modelos predictivos mediante las variables fisicoquímicas evaluadas (pH, humedad, color instrumental L*, a*, b*), utilizando la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR; Wold et al., 2001) y una red neuronal Red neuronal de ajuste de funciones (Figura 3). En PLSR se usó 7 componentes latentes seleccionados según el mínimo Raíz del Error Cuadrático Medio (RMSE), utilizando una validación cruzada de 5 folds sin aplicación previa de mean-centering. Sin embargo, en las ANN se empleó una arquitectura de ajuste de funciones tipo feed-forward implementada mediante FITNET, compuesta por una capa de entrada de 159 neuronas, correspondientes a las bandas espectrales preprocesadas, dos capas ocultas de 20 y 10 neuronas y una neurona en la capa de salida para la predicción continua de cada propiedad fisicoquímica. En ambas capas ocultas se utilizó la función de activación sigmoidal tangencial hiperbólica (tansig), mientras que en la capa de salida se aplicó una función lineal (purelin), adecuada para problemas de regresión. El entrenamiento se ejecutó mediante el algoritmo trainlm, basado en el método de Levenberg–Marquardt, con un máximo de 500 épocas. La evaluación se efectuó mediante validación cruzada externa de 5 folds, repetida 30 veces, incorporando en cada conjunto de entrenamiento una partición adicional del 15 % para validación interna y del 85 % para la actualización de los pesos de la red. Esta configuración permitió estimar de manera independiente el desempeño de entrenamiento, validación interna y prueba externa mediante R^2, RMSE, RPD, MAE y sesgo (Mardjan et al. 2025).

El análisis computacional y el modelado se realizaron con MATLAB, versión R2025b. La arquitectura de la red neuronal de ajuste de funciones de tipo feed-forward, implementada mediante FITNET, se presenta en la Figura 3.

Figura 3

Arquitectura de la red neuronal de ajuste de funciones (FITNET) empleada para predecir las propiedades fisicoquímicas del cacao CCN-51 a partir de perfiles espectrales preprocesados.



Evaluación del desempeño predictivo

El desempeño de los modelos PLSR y ANN fue evaluado mediante el coeficiente de determinación (R^2), la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y la desviación predictiva residual (RPD = desviación estándar de referencia / RMSE de validación), calculados sobre el conjunto de validación (Caporaso et al. 2018; Hayati et al. 2021). Se adoptó $R^2 \geq 0.70$ como umbral de aceptabilidad, valor consistente con el reportado en estudios de predicción NIR de parámetros fisicoquímicos en granos de cacao (Anyidoho et al., 2021; Hayati et al., 2021; Riza et al., 2023; Teye et al., 2015). El RMSE fue interpretado en relación con la desviación estándar de cada variable de referencia; valores inferiores a dicha desviación indican precisión aceptable (Hayati et al., 2023). La robustez predictiva del RPD se clasificó según la

escala de Hayati et al. (2023): < 1.5, no recomendable; 1.5–2.0, estimación aproximada; 2.0–2.5, adecuado; 2.5–3.0, bueno; ≥ 3.0, excelente. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

2.3.2. Diseño de la investigación

La investigación se desarrolló bajo un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con cinco tratamientos y tres repeticiones por tratamiento (15 unidades experimentales en total). Los tratamientos combinaron dos concentraciones de bromelina (A: 0.36 % y 1.14 %) y dos concentraciones de laccasa (B: 0.36 % y 1.14 %), más un control sin adición enzimática, según el esquema presentado en la Tabla 2 y representado en la Figura 4.

Tabla 2

Esquema del diseño completamente aleatorizado (DCA) para la evaluación de bromelina y laccasa en la fermentación del cacao CCN-51

N°	Tratamiento	Bromelina (%)	Laccasa (%)
1	A1B1	0.36	0.36
2	A1B2	0.36	1.14
3	A2B1	1.14	0.36
4	A2B2	1.14	1.14
5	Control	-	-

Nota: Las concentraciones corresponden a porcentaje p/p respecto a la masa de granos frescos por cajón (5 kg). A1 = bromelina 0.36 %; A2 = bromelina 1.14 %; B1 = laccasa 0.36 %; B2 = laccasa 1.14 %.

Variables de estudio

Fase I

a) Variable independiente

- Concentración de bromelina (0.36 % y 1.14 %)
- Concentración de laccasa (0.36 % y 1.14 %).

b) Variables dependientes

- Características fisicoquímicas del grano: humedad, pH y color instrumental (L*, a*, b*, ΔE), determinadas en los días 0, 2, 4 y 6 de fermentación.

Fase II

c) Variable independiente

- Los perfiles espectrales preprocesados.

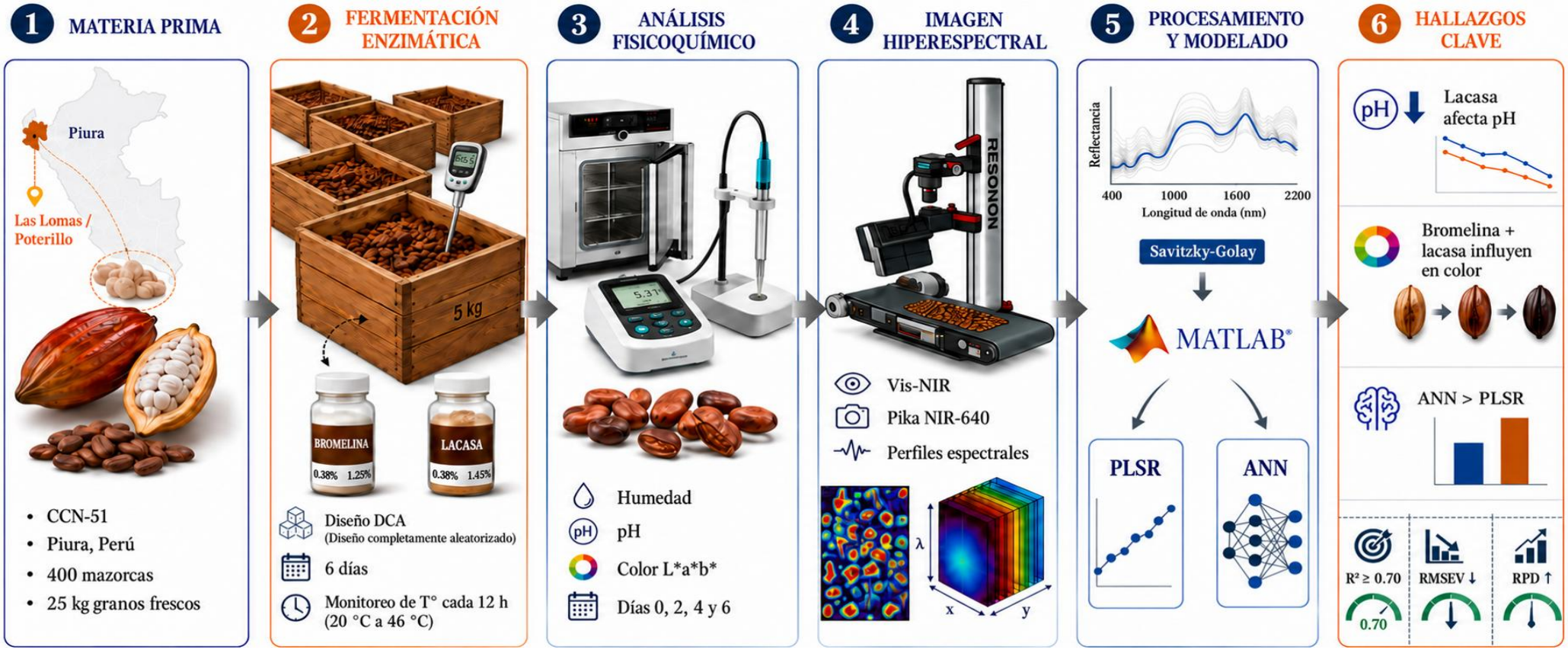
d) Variables dependientes

- Métricas de desempeño de los modelos (R^2, RMSE, RPD) constituyeron las variables dependientes.

La representación esquemática del flujo experimental completo se presenta en la Figura 4.

Figura 4

Esquema metodológico completo del diseño completamente aleatorizado (DCA) aplicado a la fermentación enzimática del cacao CCN-51 y su modelado hiperespectral mediante PLSR y ANN.



Nota. La representación visual del esquema fue elaborada con asistencia de una herramienta de inteligencia artificial: Chat gpt plus, bajo la dirección y revisión de los autores. El diseño experimental, la metodología, la ejecución del estudio fueron desarrollados exclusivamente por los autores. PLSR = regresión por mínimos cuadrados parciales; ANN = redes neuronales artificiales.

2.3.3. Análisis estadístico de datos

Antes de ejecutar el análisis de varianza, se comprobaron de forma obligatoria los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965) y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Levene, 1960), con nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Tablas G.1 a G.14, Anexo G). Para las variables y tiempos en que ambos supuestos se cumplieron, se aplicó análisis de varianza de una vía (ANOVA, GL tratamiento = 4, GL error = 10, n = 3 por tratamiento); en los casos en que el supuesto de normalidad no se cumplió, pero la homogeneidad de varianzas sí (humedad días 0, 2 y 4; pH día 2; temperatura horas 0, 8 y 20), se procedió igualmente con el ANOVA dado que la prueba de Levene confirmó varianzas homogéneas, interpretándose esos resultados con cautela. Las comparaciones múltiples de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey HSD (Tukey, 1949) con $\alpha = 0.05$. El análisis estadístico paramétrico se ejecutó en Minitab Statistical Software versión 22.

Para el modelado quimiométrico, los perfiles espectrales preprocesados (filtro Savitzky-Golay de segundo orden, ventana de 15 puntos, sin derivadas; normalización de la Varianza Normal Estándar) fueron utilizados como matriz de entrada (1500 × 159 variables). Se desarrollaron modelos de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (Wold et al., 2001) con 7 componentes latentes, seleccionados por mínimo de la Raíz cuadrática media (RMSE) mediante validación cruzada de 5 folds sin centrado en la media, y modelos de red neuronal artificial tipo feed-forward (ANN-FITNET), con arquitectura 159–20–10–1, funciones de activación tansig en capas ocultas y purelin en la capa de salida, entrenados mediante el algoritmo Levenberg–Marquardt (trainlm) con máximo de 500 épocas. La validación se realizó mediante validación cruzada externa de 5 folds repetida 30 veces, con partición interna 85/15 % por fold. El análisis computacional se realizó en MATLAB versión R2025b.

El desempeño de los modelos se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y la desviación predictiva residual (RPD = desviación estándar de referencia / RMSE de validación), adoptando $R^2 \geq 0.70$ como umbral de aceptabilidad (Anyidoho et al., 2021; Hayati et al., 2021). La robustez predictiva se clasificó según la escala de Hayati et al., (2021) y Hayati et al., (2024): RPD < 1.5, no recomendable; 1.5–2.0, estimación aproximada; 2.0–2.5, adecuado; 2.5–3.0, bueno; ≥ 3.0, excelente.

III. RESULTADOS

3.1. Determinación de características fisicoquímicas

Se determinaron las características fisicoquímicas (pH, humedad y color instrumental) de los granos de cacao CCN-51 sometidos a los cinco tratamientos evaluados. Los datos completos por repetición y el detalle de los análisis estadísticos se presentan en las Tablas G.1 a G.14 del Anexo G.

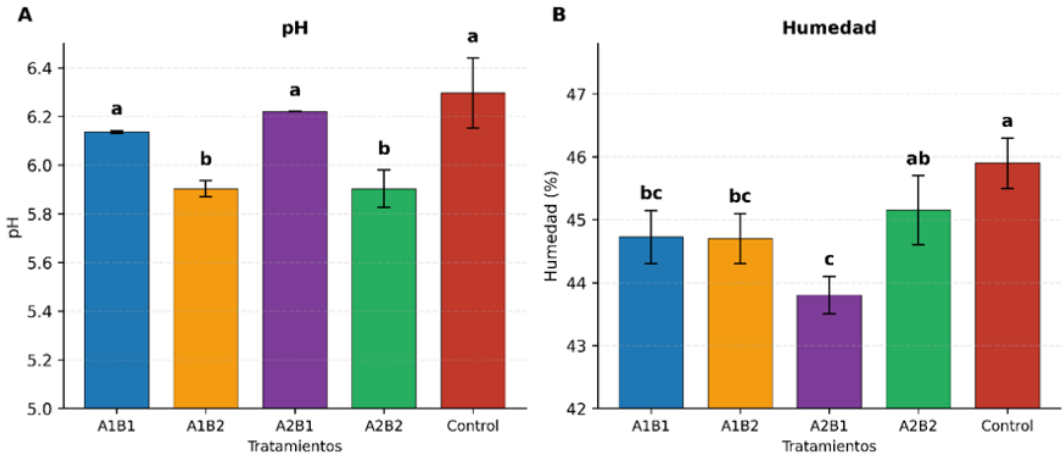
El seguimiento de la temperatura (Tablas G.1 y G.2, Anexo F) no mostró diferencias significativas entre tratamientos durante las primeras 68 h de fermentación. A partir de las 80 h, los tratamientos enzimáticos presentaron un incremento térmico sostenido respecto al control ($F_{(4,10)} = 22.98$, $p < 0.001$). Entre 128 y 152 h, A1B1, A1B2, A2B1 y A2B2 se estabilizaron entre 45 y 46 °C, mientras que el control permaneció en 29–30 °C, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos enzimáticos en ese período (Tabla G.2).

El contenido de humedad disminuyó progresivamente en todos los tratamientos (Tablas G.3 y G.4). No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en los días 0 y 2. En los días 4 y 6, el ANOVA indicó efecto significativo del tratamiento ($F_{(4,10)} = 8.93$, $p = 0.0025$ y $F_{(4,10)} = 9.78$, $p = 0.0017$, respectivamente). Al día 6, A2B1 presentó el menor contenido de humedad (43.80 ± 0.30 %), estadísticamente inferior al control (45.90 ± 0.40 %); A1B1 (44.72 ± 0.42 %) y A1B2 (44.70 ± 0.40 %) mostraron valores intermedios, y A2B2 (45.15 ± 0.55 %) no se diferenció del control (Figura 5B).

El pH mostró diferencias significativas entre tratamientos en el día 0 ($F_{(4,10)} = 7.74$, $p = 0.0041$), las cuales deben atribuirse a variabilidad previa al inicio de la fermentación. En el día 2 no se detectaron diferencias ($p = 0.1658$). En el día 4, A2B1 presentó el mayor pH (6.43 ± 0.21), estadísticamente superior al resto de tratamientos ($F_{(4,10)} = 17.34$, $p < 0.001$). Al día 6, A1B2 y A2B2 ambos con la mayor concentración de laccasa (1.14 %) registraron los menores valores de pH (5.90 ± 0.03 y 5.90 ± 0.08, respectivamente), estadísticamente inferiores al control (6.30 ± 0.14), A1B1 (6.14 ± 0.01) y A2B1 (6.22 ± 0.00) ($F_{(4,10)} = 17.97$, $p < 0.001$; Figura 5A, Tabla G.6).

Figura 5.

pH y contenido de humedad al final de la fermentación de cacao en respuesta a diferentes combinaciones de bromelina y laccasa en el sexto día de fermentación.



Nota: (A) pH y (B) contenido de humedad determinados al día 6 de fermentación. Las barras representan la media ± desviación estándar de tres repeticiones (n = 3). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos correspondieron a A1B1 (0.36% bromelina + 0.36% laccasa), A1B2 (0.36% + 1.14%), A2B1 (1.14% + 0.36%), A2B2 (1.14% + 1.14%) y un control sin adición enzimática.

En los resultados de color, específicamente en las coordenadas a* y b* no mostraron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos durante los 6 días evaluados ($p > 0.05$; Tablas G.9 – G.12). La luminosidad (L*) difirió entre tratamientos únicamente en el día 4 ($F_{(4,10)} = 4.95$; $p = 0.0184$), con el menor valor en A2B2 (50.41 ± 0.38), distinto de A2B1 (54.44 ± 0.52) y del control (53.75 ± 2.39) (Tukey, $p < 0.05$). La diferencia total de color respecto al día 0 de la misma repetición (ΔE) no difirió entre tratamientos en ningún día (día 2: $F_{(4,10)} = 1.17$, $p = 0.380$; día 4: $F_{(4,10)} = 1.49$, $p = 0.278$; día 6: $F_{(4,10)} = 0.58$, $p = 0.686$), con valores medios entre 1.78 y 6.05. Al día 6, ningún tratamiento difirió en L*, a*, b* ni en ΔE ($p > 0.05$; Tablas G.7–G.15).

3.2. Perfiles de datos a través de la aplicación del espectro NIR

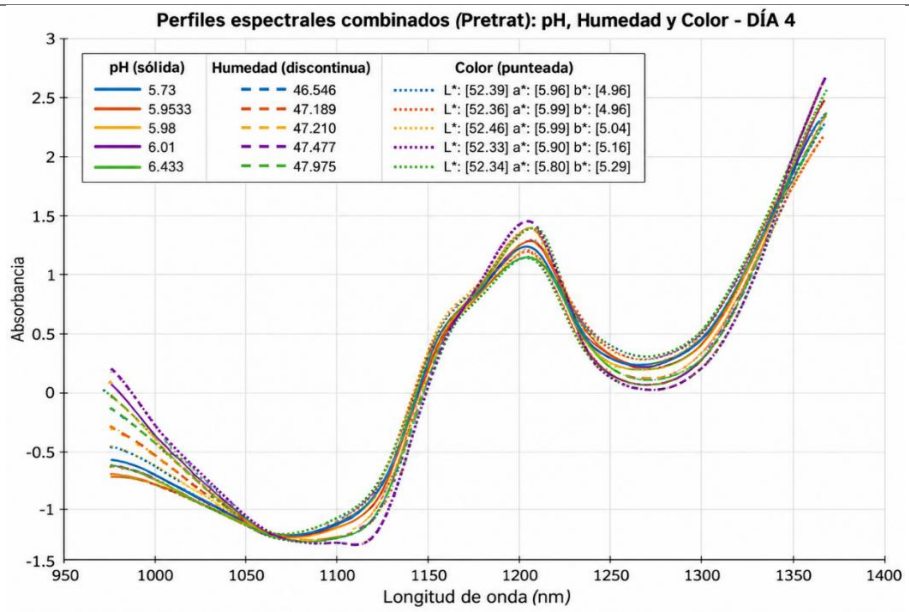
En la tabla 3 pueden verse, de forma conjunta, los perfiles espectrales pretratados de los parámetros estudiados durante el día 4 de fermentación tanto para pH, humedad y color instrumental (L* a* y b*). Los resultados se presentan en una única gráfica, en donde observamos y comparamos con más facilidad el comportamiento de cada parámetro a lo largo del rango espectral de 975 a 1363 nm. Los perfiles de pH se muestran con diferentes colores para poder distinguirlos visualmente con líneas continuas, la humedad con líneas discontinuas y el color instrumental con líneas punteadas.

Estos perfiles permiten ver cómo se va comportando la respuesta espectral a medida que va avanzando el proceso fermentativo, proporcionando la base para el modelamiento posterior, cada longitud de onda para los tres parámetros, donde se aprecian algunas variaciones en la intensidad de absorbancia en determinadas zonas del espectro, especialmente alrededor de 1200 nm y entre 1250 y 1300 nm, manteniendo las curvas una tendencia general semejante.

Tabla 3.

Perfiles espectrales suavizados - normalizados para pH, humedad y color L a* b* en el día 4*

(A) pH (B) Humedad (C)Color L* a* b



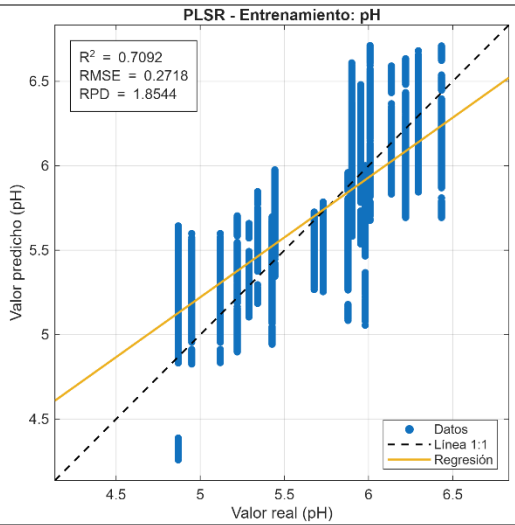
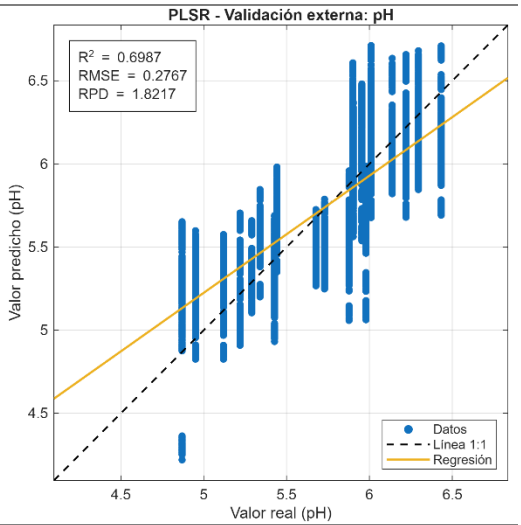
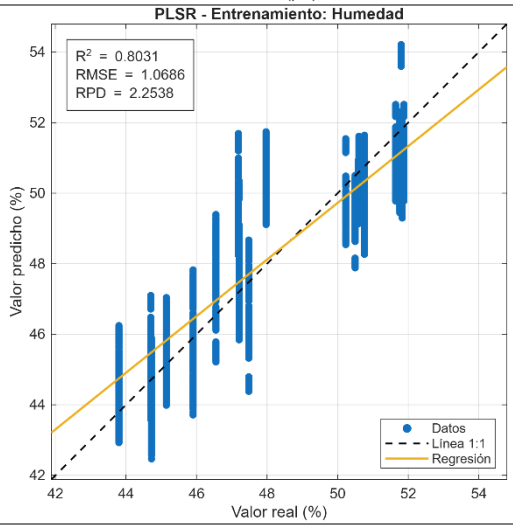
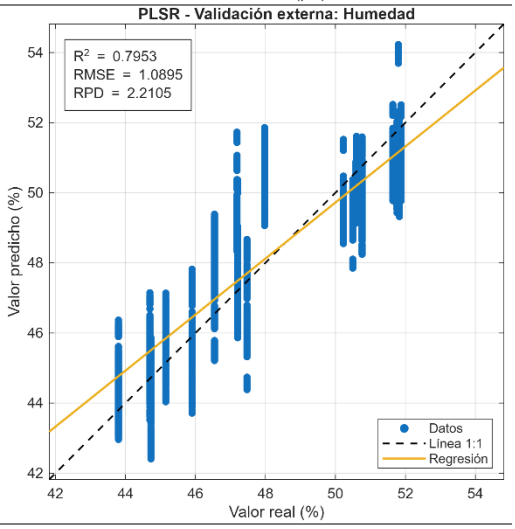
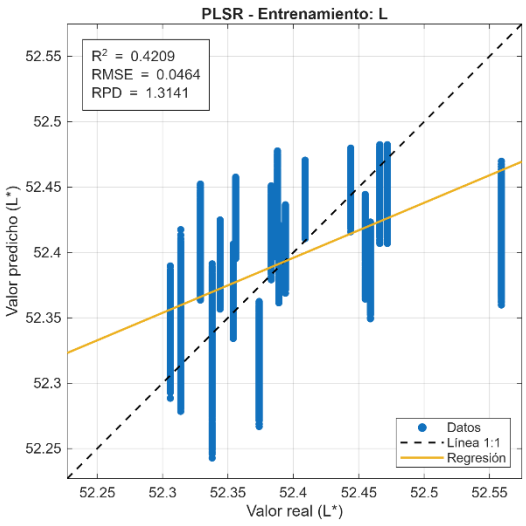
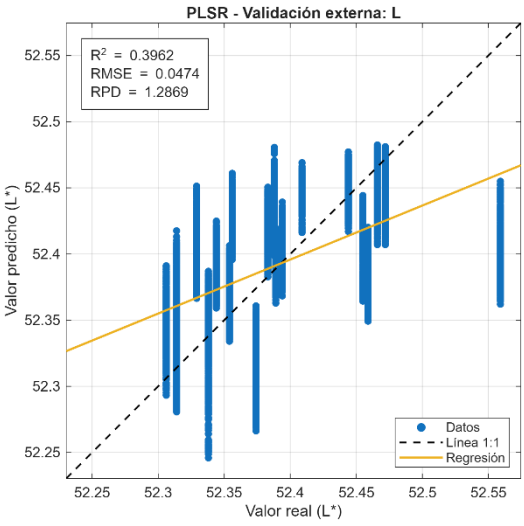
3.3. Validación de modelo predictivo

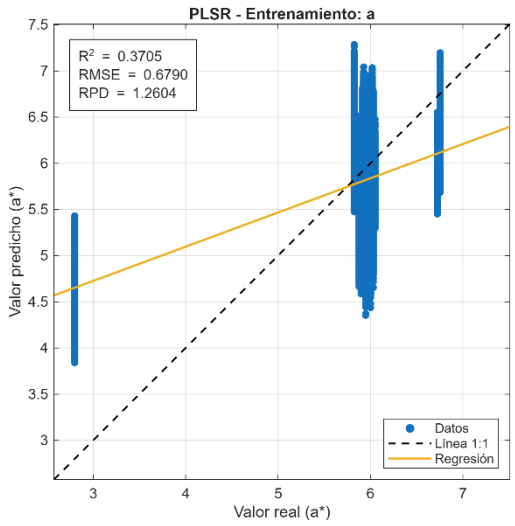
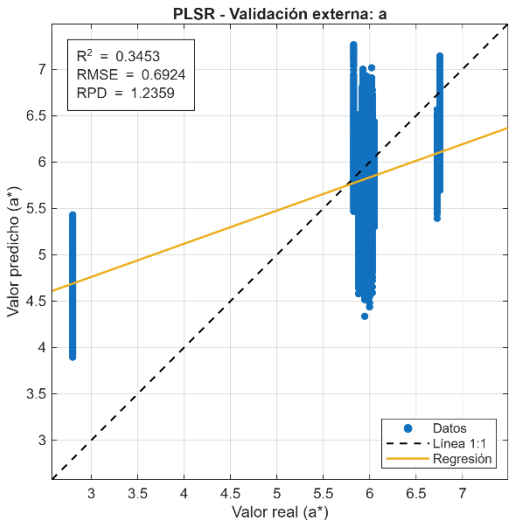
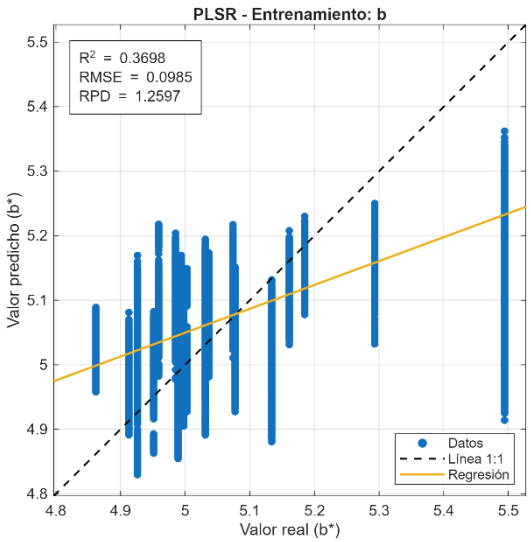
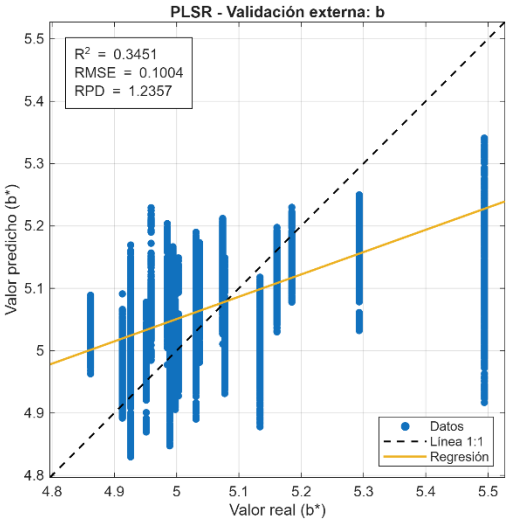
3.3.1. Modelo predictivo PLSR

En la Tabla 4 se incluyen los gráficos de dispersión derivados para los modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) de los parámetros pH, humedad y color instrumental. El análisis mencionado complementa el modelamiento con redes neuronales evaluando un enfoque lineal supervisado.

Tabla 4.

Gráficos de dispersión para entrenamiento y validación de los parámetros predichos por PLSR

Parámetro	Entrenamiento	Validación
pH		
Humedad		
Color (L*)		

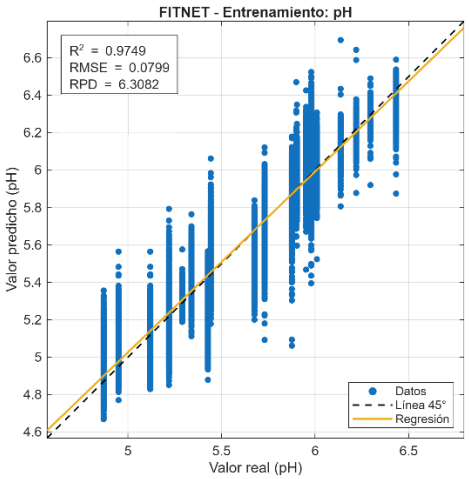
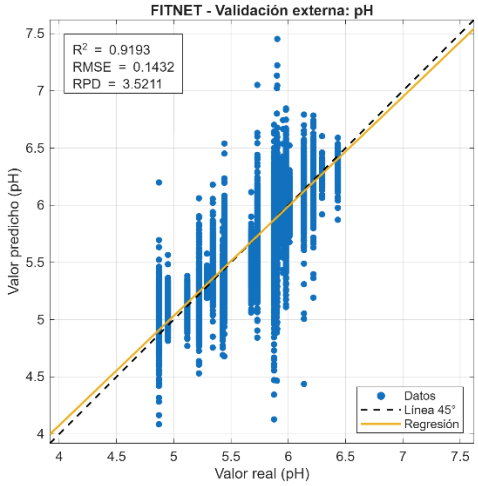
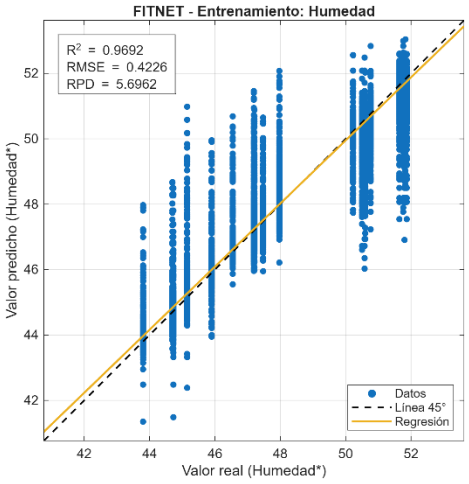
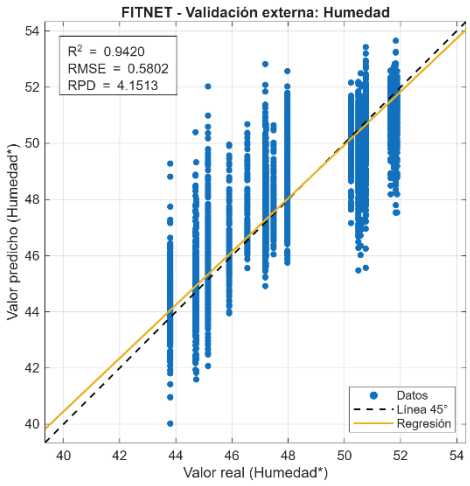
Parámetro	Entrenamiento	Validación
Color (a*)		
Color (b*)		

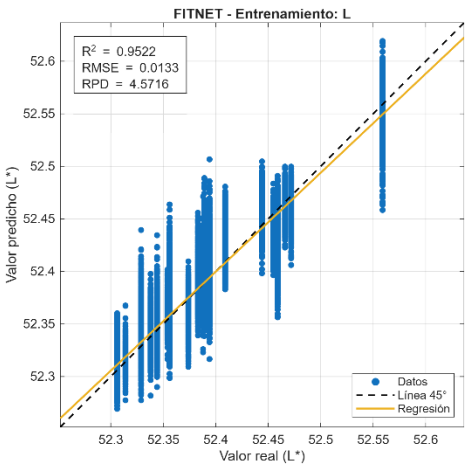
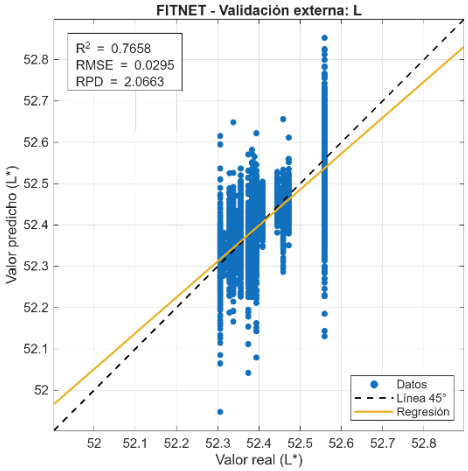
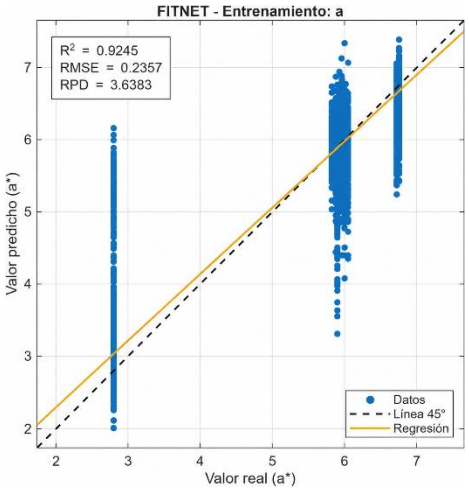
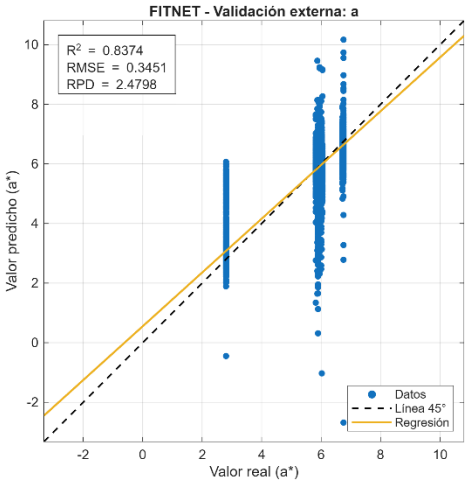
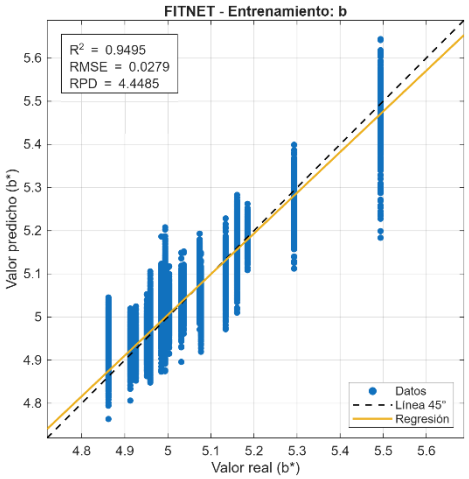
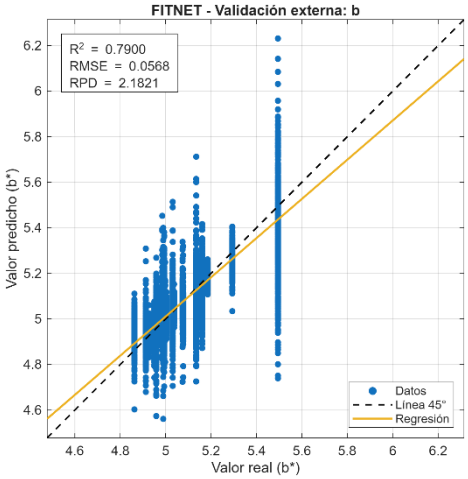
3.3.2. Modelo predictivo de Redes Neuronales (Perceptrón multicapa)

En la Tabla 5 se resumen todos los gráficos de dispersión correspondientes al entrenamiento y validación de red neuronal perceptrón multicapa para los parámetros de pH, humedad y color (L*, a*, b*) evaluados. Estos gráficos muestran la relación entre los valores reales y los predichos, lo que permite evaluar visualmente el desempeño del modelo. Los modelos basados en redes neuronales presentaron un mejor ajuste y una menor dispersión respecto a los valores experimentales.

Tabla 5.

Gráficos de dispersión para entrenamiento y validación de los parámetros predichos por red neuronal perceptrón multicapa.

Parámetro	Entrenamiento	Validación
pH		
Humedad		

Parámetro	Entrenamiento	Validación
Color (L*)		
Color (a*)		
Color (b*)		

Los coeficientes de determinación (R^2) elevados observados en la mayoría de los parámetros indican una alta capacidad de la red neuronal para capturar la relación entre espectros y variables de fermentación. La alineación cercana a la línea Y=T demuestra un ajuste adecuado sin evidencia marcada de sobreajuste. Esto confirma que el patrón espectral contiene suficiente información para la predicción multivariante en sistemas biológicos complejos como la fermentación del cacao, ya que ha obtenido coeficientes de predicción mayores que los obtenidos en otras investigaciones, como por ejemplo 0.54-0.67 para predecir parámetros de calidad durante la fermentación (León et al. 2016).

La comparación sistemática del desempeño predictivo entre modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) y redes neuronales artificiales (ANN) se resume en la Tabla 6. Los modelos ANN alcanzaron el nivel de aceptabilidad ($R^2 \geq 0.70$) en los cinco parámetros evaluados durante el entrenamiento y en cuatro de cinco en validación, mientras que PLSR alcanzó el umbral de aceptabilidad únicamente para humedad (R^2 de validación = 0.795), mientras que para pH (R^2 de validación = 0.699) se situó marginalmente por debajo del criterio establecido ($R^2 \geq 0.70$), sin alcanzarlo para los parámetros cromáticos (R^2 de validación = 0.396, 0.345 y 0.345 para L*, a* y b*, respectivamente). La superioridad de las arquitecturas no lineales ha sido consistente en todos los parámetros evaluados, obteniendo valores de RPD de entrenamiento del ANN entre 3.6 y 6.3 y de validación entre 2.07 y 4.15, lo que indica que los modelos con capacidad predictiva de adecuada a excelente según los criterios internacionales establecidos por Hayati et al. (2021) y Forte et al. (2022).

.

Tabla 6.

Comparación de desempeño PLSR vs ANN

Parámetro	Modelo	R^2 Entrenamiento	R^2 Validación	$R^2 > 0.7$ Cumple	RMSE Entrenamiento	RMSE Validación	RPD Entrenamiento	RPD Validación	Evaluación
pH	PLSR	0.709	0.699	No	0.272	0.277	1.854	1.822	Estimación aproximada
	ANN	0.975	0.919	Sí	0.08	0.143	6.308	3.521	Excelente
Humedad	PLSR	0.803	0.795	Sí	1.069	1.09	2.254	2.211	Adecuado
	ANN	0.969	0.942	Sí	0.423	0.58	5.696	4.151	Excelente
L*	PLSR	0.421	0.396	No	0.046	0.047	1.314	1.287	No recomendable
	ANN	0.952	0.766	Sí	0.013	0.03	4.572	2.066	Adecuado
a*	PLSR	0.37	0.345	No	0.679	0.692	1.26	1.236	No recomendable
	ANN	0.924	0.837	Sí	0.236	0.345	3.638	2.48	Adecuado
b*	PLSR	0.37	0.345	No	0.098	0.1	1.26	1.236	No recomendable
	ANN	0.949	0.79	Sí	0.028	0.057	4.449	2.182	Adecuado

Nota. R^2 = coeficiente de determinación; RMSE = raíz del error cuadrático medio; RPD = ratio of performance to deviation (cociente entre la desviación estándar de referencia y el RMSE de validación). La evaluación del desempeño se basa en el RPD de validación según los criterios de (Hayati et al. 2021) y Hayati et al. (2024): < 1.5 = no recomendable; 1.5–2.0 = estimación aproximada; 2.0–2.5 = adecuado; 2.5–3.0 = bueno; ≥ 3.0 = excelente. El criterio de aceptabilidad adoptado es $R^2 \geq 0.70$.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Efecto de enzimas oxidativas y proteolíticas sobre características fisicoquímicas del grano fermentado

Temperatura

La intensificación térmica registrada en los tratamientos enzimáticos a partir de las 80 h, se obtuvo una temperatura de 45–46 °C frente a los 29–30 °C del tratamiento control (Tabla G.2), esto constituye una evidencia más sólida del efecto de la combinación bromelina y laccasa sobre la fermentación. Este comportamiento es aplicable a la aceleración de reacciones exotérmicas, donde la hidrólisis proteica catalizada por bromelina libera calor de enlace peptídico mientras expone sustratos aminoacídicos al consorcio microbiano, y la oxidación de compuestos fenólicos por laccasa, mediante entrega de un electrón con reducción de O_2 molecular, genera calor de reacción adicional (Hilgers et al., 2018; Sondhi et al., 2023). El incremento de temperatura en los tratamientos enzimáticos está relacionado con lo reportado por Morales et al., (2024), quienes documentaron temperaturas fermentativas más elevadas al incorporar polifenoloxidasa en cacao fino, aunque en ese caso acompañadas de mayor presencia de mohos cuando el secado postcosecha no fue apropiadamente controlado.

pH

Los valores de pH al día 6 oscilaron entre 5.90 ± 0.03 (A1B2) y 6.30 ± 0.14 (Control), con diferencias estadísticamente significativas ($F_{(4,10)} = 17.97$, $p < 0.001$). Los tratamientos con elevada concentración de laccasa (1.14 %, A1B2 y A2B2) revelaron valores inferiores de pH con respecto al control y a los tratamientos con menor concentración de la misma enzima, lo que propone una relación entre la actividad oxidativa de la laccasa y la acidificación del sistema. Este resultado es estable con la bioquímica de la fermentación, ya que la laccasa, como oxidorreductasa fenólica, cataliza la oxidación de sustratos polifenólicos como las catequinas, epicatequinas y procianidinas, generando orto-quinonas como productos primarios (Couto y Herrera, 2006; Hilgers et al., 2018). Las quinonas son electrófilas reactivas que logran polimerizarse espontáneamente o reaccionar con grupos amino libres generados por la bromelina, produciendo compuestos de pardeamiento y liberando protones en el proceso, lo que contribuye a la acidificación medible del extracto acuoso del cotiledón (Morales et al., 2024; Sondhi et al., 2023).

Por otro lado, los valores de pH finales logrados (5.90–6.30) se sitúan por encima del rango de 5.0–5.5 considerado óptimo para extender el potencial aromático y facilitar la muerte del embrión en cacao fermentado de calidad. Algunos estudios documentaron un pH final de 5.06 tras 155.87 h de fermentación espontánea con secado controlado (Al Riza et al., 2023; Mougang et al., 2024; Ruiz et al., 2024), mientras que Ruiz et al. (2024) describieron una estabilización entre 5.0 y 5.3 al final de la fase acética en fermentaciones de 120 h, valores inferiores a los aquí registrados. En la publicación de Morales et al., (2024) utilizaron polifenoloxidasa, una enzima similar a la laccasa, y *Saccharomyces cerevisiae*, donde el pH adquirió el rango ideal de 5.0–5.5, si bien esa fermentación también contó con la contribución ácida del metabolismo microbiano activo. La comparación indica que a las 144 h de fermentación y las condiciones del presente estudio produjeron una acidificación incompleta respecto al el rango referencial de pH de 5,0–5,5 reportado en la literatura para granos de cacao fermentados de calidad comercial (Al Riza et al., 2023; Mougang et al., 2024; Ruiz et al., 2024). El agregado exógeno de enzimas como la bromelina y laccasa, sin inóculo microbiano definido, no sustituye el aporte ácido de las bacterias lácticas y acéticas propias de la fermentación espontánea, las cuales son responsables de generar ácido láctico y ácido acético que logran descender el pH por debajo del valor de 5.5 (Mougang et al., 2024), sino que cambian la composición del sustrato sin sustituir la acidogénesis microbiana natural. Por otro lado, la no determinación de la actividad enzimática específica (U/g) de los lotes comerciales utilizados dificulta corroborar si las dosis aplicadas fueron bioquímicamente equivalentes a las usadas en estudios previos, lo que constituye una limitación del estudio.

Hartuti et al., (2020) en su estudio realizado lograron evaluar el efecto del almacenamiento previo de mazorcas, la tasa y modo de aireación sobre el pH del cacao fermentado, registrando valores finales dentro del rango 4.873-6.517, similar a la variabilidad observada en el presente estudio, confirmando que el pH al finalizar la fermentación es altamente sensible a las condiciones operativas. En cuanto al clon CCN-51, Velásquez et al., (2025) obtuvieron un valor de pH entre 4.00 y 5.00 al día 5 con *S. cerevisiae* y extracto de mango como agentes bioactivos, lo que refuerza que la acidificación en este clon requiere tanto actividad microbiana activa como condiciones de sustrato adecuadas.

Humedad

El contenido de humedad disminuyó progresivamente en todos los tratamientos, con diferencias estadísticamente significativas entre ellos únicamente en los días 4 y 6 ($F_{(4,10)}$ = 8.93, p = 0.0025 y $F_{(4,10)}$ = 9.78, p = 0.0017, respectivamente). Al día 6, el tratamiento A2B1 (1.14 % bromelina + 0.36 % laccasa) exhibió la mayor pérdida de humedad (43.80 ± 0.30 %), estadísticamente inferior al control (45.90 ± 0.40 %), mientras que A2B2 no se diferenció del control (Tabla G.4). Los valores obtenidos (43.80–45.90 % en el grano húmedo al final de los 6 días de fermentación) son propios de granos aún en fase fermentativa activa, no del grano seco comercialmente idóneo (< 7.5 %, ISO, 2018). Esta distinción es importante: la etapa evaluada corresponde al proceso fermentativo y no incluye el secado posterior, por lo que los datos de humedad representan la evolución del agua intragranular durante la fermentación y no la calidad del grano final a exportación.

El mecanismo más probable detrás de la mayor pérdida de humedad en A2B1 es doble, cuanto más mayor es la concentración de bromelina (1.14 %) acelera la hidrólisis de proteínas de almacenamiento del cotiledón, especialmente globulinas, liberando péptidos cortos y aminoácidos libres (Purbaningrum et al., 2023; Sari et al., 2025), lo que aumenta la presión osmótica intracelular y favorece la exudación de agua hacia la interfase grano-pulpa. Por otro lado, la mayor temperatura alcanzada en los tratamientos enzimáticos, documentada desde las 80 h, incrementa la tasa de evaporación de la masa fermentante (Balcázar et al., 2023; Mougang et al., 2024). Purbaningrum et al. (2023) demostraron que la bromelina a 50 °C y pH 6.0 alcanza su máxima actividad proteolítica (0.21 U/mL) y que el grado de hidrólisis máximo (42.95 %) se logra a 10.5 U/mL durante 6 h, condiciones que producen una ruptura significativa de la estructura proteica que modificaría la capacidad de retención de agua del cotiledón. El hecho de que A2B2, con la máxima concentración de ambas enzimas, no se diferencie del control en humedad al día 6 sugiere un efecto competitivo o inhibitorio entre los productos generados por ambas enzimas en alta concentración, por ejemplo, polímeros quinónicos producidos por laccasa que podrían saturar sitios proteicos accesibles a la bromelina, lo que atenúa la respuesta neta sobre la pérdida de agua.

La disminución de humedad registrada fue inferior a la documentada en fermentaciones espontáneas. Mougang et al., (2024) en su estudio indico una disminución del 60 % al 7.49 % tras fermentación y secado combinados, mientras que Morales et al., (2024) consiguieron por debajo del 7.5 % cumpliendo estándares internacionales. Estas

diferencias son explicables, ya que en el presente estudio se midió la humedad al final de la fermentación (144 h) y no después del proceso de secado. Poer otro lado, la mayor pérdida de agua durante la fermentación en el tratamiento A2B1 es importante ya que influye en la concentración de los azúcares y los ácidos en el cotiledón, regulando la velocidad de las reacciones enzimáticas internas y la disponibilidad de sustratos para los modelos predictivos hiperespectrales (Balcázar et al., 2023; Mougang et al., 2024).

Color instrumental (L*, a*, b*, ΔE)

El parámetro que menos se vio afectado por los tratamientos enzimáticos fue el cambio de color. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a*, b* ni ΔE en ninguno de los días evaluados ($p > 0,05$; Tablas G.9–G.14), mientras que L* difirió solo el día 4 ($F_{4,10} = 4.95$, $p = 0.0184$). El tratamiento A2B2 en el dia 4 registró la menor luminosidad (50.41 ± 0.38) frente a A2B1 (54.44 ± 0.52) y el control (53.75 ± 2.39), sin que ello se tradujera en un ΔE mayor respecto al día 0 (A2B2: 4.83 ± 1.67; control: 3.58 ± 1.94, Tabla G14). Respecto al día 6 de fermentación, todos los tratamientos incluido el control, se oscurecieron y redujeron a* respecto al día 0 (ΔL* entre -2.4 y -3.9; Δa* entre -2.1 y -3.4), lo que indicaría que el cambio de color se relaciona principalmente al proceso fermentativo y no a la adición enzimática.

La oxidación que efectúa la laccasa sobre los componentes fenólicos del cotiledón, catequinas, epicatequinas y antocianinas explicaría bioquímicamente la menor luminosidad de A2B2 en el día 4 de fermentación (Couto y Herrera, 2006; Hilgers et al., 2018; Sondhi et al., 2023). Por otro lado, la laccasa cataliza la oxidación monoelectrónica de sustratos fenólicos formando radicales fenoxilo que polimerizan espontáneamente en quinonas y complejos melanoides de coloración marrón, un mecanismo parecido al de la polifenoloxidasa, pero con mayor extensión de sustrato (Couto y Herrera, 2006; Hilgers et al., 2018). En los granos de cacao, esta reacción es el fundamento del cambio de color púrpura a marrón que caracteriza el grano bien fermentado (Flores et al., 2025; Morales et al., 2024). Sin embargo, la enzima bromelina al lograr hidrolizar las proteínas de almacenamiento, expone residuos aminoacídicos, especialmente lisina y fenilalanina, que pueden participar en reacciones de Maillard con azúcares reductores disponibles, favoreciendo al oscurecimiento y aumentando a* y b* (Purbaningrum et al., 2023; Sari et al., 2025). En el estudio de Sari et al., (2025), el tratamiento con enzima bromelina en cacao no fermentado producido menor L* (48.9 ± 0.7) y mayores a* (11.9 ± 0.4) y b*

(22.3 ± 0.2) en comparación con muestras sin tratamiento, demostrando de este modo el papel proteolítico de la enzima en la producción de precursores del pardeamiento.

Sin embargo, las diferencias cromáticas observadas al día 4 no persistieron al día 6, cuando todos los tratamientos mostraron valores estadísticamente homogéneos (L* ≈ 49–51, a* ≈ 3–4, b* ≈ 3–5, ΔE ≈ 3.8-6.1). La actividad máxima de ambas enzimas se situó en la fase intermedia mesofílica de la fermentación (días 3 a 5), coincidiendo con el rango de temperatura donde la bromelina conserva su actividad (35–65 °C) y la laccasa es estable (Purbaningrum et al., 2023; Sondhi et al., 2023). Con el progreso de la temperatura cuando se alcanzan los 45 °C en el día 6, la desnaturalización parcial de las enzimas exógenas determinó la disminución de su actividad catalítica y limitó el progreso de las reacciones de oxidación y de pardeamiento, mecanismo que resulta ser coherente con las condiciones de actividad óptima de la bromelina indicadas por (Purbaningrum et al., 2023), 50 °C, pH 6.0 y con la sensibilidad de la laccasa a la temperatura elevada determinada en los estudios de (Sondhi et al., 2023).

Desde un punto de vista normativo, los valores de L* el día 6 (49 a 51) y a* (3 a 4) son inferiores a los granos fermentados informados por Flores et al., (2025) para CCN-51 (L* interno ≈ 22 a 44, a* ≈ 2 a 15), que podría explicarse por las mediciones empleadas en este experimento que correspondieron a granos aún húmedos, sin secado, elevando involuntariamente L* y reduciendo la saturación del color. En fermentaciones con polifenoloxidasa, Morales et al., (2024) indicaron que la transición completa de color de púrpura a marrón en granos secos, que corroboran que el secado posterior a la fermentación es determinante para consolidar los cambios de color iniciados por la enzima. En general, el efecto del cromatismo de bromelina y laccasa de este estudio fue de menor magnitud que el mencionado en mediciones observadas en fermentaciones microbianas activas y reafirma la hipótesis de que estas enzimas modifican la disponibilidad de sustratos fenólicos y proteicos, pero no pueden sustituir de forma autónoma la cadena oxidativa completa que cumple su función durante la fermentación espontánea.

El comportamiento conjunto de estas variables fisicoquímicas debe interpretarse bajo cuatro limitaciones estructurales del estudio. En primer lugar, la falta de determinación de la actividad enzimática específica (U/g o U/mL) de los lotes comerciales de bromelina y laccasa impidió evidenciar que las dosis expresadas en porcentajes masa/masa del promotor y de la laccasa cargaban catalíticamente de forma análoga entre ellas y respecto

a la información reportada en la bibliografía (Hariyadi et al., 2024; Purbaningrum et al., 2023). En segundo lugar, el diseño DCA con cuatro tratamientos enzimáticos y un control, evaluados con tres repeticiones independientes (n = 3 por tratamiento), limitó los grados de libertad del error (GL error = 10), lo que restringe la sensibilidad estadística para detectar diferencias de pequeña magnitud, en coordenadas a* y b*, cuya variabilidad intrínseca fue alta (CV > 20 % en varios días). En tercer lugar, la falta de caracterización microbiológica paralela imposibilita discriminar la aportación de la actividad enzimática exógena respecto de la sucesión microbiana espontánea que se produjo irremediablemente durante los 6 días de fermentación en condiciones no asépticas, observándose que el efecto sobre pH, humedad y color del cacao es el resultado de ambas fuentes de actividad bioquímica, y no de las enzimas adicionadas. En cuarto lugar, las repeticiones se realizaron en semanas diferentes, de manera que la variabilidad entre repeticiones incluye diferencias de lote de materia prima y de condiciones ambientales. Estas limitaciones no invalidan los resultados, pero sí establecen el marco de inferencia dentro del cual estos resultados deben aceptarse, a saber: la adición conjunta de bromelina y laccasa modifica la dinámica fisicoquímica de la fermentación del cacao CCN-51, con efectos que son dispares según la combinación y el momento de evaluación sin que se haya podido separar los mecanismos enzimáticos de los microbianos en el marco del presente diseño.

4.2. Sensibilidad espectral y capacidad informativa de perfiles Vis-NIR preprocesados

La información obtenida tras el desarrollo de la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) demuestra que la firma óptica del grano de cacao es sensible a las transformaciones bioquímicas asociadas al proceso fermentativo (Anyidoho et al., 2021; Pinto et al., 2024). Entre los días 0, 2, 4 y 6, los perfiles espectrales mostraron diferencias en la absorbancia, esencialmente en las regiones cercanas a 1200 y a 1350 nm, que corresponden a los sobre tonos vibracionales de los enlaces C–H, O–H y N–H sensibles al pH o a la composición del grano (Anyidoho et al. 2021; Caporaso et al. 2018; Krähmer et al., 2015).

La respuesta espectral para el pH se centra en la misma región de 1150-1250 nm donde se evidencia que prevalece el sobretono O–H y que la acidificación del cotiledón durante la fermentación está medida por la liberación de protones en medio acuoso (Ruiz et al. 2024); la absorbancia de esta banda no produce la captura, por lo tanto, de la señal de agua o acidez, sino que capturan su covariación a lo largo del proceso fermentativo. Esta

covariación da respuesta a la razón por la que los modelos predictivos de pH y humedad son coincidentes sensibles a la misma región espectral, aunque sus desempeños de predicción difieran sustancialmente entre PLSR y ANN (Tabla 6).

Para el Día 0, los datos espectrales son muy conglomerados y con valores de pH más bajos, lo que da cuenta de una matriz química inicial homogénea y ácida (Krähmer et al. 2015; Ruiz et al. 2024). No obstante, en los Días 4 y 6 sí se evidenció mayor dispersión espectral y desplazamientos en la intensidad de bandas, en concordancia con el aumento del pH hacia condiciones menos ácidas (Morales et al. 2024; Vásquez et al. 2025). Este comportamiento se asocia a la degradación de compuestos complejos, la difusión de ácidos orgánicos al exterior del grano y la liberación de ácidos durante la fermentación, fenómenos que modifican la reflectancia de la muestra (León et al. 2016).

La sensibilidad del espectro NIR ante esas variaciones se convierte en concordante con los reportes que atribuyen los cambios espectrales a la reconfiguración molecular del agua y de los ácidos orgánicos durante la fermentación (Anyidoho et al. 2021; Priambodo et al. 2022). En consecuencia, la región 950 - 1400 nm contiene información suficiente para modelar el estado fermentativo y predecir parámetros fisicoquímicos clave, validando el NIR como herramienta robusta de monitoreo no destructivo en cacao (Al Riza et al. 2023; Anyidoho et al. 2021).

El análisis de los perfiles espectrales de humedad (Tabla 3, panel B) confirmó que la espectroscopía NIR es una herramienta de alta sensibilidad para monitorear la migración de agua durante la fermentación del cacao, en el día 0, los perfiles espectrales presentan una mayor intensidad de absorbancia en las regiones de 1200 nm y hacia los 1350 nm, zonas estrechamente vinculadas a los sobre tonos de los enlaces O - H (Anyidoho et al. 2021; Forte et al. 2022; Krähmer et al. 2015; Saputro et al. 2022). El análisis hiperespectral inicial es característica de granos con alto contenido de humedad y presencia de mucílago (Krähmer et al. 2015; Pinto et al. 2024). Se observa una disminución progresiva en la intensidad en zonas propias de vibraciones asociadas al agua, lo cual coincide con la pérdida gradual de humedad típica de la fermentación (Wahyuni et al. 2018). La espectroscopía utilizada detecta apropiadamente los cambios en la composición acuosa, respaldando el uso de estos perfiles como insumo confiable para los modelos neuronales y PLSR.

Se observó una disminución progresiva en el transcurso del dia 6 y un desplazamiento en la amplitud de estas bandas, donde no es solo una reducción numérica, sino la evidencia física de la exudación del mucílago y la evaporación del agua debido al incremento de la temperatura en la masa de fermentación (Anyidoho et al. 2021; Balcázar et al. 2023; Kouamé et al. 2021; Mougang et al. 2024). Según las investigaciones de Morales et al. (2024); Purbaningrum et al. (2023) esta pérdida de humedad es crítica, porque que regula la concentración de azúcares y ácidos en el cotiledón, influyendo directamente en la velocidad de las reacciones enzimáticas internas.

Los estudios indican que la pérdida gradual de humedad altera la reflectancia de la testa del grano, lo que permite una clasificación precisa del estado de madurez fermentativa (Anyidoho et al. 2021; Pinto et al. 2024). Al comparar los perfiles obtenidos con otras investigaciones se confirma que la normalización y el suavizado aplicados fueron efectivos para eliminar el "ruido" por dispersión de luz, permitiendo que la señal detectada sea puramente química y estructural (Cruz et al. 2020; Krähmer et al. 2015; Pinto et al. 2024; Ruiz et al. 2024).

Los perfiles espectrales de la Tabla 3 demostraron que la espectroscopía NIR puede codificar las variaciones cromáticas del grano de cacao mediante su respuesta óptica (Pinto et al. 2024). En el día 4, el perfil espectral da cuenta de la homogeneidad de los granos que son púrpuras o blanquecinas en función del genotipo (Krähmer et al. 2015; Pinto et al. 2024). A medida que la fermentación avanza hacia los días 4 y 6, se genera mayor dispersión en la absorbancia, pero solamente en las zonas situadas alrededor de 1000 y 1200 nm, en donde las diferencias medían las degradaciones de antocianinas y la formación de compuestos propios del pardeamiento, como lo son quinonas y complejos proteína polifenol (Pinto et al. 2024; Ruiz et al. 2024).

Los perfiles espectrales obtenidos en función de los parámetros de color L*, a* y b* en el día 4 y es de destacar que la inclusión de estos índices incorporados permite realizar la evaluación del proceso evolutivo en su evolución cromática y asocia reacciones enzimáticas y oxidativas (Mayra et al. 2024); pudiendo ser detectable mediante información espectral. Los cambios presentados en los perfiles son compatibles con modificaciones de luminosidad tonicidad rojo amarilla del proceso fermentativo (Ruiz et al. 2024). Las modificaciones observadas entre días el sistema propuesto por los parámetros colorimétricos pueden generar firmas espectrales útiles para la predicción, lo

que es coherente con estudios donde el color se observa como asociado a las comprobaciones bioquímicas (León et al. 2016).

Los índices colorimétricos L∗, a∗ y b∗ confirmaron que el avance del color se encuentra asociada a reacciones oxidativas catalizadas por enzimas como el polifenol oxidasa (Ruiz et al. 2024; Sari et al. 2025). El aumento de dispersión en el día 4 de fermentación coincide con el pico de actividad bioquímica y la estabilización de tonos rojos (a∗) y amarillos (b∗) tras la hidrólisis de pigmentos (Balcázar et al. 2023).

4.3. Comparación quimiométrica entre los modelos lineales y los no lineales

De acuerdo con el tercer objetivo, la comparación entre regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) y redes neuronales artificiales (ANN) mostró que los modelos no lineales mejoran de manera constante en todos los parámetros que se evaluaron.

En la Tabla 4 se vio una diferencia grande en cómo el modelo PLSR predice cada parámetro. Para el pH, el modelo PLSR obtuvo un R^2 de validación = 0.699, se encuentra por debajo del criterio de aceptabilidad ($R^2 \geq 0.70$), con RMSE de validación = 0.277 y RPD = 1.8, valor que según investigación de Hayati et al. (2023) corresponde a una estimación aproximada que requiere mejora del modelo. Para humedad, PLSR obtuvo R^2 de validación = 0.795 y RPD = 2.2, este modelo es bueno para clasificar muestras, pero no es lo suficientemente preciso para usos que exigen alta exactitud (Forte et al., 2022; Hayati et al., 2021). Los parámetros cromáticos revelaron el desempeño más bajo: L* (R^2 de validación = 0.396, RPD = 1.3), a* (R^2 de validación = 0.345, RPD < 1.5) y b* (R^2 de validación = 0.345, RPD < 1.5), estos valores muestran que el modelo lineal no logra capturar las relaciones entre los perfiles espectrales y las coordenadas colorimétricas, lo cual es coherente con que las reacciones de pardeamiento enzimático son no lineales (Caporaso et al. 2018; Teye et al. 2015).

Por otro lado, los modelos ANN (Tabla 5) obtuvieron un desempeño más alto en todos los parámetros. El pH, se obtuvo R^2 de entrenamiento = 0.975 y R^2 de validación = 0.919, con RMSE de validación = 0.143 y RPD = 6.3, valor que sitúa al modelo en la categoría de excelente capacidad predictiva (RPD > 3.0) conforme a los criterios de (Forte et al. 2022; Hayati et al. 2024). Con respecto a L*, los coeficientes fueron R^2 de entrenamiento = 0.952 y R^2 de validación = 0.766, con RPD = 4.5; para a*, R^2 de entrenamiento = 0.924 y R^2 de validación = 0.837, con RPD = 3.6; y para b*, R^2 de entrenamiento = 0.949 y R^2 de validación = 0.790, con RPD = 4.4. Los gráficos de dispersión muestran una alineación

cercana a la línea de identidad (Y=T), especialmente para pH y los parámetros cromáticos L* y a*, fortaleciendo ajuste robusto y adecuada capacidad de generalización, superando los coeficientes de determinación (R^2 = 0.54–0.67) reportados por estudios de León et al. (2016) para la predicción del índice de fermentación en cacao mediante ANN basadas en color digital.

En la humedad las redes neuronales artificiales, alcanzaron un entrenamiento de R^2 entrenamiento = 0.969, en validación el coeficiente fue R^2 de validación = 0.942 con RMSE de validación = 0.580 y RPD = 5.6, lo que corresponde a un modelo de alta capacidad. No obstante, la dispersión observada en los gráficos de validación (Tabla 5) sugiere que parte del ajuste refleja la baja variabilidad intrínseca del contenido hídrico entre tratamientos durante la fase fermentativa activa previa al secado (43.80 – 45.90 %), lo que limita el rango de predicción y puede inflar artificialmente el R^2 (Anyidoho et al. 2021; Caporaso et al. 2018).

La comparación de modelos predictivos entre PLSR y ANN (Tabla 6) indica la superioridad estable de las redes neuronales artificiales. Mientras que, PLSR no alcanzó un $R^2 \geq 0.70$ en los parámetros cromáticos (L*, a*, b*), con valores de RPD en la categoría de modelo inadecuado (RPD < 1.5 para a* y b*; RPD = 1.3 para L*), la ANN cumplió exitosamente en todos los parámetros durante el entrenamiento y en cuatro de cinco en validación: pH (R^2 de validación = 0.919), L* (R^2 de validación = 0.766), a* (R^2 de validación = 0.837) y b* (R^2 de validación = 0.790). Los valores de RPD del ANN (3.6 – 6.3) corresponden a un modelo excelente según los criterios internacionales señalados para la espectroscopía NIR en los principales de cacao (Forte et al., 2022; Hayati et al., 2021; Panchbhai y Lanjewar, 2025). Esta diferencia confirma el ambiente no lineal de las relaciones entre perfiles espectrales y las propiedades fisicoquímicas del grano fermentado y válida las redes neuronales artificiales (ANN) como instrumento de predicción fuerte para el monitoreo no destructivo en procesos de fermentación enzimática de cacao CCN51.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La composición de las enzimas bromelina y laccasa alcanzó cambiar las características fisicoquímicas del grano de cacao CCN-51 durante su fermentación. Los tratamientos con mayor concentración de laccasa (1.14 %) produjeron los menores valores de pH al día 6 (5.90 ± 0.03), estadísticamente inferiores al control (6.30 ± 0.14). La combinación A2B1 registró la mayor reducción de humedad (43.80 ± 0.30 % frente a 45.90 ± 0.40 % del control). La luminosidad (L*) fue desigual entre tratamientos sólo en el día 4, sin almacenar al término del proceso, mientras que las coordenadas a* y b* y la diferencia total de color (ΔE) no demostraron diferencias explicativas entre los procedimientos en ningún tiempo estimado.

Los perfiles hiperespectrales NIR, inscritos entre los 975 y 1363 nm, remando mediante filtro Savitzky–Golay y normalización SNV, accedieron asemejar cambios agrupados al proceso de la fermentación. La diferencia entre las muestras donde se alcanzó que los días 4 y 6 fue mayor, donde la seguridad que el uso de esta habilidad como una iniciativa de evaluación no demoledor durante el proceso de fermentación.

En el modelado predictivo, las redes neuronales artificiales mostraron una ocupación superior al PLSR para todas las variables desarrolladas. Los modelos ANN alcanzaron valores de R^2 de validación de 0.919 para el pH, 0.942 para la humedad, 0.766 para L*, 0.837 para a* y 0.790 para b*. Así mismo, los valores de RPD quedaron entre 2.07 y 4.15, lo que muestra una capacidad de predicción excelente, como la variable analizada. PLSR mostró una labor definida para los parámetros de color, con valores de RPD iguales o menores a 1.

5.2. Recomendaciones

Aplicar diseños de superficie de respuesta (como por ejemplo Box– Behnken o DCCR) para poder ajustar las concentraciones intermedias de las enzimas bromelina y laccasa (0.50-1.00 %) y tiempos de fermentación más apartados (144-168 h), para poder asemejar situaciones óptimas que extiendan las variaciones coloreadas y de acidificación, con el propósito de resaltar la condición del diseño completo aleatorizado (DCA).

Caracterizar la actividad enzimática específica (U/g o U/mL) de cada lote comercial de bromelina y laccasa a través de ensayos estandarizados antes de su aplicación, para poder expresar las dosis en unidades de actividad y no solo en base p/p comercial.

Considerar la caracterización microbiológica (recuento de levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias acéticas a través de placas selectivas, o secuenciación metagenómica) en paralelo a la caracterización fisicoquímica, para diferenciar la contribución del factor enzimático exógeno respecto de la sucesión microbiana espontánea propia de la fermentación.

Aumentar el tamaño muestral ($n \geq 50$) con observaciones independientes de zonas productoras diferentes de CCN-51 provenientes de Piura y considerar además la validación externa por las cosechas y los lotes para reducir el sobreajuste, particularmente en referencia al Color b*.

Considerar dentro de los análisis las técnicas GC-MS (para compuestos volátiles), HPLC (polifenoles específicos) y evaluación sensorial con panelistas entrenados para relacionar cambios espectrales y enzimáticos con los atributos organolépticos, para poder confirmar de este modo el impacto en calidad percibida real.

Extender el rango espectral incluyendo 400-900 nm (UV-Vis/NIR) para optimizar la predicción de Color b* ($R^2 < 0.20$). Ajustar CNN-51 para cubos hiperespectrales (spatial × spectral) uniendo heterogeneidad espacial del grano.

Ejecutar el proceso de validación en cajones fermentadores de alto volumen (500-1000 kg), predecir que la comercialización enzimática, el control térmico y existente. Integrar con análisis de impacto monetario (precio de enzimas vs aumento de valor del grano).

Efectuar los sensores NIR portátiles de bajo precio (filtros de interrupción) medios en longitudes diagnósticas (1687, 2057, 2217 nm) e integración con modelos ANN previamente con alta calidad para no ser destructivo en tiempo existente.

Promover la instalación y equipamiento en la Universidad Nacional de Jaén un laboratorio de procesamiento hiperespectral (cámara NIR ≥ 200 bandas, software quimiométrico y estación GPU) y un laboratorio de software con Design Expert, Minitab y Python para modelado predictivo aplicado.

A nuestras autoridades de la Universidad nacional de Jaén, promover la firma de convenios con cooperativas de Morropón, Huancabamba y Ayabaca para validación en condiciones reales y capacitación técnica orientada a adopción del protocolo con la respectiva transferencia tecnológica.

Desarrollar enfoques híbridos (PLSR para selección/interpretabilidad o ANN para predicción) o ensembles, maximizando interpretabilidad y precisión.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Riza, D., Putranto, A., Iqbal, Z., Firmanto, H., y Anggraini, C. (2023). Prediction of Fermentation Index and pH of Cocoa (Theobroma cacao L.) Beans Based on Color Features (Cut Test) and Partial Least Square Regression Model. *Food Science and Technology*, *11*, 54–62. https://doi.org/10.13189/fst.2023.110106

Anyidoho, E. K., Teye, E., Agbemafle, R., Amuah, C. L. Y., y Boadu, V. G. (2021a). Application of portable near infrared spectroscopy for classifying and quantifying cocoa bean quality parameters. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(5). https://doi.org/10.1111/jfpp.15445

Anyidoho, E. K., Teye, E., Agbemafle, R., Amuah, C. L. Y., y Boadu, V. G. (2021b). Application of portable near infrared spectroscopy for classifying and quantifying cocoa bean quality parameters. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(5). https://doi.org/10.1111/jfpp.15445

AOAC International. (2023a). AOAC Official Method 931.04: Loss on drying (moisture) in cacao products. En *Official methods of analysis of AOAC International* (22a ed.). Oxford University Press.

AOAC International. (2023b). AOAC Official Method 970.21: pH of cacao products: Potentiometric method. En *Official methods of analysis of AOAC International* (22a ed.). Oxford University Press.

Balcázar, C. R., Pajuelo, A. J., Trigoso, D. F., Iliquin, A. F., Fernández, E., Yoplac, I., Muñoz, L. D., Rodríguez, N., Maza, I. M., Cayo, I. S., Chagas, G. C. A., Maicelo, J. L., y Castro, E. M. (2023). Reduction in the Cocoa Spontaneous and Starter Culture Fermentation Time Based on the Antioxidant Profile Characterization. *Foods*, *12*(17), 3291. https://doi.org/10.3390/foods12173291

Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., y Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra.

Applied Spectroscopy, *43*(5), 772–777. https://doi.org/10.1366/0003702894202201

Biocatalysts. (2023). *Bromelain: Powerful proteolytic enzyme*. Biocatalysts. https://www.biocatalysts.com/media-resources/bromelain-food-applications

Caporaso, N., Whitworth, M. B., Fowler, M. S., y Fisk, I. D. (2018). Hyperspectral imaging for non-destructive prediction of fermentation index, polyphenol content and antioxidant activity in single cocoa beans. *Food Chemistry*, *258*, 343–351. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.039

Conigliaro, P., Portaccio, M., Lepore, M., y Delfino, I. (2023). *Propiedades ópticas de las lacasas y su uso para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos: Una breve revisión*. https://www.mdpi.com/2076-3417/13/23/12929

Couto, S., y Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, *24*(5), 500–513. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003

Cruz, J. P., Fernández Pierna, J. A., Rogez, H., Barbin, D. F., y Baeten, V. (2020). Authentication of cocoa (Theobroma cacao) bean hybrids by NIR-hyperspectral imaging and chemometrics. *Food Control*, *118*, 107445. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107445

Flores, D., Tuesta, T., Silva-Paz, R., Liñan-Pérez, J., Puma-Isuiza, G., Jordán-Suárez, O., y Ramos-Ramírez, M. (2025). Effect of Fermentation and Drying Practices on the Physical, Chemical and Sensory Characteristics of CCN51 Cocoa Beans (Theobroma cacao). *International Journal of Agriculture and Biosciences*, *14*(5), 839–850. https://doi.org/10.47278/journal.ijab/2025.069

Forte, M., Currò, S., Van De Walle, D., Dewettinck, K., Mirisola, M., Fasolato, L., y Carletti, P. (2022). Quality Evaluation of Fair-Trade Cocoa Beans from Different

Origins Using Portable Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). *Foods*, *12*(1), 4. https://doi.org/10.3390/foods12010004

Guzmán, T. M., Ramos-Guerrero, L. A., Guerra, L. S., y Ruales, J. (2023). Optimization of cacao beans fermentation by native species and electromagnetic fields. *Heliyon*, *9*(4), e15065. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15065

Hahn, V. (2023). Potential of the enzyme laccase for the synthesis and derivatization of antimicrobial compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(4), 107. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03539-x

Hariyadi, T., Paramitha, T., Irmawati, D., y Salsabila, S. (2024). The Effect of Pineapple Crude Enzymes and Fermentation Time on The Decaffeination Process of Robusta Coffee. *Current Journal: International Journal Applied Technology Research*, *5*, 63–70. https://doi.org/10.35313/ijatr.v5i1.128

Hartuti, S., Bintoro, N., Karyadi, J. N. W., y Pranoto, Y. (2020). Analysis of pH and color of fermented cocoa (Theobroma cacao L) beans using response surface methodology. *Pertanika Journal of Science and Technology*, *28*(2), 509–522.

Hayati, R., Maulina, F. A., y Munawar, A. A. (2024). Non-Destructive Prediction of Moisture and Fat Content in Cocoa Beans Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Regression Models. *International Journal of Design & Nature and Ecodynamics*, *19*(1), 281–290. https://doi.org/10.18280/ijdne.190131

Hayati, R., Zulfahrizal, Z., y Munawar, A. A. (2021). Robust prediction performance of inner quality attributes in intact cocoa beans using near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Heliyon*, *7*(2), e06286. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06286

Hilgers, R., Vincken, J.-P., Gruppen, H., y Kabel, M. A. (2018). Laccase/Mediator Systems: Their Reactivity toward Phenolic Lignin Structures. *ACS Sustainable*

Chemistry & Engineering, *6*(2), 2037–2046. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03451

Ibrahim, N. S., Hidayat, C., Utami, T., Yanti, R., y Witasari, L. (2024). Flavor Precursor and Volatile Compounds Formation of Unfermented Cocoa Beans Hydrolyzed by Papain. *Food Science and Technology*, *44*. https://doi.org/10.5327/fst.00224

ISO. (2018). *GIP 103—Guía de Implementación de la Norma Técnica Peruana NTP-ISO 2451-2018 Granos de cacao. Especificaciones y requisitos de calidad*. https://www.gob.pe/institucion/inacal/informes-publicaciones/2187947-gip-103-guia-de-implementacion-de-la-norma-tecnica-peruana-ntp-iso-2451-2018-granos-de-cacao-especificaciones-y-requisitos-de-calidad

ISO/CIE. (2019). *ISO/CIE 11664-4:2019(E): Colorimetry—Part 4: CIE 1976 L*a*b* colour space* (ISO/CIE 11664-4:2019). https://www.iso.org/standard/74166.html

Kouamé, C., Loiseau, G., Grabulos, J., Boulanger, R., y Mestres, C. (2021). Desarrollo de un modelo para la fermentación alcohólica de granos de cacao por una cepa de Saccharomyces cerevisiae. *International Journal of Food Microbiology*, *337*, 108917. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108917

Krähmer, Annika Engel, Daniel Kadow, Naailah Ali, Pathmanathan Umaharan, Lothar W. Kroh, y Hartwig Schulz. (2015). Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *181*, 152–159. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.084

Kumar, A., Dhiman, S., Krishan, B., Samtiya, M., Kumari, A., Pathak, N., Kumari, A., Aluko, R. E., y Dhewa, T. (2024). Microbial enzymes and major applications in the food industry: A concise review. *Food Production, Processing and Nutrition*, *6*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s43014-024-00261-5

León, N., Abderrahim, M., Nuñez, L., Arribas, S. M., y Condezo, L. (2016). Predicción del índice de fermentación de granos de cacao (Theobroma cacao L.) basada en medición de color y redes neuronales artificiales. *Talanta*, *161*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.022

Levene, H. (1960). Robust test for equality of variances. En *Contribucions to Probability and Statics*.

Mardjan, S., Mitaray, M. K., Samsudin, S., Rahardjo, Y. P., y Firdaus, J. (2025). Portable NIR Spectroscopy for Cocoa Bean Re-fermentation Analysis: A Rapid and Reliable Technique. *Jurnal Keteknikan Pertanian*, *13*(4), 513–528. https://doi.org/10.19028/jtep.013.4.513-528

Mayra, O. C., Manosalvas-Quiroz, L.-A., Mosquera, N. P., Samaniego, I., Mayra, O. C., Manosalvas-Quiroz, L.-A., Mosquera, N. P., y Samaniego, I. (2024). Effect of fermentation parameters on the antioxidant activity of Ecuadorian cocoa (*Theobroma cacao* L.). *AIMS Agriculture and Food*, *9*(3), 872–886. https://doi.org/10.3934/agrfood.2024047

Morales, W. J., Morante-Carriel, J., Herrera-Feijoo, R. J., Ayuso-Yuste, M. C., y Bernalte-García, M. J. (2024). Effect of addition of yeasts and enzymes during fermentation on physicochemical quality of fine aroma cocoa beans. *Journal of Agriculture and Food Research*, *16*, 101126. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101126

Mougang, N. N., Tene, S. T., Zokou, R., Kohole, H. A. F., Solefack, E. N., Ntongme Mboukap, A., Abaoabo, A. A. F., y Womeni, H. M. (2024). Influencia del tiempo de fermentación, tiempo de secado y temperatura en la comercialización de las mazorcas de cacao (Theobroma cacao L.). *Applied Food Research*, *4*(2), 100460. https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100460

Panchbhai, K. G., y Lanjewar, M. G. (2025). Portable system for cocoa bean quality assessment using multi-output learning and augmentation. *Food Control*, *174*, 111234. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111234

Pinto, A., Deryck, A., Lima, G. V., de Oliveira, A. C., Moura, F. G., Barbin, D. F., Fernández Pierna, J. A., Baeten, V., y Rogez, H. (2024). Advances in the individual authentication of cocoa beans: Vis/NIR spectroscopy as a tool to distinguish fermented from unfermented beans and classify genotypes in the eastern Amazonia. *Food Control*, *164*, 110559. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110559

Priambodo, D. C., Saputro, D., Pahlawan, M. F. R., Saputro, A. D., y Masithoh, R. E. (2022). Determination of Acid Level (pH) and Moisture Content of Cocoa Beans at Various Fermentation Level Using Visible Near-Infrared (Vis-NIR) Spectroscopy. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *985*(1), 012045. https://doi.org/10.1088/1755-1315/985/1/012045

Purbaningrum, K., Hidayat, C., Witasari, L. D., y Utami, T. (2023). Flavor Precursors and Volatile Compounds Improvement of Unfermented Cocoa Beans by Hydrolysis Using Bromelain. *Foods*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/foods12040820

Riza, D. F. A., Putranto, A. W., Iqbal, Z., Firmanto, H., y Anggraini, C. D. (2023). Prediction of Fermentation Index and pH of Cocoa (Theobroma cacao L.) Beans Based on Color Features (Cut Test) and Partial Least Square Regression Model. *Food Science and Technology*, *11*(1), 54–62. https://doi.org/10.13189/fst.2023.110106

Ruiz, F. L., Marquez, F. J., García, P., Carrera, A., Ramírez, C., Ocaranza, E., y Jiménez, D. J. (2024). Physicochemical and Biochemical Changes in Cocoa during the

Fermentation Step. *Fermentation*, *10*(8), 405. https://doi.org/10.3390/fermentation10080405

Saputro, D., Priambodo, D., Pahlawan, M., y Masithoh, R. (2022). *Classification of Cocoa Beans Based on Fermentation Level Using PLS-DA Combined with Visible Near-Infrared (VIS-NIR) Spectroscopy*. 100–106. https://doi.org/10.2991/absr.k.220305.015

Sari, A. B. T., Gola, S., Rothkopf, I., Schweiggert-Weisz, U., y Schieber, A. (2025). Improving the sensory properties of unfermented cocoa press cake via hydration, yeast, and bromelain treatments. *Applied Food Research*, *6*(1), 101606. https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101606

Savitzky, Abraham., y Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, *36*(8), 1627–1639. https://doi.org/10.1021/ac60214a047

Shapiro, S. S., y Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, *52*(3–4), 591–611. https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591

Sondhi, S., Chopra, N. K., Kumar, A., y Gupta, N. (2023). Laccase: A Green Solution for Environmental Problems. *Advances in Environmental and Engineering Research*, *4*(2), 1–32. https://doi.org/10.21926/aeer.2302030

Teye, E., Huang, X., Sam-Amoah, L. K., Takrama, J., Boison, D., Botchway, F., y Kumi, F. (2015). Estimating cocoa bean parameters by FT-NIRS and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, *176*, 403–410. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.042

TradeMap. (2025). *Mapa comercial: Estadísticas comerciales para el desarrollo empresarial internacional*. https://www.trademap.org/Index.aspx

Tukey, J. W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, *5*(2), 99. https://doi.org/10.2307/3001913

Vásquez, L., Montoya, E. A., Cadenas, L. I., Plua, J. A., Camacho, C. O., Cobos, F. J., Rodríguez, S. L., y Pazmiño Pérez, Á. M. (2025). Physical, chemical and sensory evaluation of cocoa (Theobroma cacao L.) CCN51 fermented with Saccharomyces cerevisiae and fruit extract (Manila mango) at different stages of ripeness. *Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria*, *45*(3), 117–128. https://doi.org/10.12873/453vasquez

Velásquez, D., García-Alamilla, P., Kirchmayr, M. R., Lugo-Cervantes, E., y Gschaedler, A. (2025). Contribution of post-harvest processing in cocoa bean: Chemometric and metagenomic analysis in fermentation step. *Food Chemistry*, *477*, 143458. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143458

Wahyuni, M., Yunita, D., Yusriana, Aisyah, Y., Lahmer, R., y Mugampoza, D. (2018). *Chemical and microbiological characteristics of cocoa beans from pidie district, aceh province, indonesia*.

Wold, S., Sjöström, M., y Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, PLS Methods*, *58*(2), 109–130. https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1

DEDICATORIA

Gracias a Dios por darme la fortaleza, salud para alcanzar esta meta y por guiar mi camino durante todo el proceso. A mis padres, Vilma Marisol Santos Troyes y Félix Abdón Martinez Rosillo, por su amor incondicional, sus enseñanzas y el sacrificio realizado para que pudiera alcanzar mis estudios universitarios; a mi hija, Katherine Martinez, por ser mi mayor motivación; y a mis hermanos y familiares, Anthony, Katia, Sheyla, Lisbeth, Alexandra e Hilda quienes han sido mi apoyo y motivación constante e incondicional en todo momento; me impulsaron a seguir y nuca me dejaron rendirme a pesar de las dificultades.

A mi compañera de tesis, amigos e ingenieros que me brindaron apoyo, orientación y acompañamiento a lo largo de esta etapa para alcanzar nuestras metas trazadas.

Karla Jennifer Martinez Santos

A Dios por ser mi guía, mi fortaleza y su gran amor que han estado presente conmigo. A mis padres, Che Guevara Campos y Rosio Irigoin Quintana, que son el pilar fundamental en mi vida por ser mi guía constante y mi fuerza en los momentos difíciles y han guiado mis pasos durante mi carrera universitaria. Gracias por su amor incondicional, sus sacrificios silenciosos, con su ejemplo, el valor del esfuerzo y la perseverancia. Este logro también es suyo. A mis queridas hermanas Mary, Noila, Neili, Fiorela, por su apoyo inquebrantable y su paciencia infinita y por estar a mi lado en cada paso de este camino. Con todo mi cariño y gratitud, les dedico esta meta cumplida.

Agradezco también a mi compañera de tesis, Karla Jennifer Martinez Santos, por su constante apoyo a lo largo de este extenso camino académico. Asimismo, expreso mi reconocimiento a mis amigos, docentes y compañeros que contribuyeron a este proceso.

Yohana Guevara Irigoin

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradecemos a Dios por brindarnos salud para cumplir con nuestros objetivos.

A nuestro asesor Mg. Hans Himbler Minchán Velayarce, coasesor Dr. Wilson Manuel Castro Silupu y al Ing. Luis Alberto Juarez Calderón por su guía experta, conocimientos y sugerencias a lo largo de este proceso de investigación, con su dedicación y compromiso académico que han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

A nuestra alma mater, la Universidad Nacional de Jaén, a la Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias y sus docentes por la labor que desempeñan en la formación profesional durante los 5 años académicos.

Nuestro más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Frontera por abrirnos las puertas de su casa de estudios y permitirnos realizar el proceso de ejecución del proyecto de tesis en sus instalaciones y al equipo de Laboratorio de Investigación en Inocuidad de Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias y Biotecnología por el apoyo, compromiso, responsabilidad y trabajo en equipo durante el desarrollo del proyecto con la finalidad de mejorar la calidad de nuestra investigación, obteniendo resultados positivos a pesar de las diferentes dificultades durante el proceso.

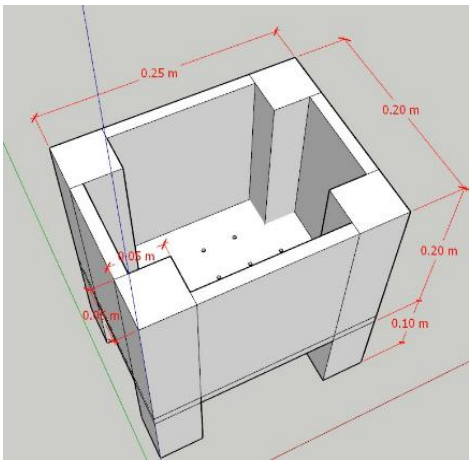
A nuestros familiares, amigos, compañeros e ingenieros con los que hemos compartido gratos momentos, quienes nos han brindado su apoyo, colaboración, ánimo, cariño y amistad, que de alguna u otra manera formaron parte de este logro.

ANEXOS

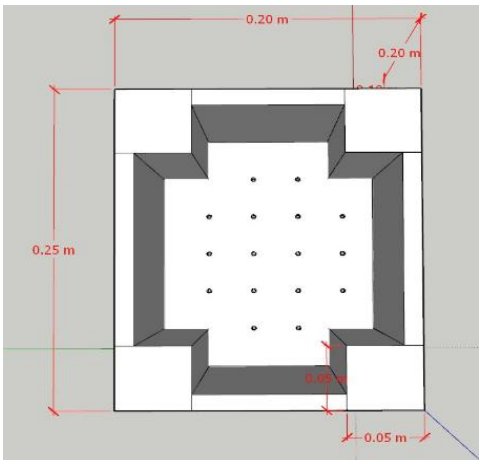
Anexo A: Diseño y construcción de los cajones fermentadores

Figura A.1

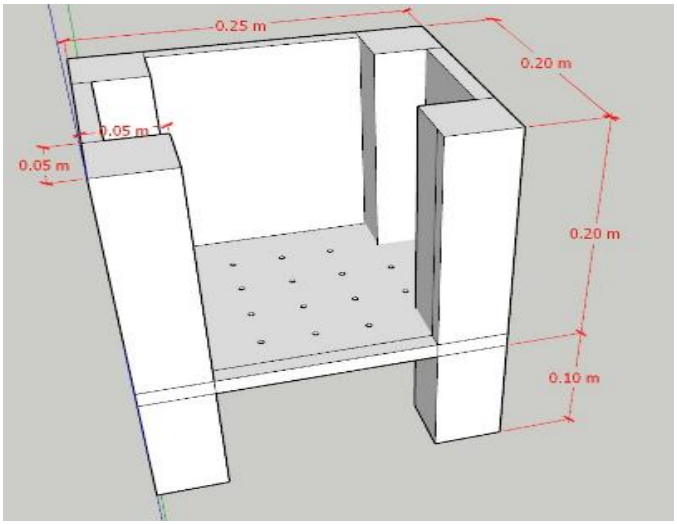
Diseño y dimensiones de los cajones fermentadores utilizados en el estudio



A



B



C

Nota: (A) vista tridimensional de cajón fermentador de madera con dimensiones generales. (B) Vista superior del cajón fermentador mostrando la disposición del sistema de drenaje en la base. (C) Vista interna del cajón fermentador con detalle del fondo perforado y del tabique interno utilizando para la separación y el manejo de la masa durante la fermentación.

Figura A.2

Armado de los cajones fermentadores mediante madera Guazuma crinita (bolaina blanca).



A



B



C



D

Nota: (A) Corte y preparación de las piezas de madera para la fabricación de los cajones fermentadores. (B) Ensamblaje manual de las estructuras mediante unión de piezas. (C) Verificación del ajuste y estabilidad de los cajones durante el armado. (D) Cajones fermentadores terminados y listos para su uso experimental.

Anexo B: Obtención y preparación de los granos de cacao para la fermentación

Figura B.1

Recolección, selección y quebrado de mazorcas de cacao CCN-51 previo a la fermentación



A



B



C



D

Nota: (A) Mazorcas de cacao CCN-51 seleccionadas para el proceso experimental. (B) Clasificación manual de las mazorcas previo al quebrado. (C) Extracción de granos de cacao durante el proceso de despulpado. (D) Separación de granos y residuos obtenidos tras el quebrado de las mazorcas.

Figura B.2

Pesado y colocado los granos de cacao CCN-51 en los cajones fermentadores



A



B



C

Nota: (A) Pesado de granos de cacao CCN-51 mediante balanza de 5k previo a la colocación en los cajones fermentadores. (B) Distribución manual de los granos dentro del cajón durante el llenado. (C) Granos de cacao frescos para el proceso fermentativo.

Figura B.3

Pesado de las enzimas Bromelina y Laccasa



A



B

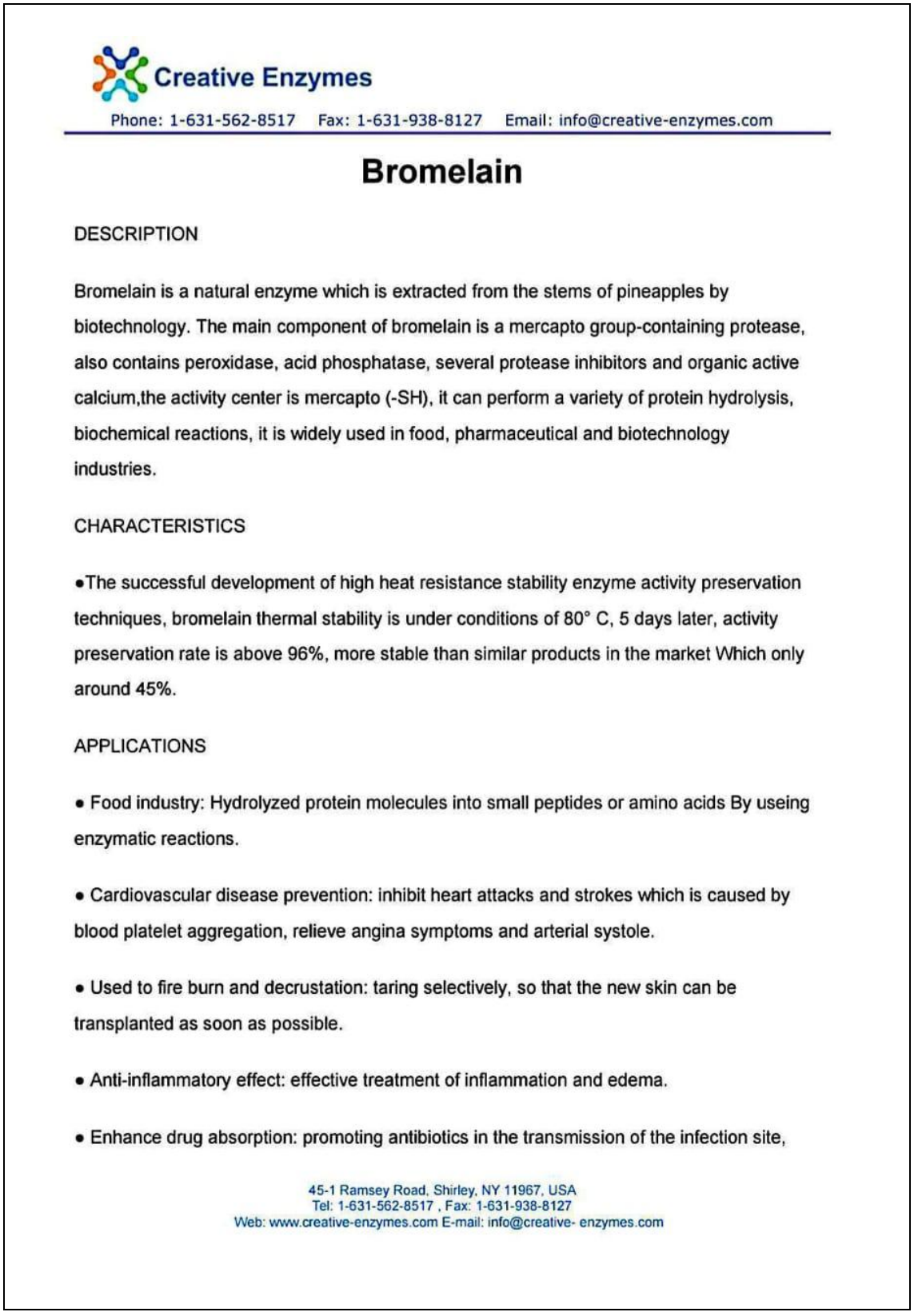


C

Nota: (A) Bolsas que contienen las enzimas en polvo: Bromelina y Laccasa (B) Pesado exacto de las cantidades a requerir de las enzimas en balanza analítica durante la preparación experimental. (C) Muestras de enzimas combinadas para el mezclado con jugo del mucílago.

Anexo C: Fichas técnicas de las enzimas

Figura C.1
Ficha técnica de la enzima Bromelina



Creative Enzymes

Phone: 1-631-562-8517 Fax: 1-631-938-8127 Email: info@creative-enzymes.com

Bromelain

DESCRIPTION

Bromelain is a natural enzyme which is extracted from the stems of pineapples by biotechnology. The main component of bromelain is a mercapto group-containing protease, also contains peroxidase, acid phosphatase, several protease inhibitors and organic active calcium,the activity center is mercapto (-SH), it can perform a variety of protein hydrolysis, biochemical reactions, it is widely used in food, pharmaceutical and biotechnology industries.

CHARACTERISTICS

•The successful development of high heat resistance stability enzyme activity preservation techniques, bromelain thermal stability is under conditions of 80° C, 5 days later, activity preservation rate is above 96%, more stable than similar products in the market Which only around 45%.

APPLICATIONS

• Food industry: Hydrolyzed protein molecules into small peptides or amino acids By useing enzymatic reactions.

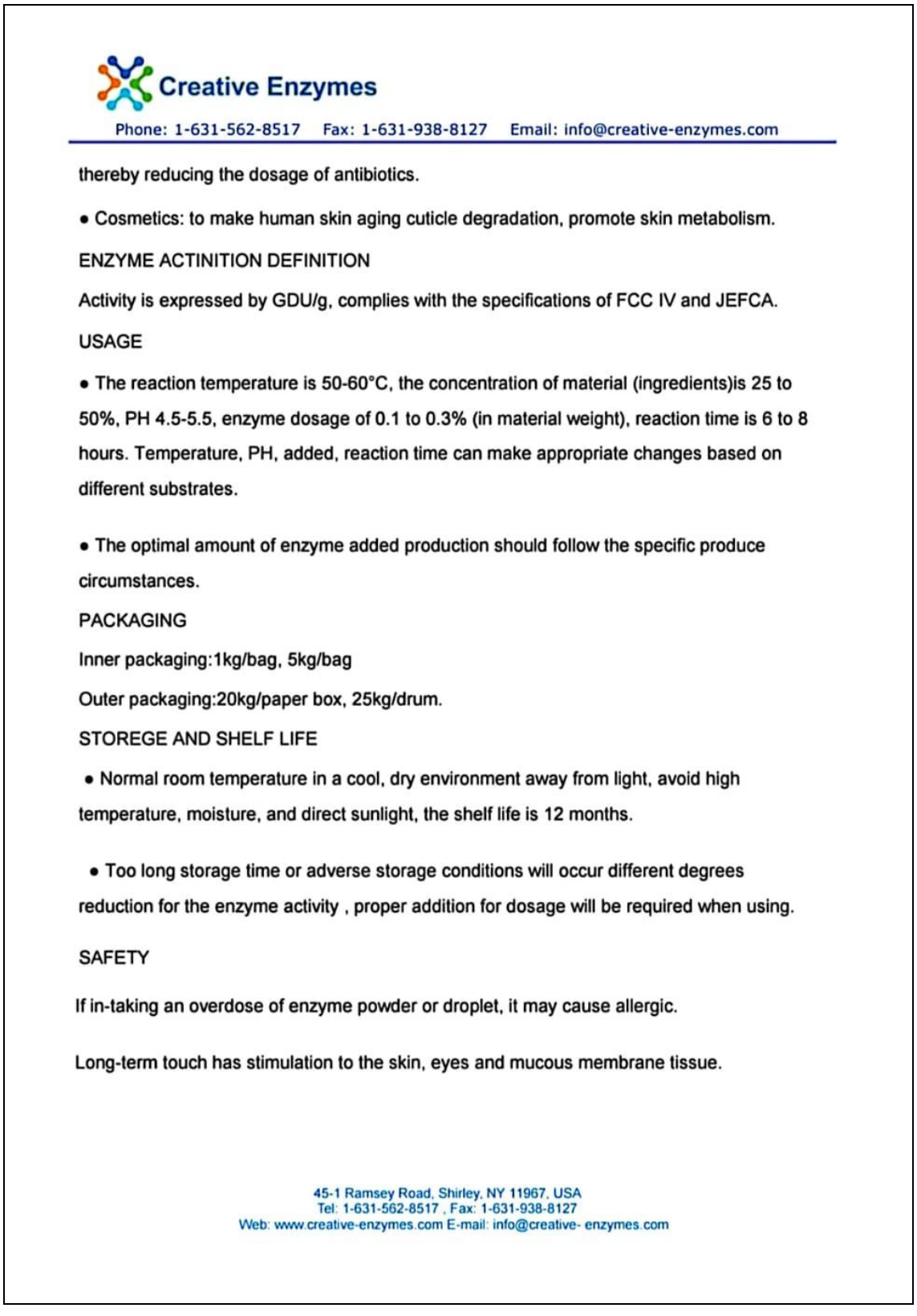
• Cardiovascular disease prevention: inhibit heart attacks and strokes which is caused by blood platelet aggregation, relieve angina symptoms and arterial systole.

• Used to fire burn and decrustation: taring selectively, so that the new skin can be transplanted as soon as possible.

• Anti-inflammatory effect: effective treatment of inflammation and edema.

• Enhance drug absorption: promoting antibiotics in the transmission of the infection site,

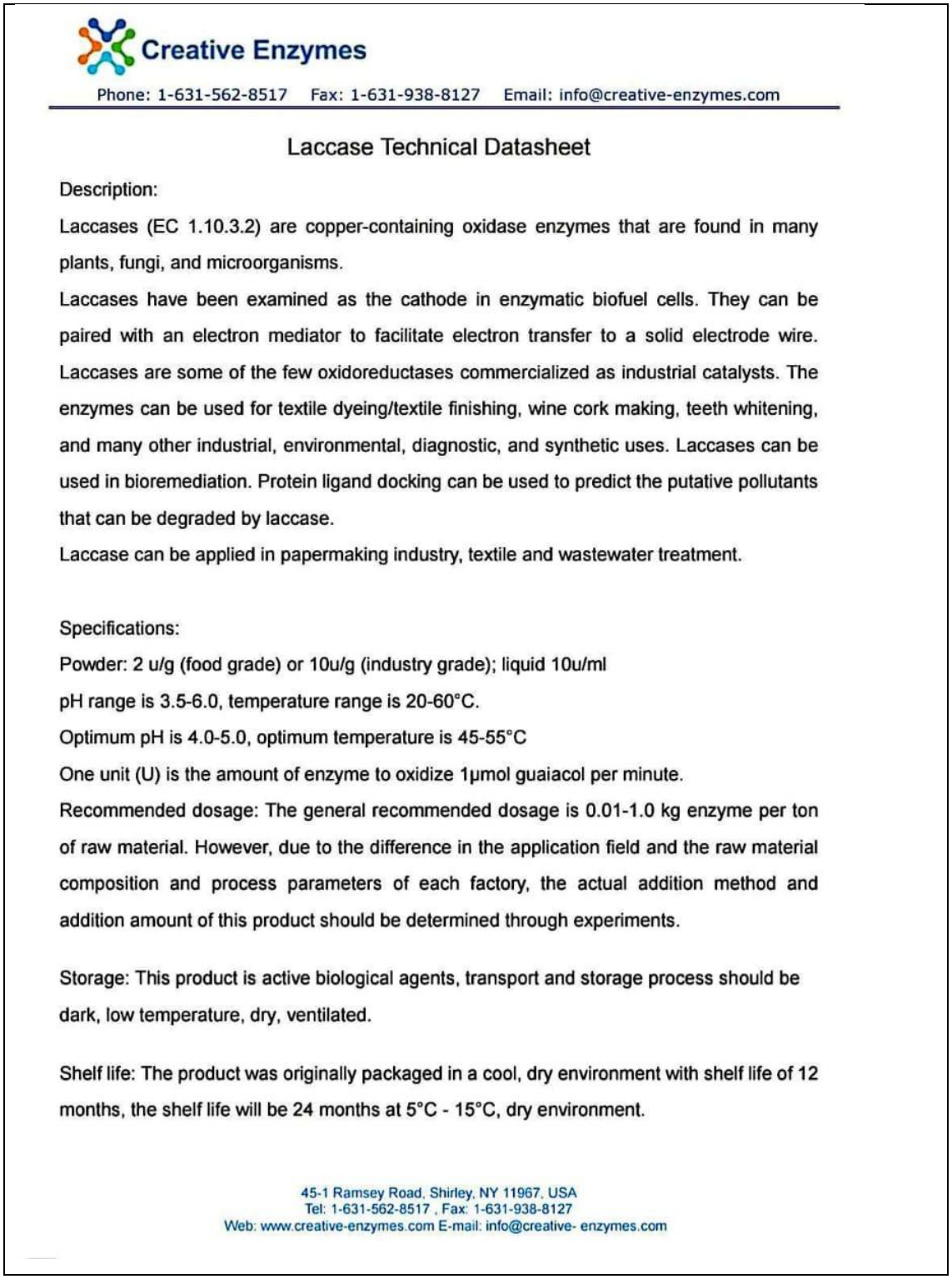
45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA
Tel: 1-631-562-8517 , Fax: 1-631-938-8127
Web: www.creative-enzymes.com E-mail: info@creative- enzymes.com



Nota: La bromelina es una enzima proteolítica de origen vegetal utilizada en múltiples aplicaciones industriales; se describen sus características de actividad enzimática, condiciones de uso, empaque, almacenamiento y aspectos de seguridad, incluyendo rangos de temperatura, pH y vida útil.

Figura C.2

Ficha técnica de la enzima Laccasa



Creative Enzymes

Phone: 1-631-562-8517 Fax: 1-631-938-8127 Email: info@creative-enzymes.com

Laccase Technical Datasheet

Description:

Laccases (EC 1.10.3.2) are copper-containing oxidase enzymes that are found in many plants, fungi, and microorganisms.

Laccases have been examined as the cathode in enzymatic biofuel cells. They can be paired with an electron mediator to facilitate electron transfer to a solid electrode wire. Laccases are some of the few oxidoreductases commercialized as industrial catalysts. The enzymes can be used for textile dyeing/textile finishing, wine cork making, teeth whitening, and many other industrial, environmental, diagnostic, and synthetic uses. Laccases can be used in bioremediation. Protein ligand docking can be used to predict the putative pollutants that can be degraded by laccase.

Laccase can be applied in papermaking industry, textile and wastewater treatment.

Specifications:

Powder: 2 u/g (food grade) or 10u/g (industry grade); liquid 10u/ml

pH range is 3.5-6.0, temperature range is 20-60°C.

Optimum pH is 4.0-5.0, optimum temperature is 45-55°C

One unit (U) is the amount of enzyme to oxidize 1μmol guaiacol per minute.

Recommended dosage: The general recommended dosage is 0.01-1.0 kg enzyme per ton of raw material. However, due to the difference in the application field and the raw material composition and process parameters of each factory, the actual addition method and addition amount of this product should be determined through experiments.

Storage: This product is active biological agents, transport and storage process should be dark, low temperature, dry, ventilated.

Shelf life: The product was originally packaged in a cool, dry environment with shelf life of 12 months, the shelf life will be 24 months at 5°C - 15°C, dry environment.

45-1 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA
Tel: 1-631-562-8517 , Fax: 1-631-938-8127
Web: www.creative-enzymes.com E-mail: info@creative- enzymes.com

Nota: Se presenta la descripción, especificaciones, rangos de pH y temperatura, dosificación recomendada y condiciones de almacenamiento de la enzima Laccasa para aplicaciones industriales.

Anexo D: Incorporación de enzimas y monitoreo fisicoquímico del proceso fermentativo

Figura D.1

Proceso de filtrado jugo del mucilago de cacao CCN-51 y mezclado con las enzimas



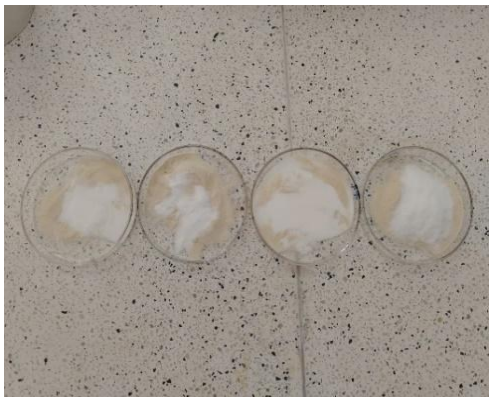
A



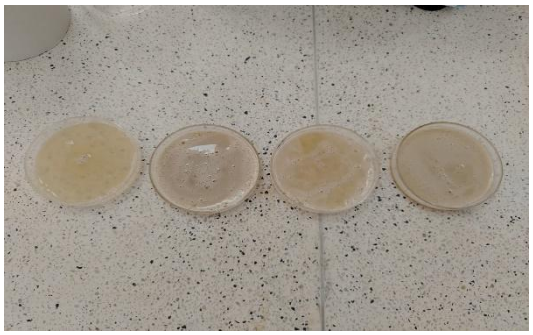
B



C



D



E

Nota: (A) Recipiente empleado para la recolección del mucílago de cacao. (B) Proceso de filtrado del mucílago mediante colador para la separación de impurezas. (C) Manipulación y almacenamiento de enzimas combinadas. (D) Mezclado de ambas enzimas. (E) Enzimas combinadas con mucilago del cacao.

Figura D.2

Incorporación de enzimas Bromelina y Laccasa a los granos de cacao CCN-51



A



B



C

Nota: (A) Incorporación de las enzimas Bromelina y Laccasa en los granos de cacao CCN- 51. (B) Monitoreo de la temperatura de las muestras con termómetro digital de varilla para garantizar condiciones controladas durante el proceso enzimático. (C) Disposición de los cajones durante la etapa fermentativa del cacao.

Figura D.3

Medición de pH para los granos de cacao durante la etapa fermentativa



A



B



C



D

Nota: (A) Preparación de muestras de granos de cacao para la medición de pH. (B) Trituración de la muestra para su homogenización. (C) Proceso de filtración de muestras tratadas enzimáticamente, evidenciando la separación de fases sólidas y líquidas. (D) Lectura del pH METRO digital de mesa (marca Hanna).

Figura D.4

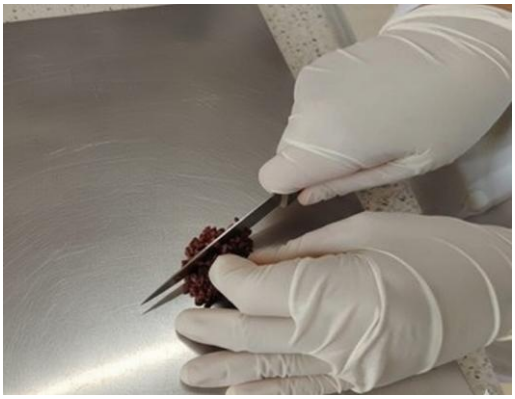
Medición de Humedad para los granos de cacao en la etapa fermentativa



A



B



C



D



E

Nota: (A) Separación de granos de cacao CCN-51 para la determinación de humedad. (B) Pesado de los granos de cacao CCN-51. (C) Preparación de la muestra mediante corte manual, realizada bajo condiciones de higiene y bioseguridad. (D) Aplicación del método de secado en estufa para la deshidratación controlada de la muestra. (E) Muestras de granos tras el proceso de secado.

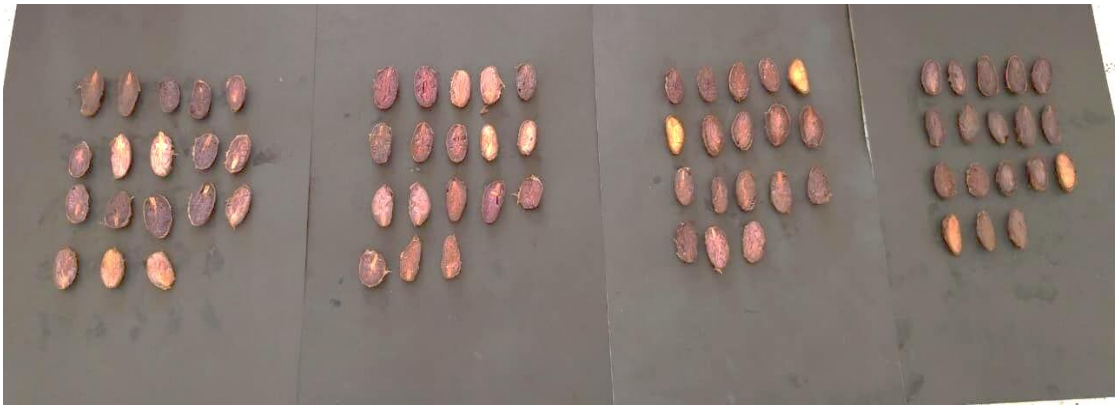
Figura D.5

Medición del color instrumental mediante colorímetro

A



B





C



D

Nota: (A) Preparación de granos de cacao para el análisis instrumental de color. (B) Disposición ordenada de los granos de cacao CCN-51 para su evaluación. (C) Manipulación del equipo colorimétrico de reflectancia durante la medición. (D) Lectura de parámetros de color en el dispositivo de medición.

Anexo E: Adquisición y procesamiento de imágenes hiperespectrales

Figura E.1

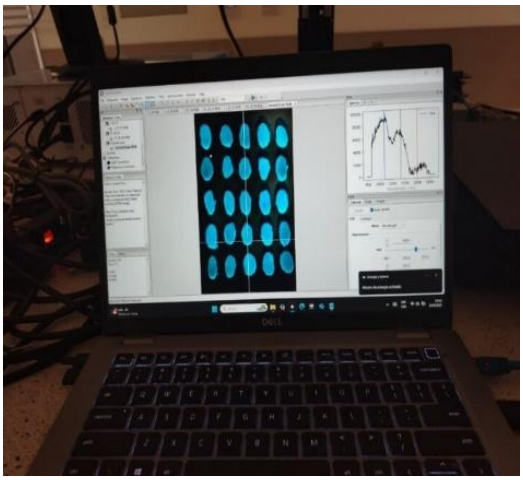
Proceso de adquisición de imágenes hiperespectrales de granos mediante cámara hiperespectral



A



B



C



D

Nota: (A) Distribución ordenada de las muestras de cacao CCN-51. (B) colocación de los granos en equipo de Resonon para la captura respectiva. (C) Visualización de resultados en el software de análisis. (D) Supervisión del proceso de captura de los granos que sean correctamente.

Figura E.2

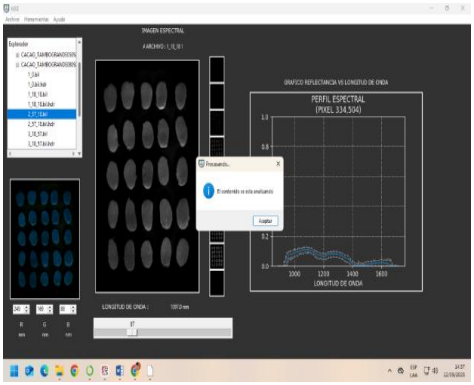
Procedimiento de análisis computacional de imágenes hiperespectrales de granos



A



B



C



D

Nota: (A) Procesamiento de datos experimentales mediante software Uncramble. (B) Análisis gráfico de resultados en computadora. (C) Registro y organización de información obtenida. (D) Evaluación final de los datos experimentales.

Anexo F: Registro de las temperaturas promedio de la masa de cacao CCN-51 durante la fermentación

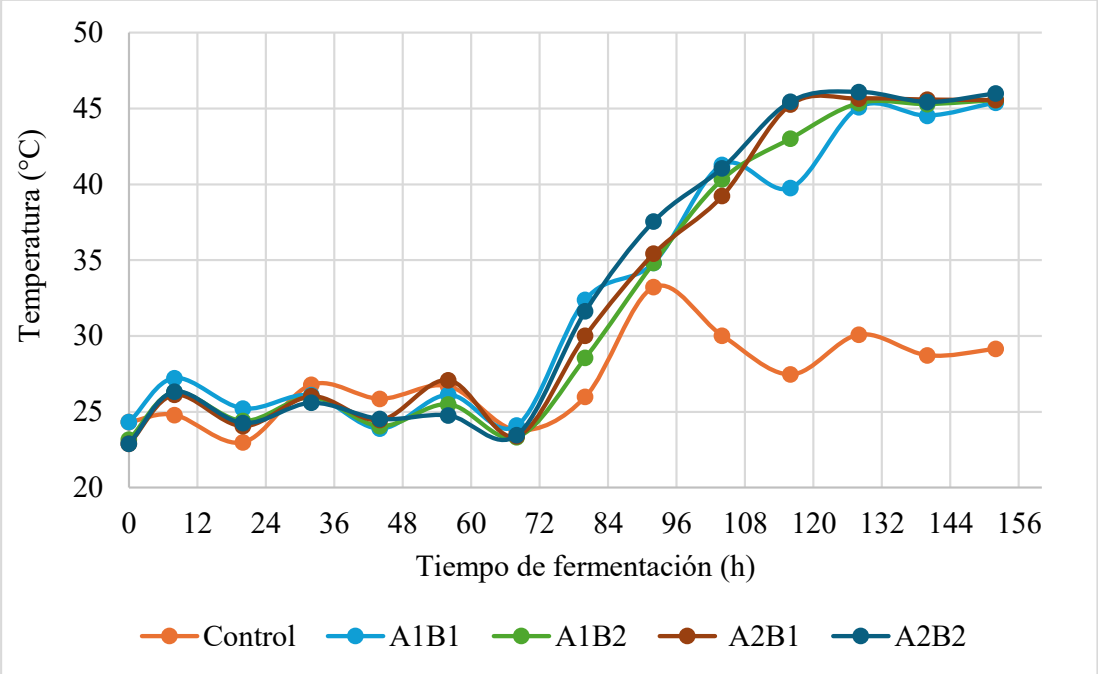
Tabla F.1

Registro de las temperaturas promedio de la masa de cacao CCN-51, por tratamiento y control durante la fermentación.

Días	Tiempo (h)	control	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
1	0	24.33	24.33	23.17	22.90	22.90
	8	24.80	27.23	26.30	26.13	26.33
2	20	23.00	25.23	24.40	24.07	24.27
	32	26.80	26.10	25.97	26.03	25.60
3	44	25.87	23.90	24.07	24.47	24.53
	56	26.70	26.13	25.50	27.10	24.77
4	68	23.80	24.10	23.33	23.40	23.47
	80	26.00	32.40	28.57	30.03	31.63
5	92	33.23	34.83	34.83	35.43	37.57
	104	30.03	41.30	40.33	39.23	41.07
6	116	27.47	39.77	43.03	45.27	45.47
	128	30.10	45.10	45.37	45.67	46.10
7	140	28.73	44.53	45.30	45.60	45.43
	152	29.15	45.40	45.57	45.57	46.00

Figura F.1

Evolución gráfica de las temperaturas promedio de la masa de cacao CCN-51, por tratamiento y control durante la fermentación.



Anexo G: Análisis estadístico

Tabla G.1

Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la temperatura durante la fermentación de cacao.

Tiempo (h)	Shapiro p	Levene p	F(4,10)	ANOVA p	Diferencias
0	0.0013	0.9999	6.44	0.0079	Sí*
8	0.0016	0.998	6.22	0.0088	Sí*
20	0.0414	0.9398	2.64	0.0971	No
32	0.0986	0.9135	1.21	0.3645	No
44	0.1892	0.9639	5.53	0.013	Sí
56	0.293	0.7012	0.95	0.4771	No
68	0.8934	0.5053	0.54	0.7104	No
80	0.7024	0.7651	22.98	<0.001	Sí
92	0.7421	0.8652	64.79	<0.001	Sí
104	0.644	0.5234	61.18	<0.001	Sí
116	0.9285	0.4638	422.37	<0.001	Sí
128	0.8772	0.7472	680.39	<0.001	Sí
140	0.3512	0.925	1009.39	<0.001	S
152	0.7471	0.511	1947.47	<0.001	Sí

Nota: *En 0 y 8 h Shapiro no se cumple, por lo que esos ANOVA deben interpretarse con cautela.

Tabla G.2

Comparación de medias de temperatura entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey.

Tiempo	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
80 h	26.00 ± 0.56 ^{c}	32.40 ± 1.30 ^{a}	28.57 ± 1.30 ^{b}	30.03 ± 0.68 ^{ab}	31.63 ± 0.32 ^{a}
92 h	33.23 ± 0.23 ^{c}	34.83 ± 0.31 ^{b}	34.83 ± 0.21 ^{b}	35.43 ± 0.42 ^{b}	37.57 ± 0.45 ^{a}
104 h	30.03 ± 0.15 ^{b}	41.30 ± 1.67 ^{a}	40.33 ± 0.68 ^{a}	39.23 ± 0.58 ^{a}	41.07 ± 1.38 ^{a}
116 h	27.47 ± 1.00 ^{d}	39.77 ± 0.81 ^{c}	43.03 ± 0.32 ^{b}	45.27 ± 0.40 ^{a}	45.47 ± 0.25 ^{a}
128 h	30.10 ± 0.10 ^{b}	45.10 ± 0.26 ^{a}	45.37 ± 0.55 ^{a}	45.67 ± 0.68 ^{a}	46.10 ± 0.46 ^{a}
152 h	28.93 ± 0.45 ^{b}	45.40 ± 0.36 ^{a}	45.57 ± 0.06 ^{a}	45.57 ± 0.25 ^{a}	46.00 ± 0.17 ^{a}

Tabla G.3

Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la humedad durante la fermentación de cacao

Día	Shapiro p	Levene p	F(4,10)	ANOVA p
0	0.0481	0.999	3.38	0.0539
2	0.0045	1	2.35	0.1245
4	0.0045	1	8.93	0.0025
6	0.1658	0.943	9.78	0.0017

Tabla G.4

Comparación de medias de humedad entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey

Día	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
0	51.83 ± 0.07 [a]	51.76 ± 0.09 [a]	51.64 ± 0.08 [a]	51.87 ± 0.08 [a]	51.80 ± 0.09 [a]
2	50.76 ± 0.22 [a]	50.50 ± 0.22 [a]	50.23 ± 0.22 [a]	50.58 ± 0.22 [a]	50.60 ± 0.22 [a]
4	47.97 ± 0.30 [a]	47.19 ± 0.30 [ab]	46.55 ± 0.30 [b]	47.21 ± 0.30 [ab]	47.48 ± 0.30 [a]
6	45.90 ± 0.40 [a]	44.72 ± 0.42 [bc]	43.80 ± 0.30 [c]	44.70 ± 0.40 [bc]	45.15 ± 0.55 [ab]

Tabla G.5

Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para el pH durante la fermentación de cacao

Día	Shapiro p	Levene p	F (4,10)	ANOVA p
0	0.1756	0.3893	7.74	0.0041
2	0.0464	0.6316	2.03	0.1658
4	0.1568	0.4154	17.34	<0.001
6	0.0646	0.3884	17.97	<0.001

Tabla G.6

Comparación de medias de pH entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey

Día	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
0	5.22 ± 0.02 [ab]	5.43 ± 0.15 [a]	4.95 ± 0.05 [b]	5.12 ± 0.04 [ab]	4.87 ± 0.26 [b]
2	5.88 ± 0.25 [a]	5.44 ± 0.15 [a]	5.34 ± 0.09 [a]	5.68 ± 0.02 [a]	5.29 ± 0.60 [a]
4	5.73 ± 0.06 [b]	5.98 ± 0.01 [b]	6.43 ± 0.21 [a]	5.95 ± 0.04 [b]	6.01 ± 0.09 [b]
6	6.30 ± 0.14 [a]	6.14 ± 0.01 [a]	6.22 ± 0.00 [a]	5.90 ± 0.03 [b]	5.90 ± 0.08 [b]

Tabla G.7

Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la luminosidad (L) durante la fermentación de cacao*

Día	Shapiro-Wilk p	Levene p	F(4,10)	ANOVA p
0	0.8895	0.7514	0.93	0.4851
2	0.2113	0.6713	0.9	0.497
4	0.2292	0.3258	4.95	0.0184
6	0.2414	0.4514	0.84	0.5303

Tabla G.8

Comparación de medias de luminosidad (L) entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey*

Día	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
0	53.11 ± 0.26 [a]	53.60 ± 0.62 [a]	53.92 ± 1.39 [a]	52.65 ± 0.97 [a]	53.78 ± 1.06 [a]
2	53.02 ± 3.94 [a]	53.23 ± 1.43 [a]	51.20 ± 0.40 [a]	54.28 ± 1.34 [a]	52.45 ± 1.26 [a]
4	53.75 ± 2.39 [a]	51.98 ± 1.16 [ab]	54.44 ± 0.52 [a]	52.58 ± 0.17 [ab]	50.41 ± 0.38 [b]
6	49.19 ± 0.26 [a]	50.54 ± 0.50 [a]	50.20 ± 1.91 [a]	50.30 ± 1.06 [a]	50.39 ± 0.19 [a]

Media ± SD de tres repeticiones (fermentaciones semanales independientes). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

Tabla G.9

*Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la coordenada cromática a** durante la fermentación de cacao.

Día	Shapiro-Wilk p	Levene p	F(4,10)	ANOVA p
0	0.4257	0.3806	0.81	0.5478
2	0.5265	0.6602	2.67	0.0944
4	0.4368	0.5033	3.08	0.0678
6	0.1766	0.8095	0.62	0.6608

Tabla G.10

Comparación de medias de la coordenada cromática a entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey*

Día	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
0	5.89 ± 0.25 [a]	6.44 ± 0.91 [a]	6.83 ± 1.85 [a]	5.73 ± 1.88 [a]	7.31 ± 0.27 [a]
2	5.79 ± 1.96 [a]	7.26 ± 0.56 [a]	5.31 ± 0.36 [a]	8.13 ± 0.84 [a]	6.75 ± 1.48 [a]
4	6.74 ± 2.34 [a]	6.33 ± 1.12 [a]	8.04 ± 0.58 [a]	6.88 ± 0.89 [a]	4.49 ± 0.48 [a]
6	3.37 ± 0.14 [a]	4.35 ± 0.60 [a]	3.46 ± 1.67 [a]	3.66 ± 1.05 [a]	4.24 ± 0.85 [a]

Nota: Media ± SD de tres repeticiones (fermentaciones semanales independientes). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

Tabla G.11

*Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la coordenada cromática b** durante la fermentación de cacao

Día	Shapiro-Wilk p	Levene p	F(4,10)	ANOVA p
0	0.518	0.5533	1.54	0.2637
2	0.2475	0.8211	0.67	0.6263
4	0.1521	0.8708	2.46	0.1131
6	0.1395	0.7878	1.37	0.3101

Tabla G.12

Comparación de medias de la coordenada cromática b entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey*

Día	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
0	3.48 ± 0.87 [a]	5.09 ± 0.29 [a]	5.34 ± 1.26 [a]	5.12 ± 1.94 [a]	5.44 ± 0.27 [a]
2	4.50 ± 2.89 [a]	5.77 ± 1.59 [a]	4.05 ± 1.15 [a]	3.85 ± 0.99 [a]	4.11 ± 0.34 [a]
4	5.54 ± 1.59 [a]	4.30 ± 1.06 [a]	5.13 ± 0.81 [a]	5.52 ± 0.58 [a]	3.49 ± 0.40 [a]
6	3.21 ± 0.24 [a]	4.74 ± 0.68 [a]	4.29 ± 1.43 [a]	4.26 ± 1.22 [a]	4.72 ± 0.40 [a]

Nota: Media ± SD de tres repeticiones (fermentaciones semanales independientes). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

Tabla G.13

Análisis de varianza y verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para la diferencia total de color (ΔE, respecto al día 0 de la misma repetición) durante la fermentación de cacao.

Día	Shapiro-Wilk p	Levene p	F(4,10)	ANOVA p
2	0.0868	0.7974	1.17	0.3803
4	0.7566	0.9063	1.49	0.2776
6	0.8815	0.4253	0.58	0.6864

Nota: El día 0 no se tabula: ΔE = 0 por definición (referencia = día 0 de la misma repetición).

Tabla G.14

Comparación de medias de la diferencia total de color (ΔE, respecto al día 0 de la misma repetición) entre tratamientos enzimáticos y control durante la fermentación de cacao mediante la prueba de Tukey

Día	Control	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
2	3.97 ± 2.06 [a]	1.78 ± 0.51 [a]	3.52 ± 1.60 [a]	3.38 ± 1.82 [a]	2.31 ± 0.54 [a]
4	3.58 ± 1.94 [a]	2.57 ± 1.87 [a]	2.12 ± 0.72 [a]	2.74 ± 0.98 [a]	4.83 ± 1.67 [a]
6	4.73 ± 0.47 [a]	3.81 ± 1.78 [a]	6.05 ± 3.71 [a]	3.94 ± 0.78 [a]	4.65 ± 1.69 [a]

Nota: Media ± SD de tres repeticiones (fermentaciones semanales independientes). Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$). Letras iguales en toda la fila: sin diferencias entre tratamientos.

Tabla G.15

Diferencias con signo respecto al día 0 de la misma repetición (dirección del cambio)

Tratamiento	Día	ΔL*	ΔL* ± SD	Δa*	Δa* ± SD	Δb*	Δb* ± SD
CONTROL	2	-0.09	3.73	-0.10	1.95	1.02	2.92
CONTROL	4	0.64	2.14	0.85	2.19	2.05	2.38
CONTROL	6	-3.92	0.50	-2.53	0.32	-0.28	0.81
A1B1	2	-0.37	1.10	0.82	0.43	0.69	1.30
A1B1	4	-1.61	1.78	-0.11	1.90	-0.78	1.34
A1B1	6	-3.06	1.10	-2.09	1.44	-0.35	0.95
A2B1	2	-2.72	1.13	-1.52	1.54	-1.30	0.62
A2B1	4	0.52	1.42	1.21	1.45	-0.21	0.70
A2B1	6	-3.72	3.16	-3.37	3.48	-1.05	2.67
A1B2	2	1.63	0.37	2.40	1.63	-1.27	1.62
A1B2	4	-0.08	0.81	1.15	1.86	0.40	2.41
A1B2	6	-2.35	0.44	-2.07	0.98	-0.86	2.63
A2B2	2	-1.33	0.59	-0.55	1.46	-1.33	0.12
A2B2	4	-3.38	1.44	-2.81	0.75	-1.95	0.65
A2B2	6	-3.40	1.23	-3.06	1.08	-0.72	0.63

Nota: ΔL* < 0: oscurecimiento; Δa* < 0: pérdida de componente rojo; Δb* < 0: pérdida de componente amarillo (referencia: día 0).