

**ESTUDIO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LOS  
GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN MÉXICO**



**BENJAMÍN ALBERTO COCOM CANTU**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**  
**TESIS DOCTORAL - ABRIL 2021**





UNIVERSIDAD DE ALMERÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

**ESTUDIO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LOS GRANOS DE  
CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN MÉXICO**

**STUDY OF COCOA BEANS (*Theobroma cacao* L.)  
FERMENTATION PROCESS IN MEXICO**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOPROCESOS  
INDUSTRIALES APLICADOS A LA AGROALIMENTACIÓN Y  
MEDIOAMBIENTE

Benjamín Alberto Cocom Cantu  
Tesis Doctoral. Almería. 2021

Directora: M<sup>a</sup> del Carmen Vargas García  
Co-Directora: Gloria Ivette Bolio López





# UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOPROCESOS INDUSTRIALES  
APLICADOS A LA AGROALIMENTACIÓN Y MEDIOAMBIENTE

MEMORIA PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR

Fdo.: Benjamín Alberto Cocom Cantu

Fdo.: M<sup>a</sup> del Carmen Vargas García  
Profesora Titular de Microbiología  
Universidad de Almería

Fdo.: Gloria Ivette Bolio López  
Ciencias Básicas e Ingeniería  
Universidad Popular de la Chontalpa



Esta tesis está dedicada a:

A mis Padres, quienes con sus enseñanzas, amor y paciencia sembraron en mí, a través de su ejemplo, la perseverancia, la cultura del esfuerzo y del trabajo, y la capacidad para enfrentar las adversidades con valentía hasta alcanzar las metas planteadas.

A mis hermanos Patricia, Leticia, Cristina y José. Gracias a mi familia por sus palabras de aliento.

A mis amigos:

Anabella López Martínez por su valiosa ayuda en las pruebas de laboratorio, así como su presencia y compañía durante este trabajo.

A Gloria Bolio López por su apoyo en gestiones diversas.







## **AGRADECIMIENTOS**

---



A María del Carmen Vargas García por todos los conocimientos, compromiso, paciencia, entrega y esmero dedicado a este trabajo de investigación.

A C. Carlos Hernández Echeverría y familia, por recibirme en sus instalaciones y plantaciones de cacao, con la finalidad de estudiar su proceso poscosecha.

A la **Universidad Popular de la Chontalpa** por darme todas las facilidades para realizar mis estudios doctorales.





**ÍNDICE**



## ÍNDICE

---

Resumen/Abstract.	P. 1
1. Introducción.	P. 7
1.1. Cacao: El Alimento de los Dioses.	P. 9
1.2. Cacao: Origen, Expansión y Distribución Actual.	P. 11
1.3. Cacao: Características Botánicas y Agronómicas.	P. 14
1.4. Cacao: Trascendencia Económica.	P. 18
1.5. El Cacao en México.	P. 23
1.6. Procesado y Transformación del cacao.	P. 28
1.6.1. Etapa de secado.	P. 30
1.6.2. Etapa de torrefacción.	P. 32
1.6.3. Operaciones adicionales.	P. 34
1.7. Desarrollo de las Propiedades Organolépticas: Variables de Influencia y Compuestos Implicados.	P. 39
1.7.1. Factores que condicionan sabor y aroma.	P. 40
1.7.2. Integrantes del perfil organoléptico del cacao procesado.	P. 47
1.8.1. Comunidades microbianas y eventos bioquímicos asociados.	P. 54
1.8.3. Metodologías aplicadas en la identificación del microbioma asociado a la fermentación del cacao.	P. 63
2. Hipótesis y Objetivos	P. 71
3. Diseño Experimental	P. 77
3.1. Protocolo Experimental.	P. 79
3.2. Proceso fermentativo.	P. 80
3.3. Estudio de las Muestras.	P. 82
3.3.1. Parámetros metabólicos.	P. 82
3.3.2. Comunidades microbianas.	P. 84
3.3.3. Tratamiento estadístico, y análisis de biodiversidad y filogenia.	P. 86
4. Resultados y Discusión	P. 89
4.1. Proceso Fermentativo: Parámetros Físico-Químicos.	P. 91
4.2. Proceso Fermentativo: Parámetros Organolépticos y Nutricionales.	P. 94
4.3. Proceso Fermentativo: Comunidades Microbianas.	P. 101
4.3.1. Estudio de la población eucariota asociada al proceso fermentativo.	P. 101
4.3.2. Estudio de la población procariota asociada al proceso fermentativo.	P. 114
4.3.4. Relaciones microbiota/parámetros físico-químicos.	P. 127
5. Conclusiones	P. 143
6. Bibliografía	P. 147
7. Anexos	P. 185







**RESUMEN/ABSTRACT**

---





---

RESUMEN

---

Desde tiempos ancestrales, la relación entre México y el cacao ha sido muy estrecha y, aunque en las últimas décadas el peso relativo del país azteca en el mercado mundial de este producto ha disminuido de forma considerable, recientemente se han iniciado políticas dirigidas a reactivar la importancia de este cultivo y su procesado. En este sentido, el hecho de que la variedad mayoritariamente implantada en las regiones cacaoteras del país sean la de fino aroma, reconocidas como de superior calidad, supone un claro incentivo y alienta a competir con las zonas actualmente dominantes no en términos de cantidad, sino de calidad.

La obtención de un producto final de calidad depende de un variado número de factores, entre los que, además de la variedad agrícola, también es necesario considerar el procesado al que se somete el cacao. Las etapas de transformación son diversas, destacando en gran medida la de fermentación, no sólo por situarse al inicio, sino porque en ella se adquieren gran parte de las características que van a condicionar las fases posteriores. En un alto porcentaje, la consecución de dichas características es función de la microbiota presente a lo largo de toda la fermentación. Tanto la identidad de las poblaciones microbianas participantes, como la naturaleza de sus acciones, determinan la bondad del producto fermentado. Aunque muchos de los aspectos microbianos son comunes a todos los procesos y se pueden, por tanto, considerar como universales, existe una fracción relativamente importante que se encuentra condicionada por las particularidades de cada proceso, ya sean de tipo agronómico, geográfico o logístico. Es por esta razón que se hace necesaria la elucidación de las singularidades de cada proceso en relación con el microbioma asociado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo ratificaron este patrón, dado que la naturaleza genérica de las poblaciones actuantes coincidió con lo descrito en bibliografía, dominancia secuencial de levaduras, bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético, pero apuntaron a la existencia de rasgos propios en cuanto a la identidad de algunas de las especies protagonistas. Así, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae*, levaduras habitualmente referenciadas, compartieron protagonismo con *Kazachstania humilis*, especie menos frecuente en papeles protagonistas. De forma similar, entre las bacterias del ácido láctico, aparecieron *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum*, pero no como representantes más destacados, ya que en este caso tal función le correspondió a *Lactobacillus cacaonum*. Entre las bacterias del ácido



acético, fue *Acetobacter pasteurianus* la especie que, de forma casi absoluta, ostentó el protagonismo dentro de este grupo. Si bien esta acetobacteria suele citarse entre las típicas en la fermentación del cacao, no lo es tanto que los niveles cuantitativos de su presencia copen la práctica totalidad de esta comunidad. A las especies mencionadas habría que añadir otras tres no identificadas, pero que evolutivamente se ubicaron próximas a bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético, y que, por su abundancia relativa, parecen desempeñar un papel importante en la fermentación, especialmente en la etapa inicial.

El procesado de los datos obtenidos también ha confirmado la interrelación entre las distintas comunidades microbianas y los principales eventos metabólicos, con la existencia de dependencias entre consumo de fuentes nutricionales y acumulación de metabolitos con microorganismos específicos. Adicionalmente, los análisis realizados también pusieron de manifiesto la clara evolución cronológica con la que se desarrolla el proceso, estableciendo dos etapas claramente diferenciadas, y subetapas dentro de ellas.

El presente estudio, además de verificar la idoneidad del proceso fermentativo ejecutado en cuanto a las características del producto final obtenido, ha permitido establecer la naturaleza de la comunidad microbiana actuante, así como la importancia relativa de cada una de las especies participantes en relación con las transformaciones que el cacao experimenta a lo largo de la fermentación. Este conocimiento será aprovechado en un futuro para optimizar aun más esta etapa mediante estrategias de inoculación que puedan, a través de la acción de especies concretas, dotar al producto con matices diferenciadores que confieran un valor añadido al producto generado.



---

**ABSTRACT**

---

Association between Mexico and cocoa has been much closed from ancient times. Although during last decades the relative importance of this country in the global market has decreased significantly, policies leading to the reactivation of its cultivation have been recently implemented. In this sense, it provides an incentive the fact that the cacao variety established in the cocoa-growing regions of the country is “Criollo”, which is recognised as a fine aroma variety with higher quality properties. Thus, competition with other producers can be achieved through quality rather than quantity.

The quality of the final product is depending on several factors, among them, agronomic variety and processing methodologies. There are different phases of processing, fermentation being one of the most outstanding, both because is at the start of the transformation and determines the acquisition of correct properties for further developments. To a large extent, this last fact is conditioned by microbial communities present through the process, namely species identities and metabolic activities. While many microbiological features of the fermentation can be assumed as universal, others are influenced by idiosyncrasies of each process wether of a agronomic, geographic or logistic kind, which makes it necessary for producers to elucidate the microbial singularities of every process. Results here described confirmed this profile, since they combined some characteristics previously referred in literature, as in the case of the sequence of the microbial communities throughout the fermentation (yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria), with specific features concerning the identity of some dominating species. Thus, typical yeast species associated to cocoa fermentation as *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora opuntiae* shared protagonism with *Kazachstania humilis*, which is rather rare. Similarly, *Lactobacillus cacaonum* was the most prominent representative of lactic acid bacteria, instead of the more usual *L. fermentum* and *L. plantarum*. Among acetic acid bacteria, *Acetobacter pasteurianus* was almost the only relevant member of this group. Although this is one of the species typically associated to the cocoa fermentation, such dominance is unusual. Finally, three not assigned OTUs but evolutionarily closed to lactic and acetic acid bacteria seemed to play a prevalent role on account their relative abundances, especially at the beginning of the fermentation.



The analysis of the results also ratified the connection between microbial communities and main metabolic changes. Thus, correlations between nutritional sources and accumulation of metabolites and specific microorganisms were detected. Moreover, the statistical treatment of the data revealed a clear chronological pattern, with the establishment of two main different phases and sub-phases within them.

The present study verified the adequacy of the performed process regarding the final properties of the fermented product and it has allowed bringing light into the composition of the significant microbial community and the participation of every microorganism in ongoing transformations that cacao beans suffer. Such knowledge will be used to optimize even more this fermentation stage by means of inoculation strategies that add new singular nuances and higher value to cocoa.



## **1. INTRODUCCIÓN**







### 1.1. CACAO: EL ALIMENTO DE LOS DIOS.

El origen de la planta de cacao como cultivo se remonta probablemente al siglo IV-V de nuestra era, aunque la antecesora a partir de la cual surgió la especie citada, tras numerosos procesos de entrecruzamiento y selección puede datarse incluso 35.000 años atrás (Verna, 2013). Fueron los olmecas los que, en principio, comenzaron a consumir productos elaborados a partir del fruto de cacao, y los que le dieron nombre, kakawa (Kaufman y Justeson, 2007). Con posterioridad, lo mayas tomaron su relevo en la elaboración una bebida a la que denominaban “Xocolatl” a partir de las vainas secadas, molidas y disueltas en agua. El producto resultante, de un fuerte sabor amargo, ejercía un efecto estimulante y vigorizante, muy apreciado, no sólo por la población maya, sino también por el pueblo azteca, tras su conquista sobre los primeros. La consideración en la que tenían este producto, al que asignaban origen divino y efectos medicinales (Dillinger *et al.*, 2000), alcanzaba tal medida, que su consumo quedaba restringido a guerreros y autoridades políticas y religiosas, e incluso le dieron rango de moneda de cambio (Christopher, 2013), consideración que se mantuvo incluso hasta el siglo XIX (Wood y Lass, 2008).



**Figura 1.1.** Grabado en el que se representa el consumo de productos derivados del cacao en la cultura maya (<https://www.thesacredscience.com/an-ancient-maya-chocolate-recipe-for-romance/>).



La llegada de Cristóbal Colón a América propició el primer contacto entre la cultura europea y el cacao, si bien fue Hernán Cortés el que hizo llegar las semillas al viejo continente, tras familiarizarse con la bebida generada a partir del cacao en la corte de Moctezuma, de quien se dice que consumía grandes cantidades de ella (Verna, 2013). Los fuertes lazos de conexión entre España y América favorecieron una rápida expansión de la bebida de cacao por la Península Ibérica y, con posterioridad, por toda Europa. No obstante, los gustos europeos forzaron cambios en los aditivos incorporados a la bebida, optando por azúcar, canela o vainilla, en lugar de especias picantes (Cidell y Alberts, 2006). Esta versión suavizada se hizo popular entre las clases pudientes, llegando a ser común en las cortes europeas, y haciendo que el naturalista sueco Carl von Linné diera el nombre de Alimento de los dioses, *Theobroma cacao*, a la planta.

Dos hitos principales marcan la universalización del chocolate (Figura 1.2.), facilitando su consumo a clases más populares: el desarrollo del motor de vapor en el siglo XVIII, que propició la mecanización en el proceso de molturación del cacao, y la invención de la prensa de cacao por parte del químico holandés Coenraad Van Houten, que permitió la separación entre las fracciones del cacao, polvo y manteca, hecho que dio lugar al nacimiento de lo que actualmente conocemos como chocolate (Ozturk y Young, 2017).

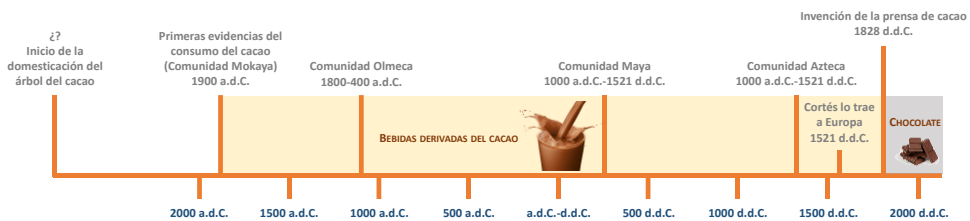


Figura 1.2. Hitos en la relación cacao-humanidad (adaptado de Ozturk y Young, 2017).

A partir de la invención de la prensa de cacao, los avances se suceden de forma constante, permitiendo la comercialización de una amplia variedad de nuevos productos y facilitando su llegada a un amplio volumen de consumidores. Así, en 1847, sale al mercado la primera barra de chocolate sólido y se produce la manteca de cacao (Morganelli, 2006). En 1875, se mezcla leche condensada en polvo con el



cacao, para dar nacimiento al chocolate con leche (Beckett, 2008), y en 1879 Lindt desarrolla el proceso de conchado, mantenido hasta la actualidad, y mediante el cual se produce la mezcla de la manteca de cacao con leche y vainilla durante 12-48 h a temperatura controlada, generando así un chocolate más suave y con mejores propiedades organolépticas (Müntener, 2010).

## 1.2. CACAO: ORIGEN, EXPANSIÓN Y DISTRIBUCIÓN ACTUAL.

La localización geográfica primaria del cacao siempre ha resultado un tema complejo. Por un lado, todos los ancestros salvajes de la especie se ubican en América del Sur y, de forma más concreta, en las zonas de influencia de los ríos Orinoco y Amazonas (Henderson *et al.*, 2007) y, sin embargo, algunos autores sitúan el origen del cacao en América Central (Schwan y Wheals, 2004), en torno a 4.000 años atrás. Estudios de carácter genético realizados en los últimos años parecen sustentar la primera teoría, apuntando a las actuales Colombia y Venezuela como zonas más probables para ostentar el papel de cuna del cacao (Motamayor *et al.*, 2002). A partir de tales zonas se produjo la expansión hacia la parte central del continente, gracias a la movilidad humana y a sus prácticas comerciales. Existen evidencias que confirman ya el consumo de bebidas derivadas del cacao en las comunidades indígenas que poblaban la costa pacífica de México en el periodo comprendido entre 1.900 y 1.500 años a.d.C. (Ozturk y Young, 2017), siendo esta forma del cacao la que mayoritariamente contribuyó a su diseminación por Mesoamérica (Clement *et al.*, 2010).

La distribución del árbol del cacao por el continente americano se sustentó a partir de dos variedades principales de la especie. Así, por un lado, la expansión en dirección norte hacia Mesoamérica tuvo como protagonista a la denominada variedad “criollo”, procedente de Venezuela, mientras que en zonas más meridionales, como el norte del actual Brasil, se impuso la variedad “forastero” (Motamayor *et al.*, 2002). Existe una tercera variedad, “trinitario”, generada a partir de un proceso de hibridación natural entre las dos anteriores (Tezara *et al.*, 2016). La primera de estas variedades, “criollo”, ya como consecuencia de la presencia en el continente de conquistadores europeos, principalmente españoles, franceses y portugueses, continuó distribuyéndose por diversos territorios, incluyendo numerosas islas del Caribe, tales como Trinidad, Jamaica, Martinica o Haití. A



principios del siglo XIX, los portugueses exportaron las semillas del cacao hasta la isla de Santo Tomé, en la costa occidental africana, desde donde pasó a la vecina isla Príncipe. De ahí pasó, durante el último tercio del siglo, hasta Ghana, país que actuó como centro de difusión para todo el continente, con Costa de Marfil, Camerún y Nigeria como principales exponentes (Nair, 2010). La adaptación del cultivo fue tal que, en la actualidad, son los mayores productores mundiales de cacao. En Asia, el cultivo del cacao fue introducido por los holandeses a través de la isla de Célebes, en Indonesia y más tarde Java, zonas a la que llevaron la variedad “criollo” en la segunda mitad del siglo XVI. Por su parte, los españoles transportaron semillas de esa misma variedad a Filipinas, a principios del siglo XVII. Transcurridos casi dos siglos, en 1798, el cacao llegó a Sri Lanka desde Trinidad, y desde ahí pasó en años sucesivos, ya durante el siglo XIX, a Singapur, Fiji, Samoa, Australia e India (Zhang y Motilal, 2016).

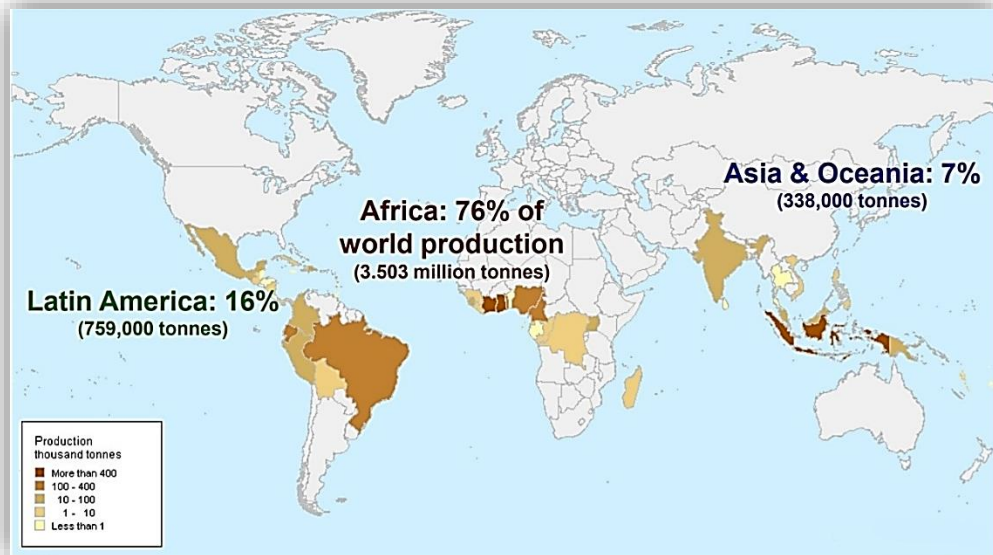
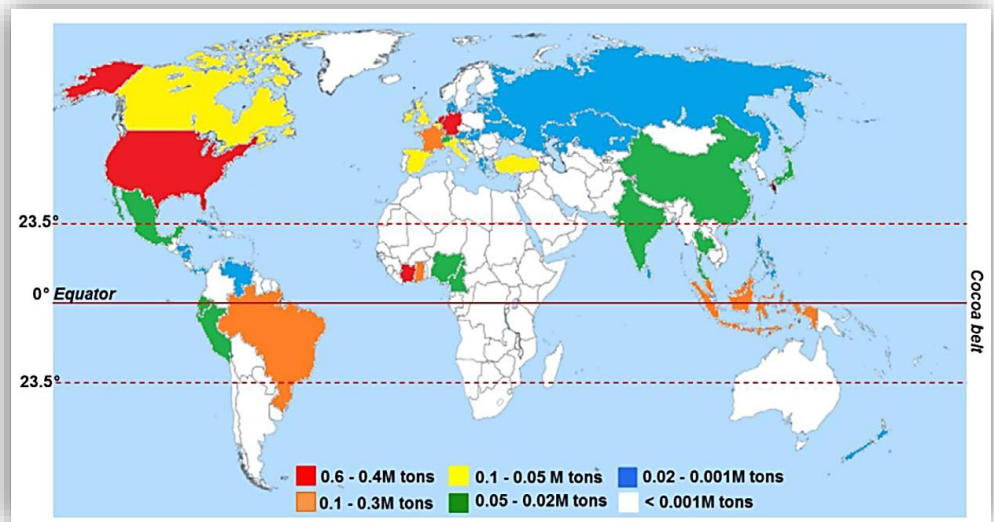


Figura 1.3. Países productores de cacao y niveles de producción (Pipetone, 2018).

En la actualidad, los principales productores de cacao (Figura 1.3.) se reparten entre África Occidental (Camerún, Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Santo Tomé y Príncipe), América Latina (Belize, Brasil, Costa Rica, Ecuador, México y Perú) y Asia



(Indonesia, Malasia, Papúa Nueva Guinea) (Franzen y Mulder, 2007), países todos pertenecientes al denominado cinturón del cacao, situado entre 10 y 20 grados al norte y al sur del ecuador (Verna, 2013). El continente africano acaparó en 2018 el 76% de la producción mundial, quedando muy lejos del 16% generado por Latino América y del 7% procedente de Asia y Oceanía (Pipitone, 2018). El grueso de la producción, en torno al 70%, proviene de granjas de pequeño tamaño, menos de 5 ha, y ámbito familiar (Franzen y Mulder, 2007), de las que, según la Fundación Mundial del Cacao, existen entre 5 y 6 millones, y que implican, desde una perspectiva laboral, en torno a 40-50 millones de personas (Beg *et al.*, 2017), gran parte de las cuales se mueven en una economía de subsistencia, a pesar del importante margen de beneficio que alcanzan las grandes empresas industrializadoras (Oluyoel *et al.*, 2011). Una de las razones que expliquen tal situación pueden encontrarse en el hecho de que los países productores en los que además se procesa el cacao son minoría, destacando Costa de Marfil, Ghana, Brasil, Indonesia o Malasia. El grueso de la producción mundial, en cambio, es transformada en terceros países (Figura 1.4.), localizados principalmente en Europa y América del Norte (Ozturk y Young, 2017), zonas en las que se localizan las grandes multinacionales en las que el cacao se transforma.



**Figura 1.4.** Principales países transformadores del cacao y niveles de procesado (Ozturk y Young, 2017).





Una particularidad del cacao producido en Latino América es su nivel de calidad en comparación con el de otras regiones productoras. El denominado cacao fino o de aroma, reconocido por sus superiores propiedades (Rottiers *et al.*, 2019), se genera de forma mayoritaria en el continente americano (Papalexandratou *et al.*, 2019) y, de forma concreta en la zona del Caribe. Así, el 80% de este tipo de cacao proviene de esta región, repartiéndose el porcentaje restante entre Asia y Oceanía, el 18%, y África, el 2%. La importancia relativa de estas variedades en el global de la producción mundial permanece en niveles secundarios, como lo demuestra el hecho de que en el pasado se ampliaran las fronteras agrícolas de las variedades ordinarias, quedando el cacao fino destinado de forma casi exclusiva a la elaboración de recetas tradicionales de alta calidad (Arevalo-Gardini *et al.*, 2019; Zambrano *et al.*, 2019). La tendencia, no obstante, parece estar cambiando en los últimos años, ya que se ha observado un incremento de la demanda por parte de los consumidores de este tipo de productos tradicionales, cuyas características organolépticas se diferencian claramente. La continuidad de esta tendencia propiciaría en un futuro cercano un incremento en la proporción que supone en la actualidad la producción del cacao fino o de aroma en relación sobre la totalidad mundial, entre un 3% y un 10% (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2018; Tuentner *et al.*, 2020). De este modo, se incrementará el papel que estas variedades desempeñan a escala global y, consecuentemente, el de América Latina, dada su condición de principal origen de tales cultivares.

### 1.3. CACAO: CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y AGRONÓMICAS.

El cacao, *Theobroma cacao*, es la única especie de las 22 existentes en el género *Theobroma*, perteneciente a la familia Malvaceae (Alverson *et al.*, 1999), cuya

**Tabla 1.1.** Clasificación taxonómica del cacao.

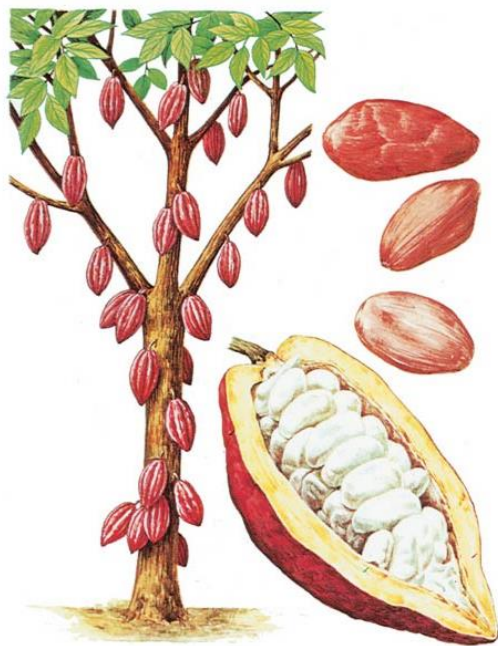
Nivel taxonómico	
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Theobroma</i>

trascendencia económica alcanza consideración mundial. Desde una perspectiva local, *T. angustifolium* se mezcla con *T. cacao* en zonas de México y Costa Rica, la pulpa de *T. grandiflorum* se utiliza como sustrato para la elaboración de una bebida en algunas regiones de Brasil, e incluso



*T. bicolor* puede llegar a tener la misma funcionalidad que *T. cacao* en lugares muy específicos (Nair, 2010).

Desde una perspectiva botánica, *Theobroma cacao* se define como una especie diploide de naturaleza perenne, que puede alcanzar entre 8 y 15 m de altura (Ozturk y Young, 2017), aunque en condiciones de cultivo suele oscilar entre 3 y 5 m (de Almeida y Valle, 2008). Se caracteriza por tener raíz de tipo pivotante que se extiende preferentemente en sentido longitudinal, hasta 150 cm, siendo escasa la presencia de raíces secundarias laterales, las cuales se concentran en los primeros 20-30 cm de suelo (Wartenberg *et al.*, 2017). No obstante, el papel que dichas raíces secundarias desempeñan es relevante, ya que son las principales encargadas de procurar nutrientes (Hartemink, 2005), mientras que la raíz principal cumple fundamentalmente funciones de anclaje.



**Figura 1.5.** Árbol y fruta del cacao ([https://chocolate.fandom.com/wiki/Cacao\\_Tree](https://chocolate.fandom.com/wiki/Cacao_Tree)).

Los brotes que se generan a partir de las semillas se extienden hasta una longitud de 1-1,5 m. De ese tallo central, denominado “chupon” surgen ramificaciones laterales que tienden a agruparse en niveles (Carr y Lockwood, 2011). En ejemplares no controlados, nuevos chupones pueden brotar a partir del inicial. Las inflorescencias, que pueden llegar a agrupar hasta 50 flores, se constituyen en forma de cima. Cada flor consta de cinco sépalos y cinco pétalos, diez estambres distribuidos en dos círculos, sólo uno de los cuales es fértil, y un ovario superior integrado por cinco carpelos fusionados (Lim, 2012).

De las numerosas flores que presenta el árbol, sólo un pequeño número se desarrolla hasta fruto, perdiéndose en pocas horas aquellas que no son fertilizadas



(Bridgemohan y Mohammed, 2019). La polinización se produce por vía natural o mediante autopolinización (de Schawe *et al.*, 2013), dado que los estambres fértiles están rodeados por un anillo de estaminodios. En el caso de polinización natural, se requiere la intervención de ciertos insectos, de forma mayoritaria pertenecientes al género *Forcipomya* (de Schawe *et al.*, 2018). En menor medida, las hormigas también pueden actuar como agentes polinizadores y sólo en ocasiones excepcionales, la fertilización se llega a producir como consecuencia de la acción del viento.

Desde una perspectiva agronómica, los tres cultivares tradicionalmente diferenciados en función de características organolépticas (Criollo, Forastero y Trinitario), han sido evaluados mediante herramientas genéticas, lo que ha permitido el establecimiento de hasta 10 grupos de referencia distintos, que avalan la diversidad genética presente en la especie. Los grupos genéticos establecidos, de acuerdo con su diferenciación geográfica, son: Amelonado, Contamama, Criollo, Curaray, Guiana, Iquitos, Marañón, Nanay, Nacional y Purús (Motamayor *et al.*, 2008). En los últimos años, los estudios de variabilidad genética se han multiplicado, la mayor parte de ellos focalizados en poblaciones autóctonas (Boza *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2015; Gopaulchan *et al.*, 2019; Adenet *et al.*, 2020; Everaert *et al.*, 2020), lo que permite adquirir un mayor conocimiento de la distribución geográfica de los distintos grupos ancestrales, y de la forma en la que han ido interaccionando entre ellos a lo largo del tiempo, dando lugar a cultivares híbridos.

El cultivo del cacao se restringe al cinturón comprendido entre 10-20 °, tanto al norte como al sur del ecuador, zona en la que se dan las condiciones climáticas demandadas por la planta. Los principales factores climáticos que condicionan el desarrollo del cacao son, como era de esperar, temperatura y lluvia (Yoroba *et al.*, 2019). Respecto a la primera, el rango óptimo de crecimiento del cacao se sitúa entre los 15 °C y los 32 °C, con límite inferior a partir del cual se generan daños en la planta en 10 °C, lo que limita su cultivo en zonas de altitud, en las que dichas temperaturas pueden darse con cierta asiduidad (Nair, 2010). En relación con la lluvia, el margen adecuado para el cultivo se sitúa en el rango 1150-2500 mm anuales. Por debajo de ese rango, la disponibilidad de agua sería insuficiente para cubrir los niveles normales de evapotranspiración de la planta, mientras que rangos superiores favorecerían el grado de incidencia de enfermedades (Okongor *et al.*, 2013). Con respecto a este factor, además de la pluviosidad anual, también es





necesario considerar su distribución temporal, de manera que no se alternen épocas de concentración con temporadas de sequía. El sombreado es otro importante factor de influencia en los niveles de productividad del cacao. Debido a su distribución geográfica y a las características vegetales de tales zonas, tradicionalmente se ha considerado que el sombreado resulta esencial para obtener una buena productividad (Somarriba y Beer, 2011), dado que se le atribuyen aspectos tales como el mantenimiento de la humedad del suelo, mejora de la fertilidad o supresión de malas hierbas (Franzen y Mulder, 2007). No obstante, son numerosos los estudios que ponen en entredicho tal consideración, apuntando a una mayor generación de frutos y una mayor capacidad de tolerancia a situaciones de estrés en cultivos en los que hay una mayor penetrabilidad de la luz (Vaast y Somarriba, 2014; Abdulai *et al.*, 2017; Blaser *et al.*, 2017), siempre y cuando no se superen niveles de irradiación con capacidad para dañar el sistema fotosintético foliar. En realidad, la ausencia de vegetación acompañante que proporcione sombra aporta tanto aspectos positivos (mayor productividad, menor incidencia de enfermedades), como negativos (inferior vida productiva, mayores demandas de fertilización, superiores necesidades de inversión, disminución de la diversidad vegetal autóctona), por lo que lo es necesario encontrar el equilibrio correcto, tanto en lo que respecta a presencia cuantitativa como a la identidad de las especies utilizadas (Graefe *et al.*, 2017), que favorezca los máximos niveles de producción a la vez que se minimicen los daños potenciales derivados de la ausencia de sombreado. Así, *grosso modo*, los sistemas de cultivo utilizados de forma mayoritaria se diferencian en función de este factor (Jagoret *et al.*, 2017):

1. Sistema de cultivo intensivo, gestionado en ausencia de sombra o con sombreado homogéneo, con selección de variedades e incorporación de elevadas cantidades de fertilizantes y fitosanitarios.
2. Sistema agroforestal, en el que el cacao coexiste con otras especies, que pueden o no ser explotadas comercialmente, y que propician un mayor grado de sostenibilidad.

El marco de plantación habitual varía entre 1000 y 1200 árboles ha<sup>-1</sup>, aunque puede ir desde 600 árboles ha<sup>-1</sup> hasta densidades tan altas como 3000 árboles ha<sup>-1</sup>, (Ofori-Frimpong *et al.*, 2010). Desde un punto de vista nutricional, y en un marco de plantación medio, las necesidades estimadas por hectárea giran en torno a 200 kg de nitrógeno, 25 kg de fósforo, 300 kg de potasio y 140 kg de calcio (Zhang y



Motilal, 2016). Particularmente llamativo resulta la gran demanda de potasio, elemento que confiere al cacao niveles importantes de tolerancia frente al estrés hídrico (de Almeida y Valle, 2008).

Desde el momento de su siembra, el árbol del cacao requiere entre 3 y 5 años para rendir sus primeros frutos, pero su productividad se puede mantener durante décadas (Zhang y Motilal, 2016). Durante el ciclo productivo, los frutos, vainas portadoras de 40-50 semillas embebidas en una pulpa ácida semidulce, tardan en torno a medio año para desarrollarse y madurar (Niether *et al.*, 2018), lo que implica que, de forma mayoritaria, se producen dos cosechas en el año (Owolarafe *et al.*, 2007). Los niveles medios de productividad varían de forma considerable en función de los sistemas y condiciones de cultivo, fluctuando desde 80 kg ha<sup>-1</sup> hasta 4000 kg ha<sup>-1</sup> (Jagoret *et al.*, 2017). La etapa de recolección, de corta duración, demanda una elevada mano de obra, requerimiento que se mantiene con posterioridad, en el procesado inicial de los frutos. Dicho procesado incluye la ruptura manual de las vainas y la separación de los contenidos internos, semillas y pulpa, también por vía manual. Ese material interno es el que es sometido a la acción microbiana durante la fase de fermentación, durante la cual se generan la mayor parte de los compuestos que, en etapas posteriores del procesado, van a condicionar las propiedades organolépticas y, en consecuencia, la calidad del cacao en su utilización comercial (Kongor *et al.*, 2016).

#### 1.4. CACAO: TRASCENDENCIA ECONÓMICA.

A pesar de que la producción de cacao sigue siendo un proceso mayoritariamente de carácter tradicional, con escasa presencia de procesos mecanizados, desde hace más de una década se supera la barrera productiva de 4.10<sup>6</sup> t año<sup>-1</sup>. Los movimientos exportadores del cacao, en cualquiera de sus formas, alcanzaron en 2017 los 8,6 billones de dólares, y se prevé que en 2025 duplique ese valor, con una tasa anual de crecimiento del 7,3% (Voora *et al.*, 2019). Desde una perspectiva laboral, el cacao supone la forma de vida y el sustento de 40-50 millones de personas (Beg *et al.*, 2017), distribuidas en numerosos países, gran parte de ellos en vías de desarrollo. En una elevada proporción, estos productores primarios de cacao son altamente susceptibles de padecer pobreza (Fountain y Hütz-Adams, 2018), lo que se debe, entre otros factores, a la enorme volatilidad de los precios



(Tothmihaly, 2017) y a la concentración de la industria del procesado en un bajo número de multinacionales (Gayi y Tsowou, 2016; Oomes *et al.*, 2016).

La volatilidad del precio del cacao es consecuencia mayoritaria de la dependencia casi exclusiva que tiene este parámetro de las fuerzas de oferta y demanda, que propicia un ciclo continuo de ascenso/descenso en el coste del producto (Figura 1.6.). El limitado número de aplicabilidades del producto y la completa ausencia de posibles sustitutos hace que exista una fuerte conexión entre el precio del cacao y su ciclo productivo. La existencia de una elevada demanda provoca un incremento en los niveles de producción que, en un momento dado, saturan el mercado y generan una caída en el precio que, si se prolonga en el tiempo, fuerza a los agricultores a la búsqueda de cultivos alternativos que les garanticen un mínimo de ingresos. Lógicamente, esto conduce a una disminución de la producción que, a su vez, da lugar a un ascenso del precio, con lo que el ciclo se vuelve a iniciar (UNCTAD, 2006).



**Figura 1.6.** Ciclos de conectividad entre producción y precio del cacao (adaptado de Pipitone, 2018).

En la década de los 70 del pasado siglo, los países líderes en el mercado del cacao, tanto productores como procesadores, crearon bajo el auspicio de Naciones Unidas la Organización Internacional del Cacao (ICCO), con el objetivo principal de poner fin a los altibajos asociados a los precios y a la producción del cacao y conseguir un mayor grado de estabilidad. Sin embargo, la escasa disponibilidad de fondos económicos y la ausencia del mayor consumidor a nivel mundial en la



organización han impedido, hasta el momento, la consecución de dicho objetivo (Dand, 2011).

**Tabla 1.2.** Compañías multinacionales líderes en el sector de la producción de derivados del cacao (adaptado de Neilson *et al.*, 2018).

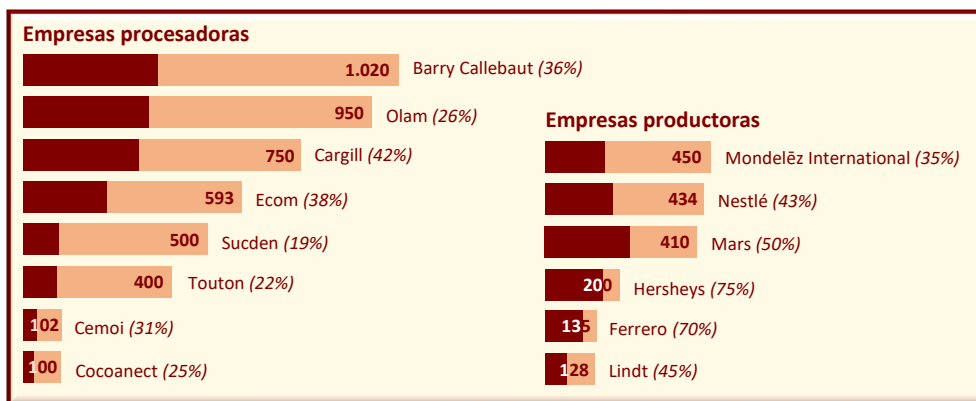
Compañía	Ventas (millones \$)	Demanda de cacao (miles t)	Marcas
Mars Inc (EE.UU.)	18.400	390	Snickers, Galaxy, Mars, M&M's
Mondelēz International (EE.UU.)	16.691	450	Cadbury, Milka, Toblerone
Nestlé SA (Suiza)	11.041	430	Kit Kat, Smarties, Crunch
Ferrero Group (Luxemburgo/Italia)	9.757	120	Ferrero Rocher, Kinder, Nutella
Hershey Foods Corp (EE.UU.)	7.422	200	Hersheys, Kit Kat, Cadbury
Lindt & Sprüngli AG (Suiza)	4.171	100	Lindt

\*Los datos son referidos a la campaña 2014/2015

El segundo de los factores citados que propicia la enorme vulnerabilidad de los productores primarios de cacao se encuentra en el bajo número de empresas que gestionan el mercado mundial (Tabla 1.2.) (Fold y Neilson, 2016). De forma concreta, seis compañías (Mars Inc., Mondelēz International, Ferrero Group, Nestlé S.A., Hershey Foods Corp., y Lindt & Sprüngli AG) acaparan las diez marcas de chocolate más vendidas y copan más del 40% del uso de la producción mundial de cacao (Fountain y Hütz-Adams, 2018). Aunque en algunos casos se apunta a la enorme atomización de los productores cacaoteros y a su enorme dependencia de este producto como única fuente de ingresos como principales causas de los bajos precios imperantes en el sector (Oomes *et al.*, 2016), la realidad es que el control de la industria procesadora de cacao reside en un número muy limitado de multinacionales (Beg *et al.*, 2017). A pesar de la existencia de leyes anti-monopolio y la penalización de prácticas que lleven a la adopción de acuerdos entre empresas para fijar precios mínimos de adquisición de la materia prima, lo cierto es que este



es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar el porqué de la elevada vulnerabilidad económica de los pequeños productores de cacao. En este sentido, la acción de diversas ONGs, así como la creciente tendencia por parte de los consumidores de exigir productos más sostenibles, tanto desde una perspectiva ambiental como laboral, incluyendo en este último punto criterios de comercio justo (Nelson y Phillips, 2018), apuntan a la posible implantación, cada vez en mayor medida, de prácticas más respetuosas en relación con la economía de los pequeños productores (Humphrey y Navas-Alemán, 2010). Así, el porcentaje de cacao originado bajo estas premisas, catalogado como cacao “certificado”, sobre el total del gestionado por las empresas cacaoteras es cada vez mayor (Figura 1.7.). Por otra parte, los países productores, que desempeñan un papel prácticamente nulo en el procesado del cacao, aspiran a crear una industria transformadora que permita incrementar el valor añadido del cacao autóctono y, en consecuencia, potenciar el escaso rendimiento económico que obtienen los productores (Malan, 2018).



**Figura 1.7.** Empresas de procesado de cacao y comercializadoras de sus derivados: volumen de cacao transformado, en t (x1000), y porcentaje sobre el total catalogado como cacao “certificado” (adaptado de Fountain y Huetz-Adams, 2018).

El precio del cacao a nivel mundial se hace público de forma diaria como la media resultante de los valores fijados por los mercados agrarios de Londres y Nueva York, aunque luego pueden existir ligeras variaciones atendiendo a peculiaridades del país de origen o de la fecha de adquisición (Fountain y Huetz-



Adams, 2018). Precisamente, el importante papel que juega Reino Unido en el mercado del cacao arroja sombras con respecto al futuro de este producto y su viabilidad económica, como consecuencia del Brexit. Si, además, se considera que el pasado inmediato no ha sido especialmente favorable para la economía del cacao, tiempo en el que se registró una caída cercana al 50% en el periodo comprendido entre 2015 y 2017 (Voora *et al.*, 2019), resulta evidente la necesidad de implementar actuaciones que mejoren las perspectivas económicas, tanto para productores como para procesadores. Así, junto a las medidas comentadas con anterioridad referentes a la adopción de prácticas que garanticen la producción del denominado cacao “de confianza”, con el valor añadido que eso confiere desde una perspectiva ambiental y de comercio justo, en los últimos años se están realizando esfuerzos tendentes a diversificar la gama de productos en los que se demanda utilización de cacao (Beg *et al.*, 2017), no sólo en el sector alimentario, sino también en el campo de la cosmética (Gyedu-Akoto *et al.*, 2015; Fonseca-Santos *et al.*, 2017). Igualmente interesante sería incrementar el número de actores implicados en el sector, de manera que no se favorezca la concentración del mercado en un número limitado de compañías, factor que puede suponer un riesgo en el futuro (Oomes *et al.*, 2016).

**Tabla 1.3.** Geografía del consumo de chocolate y otros derivados del cacao (adaptado de Poelmans y Swinnen, 2019).

Región	Consumo (kg/capita)			Valor (millones de \$)		
	2004	2018	Variación	2004	2018	Variación
Europa Occidental	4,50	4,62	+3%	27.207	33.285	+22%
Europa Oriental	3,62	4,83	+34%	5.516	11.519	+109%
América del Norte	5,10	4,27	-16%	13.999	22.249	+59%
América Latina	0,79	1,11	+40%	1.757	4.988	+184%
Asia Pacífico	0,06	0,13	+132%	1.525	7.148	+369%
Australia	3,63	4,63	+27%	1.229	2.254	+83%
Oriente Medio y África	0,42	0,51	+20%	779	1.494	+92%

En los últimos años, la demanda de productos derivados del cacao se ha visto incrementada, especialmente en países en vías de desarrollo (Poelmans y Swinnen, 2019), crecimiento que contrarresta con creces el descenso en consumo registrado en algunos países desarrollados, como es el caso de EE.UU o Alemania (Tabla 1.3.).



En los próximos años, y siempre y cuando se mantengan estas tendencias, es posible que resulte difícil cubrir plenamente las necesidades de cacao. En tal caso, las probabilidades de entrar en un nuevo ciclo de subida de precios como consecuencia de la incapacidad para abastecer la demanda global serán elevadas.

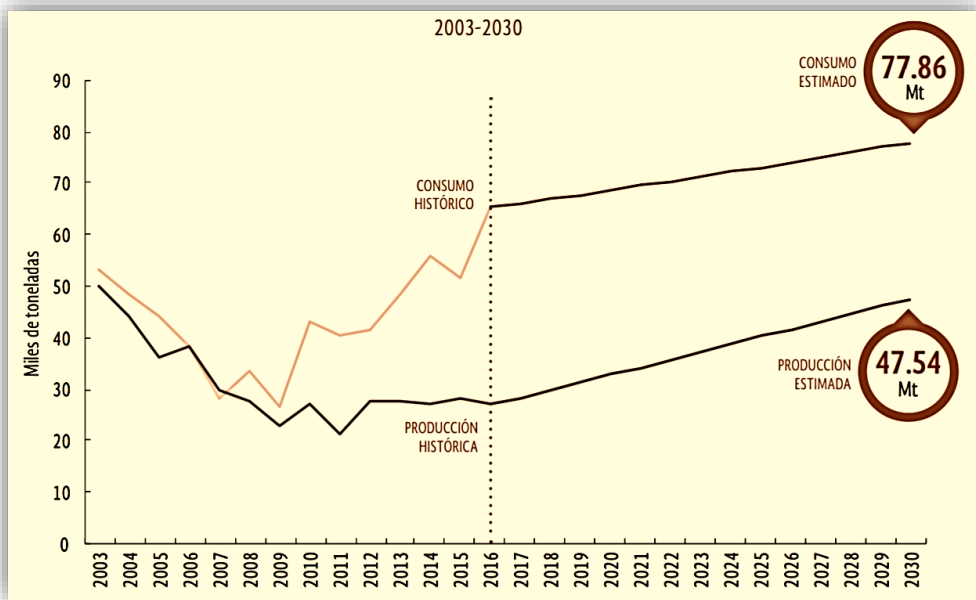
Desde un punto de vista climático, factor de especial relevancia en un futuro no excesivamente lejano, las previsiones de producción para el cacao no parecen ser negativas, dada sus demandas térmicas (Kozicka *et al.*, 2018), aunque los nuevos patrones de distribución de precipitaciones pueden alterar el marco geográfico de desarrollo de este cultivo, favoreciendo a aquellas regiones que presentan un clima con altos niveles de humedad. Sin embargo, la productividad no presenta márgenes importantes de mejora en las actuales condiciones, con los cultivos basados en las tres variedades tradicionales (criollo, forastero y trinitario), las cuales probablemente presenten un elevado grado de sensibilidad a las plagas en un potencial nuevo escenario propiciado por el cambio climático. En este sentido, la diversidad genética existente en la especie puede desempeñar un importante papel (Zhang y Motilal, 2016), lo que, considerando que dicha riqueza se localiza mayoritariamente en América Latina, puede conceder a esta región un papel destacado en lo concerniente a la generación de cacao con superiores cualidades y más resistente a la acción de plagas (Kieck *et al.*, 2016).

### 1.5. EL CACAO EN MÉXICO.

El cultivo del cacao en México data de miles de años atrás. Como ya se ha comentado en epígrafes anteriores, existen evidencias que muestran como diversos pueblos asentados en la zona desde tiempos ancestrales, tales como los Olmecas, los Mayas o los Mokayas, ya se beneficiaban de los frutos de esta especie, e incluso los Aztecas llegaron a utilizarlos como moneda de cambio (McShea *et al.*, 2009). También se asocia a México el desarrollo de las variedades tradicionales, a través de la recombinación entre plantaciones nativas y genotipos de elevada productividad externamente introducidos (Vázquez-Ovando *et al.*, 2015). Ya en épocas más recientes, la importancia relativa del país como productor de cacao ha disminuido de forma considerable como consecuencia del dominio ejercido en las últimas décadas por regiones de menor tradición cacaotera, tales como África y, en menor medida, Asia y Oceanía. En la actualidad, la aportación de México a la



producción mundial de cacao no alcanza el 2% (Fluck, 2014), porcentaje que aun le permite encontrarse entre los diez mayores productores del mundo (Slavova, 2017), a pesar de que los volúmenes recolectados en los últimos años han mostrado una tendencia global descendente (Figura 1.8.), si bien datos recientes registrados, correspondientes a 2017, muestran un leve repunte (de 26.969 a 27.326 t) (Suárez-Venero *et al.*, 2019). No obstante, en el periodo previo comprendido entre 2003 y 2016, la reducción en los niveles de producción superó el 46% y el 26% en lo concerniente al rendimiento (SAGARPA, 2017).



**Figura 1.8.** Histórico de la producción y consumo de cacao en México en el periodo 2003-2016 y previsiones de futuro hasta el año 2030 (SAGARPA, 2017).

Las razones que ocasionan la inestabilidad de los niveles de producción del cacao en México son variadas, aunque se relacionan mayoritariamente con la elevada incidencia de fitopatógenos registrada en los últimos años y, en concreto, la de la especie *Moniliophthora roreri*, que ocasiona la podredumbre del cacao, principal enfermedad de este cultivo, afectando en ocasiones hasta al 90% de la producción (Ortega Andrade *et al.*, 2017). Otros aspectos que inciden negativamente sobre la





producción de este cultivo se relacionan con factores de comercialización, tales como el elevado número de intermediarios, los altos costes de producción, que limitan su competitividad internacional, la avanzada edad de los cultivos, la falta de formación en los trabajadores o la ausencia de ayudas públicas que potencien la productividad (Molina Martínez y Ramos Martínez, 2020) y de rentabilidad, que hace insostenible el mantenimiento de las explotaciones unifamiliares (Zequeira, 2012).



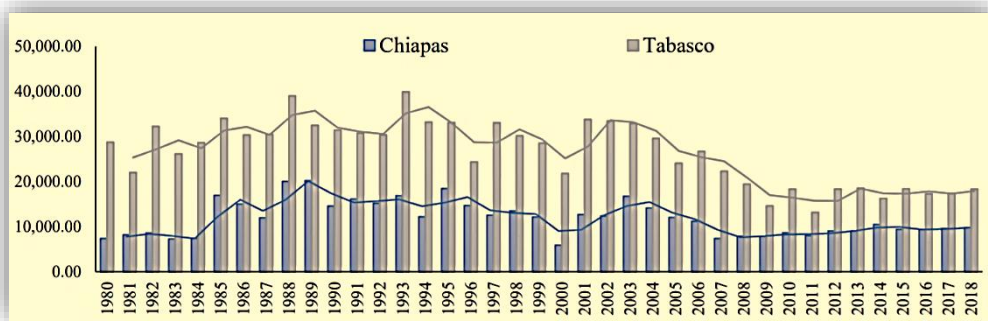
**Figura 1.9.** Regiones productoras y con potencial productor de cacao en México ([https://cacaomexico.org/?page\\_id=168](https://cacaomexico.org/?page_id=168)).

**Tabla 1.4.** Comparativa de las principales regiones cacaoteras de México (Cacao México, 2009).

Estado	Superficie sembrada (h)	Superficie cosechada (h)	Producción (t)	Rendimiento (t/h)
Tabasco	41.117	41.117	16.560	0,40
Chiapas	20.203	20.203	7.855	0,39
Guerrero	240	240	196	0,81
Oaxaca	36	1	1	0,80
<b>Total</b>	61.595	61.510	24.612	0,40



La contribución del cacao al PIB agrícola mexicano alcanza el 0,15%, acaparando el 0,04% de la producción de agroindustriales (SAGARPA, 2017). Las plantaciones de cacao, que ocupan aproximadamente a 37.000 productores, se centran fundamentalmente en la zona sur del país, con los estados de Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Tabasco como zonas destacadas (Figura 1.9., Tabla 1.4.). Estos dos últimos estados, además de ser los centros históricos de producción, concentran la práctica totalidad del cacao originado en México, con el 32,9% y el 66,9% del total, respectivamente (Figura 1.10.) (Grupo Hydro Environment, 2018), mientras que el resto presenta, por sus condiciones climáticas, un importante potencial de futuro. En el caso concreto del estado de Tabasco, las condiciones ambientales, con un clima de tipo tropical húmedo, caracterizado por temperaturas fluctuantes entre 17 °C y 42 °C y precipitaciones anuales en torno a 2000 mm, favorecen el desarrollo de un sistema agroforestal adecuado para el cultivo del cacao, independientemente de la variedad tradicional utilizada (Brito-Vega *et al.*, 2018a). Este sistema, en el que los especímenes de *Theobroma cacao* crecen en un marco forestal de carácter preferentemente natural, coexiste con plantaciones deforestadas en las que son especies como el plátano, la mandioca o el maíz las que proporcionan sombra al cacao (Brito-Vega *et al.*, 2018b). El primero de los sistemas se considera más sostenible, tanto desde un punto de vista ecológico, ya que favorece un mayor mantenimiento de la fertilidad del suelo, como productivo, dado que propicia un marco de estabilidad para los productores, al coexistir el cacao con otras especies comercialmente aprovechables (López-Juárez *et al.*, 2019).



**Figura 1.10.** Histórico de la producción de cacao (t) en Tabasco y Chiapas, principales regiones cacaoteras de México (Martínez-Salvador y Martínez-Salvador, 2020).



Aunque durante mucho tiempo la variedad dominante en los sistemas productivos mexicanos fue la del tipo Criollo, a la que se asocian mejores propiedades organolépticas, a partir de la segunda mitad del siglo XX, y como consecuencia de su alta sensibilidad a plagas y enfermedades, su utilización fue decayendo, hasta el punto de que en la actualidad sólo supone el 2% de la producción. El tradicionalmente denominado tipo Forastero se ha impuesto de forma mayoritaria, siendo las variedades Guayaquil, Calabacillo y Ceylán las principalmente utilizadas (Andrade Aguirre, 2007). Precisamente, una de las principales recomendaciones planteadas desde la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en los planes estratégicos dirigidos a la potenciación del sector cacaotero se centra en la recuperación de las variedades originarias de la zona y en la creación de un banco de clones regionales (SAGARPA, 2017), dando así protagonismo a las variedades autóctonas, de mayor riqueza aromática. En este sentido, diferentes estudios apoyan la existencia de variabilidad genética única en las poblaciones de cacao en México, no sólo con respecto a las procedentes de la zona sur del continente, sino incluso entre ellas (Whitkus *et al.*, 1998; Vázquez-Ovando *et al.*, 2014). Se pretende, por tanto, incrementar la competitividad mediante caracteres diferenciadores de calidad y no tanto a través de los niveles de producción, sin despreciar tampoco este último criterio. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucede en otros países cacaoteros, en México no existe un centro de conservación regulado que gestione la diversidad genética del cacao, especialmente en lo referente a cultivares ancestrales, y que actúe como banco de germoplasma, con potencial para mejorar las variedades comerciales (Flood y Murphy, 2004). Además de las cuestiones relacionadas con la conservación de la diversidad genética, otras propuestas específicas para la región productora de Tabasco contempladas en el documento estratégico y avaladas por diferentes estudios (de la Cruz-Landero *et al.*, 2015), con vistas a mejorar el sector cacaotero son:

- Renovación de las plantaciones, cuya edad media oscila entre 30 y 40 años (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2011).
- Optimización del manejo integral de plagas y enfermedades.
- Creación de viveros adaptados a las demandas específicas del sector.
- Modernización de equipos e infraestructuras destinados al procesado del cacao, principalmente en las etapas de fermentación y secado, y a la



elaboración de derivados de carácter artesanal, tanto chocolate como otro tipo de productos.

- Desarrollo de programas de asistencia técnica y capacitación para los procesos de producción y de generación de derivados de alto valor añadido, que permitan mejorar el nivel formativo y la capacidad de gestión, generalmente bajos, de los pequeños productores (Engler y Toledo, 2010).
- Establecimiento de canales de comunicación que propicien la transferencia de tecnología y potencien la innovación.
- Reconocimiento e impulso de procesos de certificación orgánica.
- Implantación de sellos de calidad.

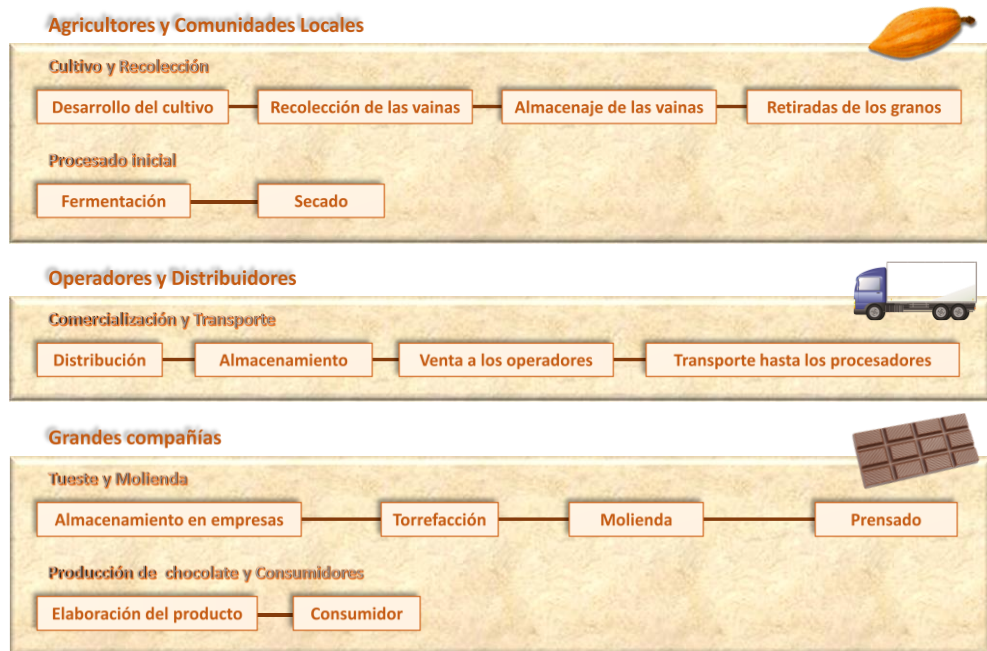
El pasado reciente del cultivo del cacao y su producción en México no puede considerarse especialmente satisfactorio, tal y como demuestran los diversos datos productivos y económicos expuestos. Sin embargo, las causas que motivan estos resultados negativos han sido identificadas y la voluntad, tanto de instituciones públicas como de agricultores, apunta claramente a un importante cambio en la gestión y el manejo del cultivo y de su posterior procesado, con vistas a optimizar los sistemas productivos y propiciar la generación de productos de gran calidad, capaces de satisfacer la actual demanda de derivados del cacao con un alto valor añadido, por los cuales el consumidor está dispuesto a pagar precios superiores (Caligiani *et al.*, 2016). Las oportunidades que ofrece este sector dentro del mercado global del cacao son especialmente interesantes, ya que no se encuentra sometido a las fluctuaciones habituales del cacao tradicional y no se rige por las directrices marcadas por los Mercados de Intercambio de Londres y Nueva York, que controlan la comercialización de este producto (Santander Muñoz *et al.*, 2020). Sin duda, este último ha de ser el enfoque del sector cacaotero mexicano, al menos en un futuro inmediato, dada la elevada capacidad productora de otras regiones, principalmente en el continente africano.

### 1.6. PROCESADO Y TRANSFORMACIÓN DEL CACAO.

Las propiedades intrínsecas del cacao imposibilitan su comercialización directa. La presencia de compuestos que le confieren un fuerte sabor amargo y astringente, nada agradable al paladar, hacen obligatoria la realización de una serie de etapas dirigidas a la transformación de dichos compuestos (De Wuyt y Weckx, 2016), y



que concluyen con la generación de un producto final con adecuadas características organolépticas para su utilización en los procesos de elaboración de productos tales como chocolate, cacao en polvo o mantequilla de cacao. Las etapas habituales en el procesado del cacao que conllevan cambios en sus características incluyen fermentación, secado, torrefacción y molienda (Figura 1.11.). Las dos primeras se ejecutan de forma mayoritaria en las zonas de cultivo y recolección, mientras que las dos últimas suelen ser realizadas por las empresas alimentarias (Santander Muñoz *et al.*, 2020).



**Figura 1.11.** Etapas en la cadena de valor del cacao, desde el cultivo hasta su consumo (adaptado de Ozturk y Young, 2017).

La recolección del cacao ha de realizarse en el momento preciso de madurez, ya que de lo contrario puede producirse la germinación de las semillas (excesiva madurez) o la afectación negativa de la fermentación y la correspondiente reducción en la producción (falta de madurez) (Gutiérrez y Pérez, 2015, 2015). Una vez recolectados, las vainas de cacao son manualmente abiertas mediante la acción de un machete, en una operación en la que se requiere una gran destreza, ya que



se ha de evitar la afectación de las semillas y la mezcla de estas con la placenta, ya que, en caso contrario, la fermentación transcurriría de forma inadecuada. En este sentido, y de forma previa a la fermentación, parte de la pulpa ha de ser retirada, dado que un exceso de disponibilidad incrementaría la concentración de azúcares fermentable, lo que favorecería en demasía cierta actividad microbiana, dando lugar a niveles indeseables de ácido que incidirían negativamente en las cualidades organolépticas finales (Afoakwa y Paterson, 2010). La eliminación se puede efectuar por vía mecánica o mediante la acción de enzimas pectinolíticas, y en ambos casos, es aconsejable que el porcentaje retirado de pulpa esté entre el 10% y el 30%, con preferencia del rango 20-25% (Kongor *et al.*, 2016). El almacenamiento durante un breve periodo de tiempo de las vainas tras la recolección y con anterioridad a su apertura puede también ocasionar ciertas modificaciones químicas, relacionadas principalmente con la reducción de azúcares reductores y no reductores, grasas, proteínas y polifenoles (Santander Muñoz *et al.*, 2020) que posteriormente influirán positivamente sobre el desarrollo de los componentes organolépticos (Saltini *et al.*, 2013; Shcwan y Fleet, 2014).

A continuación se describen de forma detallada las distintas etapas incluidas en el procesado del cacao, con excepción de la fermentación, principal objeto de estudio de esta tesis y razón por la cual se tratará en mayor profundidad con posterioridad.

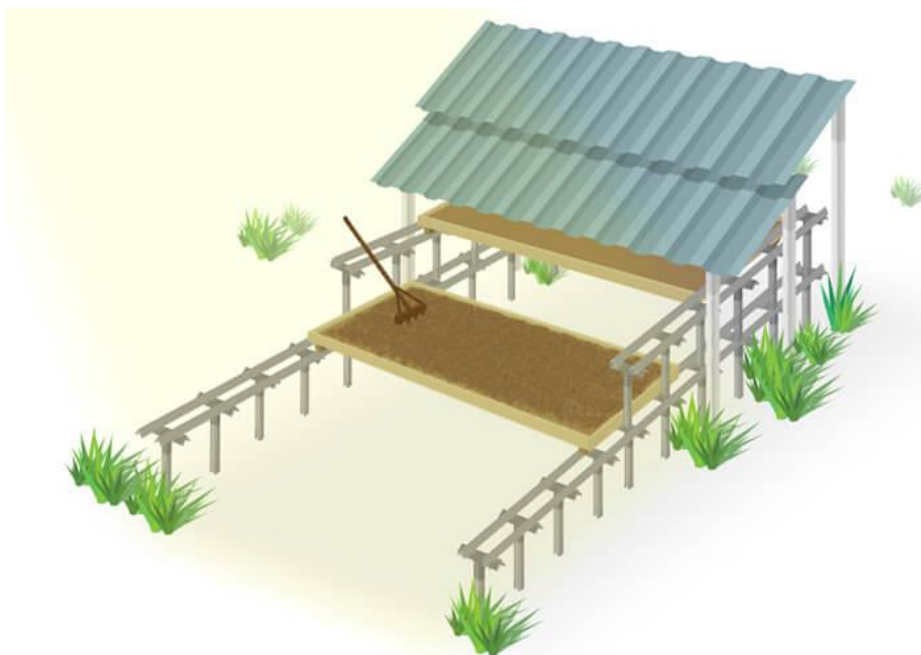
### *1.6.1. Etapa de secado.*

Tras la etapa de fermentación, los granos portan un elevado grado de humedad que, de no ser reducido, propiciaría el crecimiento de especies fúngicas, prolongaría en exceso la acción de especies microbianas propias de la fermentación y aumentaría el riesgo de alterar los granos durante la subsiguiente etapa de almacenamiento (Aprotosiaie *et al.*, 2016). Desde el 40-60% que suelen mostrar las semillas al finalizar la transformación biológica, la etapa de secado ha de rebajar la presencia de agua hasta un nivel del 6-8% (Kongor *et al.*, 2016). Un excesivo secado que concluya con niveles inferiores a estos confieren una alta fragilidad a los granos, que dificultan enormemente su posterior manejo (Guerrero, 2011).

Además de actuar minimizando determinados procesos o evitando la presencia de especies indeseables, la etapa de secado también contribuye en



positivo al desarrollo de las propiedades deseables del cacao. En concreto, durante esta fase, se potencia el desarrollo del color a través de una serie de reacciones de carácter oxidativo, ya existentes en la etapa fermentativa (Merkus, 2014). Los compuestos de naturaleza polifenólica son transformados en quinonas mediante la acción de las polifenol oxidasas, y estas, a su vez, experimentan procesos de condensación con grupos amino o sulfhidrilo libres, que desembocan en la generación de compuestos pardos (Aprotosiaie *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha comprobado la formación de los denominados compuestos de Amadori, precursores necesarios para las reacciones de Maillard, que se dan durante el secado y con posterioridad (Kongor *et al.*, 2016) y que derivan de la interacción entre glucosa y aminoácidos libres.



**Figura 1.12.** Plataforma para secado natural del cacao (<https://www.virtualpro.co/infografias/secado-del-cacao>).

Desde una perspectiva metodológica, el secado puede llevarse a cabo por vía natural, simplemente por exposición de los granos fermentados a la luz solar, o por





aplicación de técnicas artificiales. La primera tiene mejor consideración, dado que, al contrario que las segundas, no sólo no genera aromas desagradables (Bernaert *et al.*, 2012), sino que aportan ciertas características de sabor. No obstante, presenta el inconveniente de un bajo nivel de control, ya que depende de las condiciones ambientales (Toker *et al.*, 2020). La velocidad de secado también es importante, ya que un proceso que transcurra excesivamente rápido puede ocasionar que en la parte interna del grano quede cierto grado de humedad (Gutiérrez, 2017), y que queden remanentes de ácido acético excesivamente altos (Saltini *et al.*, 2013), mientras que en el caso contrario, no se adquirirá la tonalidad adecuada de color, se rebajará el nivel de acidez hasta niveles inadecuados y se favorecerá la contaminación fúngica (Bharath y Bowen-O'Connor, 2008; Zahouli *et al.*, 2010). En un proceso típico de secado natural, los granos se extienden en capas de 10 cm de altura, que son periódicamente rastrilladas y, cuando las condiciones climáticas lo requieren, cubiertas con plataformas móviles. La duración de esta etapa suele extenderse aproximadamente siete días. Los procesos artificiales se dan en mayor medida en zonas en las que las precipitaciones son habituales. En tales casos, las capas de grano se colocan sobre unas plataformas que, su vez, se ubican sobre material leñoso ardiente. En algunas zonas, este sistema tradicional ha sido sustituido por intercambiadores de calor, que evitan la adquisición de las típicas características del ahumado. En tales casos, las temperaturas aplicadas oscilan entre 40 °C y 60 °C, aunque algunos autores postulan incluso valores en torno a 70 °C (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012). Sea cual sea la temperatura seleccionada, el proceso ha de realizarse de forma controlada para garantizar el correcto desarrollo de las reacciones de influencia organoléptica (Alean *et al.*, 2016).

Por las características de esta etapa, generalmente realizada al aire libre, ha de prestarse especial atención a la posible presencia de contaminantes microbianos procedentes del entorno y de micotoxinas, dada la adaptabilidad de ciertas especies fúngicas a bajos niveles de actividad de agua (Copetti *et al.*, 2011b).

### 1.6.2. Etapa de torrefacción.

Tras la etapa de secado, los granos de cacao son sometidos a una serie de operaciones intermedias antes de proceder a la siguiente fase, la torrefacción,





realizada ya, de forma general, por las grandes empresas alimentarias. Las operaciones intermedias incluyen limpieza, mezcla, pre-tratamiento térmico y aventado (Predan *et al.*, 2019). La tercera de estas operaciones, el pre-tratamiento térmico, implica la aplicación durante un muy breve intervalo de tiempo de una fuente de calor de elevada intensidad (vapor saturado o radiación infrarroja), de manera que el calor se concentra en la superficie de los granos, sin alterar la zona central, lo que propicia una fácil separación de la cáscara del grano sin que se produzcan otras reacciones de incidencia negativa sobre las propiedades organolépticas (Beckett, 2009). Precisamente, el aventado subsiguiente consiste en la separación definitiva de la cáscara mediante una ruptura inicial realizada por medios mecánicos, de manera que esta queda separada de los cotiledones, y su posterior separación, aprovechando la diferencia de densidad entre ambos componentes, aplicando un flujo de aire de velocidad adecuada (Akinnuli *et al.*, 2015). Opcionalmente, el proceso de torrefacción se puede realizar sobre los granos completos, sin descascarillarlos, lo que facilita considerablemente la operación de aventado y hace innecesaria la del pre-tratamiento térmico (Gutiérrez, 2017). Existe una tercera alternativa, en la que los embriones ya separados de la cáscara son finamente molturados hasta alcanzar el estado líquido (Gutiérrez y Pérez, 2015). Adicionalmente, las operaciones dirigidas a la ruptura de la cáscara y a su separación se pueden realizar tras la etapa de torrefacción, que en este caso se ejecutaría sobre el grano completo.

La torrefacción del cacao, *grosso modo*, consiste en la aplicación de temperaturas entre 130 °C y 150 °C durante 15-45 min (Żyżelewicz *et al.*, 2016), aunque las características intrínsecas de cada proceso, tales como el destino final del cacao o la variedad cultivar empleada, decidirán las condiciones exactas (Kongor *et al.*, 2016), dado que el efecto sobre el cacao varía de modo considerable en función de la temperatura y el tiempo de tratamiento (Farah *et al.*, 2012). Mediante esta etapa se consigue disminuir aún más el porcentaje de humedad, hasta aproximadamente el 2%, se eliminan ácidos volátiles no deseables, como es el caso del ácido acético, se produce la higienización microbiana del producto, y los precursores generados durante la fermentación interaccionan entre sí, propiciando así la formación de las propiedades organolépticas deseables en el cacao y sus derivados (Santander Muñoz *et al.*, 2020). Adicionalmente, se suele reducir la presencia de compuestos polifenólicos, hecho que tiene aspectos tanto positivos



(se reduce la astringencia) como negativos (se pierde capacidad antioxidante) (Urbańska y Kowalska, 2019).

Aunque todos los eventos que tienen lugar durante la etapa de torrefacción, la adquisición de características de aroma y sabor muestran especial relevancia. Compuestos de naturaleza peptídica y azúcares reductores generados durante la fermentación interaccionan vía reacciones de Maillard, generando bases de Schiff. Estas, a su vez, experimentan las reacciones de reordenación de Amadori, dando lugar a compuestos intermediarios que, con posterioridad, son transformados mediante diversas rutas. Una de las más destacadas es la conocida como degradación de Strecker que, a través de sucesivas etapas, concluye con la generación de compuestos volátiles orgánicos, de importancia organoléptica., tales como aldehídos y pirazinas (Huang y Barringer, 2011).

### *1.6.3. Operaciones adicionales.*

Además de las etapas comentadas, de obligada realización, el procesado del cacao hasta concluir en la obtención de un producto con características organolépticas definidas puede incluir otra serie de operaciones opcionales tendentes a mejorar tales características. Una de dichas operaciones es la alcalinización, también conocida como “Dutching”, en reconocimiento a la persona que lo realizó por vez primera, el químico holandés Johannes van Houten, y que consiste en la impregnación del cacao con una base débil, usualmente NaOH o  $K_2CO_3$  (Li *et al.* 2014).

Este tratamiento, que también puede aplicarse de forma previa a la torrefacción (Nair, 2010), tiene como objetivo principal potenciar propiedades tales como el color y el sabor y, en el caso del cacao pulverizado, mejorar su nivel de dispersabilidad en bebidas (Jolić *et al.*, 2011; Kothe *et al.*, 2013; Giacometti *et al.*, 2015). Obviamente, también se modifica el pH del producto, que pasa de valores en el rango de 5,2-5,6 a niveles en torno a la neutralidad (Afoakwa, 2015). En caso de ser necesario, tras finalizar el proceso se pueden adicionar pequeñas cantidades de ácido acético o tartárico para equilibrar el pH (Gutiérrez, 2017).

El cambio de color (Figura 1.13.) es debido a reacciones que afectan a polihidroxifenoles, concretamente a taninos, mientras que la potenciación del sabor se relaciona con una reducción en los niveles de astringencia asociada a un



incremento en el grado de polimerización de flavonoides. Este último factor puede incidir negativamente sobre las buenas cualidades atribuidas a los derivados del cacao, parte de las cuales se relacionan con la capacidad antioxidante de este tipo de compuestos, por lo que algunos productores optan por comercializar productos con cacao sin alcalinizar (Zwir, 2012). Sin embargo, y desde otra perspectiva, el tratamiento básico reduce la posible presencia de acrilamida, cuya formación se favorece durante las etapas anteriores de secado y torrefacción (Moreno-Trujillo *et al.*, 2013).



**Figura 1.13.** Adquisición de color como consecuencia del tratamiento de alcalinización del cacao (<https://www.seriousseats.com/2014/08/difference-dutch-process-natural-cocoa-powder-substitute.html>).

Otra de las operaciones a las que se somete al cacao es la molienda o molturación, generando de esta forma cacao en polvo o licor de cacao. En el caso de este último, para cuya producción se utilizan molinos de piedra, de disco o de martillo, el calor generado durante el proceso propicia que los compuestos grasos presentes en elevada concentración en los granos de cacao se fundan, dando así lugar a un producto líquido que, posteriormente, puede ser refinado mediante calentamiento a 90-100 °C. Adicionalmente, este tratamiento térmico elimina la posible presencia de contaminantes microbianos. De forma previa a su comercialización se enfría, con lo que adquiere una consistencia semi-sólida, aunque también puede ser utilizado en la elaboración de chocolate, manteca de cacao o cacao en polvo.



En la elaboración del derivado del cacao de mayor importancia, el chocolate, son habituales una serie de tratamientos dirigidos a la obtención de un producto homogéneo en su textura, y libre de características organolépticas indeseables. Las principales operaciones en ese sentido son de mezclado, refinado y conchado (Toker *et al.*, 2020). La primera de ellas, de gran influencia en las características finales del producto, se ejecuta en mezcladores continuos o discontinuos, en los que se opera mediante combinaciones variables de tiempo y temperatura. Los primeros son típicos de grandes empresas chocolateras, en las que se manejan grandes volúmenes de mezclado dispuestos en amasadoras que dan lugar a una textura plástica y consistente (Quiñones-Muñoz *et al.*, 2011), mientras que en los segundos, la operación de mezcla se mantiene durante 12-15 min, a una temperatura de 40-50 °C. Los ingredientes que se mezclan, dependiendo del tipo de producto final que se desea obtener son: licor de cacao, manteca de cacao, azúcar, grasa de leche y leche en polvo.

El principal objetivo del refinado es la adquisición de una textura suave, propiedad que se alcanza mediante el cribado de las partículas que sobrepasan un determinado tamaño, generalmente 30  $\mu\text{m}$  (Sokmen y Gunes, 2006), aunque en ocasiones se propicia la formación de una doble capa con presencia de partículas de distinto tamaño, lo que parece mejorar la textura del producto final, especialmente en el caso de los chocolates negros.

El último de los tratamientos, el conchado, confiere al chocolate sus propiedades finales en cuanto a viscosidad, textura y sabor y garantiza que todas las partículas queden perfectamente recubiertas por la fracción grasa (Gutiérrez, 2017). En esencia, el conchado consiste en la agitación del chocolate durante varias horas a una temperatura superior a los 50 °C, ya sea mediante técnicas tradicionales o en dispositivos especiales, denominados máquinas de conchado (Figura 1.14.). Las condiciones del tratamiento favorecen la pérdida de humedad y de ciertas moléculas volátiles no deseables, como es el caso del ácido acético y determinados fenoles (Beckett, 2008), y la oxidación de taninos (Reineccius, 2006), además de propiciar cierto grado de caramelización y estabilizar la viscosidad. Aunque son diversos los compuestos importantes desde el punto de vista organoléptico que se ven afectados por las condiciones del conchado, los que se ven afectados en mayor medida durante este proceso son las pirazinas (Liu *et al.*, 2015), por lo que es importante no prolongar indebidamente este proceso, ya que



**Figura 1.14.** Máquina de conchado de cacao (<https://www.pinterest.es/pin/665688388640537520/>).

el descenso en este tipo de moléculas puede ser intenso (Toker *et al.*, 2019). En este sentido, las condiciones del proceso en cuanto a tiempo y valores térmicos varían en función del tipo de chocolate que se produce. Así, para un chocolate con leche, el proceso se extiende entre 10 h y 16 h, a 49-52

°C, mientras que para un chocolate negro son 8 h a 70-82 °C. Si se quiere mantener la viscosidad en niveles adecuados, se incorpora manteca de cacao o lecitina en la parte final del proceso (Whitefield, 2005).

En términos generales, el proceso de conchado se desarrolla en tres fases (Bordin Schumacher *et al.*, 2009). Durante la primera o fase seca, en la que se desarrollan los efectos iniciales de la fricción, la fracción grasa comienza a envolver las partículas, se eliminan compuestos volátiles, y se pierde una fracción de la humedad. La segunda de las fases, conocida como etapa pastosa, se completa la pérdida de humedad y se intensifican las propiedades organolépticas relativas al sabor. En la tercera y última fase, denominada fase líquida, la pasta se licúa y homogeniza (Gutiérrez, 2017).

Tras el conchado, el cacao ha de ser atemperado, tratamiento con el cual se alcanza una configuración cristalina de la fracción grasa, factor responsable de la apariencia lustrosa del chocolate. También se favorece la adquisición de la textura crujiente y la capacidad de fundirse en la boca (Greweling, 2007). El atemperado tradicional transcurre en cuatro etapas: fundido completo a 50 °C, enfriamiento hasta el punto de cristalización a 32 °C, cristalización a 27 °C y transformación de



formas polimórficas inestables a 29-31 °C (Svanberg *et al.*, 2011). En el caso de chocolate con leche, el punto de cristalización disminuye como consecuencia de la grasa presente en la leche, por lo que el valor térmico para la cristalización es inferior (Afoakwa, 2015). En todas ellas es necesario controlar, además de la temperatura, el tiempo y la agitación, factor este último que impide la generación de fases en la mezcla debido a la diferencia de densidad de los distintos componentes (Gutiérrez y Pérez, 2015).

De forma previa a la cristalización, el chocolate ha de mantenerse líquido, por lo que se dispone en tanques con temperatura constante, 45 °C. Este valor térmico impide que se produzca solidificación, en caso de temperaturas inferiores, o de que se alteren las características organolépticas, si se aplican temperaturas superiores. Por otra parte, también es crucial el control de la humedad, ya que su incremento favorece la formación de agregados que aumentan la viscosidad hasta niveles no deseables.

La última etapa antes de la distribución y comercialización implica el moldeado del chocolate, etapa en la que se pueden incorporar diversos ingredientes, tales como frutos secos, semillas o porciones de frutas (Gutiérrez, 2017). El chocolate, ya sea atemperado o pre-cristalizado y fundido es depositado en moldes de metal o, preferentemente plástico o silicona, ya que son más económicos y su mayor flexibilidad facilita la posterior extracción (Ramírez, 2011), los cuales son operados a través de un sistema automatizado de túneles que se encuentran a 4-7 °C, si bien la superficie de los moldes ha de estar caliente para evitar la formación de cristales y promover la fusión de aquellos que son inestables (Gutiérrez y Pérez, 2015). Para evitar la formación de burbujas, y propiciar la distribución uniforme del chocolate los moldes son agitados (Laughter *et al.*, 2012). Los procesos a pequeña escala utilizan refrigeradores a 5 °C, en los que los moldes con el chocolate permanecen durante una hora. Una vez que se produce la solidificación, tiene lugar la extracción de los moldes. Este proceso puede ser automatizado, con máquinas que invierten los moldes y depositan el chocolate sobre bandejas planas, o manual. Si el chocolate ha sido bien atemperado en la etapa inmediatamente anterior, el chocolate presentará las adecuadas características de forma, color y brillo, además de mayor estabilidad, resistencia térmica y periodo de vida útil. En el caso contrario, el proceso de extracción se verá dificultado, pudiéndose incluso llegar a producir fracturas.





1.7. DESARROLLO DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS: VARIABLES DE INFLUENCIA Y COMPUESTOS IMPLICADOS.

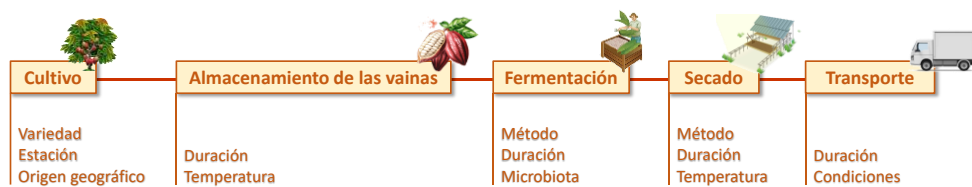
El cacao y sus productos derivados, especialmente el chocolate, se encuentran entre los productos más demandados por los consumidores. Entre otras características, tal éxito es debido, sin duda, a las propiedades organolépticas que muestran (Figura 1.15.), que se concretan en unas cualidades sensoriales únicas cuando se funde en la boca (Torres-Moreno *et al.*, 2012). Uno de los factores que contribuye en mayor medida a esas excepcionales propiedades es el sabor que, en el caso de los derivados comerciales del cacao, se desarrolla durante las etapas de procesado post-cosecha (Afoawka *et al.*, 2008), dado que el cacao natural se caracteriza por un sabor amargo y una fuerte astringencia.



Figura 1.15. Rueda de sabores del cacao y del chocolate (CAOBISCO-ECA-FCC, 2015).



El desarrollo del sabor en el cacao procesado es un fenómeno de gran complejidad en el que influyen numerosos factores, tanto relacionados con aspectos agronómicos como procesales (Figura 1.16.), y su comprensión requiere un amplio conocimiento de los diferentes componentes implicados, tanto desde una perspectiva individual como en lo referente a sus interacciones (Aprotosaias *et al.*, 2016). Así, es necesario considerar influencias causadas por variedad genotípica del cacao, condiciones ambientales durante el cultivo, localización geográfica (factores agronómicos), pre-acondicionamiento de la pulpa, proceso fermentativo, secado (tratamiento post-cosecha), y torrefacción y conchado (proceso productivo) (Engeseth y Pangan, 2018).



**Figura 1.16.** Factores de influencia en la calidad del cacao a lo largo de su procesamiento primario (adaptado de Saltini *et al.*, 2013).

### 1.7.1. Factores que condicionan sabor y aroma.

En la etapa de cultivo, las variables con mayor influencia en las características organolépticas que potencialmente puede desarrollar el cacao procesado son la variedad, las condiciones climáticas y el país de origen. Como ya se ha referenciado en epígrafes anteriores, las herramientas genéticas actualmente disponibles han puesto de manifiesto la diversidad genética asociada a la especie *Theobroma cacao*. No obstante, y desde una perspectiva estrictamente comercial, los cultivares utilizados se consideran como pertenecientes a las variedades tradicionalmente conocidas como Forastero, Criollo, Trinitario y Nacional (Giacometti *et al.*, 2015), las cuales difieren entre sí en los niveles de proteínas, carbohidratos y polifenoles, así como en el grado de actividad enzimática de las semillas (Santander Muñoz *et al.*, 2020). La primera de las variedades, Forastero, es considerada como ordinaria en cuanto a su potencial organoléptico, ya que sus propiedades son limitadas como





consecuencia de la menor presencia de compuestos aromáticos (Saltini *et al.*, 2013), lo que origina la ausencia de matices diferenciadores en el sabor que sí se pueden apreciar en los derivados obtenidos con otros cultivares (Aprotosaiae *et al.*, 2016). Por otra parte, genera derivados con valores de pH más elevados que otras variedades (Ortiz de Bertorelli *et al.*, 2009). De forma genérica, se puede decir que los chocolates derivados de esta variedad presentan sabores menos amargos, así como niveles inferiores de astringencia y acidez (Sukha *et al.*, 2008).

La variedad Criollo se caracteriza por presentar de forma natural niveles inferiores de polifenoles y superiores de pirazinas (Santander Muñoz *et al.*, 2020), lo que da lugar a productos con propiedades muy definidas en cuanto a amargor y astringencia, y un fuerte perfil aromático, como consecuencia de altos niveles de moléculas con carácter organoléptico (Ascrizzi *et al.*, 2017). Estas propiedades, en conjunción con bajos valores de pH, confieren un perfil organoléptico particular a los productos derivados de este cultivar, con un elevado potencial aromático (Aprotosiae *et al.*, 2016). Es necesario, sin embargo, procesar de forma adecuada las semillas de esta variedad, dada la intensidad de sus características (Seguine *et al.*, 2014).

Las semillas de la variedad Trinitario, híbrida entre las dos anteriores, muestra características organolépticas más parecidas a la Forastero, con la que comparte los niveles de compuestos polifenólicos (Counet *et al.*, 2004). De igual manera, los productos obtenidos muestran también similares propiedades, con la excepción de unas notas de sabor a vino, que son únicas entre los chocolates (Afoakwa *et al.*, 2008).

La última de las variedades tradicionales, Nacional, típica de Ecuador (Rottiers *et al.*, 2019), es referenciada, al igual que la variedad Criollo, como de cacao fino (Badrie *et al.*, 2015), aunque presenta concentraciones considerablemente inferiores de pirazinas (Toker *et al.*, 2020). Los chocolates elaborados con esta variedad muestran propiedades aromáticas de carácter floral y especiado (Kongor *et al.*, 2016).

Además de la variedad, durante el cultivo del cacao las condiciones a las que se ve sometida la planta, así como la localización geográfica en la que se encuentra la plantación determinan en cierto grado la composición de las semillas y, en consecuencia, la calidad organoléptica del producto generado (Trognitz *et al.*,



2013), además de su potencial influencia positiva sobre la salud, debida mayoritariamente a la presencia de compuestos bioactivos de naturaleza antioxidante (Quelal-Vásquez *et al.*, 2020). Las prácticas agrícolas difieren entre zonas, de manera que factores tales como la duración del cultivo, el marco de plantación o el protocolo de recolección, pueden ocasionar variaciones en las concentraciones de ciertas moléculas, incluso perteneciendo a la misma variedad (Lima *et al.*, 2011a; Niether *et al.*, 2017a). Las condiciones climáticas también se muestran como un factor decisivo, especialmente en la actual situación, considerando el impacto que el cambio climático tiene y tendrá en el desarrollo de la agricultura y, de forma concreta, en el cultivo del cacao (Farrell *et al.*, 2018). En este sentido, será necesario buscar variedades que puedan adaptarse a las nuevas condiciones, especialmente en lo que respecta al incremento de los valores térmicos y la mayor incidencia de las sequías (Abdulai *et al.*, 2018). No obstante, e independientemente del reto que supone el cambio climático en cuanto al cultivo y a la calidad del cacao, esta última se ve también afectada por el entorno en el que la planta se desarrolla. Así, el nivel de radiación solar, la pluviosidad o las propiedades del suelo afectan parámetros tales como la composición nutricional, el contenido en grasas o los niveles de compuestos fenólicos y, por tanto, aunque sea de forma indirecta, el perfil organoléptico del cacao procesado (Niether *et al.*, 2017b) o sus propiedades físico-químicas (Vieira *et al.*, 2015), de gran importancia a la hora de definir parámetros tales como cristalización o consistencia. Así, se ha comprobado que en aquellos casos en los que la maduración de la vaina se produce en período de sequía, el nivel de compuestos fenólicos se incrementa (Wang *et al.*, 2016).

Tras la recolección del cacao, y de forma previa a la fermentación, suele ser práctica habitual, aunque no obligatoria, el almacenamiento temporal de las vainas. Las condiciones en las que tiene lugar esta etapa pueden influir en mayor o menor medida en el potencial organoléptico del producto, si bien tal hecho permanece sin dilucidar, dada la escasa atención que, hasta el momento se ha prestado a esta operación (Hinne *et al.*, 2018). Algunos estudios apuntan el efecto que el almacenamiento tiene tanto sobre el aspecto de las vainas como sobre su composición química (Nazaruddin *et al.*, 2006; Guehi *et al.*, 2010a), mientras que su impacto sobre la comunidad microbiana presente, que regirá la posterior etapa de fermentación, ha sido descrito recientemente (Hamdouche *et al.*, 2019). Una de

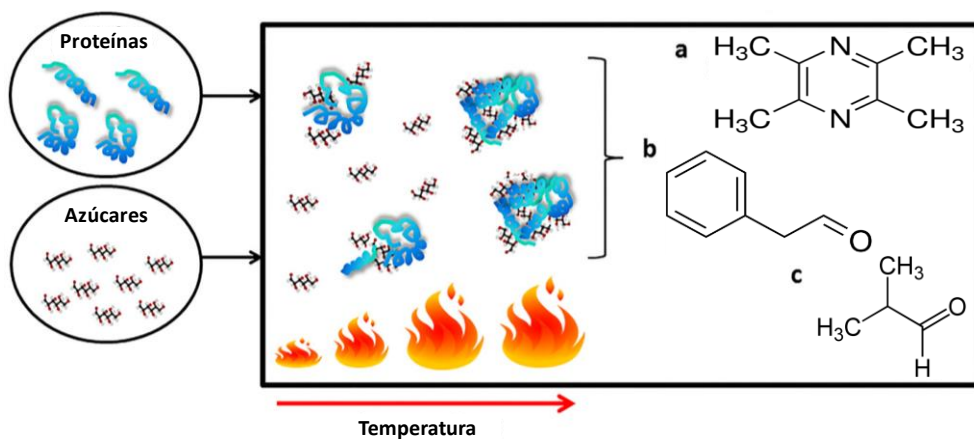


las opciones a las que se atribuye tal impacto es el desarrollo de especies contaminantes que incrementan su presencialidad durante el periodo de almacenamiento (Kedjebo *et al.*, 2016). En el caso de la composición química, se han referenciado incrementos en los niveles totales de alcoholes, con la excepción del etanol, cuando se prolonga el tiempo de almacenamiento, hecho que se asocia a una mayor actividad levaduriforme, potenciada por una baja presencialidad de bacterias del ácido láctico, como consecuencia de una mayor disponibilidad de oxígeno a medida que se aumenta la duración de esta fase (Afoakwa *et al.*, 2014). Por el contrario, ésteres y ácidos parecen reducirse en función del tiempo de almacenamiento, lo que puede deberse a un descenso en la concentración de sustratos precursores, azúcares y proteínas en el caso de los primeros (Afoakwa *et al.*, 2013), y etanol en el de los segundos (Hamdouche *et al.*, 2019). En cualquier caso, y debido a los escasos estudios realizados, los resultados son contradictorios, y mientras unos apuntan a un posible efecto negativo del precondicionamiento de la pulpa mediante almacenamiento (Hinneht *et al.*, 2019), otros postulan esta etapa como una herramienta útil en lo relativo a perfilar parcialmente las propiedades organolépticas del producto final a través de la composición química (Afoakwa *et al.*, 2014).

Tras la fermentación, etapa fundamental en la adquisición de propiedades y que, como se ha apuntado previamente, se tratará de forma individualizada, la última de las operaciones que se suele realizar por los productores es la de secado. En esta etapa, los parámetros que pueden afectar la presencia de compuestos organolépticos son metodología, duración y temperatura (Toker *et al.*, 2020). El tipo de protocolo aplicado a la hora de implementar el desecado de la pulpa fermentada puede llegar a determinar el que el producto final obtenido alcance la calidad deseada o no. En ese sentido, se valora en mayor medida un proceso tradicional de secado al sol, ya que potencia las características organolépticas asociadas a un buen chocolate (Afoakwa *et al.*, 2008), en contraposición con los protocolos de carácter artificial, que favorecen la aparición de ciertos matices no deseados, tales como notas de aroma a gasolina o a goma (Bernaert *et al.*, 2012). En general, se recomiendan procesos de secado a temperaturas no excesivamente altas y prolongados durante más tiempo, protocolos que limitarán sabores excesivamente ácidos (Toker *et al.*, 2020), si bien la duración no ha de ser tanta como para propiciar la aparición de especies fúngicas (Zahouli *et al.*, 2010). En el caso de tratamientos artificiales, se ha



comprobado que protocolos a 70 °C prolongados durante 8 h generan resultados similares a los encontrados en procesos naturales en lo que respecta a modificación de compuestos de interés organoléptico (Santander Muñoz *et al.*, 2020). Entre los eventos que tienen lugar durante el secado, destacan el descenso en la concentración de polifenoles, como consecuencia de reacciones de pardeamiento, además de difusibilidad (Aprotosaiae *et al.*, 2016), el de alcoholes, por evaporación y degradación, y el de ácidos grasos volátiles (Páramo *et al.*, 2010), aunque se aumenta el de ácidos grasos en general, debido a la acción de lipasas endógenas de las vainas (Afoakwa *et al.*, 2014). En oposición, en tratamientos con valores térmicos entre 30 °C y 50 °C, el nivel de pirazinas puede incrementarse (Rodríguez-Campos *et al.*, 2011; Utrilla-Vázquez *et al.*, 2020). Al igual que otros tratamientos que son realizados por los productores, el secado se caracteriza por una elevada heterogeneidad en sus condiciones de implementación, las cuales, al igual que la finalización del proceso, dependen totalmente del criterio del agricultor (Saltini *et al.*, 2013), lo que puede suponer un riesgo en cuanto a la idoneidad de las propiedades adquiridas por el cacao.



**Figura 1.17.** Reacciones de Maillard durante la etapa de torrefacción y ejemplos de moléculas organolépticas formadas: a) tetrametilpirazina, b) 2-metilpropanal, c) 2-fenilacetaldehído (adaptado de Teodorowicz *et al.*, 2017).

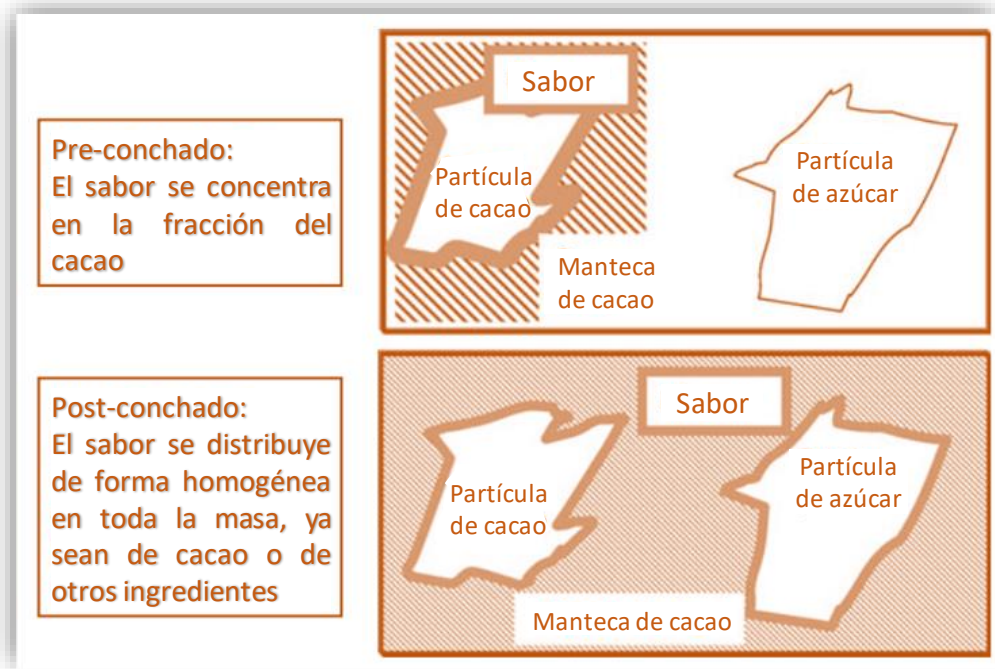
La torrefacción o tueste es la última de las operaciones que contribuye de forma importante al perfil organoléptico de los derivados del cacao. Esta etapa, ya



perteneciente al procesado secundario llevado a cabo por las compañías manufactureras, define en gran medida las características del producto final. Al igual que durante el secado, los elevados valores térmicos ocasionan un decrecimiento de los niveles totales de polifenoles, por lo que la aplicación de temperaturas inferiores durante tiempos no excesivamente largos limita la pérdida de este tipo de compuestos (Ioannone *et al.*, 2015). Por el contrario, las temperaturas elevadas generan mayores niveles de compuestos aromáticos volátiles (Santander Muñoz *et al.*, 2020), por lo que es necesario llegar a un compromiso en relación con las condiciones que permiten el equilibrio deseado entre la adquisición de las propiedades organolépticas adecuadas y el mantenimiento de niveles deseables en compuestos con acción nutracéutica. En este sentido, es necesario apuntar que una elevada presencia de polifenoles también puede afectar negativamente las características organolépticas, ya que durante el tratamiento térmico pueden unirse a diversas moléculas protagonistas en el desarrollo del aroma (Misnawi *et al.*, 2004). En cuanto a la formación de compuestos organolépticos, las reacciones de Maillard (Figura 1.17.) desempeñan un papel fundamental en esta fase (Ho *et al.*, 2014; Oracz y Nebesny, 2019), gracias a las cuales los azúcares reductores en conjunción con aminas dan lugar a compuestos tales como aldehídos y pirazinas (Saltini *et al.*, 2013), aunque también se forman alcoholes, cetonas, ésteres, éteres, furanos, pirroles o tiazoles (Kongor *et al.*, 2016). A modo ilustrativo, baste decir que hasta casi 600 compuestos diferentes derivados de este tipo de procesos y con influencia en el aroma y el sabor se han identificado en el cacao una vez tostado (Engeseth y Pagan, 2018), entre los cuales destacan 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, 2-fenilacetaldehído, benzaldehído, acetofenona, tetrametilpirazina, trimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina o 2,3-dimetil-5-etil-pirazina (Rottiers *et al.*, 2019). Estos y otros compuestos confieren al cacao procesado y sus derivados notas de sabor a producto horneado, flores, frutas, caramelo o nueces (Santander Muñoz *et al.*, 2020). Sin embargo, no todas las transformaciones que tienen lugar durante esta fase son deseables. Las condiciones de esta etapa promueven también la formación de cierto tipo de compuestos que, aunque no están relacionados con el desarrollo del aroma y el sabor, tienen una gran importancia por sus potenciales efectos negativos sobre la salud humana. Es el caso de las aminas biogénicas (Oracz y Nebesny, 2014) cuya formación se ve favorecida por altas temperaturas, elevada humedad y presencia de grupos aminos y carbonílicos.



La última de las etapas en el procesado secundario del cacao que muestra influencia sobre las propiedades organolépticas es el conchado. La aplicación de este tratamiento potencia el aroma y el sabor, entre otros factores, mediante la reducción de compuestos que inciden negativamente sobre este aspecto (Afoakwa *et al.*, 2008) y la consecuente ganancia en peso relativo de los que permanecen, aunque si el proceso se prolonga excesivamente, también decrece la presencia de moléculas de interés (Owusu *et al.*, 2012), especialmente en el caso de aldehídos, ésteres y alcoholes. Durante un correcto proceso de conchado, no aparecen nuevos compuestos de influencia organoléptica, pero sí se incrementa la presencia de los ya existentes (Counet *et al.*, 2002), aunque algunos estudios apuntan en sentido contrario (Toker *et al.*, 2020). Otro de los eventos que promueve el conchado en relación con las propiedades organolépticas es la movilidad de las moléculas organolépticas, que propicia una mayor uniformidad en su distribución (Ziegleder, 2009). Así, las moléculas que se concentran entre las partículas de cacao y la manteca de cacao, se reparten con el tercer componente presente, el azúcar (Figura 1.18.).



**Figura 1.18.** Redistribución del sabor en la masa de cacao durante el proceso de conchado (adaptado de Ziegleder, 2009).



### 1.7.2. Integrantes del perfil organoléptico del cacao procesado.

La diversidad de compuestos que contribuyen al sabor y al aroma del cacao tras su procesado es considerablemente elevada (Tabla 1.5.). El correcto balance entre todos ellos determinará la idoneidad organoléptica de los productos comerciales que lo incluyen en su formulación, y dicho balance se alcanzará sólo si el procesado es el adecuado (Engeseth y Pangan, 2018). En el epígrafe anterior se ha referido, *grosso modo*, la secuencia transformativa en cada una de las etapas de procesado en lo que respecta a la generación de compuestos de influencia aromática. En el presente apartado, se relacionarán cuáles son esos compuestos que, en mayor medida, definen el perfil organoléptico del cacao procesado y sus productos derivados.

Las familias de compuestos con mayor peso en el desarrollo de las propiedades de aroma y sabor incluyen ácidos, alcoholes, aldehídos, amidas, aminas, cetonas, ésteres, fenoles, furanos, hidrocarburos, pirazinas y terpenos (Braga *et al.*, 2018). De forma general, esas moléculas se forman a partir de una reducida variedad de precursores que, de forma mayoritaria, se identifican como oligopéptidos, aminoácidos libres, azúcares reductores y cianidina-3-galactósido (Toker *et al.*, 2020), compuesto este último perteneciente al grupo de las antocianinas que, junto a las proantocianidinas y las catequinas, constituyen la fracción polifenólica del cacao (Aprotosaiae *et al.*, 2016).

En el grupo de los ácidos, el compuesto mayoritario es el ácido acético, aunque también contribuyen los ácidos isobutírico, isovalérico y propiónico. De forma mayoritaria, confieren aromas no deseables en productos de esta naturaleza, tales como a jamón, a mantequilla o a rancio, por lo que su reducción en elevadas proporciones durante etapas post-fermentativas se considera positivo (Páramo *et al.*, 2010; Rodríguez-Campos *et al.*, 2012). Por el contrario, la presencia de aldehídos y cetonas aporta aromas y sabores favorables típicamente asociados al chocolate y productos malteados, entre los que destacan notas florales. Principales responsables de estas acciones son 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 5-metil-2-fenilhexenal o acetofenona. Adicionalmente, este grupo de compuestos contribuye a la formación de otro de los grupos de moléculas de importancia organoléptica, como son las pirazinas (Ziegler, 2009). Precisamente las pirazinas son las moléculas más influyentes en las propiedades organolépticas del cacao, producto al que dotan de un aroma a nueces, a tierra y a tostado (Czerny *et al.*, 2008). Se estima que el





número de pirazinas que participan en el desarrollo del aroma y el sabor del cacao procesado se sitúa en el margen 80-100 (Afoakwa *et al.*, 2008; Engeseth y Pangan, 2018), entre las que destacan las alquipirazinas (Ziegleder, 2009) y, de forma especial, tetrametil y trimetilpirazina (Ascrizzi *et al.*, 2017; Rottiers *et al.*, 2019), pudiendo llegar la primera a suponer hasta el 90% de la totalidad de pirazinas (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012). De hecho, la relación entre estos dos compuestos ha sido propuesta como índice del grado de torrefacción (Aprotosiae *et al.*, 2016). Adicionalmente, algunas pirazinas propician la formación de aromas específicos en conjunción con otros componentes, como es el caso de la 2,3-dimetilpirazina en relación al 2-fenil-2-butenal (Fang *et al.*, 2020). El segundo grupo de volátiles aromáticos en importancia son los ésteres (Utrilla-Vázquez *et al.*, 2020), caracterizados por la generación de notas frutales. Mayoritariamente, proceden de la actividad levaduriforme que se da durante la etapa fermentativa (Toker *et al.*, 2020), lo cual presenta el inconveniente de que, en un elevado porcentaje, se pueden perder durante las posteriores etapas de torrefacción y conchado (Ramli *et al.*, 2006), especialmente los ésteres de cadena corta (Meersman *et al.*, 2016). La molécula más habitual dentro de este grupo es el 2-fenilacetato (Mohamadi Alasti *et al.*, 2019). También de la actividad microbiana durante la fermentación proceden los alcoholes, aunque también se pueden generar como consecuencia de la degradación térmica de los aminoácidos (Aprotosiae *et al.*, 2016). Este tipo de compuestos también aporta matices frutales y florales al aroma del cacao procesado, siendo el más destacado el linalool, alcohol que también se encuadra dentro del grupo de los terpenos (Rottiers *et al.*, 2019). La presencia de esta molécula es especialmente abundante en cacaos procedentes del continente americano, dado que se asocia a variedades de cacao fino (Kongor *et al.*, 2016).

**Tabla 1.5.** Compuestos volátiles de influencia en las propiedades aromáticas del cacao procesado (adaptado de Aprotosiae *et al.*, 2016).

Compuesto	Aroma y sabor	Compuesto	Aroma y sabor
<b>Alcoholes y Fenoles</b>			
1-Propanol	Dulce, caramelo	Trans-3-hexen-1-ol	Herbal, vegetal
2-Metil-1-butanol	Frutal, uva	2-Heptanol	Cítrico
2,3-Butanodiol	Aroma manteca de cacao	1-Feniletanol	Miel, floral
2-Pentanol	Vegetal	2-Fenil-etanol	Miel, floral
1-Hexanol	Frutal, vegetal	Alcohol benzílico	Dulce, floral
2-Hexanol	Frutal, vegetal		




**Tabla 1.5 (Cont.).** Compuestos volátiles de influencia en las propiedades aromáticas del cacao procesado (adaptado de Aprotosiae *et al.*, 2016).

<b>Compuesto</b>	<b>Aroma y sabor</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Aroma y sabor</b>
<b>Aldehídos y cetonas</b>			
<i>2-Fenil acetaldehído</i>	Miel, floral	<i>5-Metil-2-fenil-2-hexenal</i>	Cacao
<i>2-Metilpropanal</i>	Chocolate	<i>2-Nonenal</i>	Vegetal
<i>2-Fenilpropanal</i>	Floral	<i>Vainilla</i>	Chocolate, dulce
<i>2-Metilbutanal</i>	Chocolate	<i>2-Pentanona</i>	Frutal
<i>3-Metilbutanal</i>	Chocolate	<i>2-Heptanona</i>	Frutal, floral
<i>2-Fenil-2-butenal</i>	Dulce	<i>Acetofenona</i>	Floral
<i>4-Metil-2-fenil-2-pentenal</i>	Cacao	<i>2-Hidroxi acetofenona</i>	Floral, herbal
<i>n-Hexanal</i>	Vegetal	<i>4-Metil acetofenona</i>	Frutal, herbal
<b>Ácidos</b>			
<i>2-Metilpropiónico</i>	Floral	<i>Ácido cinámico</i>	Miel, floral
<i>3-Fenilpropiónico</i>	Dulce, rosa		
<b>Ésteres</b>			
<i>Etil acetato</i>	Piña	<i>Etil 3-metilbutanoato</i>	Frutal
<i>Isobutil acetato</i>	Frutal	<i>Etil valerato</i>	Frutal, piña
<i>Isoamil acetato</i>	Frutal, plátano	<i>Etil hexanoato</i>	Frutal
<i>Bencil acetato</i>	Floral, jazmín	<i>Etil octanoato</i>	Frutal, floral
<i>Metilfenil acetato</i>	Dulce, miel, jazmín	<i>Etil decanoato</i>	Pera, uva
<i>Etilfenil acetato</i>	Frutal, dulce	<i>Etil laurato</i>	Frutal, floral
<i>2-Feniletil acetato</i>	Miel, floral	<i>Isoamil benzoato</i>	Bálsamo, dulce
<i>Etil butirato</i>	Piña	<i>Metil salicilato</i>	Amargo, almendra
<i>Etil lactato</i>	Frutal	<i>Metil cinamato</i>	Balsámico, fresa
<i>Etil 2-metilbutanoato</i>	Frutal	<i>Etil cinamato</i>	Dulce, canela
<b>Aminas, amides, nitrilos, purinas</b>			
<i>Benzonitrilo</i>	Almendra	<i>N-(2-fenetil) formamida</i>	Esencias
<b>Lactonas</b>			
<i>δ-Octenolactona</i>	Coco	<i>γ-Decalactona</i>	Melocotón
<b>Terpenoides</b>			
<i>Óxido de linalool (cis-furanoide)</i>	Nuez	<i>Óxido de linalool (trans-furanoide)</i>	Floral, cítrico
<i>Geraniol</i>	Floral, frutal	<i>Linalool (trans-piranoide)</i>	Floral
<i>Geranil acetato</i>	Rosa, lavanda	<i>Linalool (cis-piranoide)</i>	Floral, vegetal
<i>α-Terpenil formato</i>	Herbal, cítrico		
<b>Furanos, furanonas, piranos, pironas</b>			
<i>2-Furfural</i>	Almendra	<i>Furaneol</i>	Frutal, fresa
<i>5-Metil-2-furfural</i>	Dulce, caramelo	<i>Maltol</i>	Nuez tostada
<i>2-Furfuril acetato</i>	Frutal, plátano		
<i>2-Acetil-5-metilfurano</i>	Nuez	<i>5,6-Dihidro-6-pentil-2-pirona</i>	Coco
<i>2-furfuril propionato</i>	Especia, floral		



**Tabla 1.5 (Cont.).** Compuestos volátiles de influencia en las propiedades aromáticas del cacao procesado (adaptado de Aprotosiae *et al.*, 2016).

Compuesto	Aroma y sabor	Compuesto	Aroma y sabor
<b>Pirazinas</b>			
2-Metilpirazina	Nuez, chocolate, coco	2,3-Dietilpirazina	Nuez, cereal
2-Etilpirazina	Manteca de cacahuete	2,3-Dimetilpirazina	Caramelo, cacao
2,5-Dimetilpirazina	Cacao, nuez	2,3,5-Trimetilpirazina	Cacao, nuez
2,6-Dimetilpirazina	Nuez, café, vegetal	2,3,5,6-Tetrametilpirazina	Chocolate, cacao
2-Etil-5-metilpirazina	Nuez, patata cruda	2,3,5-Trimetil-6-etilpirazina	Caramelo, dulce
<b>Pirroles</b>			
Pirrol	Nuez	Pirrol-2-carboxialdehido	Nuez
2-Acetilpirrol	Chocolate, avellana		

### 1.8. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN EL PROCESADO DEL CACAO. ETAPA FERMENTATIVA.

No existe certeza en torno al origen del proceso de fermentación en el procesado del cacao, aunque se postula que se buscaba la obtención de un producto con mejor apariencia y preparado para la etapa de secado, gracias a la retirada de la capa mucilaginosa que recubre las semillas como consecuencia de las temperaturas alcanzadas durante esta fase (Amoa-Awua, 2015). En la actualidad, se conoce que, efectivamente, el papel que desempeña la elevada temperatura que propicia la actividad microbiana resulta fundamental en la transformación del cacao. Para alcanzar semejante valor térmico, es necesario que la masa de cacao permanezca bien aislada, de modo que se prevengan pérdidas de calor, pero también lo es que exista un adecuado flujo de aire que permita la existencia de condiciones aeróbicas cuando son demandadas (Koffi *et al.*, 2017b), por lo que es recomendable evitar la acumulación de volúmenes excesivamente grandes que favorezcan la compactación. Pero la influencia de la etapa fermentativa va más allá de un mero cambio físico. La importancia que esta fase ostenta en el procesado del cacao es considerable, dado que es durante su desarrollo cuando se comienzan a dar las transformaciones que desembocan en la generación de un producto comercializable, la mayor parte de ellas relacionadas con la adquisición de unas adecuadas propiedades organolépticas, aunque también se producen modificaciones de carácter estrictamente físico-químicas (Pereira *et al.*, 2016). Todas ellas, en mayor o menor medida, son consecuencia de la actividad microbiana (Ganeswari *et al.*, 2015).

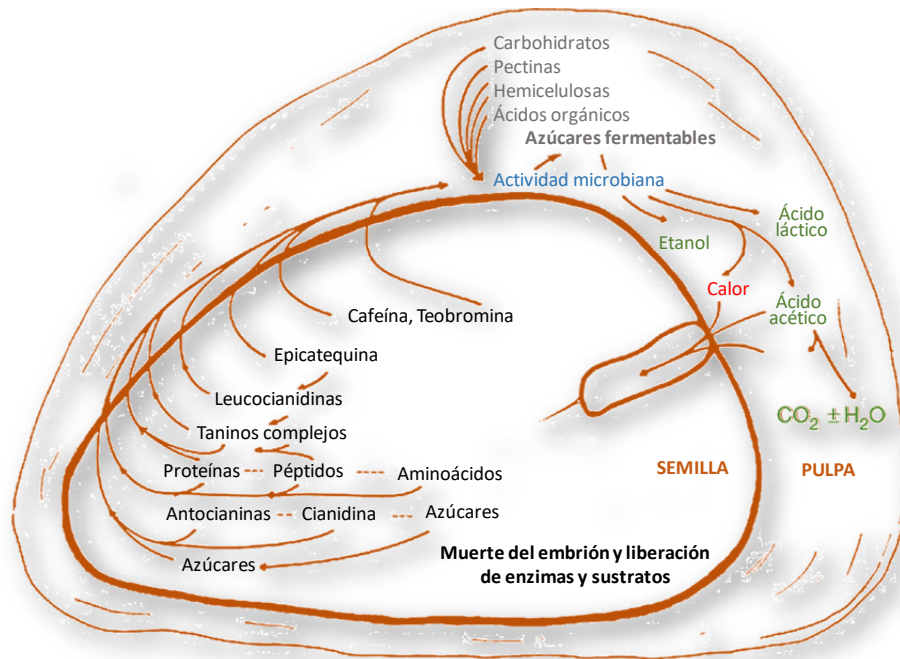


De forma natural, el cacao presenta unas características que hacen inviable su consumo. La elevada concentración de polifenoles lo dota de una astringencia indeseable, mientras que la de metilxantinas le confiere un sabor excesivamente amargo, propiedad a la que también contribuyen los polifenoles (Romanens *et al.*, 2018). Durante el proceso fermentativo, una porción de los polifenoles es eliminada, ya sea por desaparición directa por difusión o mediante procesos oxidativos catalizados por polifenol oxidasas (Camu *et al.*, 2008a), mientras que las metaxantinas también difunden (Júnior *et al.*, 2020; Peláez *et al.*, 2016). Paralelamente a la reducción de estos compuestos, se produce la formación de otra serie de moléculas precursoras del aroma y el sabor, que serán transformadas en etapas posteriores, y que son principales responsables de la adquisición de las correctas propiedades organolépticas del cacao procesado (Gutiérrez, 2017). En ese proceso biosintético, la actividad de diversas comunidades microbianas resulta esencial, tanto en lo que respecta a su acción individualmente considerada como en lo concerniente a su adecuada sucesión (Hamdouche *et al.*, 2015; Kouamé *et al.*, 2015). Así, en términos generales, se puede considerar que, desde el punto de vista microbiano, la fermentación transcurre en diversas subetapas coincidiendo con la identidad de la comunidad microbiana predominante en cada momento. De inicio, las condiciones favorecen la acción de levaduras en condiciones anaeróbicas, cuya principal consecuencia es la conversión de azúcares en etanol. En coexistencia con las levaduras, se encuentran las bacterias del ácido láctico (BALs) que, aunque presentes desde el comienzo del proceso, pasan a ser dominantes transcurridas aproximadamente 48 h de fermentación. Este grupo es responsable de la transformación de azúcares en ácido láctico. Finalmente, las bacterias del ácido acético (BAAs) adquieren protagonismo en la parte final, cuando aumenta la disponibilidad de oxígeno como consecuencia de la degradación de la pulpa y la mayor facilidad que eso supone para la entrada de aire. Su principal aportación radica en la síntesis de ácido acético a partir del etanol producido por las levaduras, acción en la que además se genera gran cantidad de energía que da lugar a un importante ascenso térmico (Fowler, 2009).

Las semillas de cacao están constituidas mayoritariamente por una fracción de pulpa mucilaginososa, que recubre las semillas propiamente dichas, integradas por dos cotiledones, cada una con su respectivo embrión. La pulpa se compone de un 10-15% de azúcares, 1-2% de pectina y polisacáridos análogos, 0,5-2% de ácido cítrico y pequeñas cantidades de proteínas, aminoácidos, minerales y vitaminas (Amoa-Awua,



2015; Nunes *et al.*, 2020). Por su parte, los cotiledones están formados por agua (32-39%), grasas (30-32%), proteínas (8-10%), polifenoles (5-6%), almidón y pentosas (4-6% de cada), celulosa y sacarosa (2-3% de cada), teobromina (1-3%), cafeína (0,2-1%) y ácidos (1%) (Bertazzo *et al.*, 2013). La composición de la pulpa propicia la acción microbiana, a partir de la cual se produce la degradación de parte de ella, generando en el proceso alcohol, ácidos y energía térmica (De Vuyst y Weckx, 2016). La combinación de estos tres productos provoca la afectación de los cotiledones, que acaban sufriendo muerte celular, lo que da lugar a su ruptura y a la liberación de los contenidos intracelulares, tanto sustratos como enzimas (Gutiérrez, 2017). Ambos resultan fundamentales en la evolución organoléptica de las semillas, por lo que los eventos que tienen lugar durante la fermentación condicionan la obtención de productos con las características deseadas (Figura 1.19.).

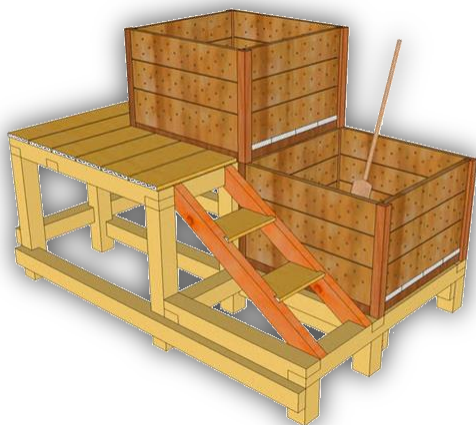


**Figura 1.19.** Eventos bioquímicos en la semilla durante la fermentación (adaptado de Fowler, 2009).

Las metodologías existentes para llevar a cabo la etapa de fermentación, de gran influencia en las características del producto final obtenido (Kostinek *et al.*,



2008), son diversas, aunque las más habituales son las que se realizan en pilas y en cajas (Visintin *et al.*, 2016). La primera de ellas, considerada como la más tradicional, implica la disposición del material, las semillas de cacao, en pilas recubiertas con hojas de plátano o banano (Owusu, 2010). Su éxito entre los agricultores radica en su bajo coste, la nula demanda de infraestructuras permanentes y la facilidad de ejecución (Aneani y Takrama, 2006). Básicamente, consiste en la construcción de una plataforma levemente inclinada, al objeto de facilitar el drenaje, en cuyo centro se sitúa el material a fermentar dispuesto en forma cónica, con una altura en esa zona central de entre 60 y 90 cm. La cobertura tiene como finalidad preservar el calor y la humedad, así como proteger el material de la posible lluvia, aunque es importante prevenir la posible limitación en la disponibilidad de oxígeno que puede ocasionar (Ganeswari *et al.*, 2015). El proceso, que se suele extender durante unos 6 días, muestra el inconveniente un alto grado de heterogeneidad a causa de las diferentes condiciones que se dan entre las zonas superficiales e internas de la pila. Parte de esta situación se puede revertir implementando prácticas de volteo que favorecen la exposición de todo el material a todas las condiciones de temperatura y aireación, generando así un producto más homogéneo y con mejores propiedades (Guehi *et al.*, 2010).



**Figura 1.20.** Cajas de fermentación en pisos (<https://3dwarehouse.sketchup.com/model/d5da9585b2e36e55630f6387981da724/cocoa-fermentation-box>).

La fermentación en cajas (Figura 1.20.), metodología dominante fuera de África (Beg *et al.*, 2017), mejora las prestaciones del sistema de pilas al reducir las posibilidades de contaminación (Ganeswari *et al.*, 2015), pero resulta más costosa



y laboriosa. El material más utilizado para su construcción es la madera de larga duración (Guda y Gadhe, 2017), aunque también se pueden utilizar materiales plásticos. En la base y en las paredes de la caja se practican orificios que cumplen el doble propósito de permitir el drenaje y favorecer la aireación. En muchos casos, las cajas disponen también de una doble pared, en cuyo espacio intermedio se dispone algún tipo de residuo agrícola que confiera aislamiento (Amoa-Awua, 2015). Al igual que en el sistema de pilas, es habitual utilizar hojas de plátano o banano como cobertura e implementar prácticas de volteo, que se suelen llevar a cabo mediante transferencias de una caja a otra (Fowler, 2009). Dependiendo de la región productora, otros sistemas utilizados, aunque en menor medida, son cestas, bandejas, toneles o plataformas (De Vuyst y Weckx, 2016).

### 1.8.1. Comunidades microbianas y eventos bioquímicos asociados.

La comunidad microbiana presente en el material a fermentar, la mezcla de semillas y pulpa, muestra una elevada complejidad en lo que respecta a su composición, tal y como corresponde a la diversidad de fuentes de las que proviene, entre las que se incluyen los trabajadores, la superficie de las propias vainas, las herramientas utilizadas en las prácticas post-cultivares, microfauna propia del entorno, e incluso los recipientes en los que se lleva a cabo la fermentación (Sarbu y Csutak, 2019). Obviamente, no todas las poblaciones integradas en la comunidad exhiben el mismo nivel de participación en los eventos que acontecen durante la fermentación, llegando algunas incluso a no ejercer ningún tipo de acción (Camu *et al.*, 2007).

Como se ha referido con anterioridad, los grupos microbianos protagonistas en el proceso fermentativo, *grosso modo*, se limitan a tres: levaduras, BAs y BAAs, si bien, y dependiendo del caso concreto, pueden contribuir de forma significativa especies integradas en otros grupos, como es el caso de ciertos hongos filamentosos o miembros del género *Bacillus* (Schwan *et al.*, 2015).

El primer grupo que adquiere relevancia durante la fermentación es el de las levaduras. Las condiciones que se dan al inicio del proceso, presencia de azúcares fermentables, bajos niveles de pH y escasa disponibilidad de oxígeno, favorecen el desarrollo de este grupo (Papalexandratou y De Vuyst., 2011), cuya principal



influencia reside en la conversión de azúcares en alcohol, la generación de ciertos precursores organolépticos y la degradación de la pulpa mediante la acción de enzimas pectinolíticas (Figueroa-Hernández *et al.*, 2019), además de promover un ascenso en el pH como consecuencia de la metabolización del ácido cítrico presente en la pulpa (Kostine *et al.*, 2008)). A medida que las condiciones del entorno van cambiando con el avance de la fermentación (ascenso de temperatura como consecuencia de reacciones aeróbicas, incremento en la concentración de etanol, o limitación de fuentes carbonadas adecuadas (Daniel *et al.*, 2009), su papel se va limitando. Aunque su participación siempre se ha considerado como imprescindible para el correcto transcurrir de la fermentación y la obtención de un cacao procesado con las adecuadas propiedades (Ho *et al.*, 2014), lo cierto es que no es hasta hace relativamente poco que se han empezado a dilucidar los detalles de su actuación, y aún, aquellos relacionados con su contribución a la calidad final del cacao procesado, no han sido totalmente esclarecidos (Jamili *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017). De forma concreta, se postula que algunos de los compuestos secundarios sintetizados por ellas, tales como alcoholes superiores, aldehídos, cetonas o ésteres de ácidos grasos pueden actuar como precursores de las posteriores propiedades organolépticas adquiridas por el cacao procesado (De Vuyst y Weckx, 2016). También se reconoce en algunas especies capacidad para producir compuestos antimicrobianos (Nielsen *et al.*, 2015).

La diversidad de levaduras relacionadas con la fermentación del cacao es relativamente alta (Tabla 1.6.), dado que la identidad de las especies dominantes se encuentra influenciada por la geolocalización y las condiciones específicas en las que se desarrolla cada proceso (Sarbu y Csutak, 2019). El primer factor parece ser especialmente determinante, como parece apuntar el estudio realizado por Ludlow *et al.* (2016), en el que se habla de poblaciones levaduriformes específicas y con características genéticas diferenciadas en función de patrones geográficos en lugar de poblaciones clónicas entre las distintas localizaciones pertenecientes a un mismo país en las que se da el cultivo. En la práctica, este hecho se traduce en que se pueden encontrar más similitudes entre las comunidades eucariotas asociadas a fermentaciones realizadas en distintos países que entre las de un mismo país, pero distintas regiones. No obstante, el perfil genérico en lo que respecta a las especies típicamente mayoritarias suele ser bastante similar, con protagonismo de un bajo número de miembros de ese grupo en cada proceso en función de sus características.





**Tabla 1.6.** Especies levaduriformes identificadas durante la fermentación del cacao en diferentes localizaciones geográficas (adaptado de Sarbu y Csutak, 2019).

País	Especies	Referencias
Brasil	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>D. etchellsii</i> , <i>K. ohmeri</i> , <i>C. orthopsilosis</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>C. magnoliae</i>	Pereira et al., 2012 C. Miguel et al., 2017
Cuba	<i>P. manshurica</i> , <i>H. opuntiar</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. occidentalis</i> , <i>orthopsilosis</i> , <i>P. terrícola</i> , <i>T. delbrueckii</i>	C. Maura et al., 2016
Ecuador	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>T. candida</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>T. holmii</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>T. castelli</i> , <i>K. apiculata</i> , <i>H. guillermondii</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>P. kudriavzevii</i>	Ordoñez-Araque et al., 2020
México	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S*</i> , <i>crataegensis</i> , <i>H. guillermondii</i>	Hernández-Hernández et al., 2016
Nicaragua	<i>H. uvarum/opuntiae</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. barkeri</i> , <i>K. humilis</i>	Papalexandratou et al., 2019
República Dominicana	<i>C. inconspicua</i> , <i>H. guillermondii</i> , <i>Y. lipolitica</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>H. valbyensis</i>	Lagunes-Gávez et al., 2007
Indonesia	<i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>S*</i> , <i>fibuligera</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Jamili et al., 2016 Ardhana y Fleet, 2003
Costa de Marfil	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>P. galeiformis</i> , <i>G. geotrichum</i> , <i>W. anomalus</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>P. manshurica</i> , <i>P. sporocuriosa</i> , <i>I. hanoiensis</i> , <i>C. insectorum</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>S. chevalieri</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>C. krusei</i> , <i>T. holmii</i> , <i>T. candida</i>	P. Koffi et al., 2016 W. Koné et al., 2016 P. Hamdouche et al., 2015 I. Ravelomanana et al., 1985
Ghana	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. guillermondii</i> , <i>S*</i> , <i>crataegensis</i>	Daniel et al., 2009

*C:* *Candida*; *D:* *Debaryomyces*; *G:* *Galactomyces*; *H:* *Hanseniaspora*; *I:* *Issatchenkia*; *K:* *Kluyveromyces*; *P:* *Pichia*; *S:* *Saccharomyces*; *S\*:* *Saccharomycopsis*; *T:* *Torulaspota*; *W:* *Wickerhamomyces*; *Y:* *Yarrowia*.





La literatura en torno a la especie más dominante es bastante contradictoria, aunque sí que existe unanimidad en la composición ampliada del grupo relativamente pequeño de levaduras importantes en la transformación del cacao. Los integrantes de ese grupo pertenecen mayoritariamente a los géneros *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* y *Pichia* (Schwan *et al.*, 2015), siendo las especies más citadas *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guillermondii*, *H. opuntiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *P. kluyveri*, *P. manshurica*, *P. membranifaciens*, *Issatchenkia orientalis*, *Kazachstania humilis*, *Candida intermedia*, o *Wickerhamomyces anomalus* (Schwan *et al.*, 2015; De Vuyst y Weckx, 2016). *S. cerevisiae* es referenciada asiduamente como especie levaduriforme dominante en la fermentación del cacao, papel que se atribuye a su capacidad para adaptarse a las estresantes condiciones que imperan en el entorno fermentativo y a su elevado potencial fermentativo (Batista *et al.*, 2015), lo que le permite mostrar un mayor grado de desarrollo que otras especies y persistir a lo largo de todo el proceso (Sarbu y Csutak, 2019). Tal es el caso que algunos autores la proponen como la más indicada entre las levaduras como candidata para ser utilizada en un potencial inóculo inicial (Schwan *et al.*, 2015), ya que, además de las características mencionadas, sintetiza compuestos que actúan como precursores organolépticos (Koffi *et al.*, 2017b; Ordoñez-Araque *et al.*, 2020), así como sustancias de carácter antimicrobiano (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2019). Por otra parte, su coexistencia con algunas bacterias del ácido láctico propicia en estas una mayor eficiencia en la metabolización del ácido cítrico como consecuencia de la competencia por otras fuentes carbonadas más fácilmente asimilables, tales como glucosa (Nielsen *et al.*, 2015).

*H. opuntiae* también es considerada como miembro destacado de la comunidad levaduriforme asociada a la fermentación del cacao (Papalexandratou *et al.*, 2013), aunque suele mostrar mejores prestaciones al comienzo del proceso, cuando los niveles térmicos y de etanol no limitan su acción (Romanens *et al.*, 2018). Los procesos en los que especies de este género son prevalentes presentan niveles inferiores de etanol que aquellos en los que es *S. cerevisiae* la levadura dominante (Ho *et al.*, 2014). Por el contrario, comparten con ésta la capacidad para sintetizar compuestos de naturaleza organoléptica, tales como monoterpenos (Serra *et al.*, 2019) o ésteres, capacidad que también exhibe otro de los géneros importantes en la biotransformación del cacao, como es *Pichia* (Sarbu y Csutak,



2019). La interrelación entre miembros de estos dos últimos géneros parece tener un carácter negativo, probablemente como consecuencia de la competición por los sustratos carbonados o la sensibilidad hacia determinados metabolitos secundarios que caracteriza a las especies de *Hanseniaspora* (Jespersen *et al.*, 2005). Otras habilidades metabólicas incluyen el carácter fructofílico de *Hanseniaspora* (Papalexandratou *et al.*, 2013), y la capacidad pectinolítica de *Pichia* (Serra *et al.*, 2019).

**Tabla 1.7.** Principales BALs identificadas durante la fermentación del cacao en diferentes localizaciones geográficas (adaptado de Schwan *et al.*, 2015).

País	Especies	Referencias
Brasil	<i>L. fermentum</i> , <i>L. cacaonum</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>Weisella</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>L** pseudomesenteroides</i> , <i>L** lactis</i> , <i>P. acidilacti</i> ,	García-Armisen <i>et al.</i> , 2010 Papalexandratou <i>et al.</i> , 2011c Illegheims <i>et al.</i> , 2012 Pereira <i>et al.</i> , 2012, 2013b
Ecuador	<i>L. fermentum</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. cacaonum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Weisella fabaria</i> , <i>L** pseudomesenteroides</i> , <i>Enterococcus</i> sp.	Papalexandratou <i>et al.</i> , 2011a
Australia	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>P. acidilacti</i> , <i>L** pseudomesenteroides</i>	Dircks, 2009
Rep. Dominicana	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i>	Lagunes-Gálvez <i>et al.</i> , 2007
Indonesia	<i>L. cellobiosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. higaridii</i>	Ardhana y Fleet, 2003
Costa de Marfil	<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L** pseudomesenteroides</i>	Lefeber <i>et al.</i> , 2010 Papalexandratou <i>et al.</i> , 2011c
Ghana	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L* lactis</i> , <i>L** pseudomesenteorides</i> , <i>L** mesenteroides</i> , <i>P. acidilacti</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Weisella</i> sp.	Carr <i>et al.</i> , 1979 Nielsen <i>et al.</i> , 2007a, b Camu <i>et al.</i> , 2007, 2008a García-Armisen <i>et al.</i> , 2010

L: *Lactobacillus*; L\*: *Lactococcus*; L\*\*: *Leuconostoc*; P: *Pediococcus*.



Las poblaciones procariotas relevantes en el proceso se asocian mayoritariamente a las bacterias del ácido láctico (Tablas 1.7.-1.8.) y del ácido acético. Las primeras en actuar son las BALs, grupo que coexiste con las levaduras al principio de la fermentación, y que suelen adquirir preponderancia cuantitativa a partir del segundo día de fermentación (Fowler, 2009). Los eventos metabólicos derivados de su actuación se relacionan principalmente con la utilización de los azúcares y el ácido cítrico presentes en la pulpa y su conversión en ácido láctico y, en menor medida, etanol y ácido acético los primeros, y ácidos láctico y acético, acetaldehído, diacetilo, acetoina y 2,3-butanodiol el segundo (Ho *et al.*, 2015). Precisamente este doble papel en su interacción con compuestos de naturaleza ácida, consumo y síntesis, les confiere un papel destacado en cuanto al control del pH (De Vuyst *et al.*, 2010), parámetro fundamental a la hora de regular la actividad enzimática y, en consecuencia, la síntesis de precursores organolépticos (Voigt y Lieberei, 2015). Adicionalmente, algunas especies muestran capacidad para sintetizar manitol a partir de fructosa (Lefeber *et al.*, 2011a). La diversidad de especies integradas en este grupo referenciadas en el proceso no es excesivamente alta, siendo *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* las más habituales (Ordoñez-Araque *et al.*, 2020), con presencia secundaria, aunque puntualmente pueden pasar a un primer plano, de *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. cacaonum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus* sp. y *Pediococcus* sp. (Schwan *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2017).

El segundo grupo bacteriano determinante en la fermentación del cacao es el de las bacterias del ácido acético, cuya principal característica reside en su capacidad para crecer a partir de etanol, compuesto que se acumula tras el desarrollo de las levaduras y que, en conjunción con el aumento del pH, los valores térmicos y el incremento de la disponibilidad de oxígeno, crea las condiciones adecuadas para estas bacterias (Hamdouche *et al.*, 2019). Con posterioridad, se postula que los cambios promovidos por su actividad metabólica ocasionan la difusión e hidrólisis de las proteínas, evento fundamental en la formación de precursores organolépticos (Saltini *et al.*, 2013). De forma concreta, su actividad metabólica consiste en la oxidación de etanol y, en menor medida, ácido láctico, hasta ácido acético y/o acetoina (Lefeber *et al.*, 2010), aunque dependiendo de la especie que se trate se producen otros procesos oxidativos, tales como la



conversión de manitol en fructosa en ausencia de etanol (Moens *et al.*, 2014) o la de glucosa en ácido glucónico (Cleenwerck *et al.*, 2008)), aunque esta última transformación en el entorno de la fermentación del cacao no es de esperar, dada la competitividad de levaduras y BALs y la disponibilidad de otras fuentes metabolizables por las BAAs (Papalexandratou *et al.*, 2011c). Adicionalmente, se puede producir la superoxidación de los ácidos acético y láctico hasta dióxido de carbono y agua, acción que incidiría sobre el nivel de acidez de la masa fermentada (Kerstens *et al.*, 2006). La presencia del ácido acético durante la fermentación ejerce un efecto antimicrobiano que permita controlar el desarrollo de microorganismos no deseables que puedan influir negativamente sobre las propiedades organolépticas del producto final (Schwan *et al.*, 2015). En este sentido, y aunque gran parte del ácido generado se pierde, los niveles remanentes en etapas posteriores contribuyen a limitar la acción de especies alterantes y la síntesis de micotoxinas (Copetti *et al.*, 2012). De forma casi exclusiva, las BAAs relacionadas con la fermentación del cacao pertenecen al género *Acetobacter*, siendo *A. pasteurianus*, con capacidad para persistir durante todo el proceso y mayor grado de tolerancia alcohólica y frente al pH (Moens *et al.*, 2014), la especie que ostenta mayor protagonismo (Lefeber *et al.*, 2011). Otros miembros del género que han sido aislados durante la fase fermentativa son *A. aceti*, *A. fabarum*, *A. ghanensis*, *A. lovanensis*, *A. senegalensis* y *A. tropicalis*, además de detecciones puntuales de *Gluconobacter oxydans* y *G. xylinus* (Moreira *et al.*, 2013).

Además de la microbiota principal ya referenciada, otros grupos y especies pueden adquirir protagonismo puntal en la fermentación cuando se dan las condiciones adecuadas. Entre las especies eucariotas, los hongos filamentosos pueden aparecer en el tramo final del proceso, propiciando la aparición de aromas no deseables y causando alteración (Schwan y Wheals, 2004), además de posibilitar la presencia de micotoxinas (Copetti *et al.*, 2014). De forma general, las especies productoras de toxinas, no suelen alcanzar grandes niveles presenciales durante la fermentación, pero su presencia en esta etapa puede servir como inóculo que propicie su posterior desarrollo hasta niveles preocupantes en etapas posteriores (Gilmour y Lindblom, 2008). Entre las especies que se pueden encuadrar en este grupo, destacan las pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Copetti *et al.*, 2011a). Recientemente, se ha asignado un papel menos negativo a la presencia de estas especies filamentosas durante la etapa fermentativa, dado el



potencial enzimático que muestran, de interés en la degradación de los compuestos poliméricos existentes en las semillas, y la ausencia de condiciones ideales para la síntesis de las toxinas (de Araújo *et al.*, 2019)

**Tabla 1.8.** Principales BAAs identificadas durante la fermentación del cacao en diferentes localizaciones geográficas (adaptado de Schwan *et al.*, 2015).

País	Especies	Referencias
Brasil	<i>A. aceti</i> , <i>A. cerevisiae</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. lovanensis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. pomarum</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>Asaia</i> sp., <i>G*. oxydans</i> <i>G. europaeus</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>G. suboxydans</i> ,	Schwan y Wheals, 2004 García-Armisen <i>et al.</i> 2010 Papalexandratou <i>et al.</i> , 2011c Illegheims <i>et al.</i> , 2012 Pereira <i>et al.</i> , 2012, 2013b
Ecuador	<i>A. cerevisiae</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. lovanensis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. peroxydans</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>G. oxydans</i>	Papalexandratou <i>et al.</i> , 2011a
Australia	<i>A. pasteurianus</i> , <i>Asaia</i> sp., <i>G. oxydans</i>	Dircks, 2009
Rep. Dominicana	<i>A. lovanensis</i>	Lagunas Gálvez <i>et al.</i> , 2007
Indonesia	<i>A. aceti</i> , <i>A. pasteurianus</i>	Ardhana y Fleet, 2003
Costa de Marfil	<i>A. ghanensis</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. senegalensis</i>	Lefeber <i>et al.</i> , 2010
Ghana	<i>A. ghanensis</i> , <i>A. lovanensis</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>G. oxydans</i>	Nielsen <i>et al.</i> , 2007b García-Armisen <i>et al.</i> 2010 Camu <i>et al.</i> , 2007, 2008b

A: *Acetobacter*; G: *Gluconobacter*; G\*: *Gluconacetobacter*.

El protagonismo que ostentan BALs y BAAs durante la fermentación entre las especies procariotas deja poco margen a que otras bacterias desempeñen un papel relevante en el proceso. No obstante, y en determinadas condiciones, miembros



del género *Bacillus* (Ordoñez-Araque *et al.*, 2020) o incluso enterobacterias pueden participar en mayor o menor medida en la biotransformación de las semillas del cacao. Las primeras, favorecidas por su capacidad para producir esporas, pueden aparecer cuando los valores térmicos ascienden (Lima *et al.*, 2011b), condiciones en las que se ha detectado la presencia de *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* o *B. subtilis* (Ordoñez-Araque *et al.*, 2020). Además de la temperatura, la capacidad de metabolizar compuestos carbonados presentes en la fermentación, especialmente durante la segunda mitad del proceso, tales como ácido láctico, ácido acético y manitol, estimulan su desarrollo en esta etapa (Sarbu y Csutak, 2019). También pueden participar en la degradación de los polímeros pectínicos (Ouattara *et al.*, 2011) y contribuir a la presencia de compuestos organolépticos, fundamentalmente a través de la producción de alquilpirazinas (Hamdouche *et al.*, 2019) y, en un sentido negativo, de ácidos grasos de cadena corta (Figuroa-Hernández *et al.*, 2019). Esta última parte negativa puede ser determinante, de manera que es aconsejable detener el proceso fermentativo si *Bacillus* se convierte en grupo dominante (Nielsen *et al.*, 2013), con abundancias relativas por encima del 3% (Papalexandratou *et al.*, 2019). Las enterobacterias, el segundo de los grupos eucariotas que puede complementar el microbioma del proceso fermentativo, suelen aparecer ya en el inicio de la fermentación, dada su presencialidad en el entorno del que proviene toda la microbiota actuante (Camu *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007). No obstante, suelen desaparecer rápidamente o caer hasta niveles indetectables una vez que la fermentación avanza (García-Armisen *et al.*, 2010; Schwan *et al.*, 2015), aunque se hipotetiza sobre su relevancia, en especial en procesos que implican cacao fino (Papalexandratou *et al.*, 2019). La asignación taxonómica de las especies detectadas es relativamente diversa, si bien de forma mayoritaria se relacionan con los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Shigella* (García-Armisen *et al.*, 2010; Hamdouche *et al.*, 2015; Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020), aunque destacan las pertenecientes a *Enterobacter* y *Tatumella* (Papalexandratou *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2020). Las principales actividades que se les asignan se relacionan con la pectinólisis, la metabolización del ácido cítrico y la producción de ácido glucónico, además de la asimilación de los azúcares presentes en la pulpa (Illeghems *et al.*, 2015). La producción de ácido glucónico no se considera de forma muy positiva, hecho al que también se une la posible síntesis de aminas biogénicas, tal y como sucede en otras fermentaciones alimentarias (Loret *et al.*, 2005).



### 1.8.3. Metodologías aplicadas en la identificación del microbioma asociado a la fermentación del cacao.

El papel que los microorganismos desempeñan en el procesado del cacao ya ha sido puesto en valor a lo largo de la presente revisión. Como en otros muchos procesos alimentarios, así como en diferentes entornos de carácter ambiental o animal, la elucidación de la comunidad microbiana permite alcanzar un mayor grado de conocimiento de la funcionalidad de esos entornos y de los mecanismos a través de los cuales discurre dicha funcionalidad (Mendes *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2017; Morgan *et al.*, 2017; Coutinho *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2018). En los últimos años, las metodologías disponibles para descifrar la compleja composición de las comunidades microbianas asociadas a ambientes concretos han evolucionado de modo considerable. El advenimiento de las técnicas moleculares, y en concreto el desarrollo de los protocolos de secuenciación masiva y de las -ómicas, ha supuesto un avance sin precedentes en la identificación de las especies participantes, así como en el establecimiento de las interacciones existentes entre distintos grupos poblacionales y en la asignación de funcionalidades (Gordial y Ronholm, 2018). En especial, la accesibilidad que este conjunto de técnicas da al considerable porcentaje de microorganismos no cultivables (Harwani, 2013), ha multiplicado exponencialmente el conocimiento en torno a la composición de las comunidades microbianas actuantes en diferentes hábitats y ha permitido descubrir la existencia de numerosas especies hasta el momento desconocidas (Razzauti *et al.*, 2015), así como la reasignación taxonómica de muchas otras (Bennett *et al.*, 2012). Pero a pesar de sus numerosas ventajas, las técnicas no cultivables no han desplazado totalmente a las tradicionales técnicas cultivables, pilar de la microbiología durante gran parte de su existencia y que, aun en la actualidad, continúan proporcionando servicios que otras metodologías no pueden cubrir como, por ejemplo, la realización de estudios de caracterización fisiológica o de virulencia, que sólo son posibles a partir de cultivos aislados (Vartoukian *et al.*, 2010). De hecho, la mejora de las técnicas cultivables, diversificando las condiciones de cultivo y la naturaleza del instrumental utilizado, ha permitido cambiar el concepto de “no cultivable” por el de “aún no cultivado” (Puspita *et al.*, 2012). Además, ha dado lugar al nacimiento de la denominada “culturómica” (Lagier *et al.*, 2012), metodología mediante la cual es posible identificar la presencia de ciertas especies difícilmente detectables a través de



protocolos genómicos, debido de forma mayoritaria a bajos niveles de presencionalidad (Greub, 2012), y que ha sido empleada con éxito en complementación con estudios metagenómicos (Fournier *et al.*, 2015).

Los métodos tradicionales de carácter cultivar se basan en la identificación de las colonias aisladas a través de sus características morfológicas y de la detección de moléculas asociadas de forma concreta a especies determinadas, crecidas en condiciones específicas, que desarrollan algún tipo de cambio fácilmente visualizable en el medio de cultivo utilizado. Obviamente, no existe ningún medio universal que permita la identificación de todas las especies existentes, por lo que la caracterización más o menos completa de la microbiota presente en un hábitat definido requiere la utilización de diversos medios y, además, la aplicación de diferentes condiciones de incubación. En el caso objeto de estudio del presente trabajo, los grupos microbianos de interés, como ya se ha mencionado, son BALs, BAAs y levaduras. Las primeras pertenecen al denominado grupo de bacterias fastidiosas, en lo que respecta a su desarrollo en condiciones de laboratorio, por lo que los medios empleados en su investigación han de satisfacer todas las exigencias nutricionales que estas especies muestran. Tales demandas son cubiertas por el medio MRS (Agar de Man, Rogosa y Sharpe), con el que se obtienen buenos resultados para especies del género *Lactobacillus* y, dependiendo del pH, para *Weisella*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Carr *et al.*, 2002). El denominado Medio 17 (M17) funciona para la mayor parte de las BALs cocáceas (Nielsen *et al.*, 2015). La utilización conjunta de ambos medios, incubados en condiciones de microaerofilia, permite obtener una imagen más o menos completa de la composición de la comunidad ácido láctica durante la fermentación del cacao. Es necesario, no obstante, prevenir el crecimiento de levaduras, propias de este entorno y capacitadas para crecer en estos medios, suplementándolos con cicloheximida y ácido sórbico (Camu *et al.*, 2007). En el caso de las BAAs, grupo también difícil de crecer en laboratorio, los medios indicados son agar GYC (Glucosa, Extracto de levadura, Carbonato), agar DMS (Desoxicolato-manitol-Sorbitol) y agar YPM (Extracto de levadura-Peptona-Manitol) (Nielsen *et al.*, 2007; Raspor y Goranovic, 2008). Al igual que en el caso anterior, la coexistencia en la masa fermentada de cacao de otras especies puede favorecer la aparición no deseada de poblaciones mixtas, por lo que se hace nuevamente necesaria la incorporación de sustancias antimicrobianas que limiten su desarrollo, cicloheximida o pimiracina para las





levaduras y nisina para las BALs (Nielsen *et al.*, 2007; Raspor y Goranovic, 2008). Finalmente, las levaduras ofrecen buenos rendimientos en medios tales como Agar Extracto de levadura-Peptona-Glucosa, Agar Extracto de malta o combinación de ambos. La presencia de BALs se evita mediante la presencia de cloranfenicol o clorotetraciclina (Jespersen *et al.*, 2005).

Una de las alternativas introducidas en los métodos cultivares dedicados a la identificación de especies microbianas y que mejora de forma significativa la eficiencia de los sistemas más tradicionales se basa en el desarrollo de perfiles proteicos generados mediante protocolos de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo (MALDI TOF), una técnica de espectrometría de masas que facilita el reconocimiento bioquímico de bacterias y levaduras a nivel de especie, en un rango entre el 73% y el 92% (Bessede *et al.*, 2010; van Veen *et al.*, 2010). Sus características (rapidez, precisión y buena relación coste-eficacia) (Carbonelle *et al.*, 2012), propician incluso que se considere una metodología al nivel de la secuenciación masiva (Urwyler y Glaubitz, 2015). Aunque se ha usado principalmente en la investigación de microorganismos de interés clínico (Carbonelle *et al.*, 2011; Croxatto *et al.*, 2012; Patel, 2015; Angeletti, 2017), también se ha aplicado con éxito en otros campos, como en el caso de la microbiota asociada a la fermentación del cacao (Miescher Schwenninger *et al.*, 2016; Miguel *et al.*, 2017).

Las técnicas no cultivares, asociadas mayoritariamente a metodologías dependientes de ácidos nucleicos, comprenden también protocolos de tipo microscópico, aunque estos últimos rara vez se utilizan en el estudio de la microbiota del cacao procesado. La técnica de detección microbiana más aplicada en este tipo de casos es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), pero su utilidad en procesos como la fermentación del cacao es limitada, dado que no permite la identificación de todas las especies presentes, sino sólo la confirmación de aquellas para las cuales se ha realizado el diseño de la sonda fluorescente. En este sentido, se podría aplicar en el seguimiento de microorganismos inoculantes o en la monitorización de especies concretas (Xufre *et al.*, 2006; Luxanil *et al.*, 2009). Pero, sin duda, las metodologías que en los últimos años han acaparado la atención de los investigadores relacionados con el estudio de microbiomas son las basadas en ácidos nucleicos (Cocolin *et al.*, 2013). Su distribución universal, por un lado, y su especificidad, por otro, hacen de ellos moléculas ideales para la caracterización



de poblaciones microbianas complejas (Cao *et al.*, 2017). Otras propiedades que caracterizan a este grupo de técnicas son su rapidez de diagnóstico y, por supuesto, su capacidad para detectar microorganismos no cultivables (Nielsen *et al.*, 2015). La investigación del microbioma del cacao mediante técnicas basadas en ácidos nucleicos, ya sea total o parcialmente, se ha abordado mediante la implementación de librerías de clones (García-Armisen *et al.*, 2010), DGGE (Papalexandratou y De Vuyst, 2011; Pereira *et al.*, 2013b), RFLPs (Bisbal *et al.*, 2009) o qPCR (Schwendimann *et al.*, 2105). La construcción de librerías clónicas se lleva a cabo tomando como referencia genes válidos para ser considerados cronómetros evolutivos y que permitan, por tanto, la caracterización taxonómica de las poblaciones presentes. A la hora de secuenciar, es necesario seleccionar un número adecuado de clones que genere una imagen representativa de la realidad del hábitat investigado sin que ello suponga un obstáculo a nivel logístico y económico. Sin embargo, esa no es una tarea sencilla, dado que la complejidad de la comunidad microbiana asociada a la muestra determina el número de clones a escrutar, de manera que no es conveniente establecer un protocolo único sin considerar las características que esta presenta. En ese sentido, suele ser habitual realizar un escrutinio previo mediante alguna técnica molecular generadora de perfiles de diversidad, que proporcione información que facilite la toma de decisiones en cuanto al número adecuado de clones a secuenciar (Nocker *et al.*, 2007). Por otra parte, y tal vez como consecuencia de este último factor, se ha observado una cierta tendencia de esta metodología a subestimar la diversidad real del hábitat (Larentis y Alfreider, 2011). Las técnicas DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente desnaturante) y RFLPs (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción) se encuadran en el grupo de técnicas productoras de perfiles genéticos. La primera, realizada en geles de acrialmida con presencia de un gradiente de concentración de urea y formamida, genera perfiles en función de diferencias de secuencia y en la mayor o menor afinidad que esta muestra por los componentes del gel. La secuenciación se lleva a cabo sobre las diversas bandas que aparecen en el gel, que son escindidas y convenientemente purificadas (Ercolini, 2004). La segunda, por su parte, origina los perfiles electroforéticos a partir de los fragmentos obtenidos tras tratar los productos de amplificación con diferentes enzimas de restricción y que, además, suelen ser sometidos a secuenciación (Viaud *et al.*, 2000). La qPCR o PCR cuantitativa transcurre de forma similar a la PCR tradicional, con la particularidad de conocer en tiempo real el nivel de amplificación, gracias a la utilización de

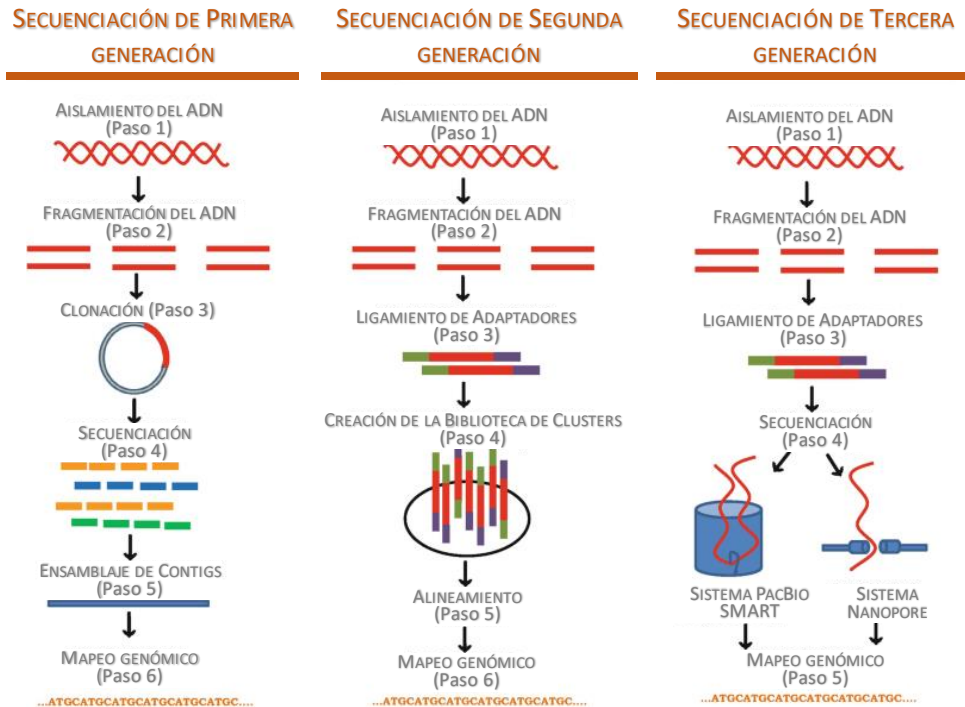


marcadores fluorescentes. La representación gráfica del incremento en la fluorescencia vs. el número de ciclos genera un coeficiente,  $C_q$ , que permite determinar el nivel inicial de ADN presente (Postollec *et al.*, 2011). Obviamente, cada gen diana ha de tener un marcador fluorescente específico. Precisamente, esta última consideración supone un importante obstáculo para la utilización de esta técnica en la caracterización de la comunidad microbiana, ya que no permite obtener una visión completa de la comunidad microbiana, dado que resulta imposible monitorizar todas las especies presentes. En ese sentido, esta técnica se adecúa más al seguimiento de algunos microorganismos concretos, de especial incidencia en el proceso (Schwendimann *et al.*, 2015). Otras de las metodologías comentadas requieren la aplicación complementaria de protocolos de secuenciación para conocer identidades, dado que de inicio sólo generan patrones diferenciadores, o resultan excesivamente costosas a nivel económico y temporal. Incluso, en algunos casos coinciden varios de estos factores.

En los últimos años, el rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha generalizado su utilización, convirtiéndolas en el sistema de estudio mayoritario gracias, entre otros aspectos, a la gran cantidad de información que generan en un limitado periodo de tiempo y con un adecuado nivel de precisión (Figura 1.21.) (Metzker *et al.*, 2010). En su contra, la complejidad bioinformática de la interpretación de los datos crudos, que demanda un alto nivel de procesado, y la relativamente escasa longitud de las lecturas generadas (Solieri *et al.*, 2012), desventajas que se solventan en las plataformas de tercera generación, basadas en la secuenciación en tiempo real de una sola molécula de ADN (Van Dijk *et al.*, 2018), con lo que además obvian los inconvenientes asociados a la PCR. No obstante, y en lo que concierne a estudios de identidad de la comunidad microbiana asociada a una determinada muestra, los cuales se basan fundamentalmente en la amplificación de un único gen (subunidad 16S del ARN ribosomal, en el caso de bacterias, o la región hipervariable ITS del cistron ribosomal, en el de eucariotas), algunos de los impedimentos asociados a las plataformas de segunda generación quedan relegados a un segundo término, ya que no se requieren complejas operaciones de ensamblaje de secuencias dirigidas a la reconstrucción de genomas completos (Mayo *et al.*, 2014). No obstante, en ocasiones, la escasa longitud de las secuencias limita la identificación a niveles taxonómicos superiores al de especie, aunque una correcta selección de la región concreta del gen a la que se dirigen los



cebadores puede incrementar la precisión de la identificación (Claesson *et al.*, 2010).



**Figura 1.21.** Protocolos de las sucesivas generaciones de secuenciación (adaptado de Srivastav y Suneja, 2019).

La primera plataforma de secuenciación masiva comercializada, la 454 GS20 de Roche, data de 2005 (Tara *et al.*, 2019) y, a pesar del escaso tiempo transcurrido, la velocidad a la que este tipo de tecnología avanza es tal, que esta plataforma ya se considera obsoleta y fuera de uso (Rihtman *et al.*, 2016). En la actualidad, y a pesar de que ya se han desarrollado modelos más sofisticados, la plataforma mayoritariamente empleada es Illumina, disponible desde 2007 y sustituta de la metodología de pirosecuenciación de los sistemas 454 gracias, sobre todo, a su bajo coste (Sinclair *et al.*, 2015). Esta plataforma se basa en protocolos de secuenciación por síntesis, en los que los cuatro nucleótidos son incorporados simultáneamente. Otras plataformas existentes en el mercado son ABI-SOLID de Applied Biosystem y



Polonator G.007 de Azco Biotech, en las que la secuenciación se lleva a cabo mediante reacciones de ligamiento, Genereader de Qiagen, basada al igual que Illumina en secuenciación por síntesis, protocolo que también sigue Ion Torrent de Thermo Fisher Scientific, aunque en este caso, la detección de la incorporación de nucleótidos es consecuencia de los mínimos cambios de pH que esta acción produce. El sistema PacBio, ya perteneciente a la denominada tercera generación de secuenciadores masivos, se fundamenta en la secuenciación en tiempo real de una sola molécula, no se ha impuesto en el mercado debido a su alto coste y a su alta tasa de error. Más probabilidades de futuro parece tener la tecnología desarrollada por Oxford Nanopore, también asociada a la secuenciación de una sola molécula, pero con prestaciones claramente superiores a PacBio, tanto en lo referente a coste como a fiabilidad y calidad.





---

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---







El proceso de fermentación del cacao se caracteriza por la sucesión de diversas poblaciones microbianas cuya actividad metabólica permite que el producto final presente las propiedades solicitadas por los productores y apreciadas por los consumidores. La composición de la comunidad microbiana participante, tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo, el momento preciso en el que intervienen los diversos grupos microbianos, y la contribución que cada uno de ellos realiza a la matriz fermentada se encuentra condicionada por una amplia variedad de factores. Así, las características intrínsecas del proceso, ya sean nutricionales, ambientales o físico-químicas determinan la microbiota propia de la fermentación. Pero, además, es necesario considerar otros aspectos sin relación directa con el hábitat en el que se han de desarrollar las especies microbianas durante la fermentación, tales como variedad del cacao, localización geográfica del cultivo, operaciones pre y post-cosecha, metodología fermentativa, etc. La existencia de un número tan elevado de factores influyentes impide que se pueda hablar de una comunidad universal en relación con la fermentación del cacao, lo que lleva a que cada proceso, en cierta medida, sea único. En muchos sentidos, esta variabilidad se considera negativa, ya que propicia una alta heterogeneidad en las propiedades finales del cacao fermentado, además de no garantizar siempre un mínimo de calidad del producto final obtenido. Sin embargo, por otra parte, estas diferencias, en caso de gestionarse de forma adecuada, pueden generar características únicas que originen productos singulares. En cualquier caso, resulta obvia la necesidad de examinar de forma individualizada cada proceso, de manera que se pueda establecer la existencia de aspectos diferenciadores y su carácter positivo o negativo.

En México, el tipo de proceso mayoritario en la industria chocolatera muestra un carácter claramente tradicional, en el que la gestión se fundamenta de forma casi absoluta en la experiencia de los manipuladores. Por otra parte, la variedad de cacao preferentemente utilizada en el país es la Criollo, cuya representatividad en el global mundial es escasa. Sin duda, estas dos características acentúan aun más las posibles particularidades del producto generado y justifican si cabe aun más la necesidad de definir los aspectos diferenciadores del sector cacaotero en México, sobre todo si se considera el olvido al que ha sido relegado en los últimos años y la práctica ausencia de estudios que profundicen en semejante conocimiento. En este sentido, el presente trabajo se plantea diversas hipótesis, cuyo discernimiento



podría suponer una importante base científica en el desarrollo del sector cacaotero en la región de Tabasco, la más destacada dentro del país, así como dotar de un mayor grado de homogeneidad al producto fermentado, independientemente de factores de procesado. Así, la **primera Hipótesis** a plantear sería **¿Existe realmente una secuencia temporal en las poblaciones microbianas asociadas a la fermentación del grano de cacao?** Derivada de esta primera hipótesis surgen otras dos, a saber **¿Tiene reflejo la posible secuencia temporal de las poblaciones microbianas en la cronología de las transformaciones experimentadas por los compuestos presentes en la matriz de cacao? (Hipótesis 2)** y **¿Es posible establecer relaciones entre especies/grupos microbianos concretos y perfiles organolépticos propios en el producto final? (Hipótesis 3)**. La obtención de respuestas a estos cuestionamientos propiciará una mayor optimización del proceso fermentativo, así como un elevado grado de estandarización que permitiría comercializar productos más homogéneos y estables en sus propiedades.

#### OBJETIVO GENERAL:

En función de lo relacionado hasta el momento, el presente trabajo se plantea con el Objetivo Principal de **establecer los aspectos microbianos que definen el proceso fermentativo del cacao, y su relación con las transformaciones químicas y organolépticas que este experimenta durante dicho proceso.**

#### *Objetivos específicos:*

El Objetivo General anteriormente citado se desglosa en los siguientes Objetivos Específicos:

1. Establecer las condiciones físico-químicas que potencialmente condicionan el establecimiento de las distintas comunidades microbianas asociadas al proceso fermentativo y su influencia en las transiciones entre unas y otras (Hipótesis 1).
2. Determinar la secuencia temporal de comunidades microbianas presentes a lo largo del proceso fermentativo (Hipótesis 1).



3. Analizar la formación de compuestos de interés organoléptico y su cronología durante el proceso fermentativo. (Hipótesis 2).
4. Evaluar la relación entre comunidades microbianas y compuestos de interés organoléptico (Hipótesis 3).





### **3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

---





En la presente sección se detalla el diseño experimental desarrollado al objeto de responder las cuestiones planteadas en las hipótesis y alcanzar los objetivos planteados.

### 3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

Tal y como se apunta en el apartado anterior, el presente trabajo se ha centrado en la investigación de la comunidad microbiana asociada a la etapa fermentativa y su influencia en los cambios físico-químicos experimentados por las semillas del cacao durante la evolución del proceso. Así, el diseño experimental desarrollado (Figura 3.1.) focaliza su acción en el seguimiento cronológico de la fermentación y en el análisis de las muestras extraídas a lo largo de ésta, llevando a cabo en todos los casos estudios dirigidos a la detección de los niveles presentes de las principales moléculas implicadas en el proceso (sustratos nutricionales y metabolitos microbianos), así como al discernimiento de las comunidades microbianas asociadas a cada una de ellas (procariota y eucariota). Adicionalmente, se monitorizaron los parámetros ambientales condicionantes de la actividad biológica.

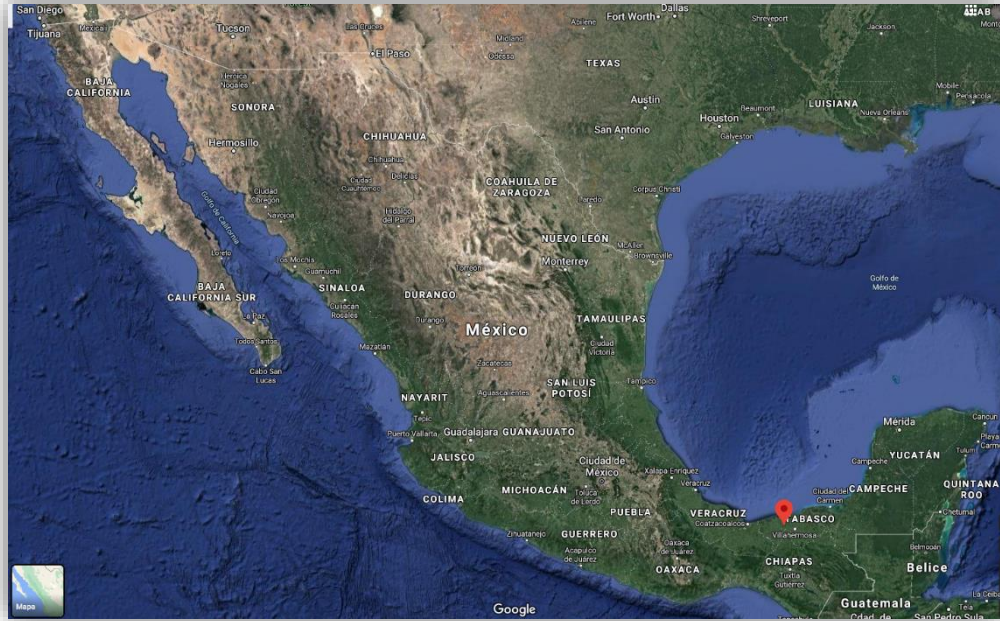


Figura 3.1. Diseño experimental seguido a lo largo del trabajo.



### 3.2. PROCESO FERMENTATIVO.

El desarrollo de la etapa fermentativa, realizada entre los meses de octubre de 2017 y enero de 2018, tuvo lugar en la localidad de Carlos Rovirosa, perteneciente al municipio de Cunduacán, en el estado de Tabasco, en México (Figura 3.2.).



**Figura 3.2.** Captura de Google Maps de la localización geográfica de la zona en la que se desarrolló el cultivo y la etapa fermentativa.

La variedad de cacao empleada fue la denominada “Criollo Carmelo” (Figura 3.3.), típica de la zona, y que se caracteriza por su semilla blanca y su alta calidad, propiedad que le ha hecho merecedora de diversos premios y que propicia que el material fermentado se destine a mercados de elevada exigencia,



**Figura 3.3.** Semillas del cacao Criollo Carmelo ([ppfam.com/en/Cacao/Mexico/1306/](http://ppfam.com/en/Cacao/Mexico/1306/)).





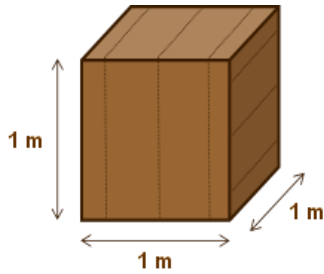
como son el europeo o el estadounidense. En concreto, la partida analizada en el presente trabajo se dirigió al último de los mercados citados.

Para la fermentación se cortaron y recolectaron aquellas mazorcas con el adecuado grado de madurez y tamaño y, lógicamente, libre de daños físicos. Se dispusieron apiladas, formato en el que permanecieron hasta alcanzar el volumen necesario para llenar el fermentador, tiempo que nunca sobrepasó los dos días. De forma previa a su introducción en la caja de fermentación, se procedió a su quebrado al objeto de extraer las semillas (Figura 3.4.), siempre evitando la afectación de éstas, ya que los granos dañados reducen la calidad del producto final.

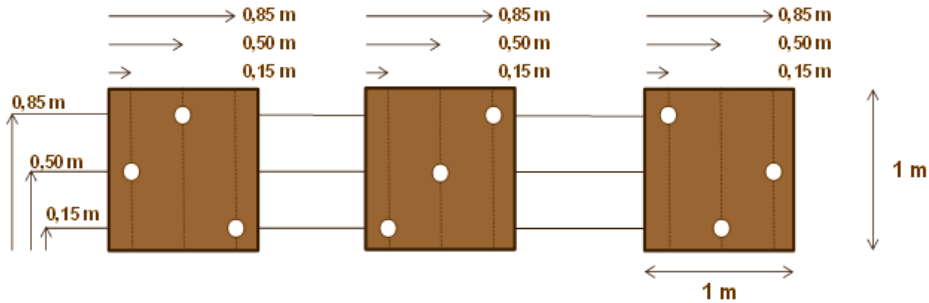


Figura 3.4. Quebrado del cacao.

Como dispositivos de fermentación se emplearon cajas de madera abiertas en su zona superior y de un m<sup>3</sup> de volumen (1 m x 1 m x 1 m). El proceso se prolongó durante seis días, realizándose cada 24 h trasiegos entre fermentadores al objeto de favorecer la aireación y la homogeneización, y facilitar el drenado de exudados residuales. Durante cada operación de trasiego se extrajeron muestras conformadas a partir de material procedente de nueve puntos diferentes de muestreo distribuidos estratégicamente en las tres dimensiones, de forma que fuesen representativos de las diferentes condiciones que se daban en la pila, tanto en lo concerniente a temperatura como a disponibilidad de oxígeno (Figura 3.5.). La mezcla del material proveniente de cada uno de los puntos se mezcló de forma adecuada, de forma que se constituyó una única muestra final de 500 g. En cada caso, las muestras fueron trasladadas en frío al Laboratorio de Química Sustentable de la Universidad Popular de la Chontalpa, en Cárdenas, Tabasco, donde fueron fraccionadas en proporciones adecuadas para la realización de las diferentes analíticas planteadas, parámetros de carácter ambiental, metabólico y microbiano. Las fracciones destinadas a la realización de análisis externos fueron convenientemente mantenidas, en refrigeración o congelación, hasta su procesado.



**Figura 3.5.** Distribución tridimensional de los nueve puntos de muestreo seleccionados en la conformación de las muestras.



### 3.3. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS.

El material obtenido en los distintos días de muestreo fue analizado al objeto de obtener una caracterización de sus propiedades finales, así como de monitorizar su evolución a lo largo del proceso. *In situ* se midió la temperatura con ayuda de un dispositivo portátil ubicado a 20 cm (superficie), 45 cm (centro) y 70 cm (fondo). En laboratorio se determinó el pH y se cuantificó la acidez titulable, parámetros estimados tanto en pulpa como en cotiledones. En el primer caso, la medida se estimó a partir de 10 g de muestra utilizando un pHmetro Hi 2209 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EE.UU.) y de acuerdo al método 970.21 (2005) de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC). En el segundo, el análisis se efectuó también a partir de 10 g de muestra diluidos hasta 100 mL y titulados con NaOH 0,1 N, según el método modificado 935.57 (1996) de la AOAC.

#### 3.3.1. Parámetros metabólicos.

La monitorización de compuestos de diferente naturaleza, tanto en su composición química como en su funcionalidad en relación con las poblaciones microbianas, se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química,



perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. En concreto, se investigaron tres compuestos considerados por su capacidad para sustentar el desarrollo microbiano, como son Glucosa, Fructosa y Ácido cítrico, y otros cuatro procedentes de la actividad microbiana, y asociados a distintos grupos poblacionales, como son Etanol, Manitol, Ácido láctico y Ácido Acético. El estudio se realizó mediante técnicas cromatograficas utilizando un equipo Agilent 7890 dotado con automuestreador y detector de ionización de llama (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) en los casos del etanol y los monosacáridos, y un cromatógrafo Waters Alliance con automuestreador y detector de arreglo de diodos (Waters Corporation, Milford, EE.UU.) para los ácidos. Los monosacáridos (Glucosa, Fructosa y Manitol) no son volátiles, por lo que, en principio, no son aptos para ser procesados mediante cromatografía gaseosa. Sin embargo, si lo son sus derivados silanizados, compuestos que fueron generados, permitiendo así la cuantificación de las moléculas precursoras.

El estudio se efectuó a partir de un extracto acuoso de las muestras obtenido tras filtrar a través de papel Whatman #2 la suspensión generada al mezclar 13-14 granos de cacao dispuestos en 60 mL de agua MiliQ, y sometida a agitación durante 5 min a temperatura ambiente en un baño ultrasónico. El extracto así preparado fue mantenido a 0 °C hasta su posterior análisis. En el caso de los compuestos monosacarídicos, los derivados silanizados se prepararon a partir de 1,5-4 mg de muestra procedente del filtrado sometido a evaporación, a los que se incorporó el reactivo "Silylating mixture according to sweely" (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.) en proporción 1:100 (muestra:reactivo). La mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min, tiempo tras el cual se procedió a la realización del análisis.

Las condiciones operativas específicas aplicadas en cada caso se detallan a continuación:

- ETANOL: se aplicó el método de estándar interno, utilizando como tal acetonitrilo grado HPLC en concentración 5,1 mg/, que fue añadido a alícuotas del extracto de la muestra en proporción 1:0,1 (extracto:estándar interno).
  - Columna: WAX 30 m x 0,25 mm e.p 0,25 µm.
  - Gas portador: Helio.



- Flujo: 1,0 mL/min (Split 100:1).
- Temperatura de la columna: 50 °C durante 4 min y rampa de 10 °C/min hasta 140 °C durante 3 min.
- Temperatura del inyector: 150 °C.
- Temperatura del detector: 200 °C.
- Volumen de inyección: 1 µL.
- Tiempo de adquisición: 14 min.
- MONOSACÁRIDOS: estándares de glucosa, fructosa, manitol, sacarosa y galactosa se procesaron de igual forma a las muestras y se cuantificaron paralelamente a estas.
  - Columna: Metil 5% fenilsiloxano 30 m x 0,25 mm e.p. 0,1 µm.
  - Gas portador: Hidrógeno.
  - Flujo: 1,8 mL/min (Split 50:1).
  - Temperatura de la columna: 100 °C durante 1 min y rampa de 10 °C/min hasta 220 °C.
  - Temperatura del inyector: 280 °C.
  - Temperatura del detector: 280 °C.
  - Volumen de inyección: 1 µL.
  - Tiempo de adquisición: 13 min.
- ÁCIDOS: se construyeron curvas de calibración a partir de soluciones de concentración conocida de los compuestos estudiados.
  - Columna: Luna 250 x 4,6 mm, 5 µm.
  - Fase móvil: Fosfato potásico monobásico 16 mM pH=2,2.
  - Flujo: 1,0 mL/min.
  - Volumen de inyección: 10 µL.
  - Tiempo de adquisición: 15 min.

### 3.3.2. Comunidades microbianas.

La secuenciación masiva del ADN microbiano presente en el material sometido a fermentación fue realizada en los laboratorios de la empresa ADM Lifesequencing, localizada en Paterna, Valencia, España. Las muestras extraídas durante el proceso fermentativo fueron convenientemente conservadas a -18 °C, tanto en periodo de almacenamiento como durante su transporte.



La extracción del ADN se llevó a cabo según el protocolo descrito por Camu *et al.* (2007) para semillas fermentadas de cacao. El ADN extraído fue limpiado y concentrado mediante la aplicación de AMPure® PB (Pacific Biosciences, Menlo Park, EE.UU.), producto especialmente diseñado para la preparación de materiales genéticos destinados a análisis de secuenciación masiva. La concentración y calidad del ADN contenido en el extracto purificado fueron evaluadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.), siendo utilizados con posterioridad los extractos de características adecuadas para la construcción de las correspondientes librerías genómicas a partir de la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr (Klindworth *et al.*, 2013), en el caso de procariontas, y la región ITS del cistron ribosomal, en el de eucariotas (Op de Beeck *et al.*, 2014). En la Tabla 3.1. se especifican las condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación del ADN presente en los extractos del material fermentado.

**Tabla 3.1.** Condiciones de amplificación: cebadores y ciclos de amplificación utilizados.

	Procariontas	Eucariotas
<b>Cebadores</b>	<i>S-D-Bact-0341-b-s-17:</i> CCTACGGGNGGCWGCAG <i>S-D-Bact-0785-a-A-21:</i> GACTACHVGGGTATCTAATCC	<i>ITS86F:</i> GTGAATCATCGAATCTTTGAA <i>ITS86R:</i> TTCAAAGATTCGATGATTGAG
<b>Ciclo de amplificación</b>		
Desnaturalización inicial	95 °C – 5 min	95 °C – 2 min
Desnaturalización	95 °C – 40 s	95 °C – 30 s
Anillamiento	55 °C – 2 min	55 °C – 30 s
Extensión	72 °C – 1 min	72 °C – 1 min
Extensión final	72 °C – 7 min	72 °C – 10 min
	25 ciclos	40 ciclos

El análisis de secuenciación masiva se realizó en una plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, EE.UU.), utilizando un protocolo de extremos pareados aplicado sobre fragmentos de 300 pb. Para la resolución de las secuencias solapantes se recurrió al software PEAR v.0.9.1 ([www.exelixis-lab.org/web/software/pear](http://www.exelixis-lab.org/web/software/pear)), mientras que para la eliminación de los adaptadores se empleó el software CUTADAPT v.1.8.1. (Martin, 2011). Aquellas secuencias con un nivel de calidad inferior a Q20, con un tamaño por debajo de 200 pb o con



presencia de secuencias quiméricas fueron eliminadas. Esta última selección se ejecutó mediante la implementación de Chimera Uchime (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias seleccionadas tras la aplicación de los citados criterios de exclusión fueron agrupadas en clústeres, con un nivel de corte del 97%, utilizando el software CD-HIT v.4.6.8. (Li y Godzik, 2006; Fu *et al.*, 2012). Finalmente, fueron asignadas al máximo nivel taxonómico posible de acuerdo con los resultados generados por la herramienta de Alineamiento Local BLAST del National Center for Biotechnology Information, NCBI ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) y su base de datos asociada, GenBank.

### 3.3.3. Tratamiento estadístico, y análisis de biodiversidad y filogenia.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, al objeto de garantizar la validez estadística de los datos. Aquellos de carácter físico-químico y metabólico fueron investigados mediante el test de Shapiro-Wilk al objeto de establecer el tipo de distribución, normal o no, y en función de dicha información, se aplicaron los análisis pertinentes para determinar la existencia de influencias significativas para cada uno de los factores en estudio y la de grupos de homogeneidad entre los niveles ensayados en cada caso. Así, los factores que mostraron una distribución normal de los datos fueron sometidos a un Análisis de Varianza y un Test de Rangos Múltiples, expresado este último en forma de Mínima Diferencia Significativa entre medias de Fisher, mientras que los datos de distribución no normal se analizaron mediante los tests de Kruskal-Wallis y Levene. En todos los casos, los análisis se realizaron a un nivel de confianza del 95%.

Los índices de Shanon-Wiener y Simpson (Tabla 3.2.), representativos de la diversidad  $\alpha$ , fueron calculados al nivel taxonómico de especie, aplicando para el establecimiento de la asignación filogenética un umbral de homogeneidad del 97%. La similitud de comunidades entre muestras, representativa de la diversidad  $\beta$ , fue estimada mediante el índice de Sørensen-Dice, tanto en su versión cualitativa, considerando de forma exclusiva ausencia o presencia de OTUs, como en la cuantitativa, calculada a partir de los datos de abundancia relativa de los OTUs presentes (Tabla 3.2.). Las relaciones filogenéticas entre especies fueron estimadas mediante la implementación del método del Vecino Más Próximo, utilizando para ello el software Mega v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013).



**Tabla 3.2.** Índices usados para estimar la diversidad microbiana a lo largo de la fermentación.

Índice	Diversidad	Tipo	Fórmula
Shannon-Wiener	$\alpha$	Uniformidad (Estructura)	$H' = - \sum p_i \log_2 p_i$
Simpson	$\alpha$	Dominancia (Estructura)	$D = 1 - \sum p_i^2$
Sørensen-Dice			
Cualitativo	$\beta$	Similitud	$I_S = \frac{2c}{a+b}$
Cuantitativo			$I_{Squant} = \frac{2pN}{aN+bN}$

$N$  = Número total de individuos en la muestra,  $N_i$  = número de individuos de la especie  $i$ -ésima,  $n$  = tamaño estandarizado de la muestra.

$p_i = n_i/N_i$ ,  $n_i$ : sumatoria del total de especies y  $N = \sum n$ .

$a$  = número de especies en la muestra 1,  $b$  = número de especies en la muestra 2,  $c$  = número de especies compartidas por las dos muestras.

$pN$  = suma de la abundancia relativa más baja para especies compartidas,  $aN$  = número de individuos en la muestra 1,  $bN$  = número de individuos en la muestra 2.

La existencia de relaciones monotónicas o lineales entre variables, tanto de tipo físico-químico como microbiológico, fue investigada mediante la correlación de Pearson o Spearman, dependiendo de la naturaleza de los datos, tanto al 95% como al 99%. Su representación gráfica fue ejecutada mediante el Análisis de Componentes Principales. La diferenciación entre muestras se analizó mediante Análisis Discriminante y Análisis de Conglomerados, este último basado en la matriz de similitud de Bray-Curtis. Todos los tratamientos estadísticos fueron realizados con los paquetes estadísticos IBM SPSS Statistics v.23 (IBM Analytics, Armonk, EE.UU.) y Statgraphics Centurion XVI v.16.1.17 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, EE.UU.).







---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





A continuación se incluyen todos los resultados obtenidos a lo largo de la fase experimental, adecuadamente tratados para facilitar su interpretación, y estadísticamente analizados, al objeto de propiciar una discusión fundamentada, que permita la extracción de conclusiones claras.

#### 4.1. PROCESO FERMENTATIVO: PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.

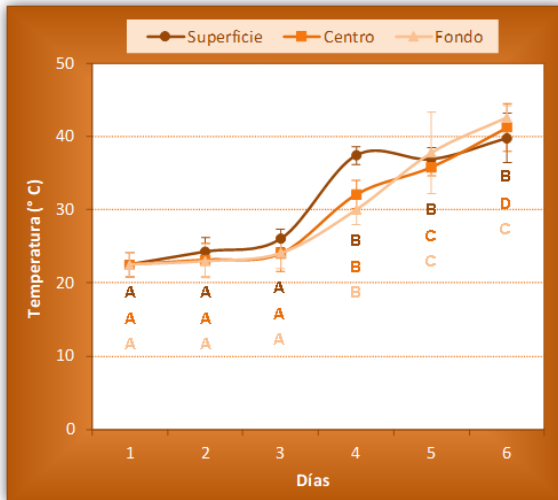
Las condiciones en las que transcurre cualquier proceso fermentativo resultan de especial importancia, dada la influencia que ejercen sobre el desarrollo microbiano y el efecto selectivo que propician sobre la identidad de las especies participantes en dicho proceso (Jamal *et al.*, 2011; Romanens *et al.*, 2018). A su vez, la comunidad microbiana actuante, tanto desde una perspectiva cualitativa como cuantitativa, marca los niveles de eficiencia de la transformación biológica y las características generales del producto final de la fermentación (Kadow *et al.*, 2015). Así, se puede decir que los parámetros físico-químicos, de manera más o menos directa, determinan la corrección de los procesos fermentativos. Por tanto, el estudio de un proceso fermentativo ha de confirmar, en primer lugar, la adecuación de estas condiciones al perfil habitual que presenta el proceso en ejecución, al objeto de sustentar la bondad de los restantes parámetros analizados.

Uno de los parámetros de mayor influencia en los procesos de carácter microbiano es la temperatura (Huang *et al.*, 2008). En el presente caso, y de acuerdo con el análisis realizado para conocer la naturaleza de los datos térmicos (Test de Shapiro-Wilk,  $P=0,0077$ ), estos no mostraron una distribución normal. Así, la existencia de influencias significativas de forma global y de niveles significativamente separados se investigó mediante pruebas de Kruskal-Wallis y Levene's, respectivamente. En este caso, se observó que, de los dos factores analizados, tiempo y nivel de profundidad, sólo la cronología generó diferencias significativas ( $P=1,40 \cdot 10^{-8}$  y  $P=0,7950$ , respectivamente).

La evolución de la temperatura se muestra en la Figura 4.1. En el gráfico se puede observar como los valores térmicos permanecieron estables en torno a los 23-24 °C durante las primeras 48 h de la fermentación, con leves pero no significativos incrementos en la zona superficial. En el tercer día se produjo un fuerte ascenso, particularmente a nivel superficial, donde se alcanzaron niveles



cercanos a los 40 °C. Esta temperatura se mantuvo con escasas variaciones hasta el final de proceso, mientras que en zonas internas y profundas continuaron ascendiendo hasta valores superiores a los detectados en superficie. No obstante, solo las temperaturas internas se separaron significativamente en cada uno de los muestreos finales.



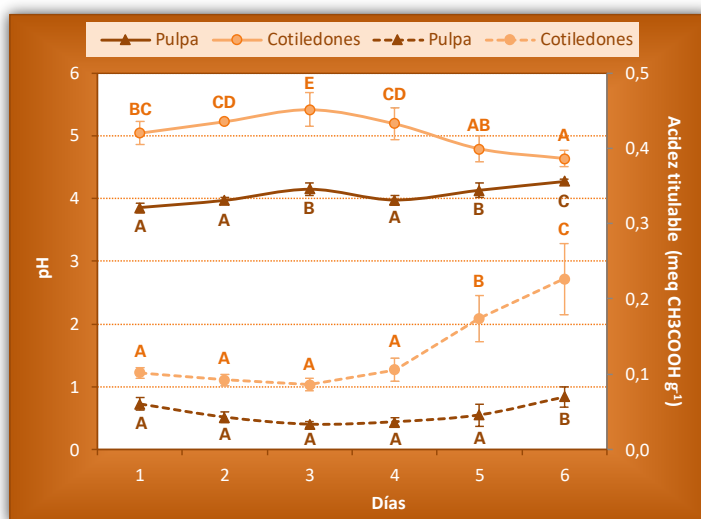
**Figura 4.1.** Perfil térmico observado durante la fermentación (Distintas letras dentro de una misma curva implica la existencia de diferencias significativas).

El incremento de temperatura en un proceso fermentativo es consecuencia de la transformación exotérmica mediante la cual, los sustratos fermentables son convertidos en precursores organolépticos, gracias a la acción microbiana (Schwan y Wheals, 2004). Aunque se han descrito procesos fermentativos de cacao en los que el máximo incremento de temperatura tiene lugar entre las 24 y 48 h (Kouamé *et al.*, 2015), en la mayoría de casos se observaron perfiles evolutivos similares a los registrados en el proceso aquí analizado (Lefeber *et al.*, 2011a; Ganeswari *et al.*, 2015). Este perfil, en el que los valores térmicos alcanzados en la fase inicial son moderados y el principal incremento se produce en la parte final, se asocia a la actividad metabólica de cada uno de los grupos microbianos dominantes en cada una de esas etapas, levaduras y bacterias del ácido láctico en la primera mitad, y bacterias del ácido acético en la segunda (Lagunas-Gálvez *et al.*, 2007).

Otro de los parámetros que condiciona los niveles de actividad en procesos microbianos es el pH (Rani y Rao, 1999). Estrechamente relacionada con él se



encuentra la acidez titulable o acidez total, concepto usualmente asociado a matrices de carácter alimentario, especialmente frutas (Tyl y Sadler, 2017). El estudio de normalidad realizado para los datos observados en cada caso arrojó resultados diferentes, calificando como datos de distribución normal los del pH ( $P=0,6119$  para pulpa y  $P=0,6520$  para cotiledones) y no normal los de acidez titulable ( $P=3,94 \cdot 10^{-8}$  para pulpa y  $P=0,0027$  para cotiledones). Los análisis estadísticos aplicados para conocer la existencia de influencias significativas y establecer niveles de significancia fueron, por tanto, los correspondientes a cada tipo de datos.



**Figura 4.2.** Evolución del pH (línea continua) y de la acidez titulable (línea punteada) durante la fermentación (Distintas letras dentro de una misma curva implica la existencia de diferencias significativas).

La evolución del pH, tanto en pulpa como en cotiledones, se vio significativamente afectada por la cronología del proceso (Figura 4.2.). No obstante, mientras en el caso de los valores observados para los cotiledones la tendencia global fue de bajada, en el caso de la pulpa fue de ascenso. Así, en relación con esta última, se pasó de un nivel inicial de 3,85, propiciado probablemente por los altos niveles de ácido cítrico presentes en esta estructura (Rodríguez-Campos *et al.*, 2011), a un valor final de 4,28, siendo el máximo detectado a lo largo de todo el proceso. Valores iniciales inferiores a 4 y posteriores incrementos, tal y como se



apunta en este estudio, han sido ya descritos en otros estudios (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007), llegándose incluso en algunos casos a registrarse valores alcalinos. Esta diversidad de resultados entre estudios parece asociarse con propiedades específicas inherentes a cultivares geográficamente localizados (Kouamé *et al.*, 2015) y características nutricionales del material de partida (Ganeswari *et al.*, 2015). Para cotiledones, la evolución se produjo entre 5,04 al comienzo del proceso y 4,64 al final, con un valor máximo de 5,42 tras 48 h de fermentación. El descenso en la segunda parte del proceso se asocia a la entrada de compuestos de naturaleza ácida al interior de los cotiledones (Copetti *et al.*, 2012). Valores de pH por encima de 5,5 al concluir el proceso fermentativo se consideran de forma negativa, ya que chocolates elaborados con materiales con tales características suelen mostrar peores propiedades organolépticas (Afoakwa *et al.*, 2008). En este sentido, el producto final originado en el presente proceso muestra niveles adecuados.

La acidez titulable se mostró estable en el caso de la pulpa, si bien el leve incremento del valor final provocó la existencia de influencias significativas globales por parte del factor tiempo (Kruskal-Wallis,  $P=0,0345$ ). Las variaciones en los cotiledones fueron, en cambio, más marcadas, centrándose tales variaciones en los dos últimos días de fermentación, pasándose de 0,10 a 0,23 meq ac. acético  $g^{-1}$ . Tal incremento diferenció significativamente esas muestras de las restantes y provocó la existencia de influencias significativas globales por efecto del factor tiempo (Kruskal-Wallis,  $P=0,0192$ ). Por otra parte, esos mayores niveles de ácidos totales en cotiledones en la fase final de proceso son consistentes con la migración de compuestos de esta naturaleza comentada con anterioridad y, desde otra perspectiva, favorece la existencia de determinadas reacciones que permiten una más adecuada fermentación (Apriyanto, 2016).

#### 4.2. PROCESO FERMENTATIVO: PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS Y NUTRICIONALES.

Las características naturales que presentan las semillas del cacao, principal materia prima utilizada en la elaboración del chocolate (Ganeswari *et al.*, 2015), limitan su utilización directa (De Vuyst y Weckx, 2016). El proceso fermentativo promueve cambios en la identidad y la concentración de numerosos compuestos que permiten su aplicabilidad a nivel alimentario (García-Armisen *et al.*, 2010), ya que mejoran sus propiedades en cuanto a aroma, sabor, textura crujiente y en boca o



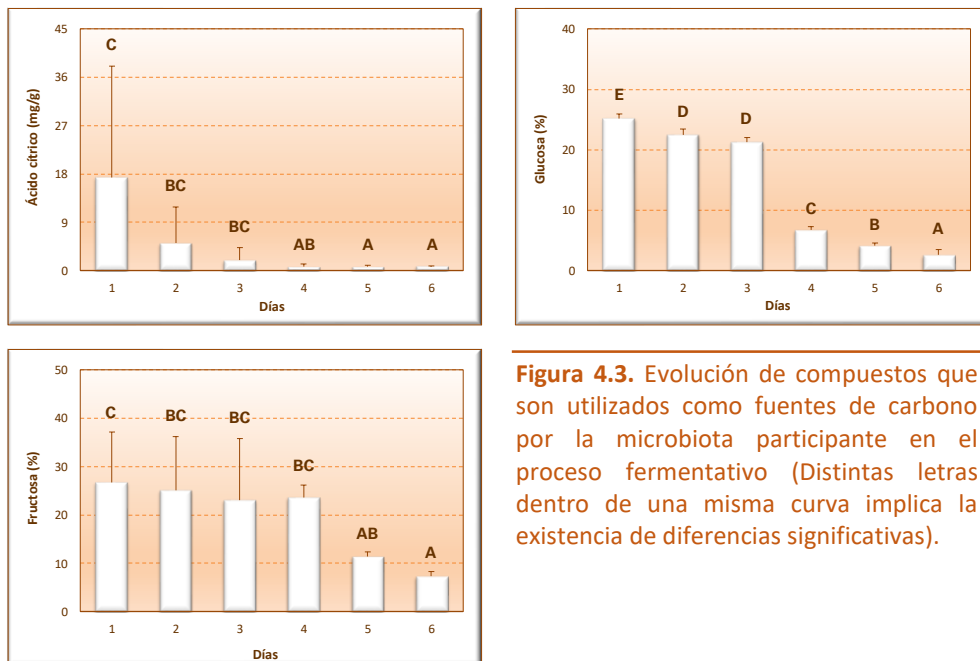
capacidad para fundirse (Gutiérrez y Pérez, 2015). Así, como consecuencia de la acción microbiana se reduce la presencia de moléculas que confieren propiedades no deseables, tales como acidez, amargor o astringencia (Saltini *et al.*, 2013), y se forman precursores del sabor que, en etapas posteriores del procesado, son transformados química o enzimáticamente hasta las formas que contribuyen a generar las propiedades organolépticas típicas del chocolate (Kongor *et al.*, 2016).

Los compuestos asociados a las propiedades organolépticas del cacao son numerosos, habiéndose descrito hasta el momento una cifra superior a 600 (Cafrack *et al.*, 2014), incluyendo moléculas tanto de carácter volátil y no volátil, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos o pirazinas (Rodríguez-Campos *et al.*, 2011). Obviamente, no todos contribuyen en la misma medida y, aunque existen importantes diferencias en las características del producto final generado en el proceso fermentativo en función de condiciones del proceso o localización geográfica (Lefeber *et al.*, 2012), las propiedades principales de las semillas fermentadas de cacao son atribuibles a un bajo número de compuestos. En gran medida, las reacciones que promueven la formación de estos precursores están propiciadas por materiales intracelulares y enzimas propias de los cotiledones liberados al medio externo, gracias a la acción de compuestos tales como el ácido acético y el etanol (De Wuyt y Weckx 2016), generados por la actividad microbiana. En este sentido, la monitorización de algunos de tales compuestos, junto con la evolución de las fuentes de carbono que sustentan el desarrollo microbiano, como glucosa, fructosa y ácido cítrico (Camu *et al.*, 2007), se postula como una estrategia válida a la hora de estimar el correcto progreso del proceso fermentativo.

En las Figuras 4.3. y 4.4. se muestra la evolución de los compuestos utilizados a modo de indicadores del proceso fermentativo. En relación con los sustratos nutricionales, y de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la Prueba de Shapiro-Wilk, sólo los datos asociados a la evolución de la fructosa mostraron una distribución normal ( $P=0,1424$ ), siendo los correspondientes a glucosa y ácido cítrico propios de distribuciones no normales ( $P=1,68 \cdot 10^{-3}$  y  $P=2,34 \cdot 10^{-5}$ ). En todos los casos, los niveles presentes de estas fuentes carbonadas al finalizar el proceso fermentativo fueron inferiores a los detectados en su comienzo, aunque sólo en el caso de la glucosa tales variaciones dieron lugar a diferencias significativas (Prueba de Kruskal-Wallis,  $P= 0,058$ ). Para fructosa y ácido cítrico, a pesar de mostrar descensos puntuales de consideración, no se observaron influencias significativas



por acción del tiempo (ANOVA,  $P=0,0596$ : Prueba de Kruskal-Wallis,  $P=0,6448$ , respectivamente), lo que probablemente sea debido a la variabilidad de las repeticiones. No obstante, si se apreció la existencia de grupos de homogeneidad diferenciados como consecuencia de las importantes diferencias encontradas entre muestras puntuales, especialmente en las comparaciones establecidas entre las concentraciones correspondientes al inicio y al final del proceso.



**Figura 4.3.** Evolución de compuestos que son utilizados como fuentes de carbono por la microbiota participante en el proceso fermentativo (Distintas letras dentro de una misma curva implica la existencia de diferencias significativas).

De acuerdo con la evolución observada para cada una de las fuentes carbonadas estudiadas, el ácido cítrico sustentó el crecimiento microbiano al inicio del proceso fermentativo, con escasa utilización de glucosa y fructosa. La rápida desaparición de este compuesto es un hecho habitualmente observado en los procesos biotransformativos del cacao (Lefeber *et al.*, 2011a), en los que incluso se ha llegado a reportar su consumo de forma casi completa en 24-36 h (Afoakwa *et al.*, 2013). En el momento en que el ácido cítrico alcanzó concentraciones mínimas, hecho que aconteció tras tres jornadas de fermentación, se observó el cambio en el patrón de consumo. Así, en el cuarto día de proceso, se detectó un fuerte descenso en el nivel presente de glucosa, retrasándose ese descenso al quinto día



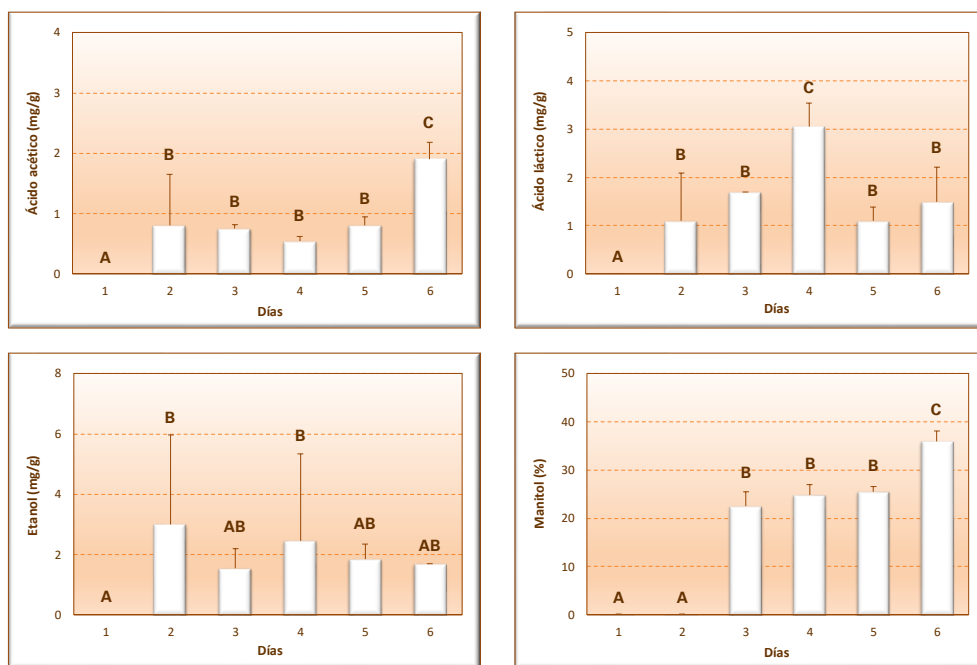


en el caso de la fructosa. Tal perfil de consumo de compuestos carbonados y, en concreto, el consumo diferencial de ácido cítrico, puede relacionarse con la composición de la comunidad microbiana en cada etapa del proceso y la dominancia de poblaciones concretas en cada una de ellas (Kouamé *et al.*, 2015). Así, el inicio del proceso suele estar dominado, en lo que respecta a la población eucariota, por bacterias del ácido láctico, muchas de las cuales, especialmente heterolácticas, utilizan citrato como sustrato para la producción de ciertos precursores organolépticos (Ho *et al.*, 2015;). Por otra parte, otro de los grupos mayoritariamente presente en la primera parte del proceso, las levaduras, también pueden crecer a partir de ácido cítrico (Camu *et al.*, 2007).

Dado que el citrato tiene consideración de co-sustrato en este tipo de procesos (De Vuyst y Weckx, 2016), su consumo suele mostrar patrones de evolución similares a otras fuentes carbonadas presentes (Camu *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2011a). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio dibujan un escenario diferente, según el cual la utilización de otros compuestos carbonados no se produce en paralelo, de manera que su consumo no tiene lugar de forma importante hasta que la concentración de citrato desciende a niveles insignificantes. No obstante, y a pesar de no ser el comportamiento más habitual, otros estudios describen procesos en los que se da una utilización preferencial del ácido cítrico (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2012). Tal diferencia puede radicar en la composición concreta de las poblaciones microbianas, ya que la capacidad de asimilación del citrato no es una propiedad de distribución universal entre bacterias del ácido láctico y, sobre todo, levaduras (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2012). Por otra parte, la síntesis de la citrato liasa, enzima responsable de la degradación del ácido, se relaciona mayoritariamente con entornos en los que los valores de pH son bajos y temperaturas moderadas (Ouattara *et al.*, 2017), condiciones que se dan en el inicio del proceso. En cualquier caso, la utilización de citrato de forma importante es una característica positiva en las especies involucradas en la fermentación del cacao ya que, por una parte, su asimilación en las etapas iniciales del proceso propicia un incremento del pH, lo que favorece la actuación de otras especies de interés (Schwan y Wheals, 2004) y, por otra, fortalece y diversifica la capacidad metabólica microbiana, lo que, en segunda instancia, influye sobre la calidad del producto final obtenido (Ouattara *et al.*, 2014) y en sus cualidades organolépticas (Laëtita *et al.*, 2014).



Una vez agotado el citrato, la acción microbiana se mantuvo gracias a la utilización de glucosa y fructosa, con mayor utilización de la primera. En este caso, la preferencia de un sustrato sobre otro puede ser consecuencia de las distintas finalidades a las que se destinan por parte de determinadas especies participantes en el proceso (Adler *et al.*, 2013), ya que mientras la glucosa se deriva hacia el mantenimiento del crecimiento, la fructosa sostiene el equilibrio redox. Adicionalmente, en ciertas especies la glucosa puede ejercer un efecto represor sobre la utilización de otras fuentes de carbono de carácter azucarado, como es el caso de la fructosa (Gänzle, 2015).



**Figura 4.4.** Evolución de metabolitos asociados a la microbiota propia del proceso fermentativo (Distintas letras dentro de una misma curva implica la existencia de diferencias significativas).

Una de las actividades microbianas sustentadas por las fuentes nutricionales es la síntesis de metabolitos, muchos de los cuales ejercen funciones como precursores de compuestos organolépticos. Aunque la variedad de compuestos generada es amplia, los más destacados son ácidos tales como acético y láctico, además de



manitol y etanol (Gutiérrez, 2017). Los tres primeros son consecuencia mayoritaria de la acción de la microbiota bacteriana, mientras que el etanol es producido en su mayor parte por levaduras (Illeghems *et al.*, 2015). La sucesión de dichas comunidades microbianas a lo largo del proceso da lugar a un perfil específico para cada uno de los compuestos citados, con concentraciones máximas coincidiendo cronológicamente con la etapa de dominio de la población microbiana productora.

Desde el punto de vista estadístico, los datos encontrados para los compuestos analizados se ajustaron a una distribución normal en todos los casos, con la excepción del manitol (Tabla 4.1.). Los correspondientes análisis realizados para determinar la existencia de diferencias significativas como consecuencia de la cronología del proceso mostraron la influencia de este factor en ambos ácidos, acético y láctico, así como en manitol, quedando el etanol como único compuesto cuyo valor fue independiente del tiempo.

**Tabla 4.1.** Análisis estadístico (Prueba de Normalidad y Análisis de Varianza/Mediana) de los metabolitos generados por la actividad microbiana.

<i>Compuesto</i>	<i>Estadístico de Shapiro-Wilk</i>	<i>ANOVA</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>
	<i>Valor de P</i>	<i>Valor de P</i>	<i>Valor de P</i>
<i>Ácido Acético</i>	0,3499	0,0001	
<i>Ácido Láctico</i>	0,7733	0,0000	
<i>Etanol</i>	0,0608	0,1094	
<i>Manitol</i>	0,0038		0,0101

La relación entre la cronología del proceso y los niveles presentes de los metabolitos microbianos se ajustó a dos perfiles principales, según los cuales las concentraciones más elevadas se detectaron bien a tiempo final, bien a tiempo intermedio (Figura 4.4.). El primero de los perfiles se observó en los casos de ácido acético y manitol, mientras que ácido láctico y etanol se encontraron en mayor concentración en la fase intermedia del proceso. Este patrón de distribución es habitual durante la fermentación del cacao (Moreira *et al.*, 2013; De Vuyst y Weckx, 2016), y es consecuencia lógica de la sucesión de distintas poblaciones microbianas, tal y como se ha mencionado previamente. Así, las condiciones iniciales de la fermentación, tanto nutricionales como ambientales, favorecen el desarrollo de



levaduras (Ganeswari *et al.*, 2015). Este grupo microbiano, principal responsable de las transformaciones que tienen lugar durante la primera fase del proceso (Ho *et al.*, 2014), favorece la producción de etanol (Illegghems *et al.*, 2015), compuesto que será transformado por poblaciones bacterianas de importancia en etapas posteriores. Los cambios asociados al desarrollo de las especies levaduriformes generan un entorno propicio a la acción de bacterias del ácido láctico (BALs), comunidad caracterizada por la síntesis de ácido láctico, además de ácido acético y manitol en menor medida, a partir de citrato y azúcares (Sandhya *et al.*, 2016). Tanto la generación de etanol por parte de las levaduras, como el desarrollo de las bacterias del ácido láctico, se ven favorecidos por los bajos niveles de oxígeno disponibles (Pereira *et al.*, 2012). La acumulación de los metabolitos propios de estas dos comunidades, así como el incremento de la temperatura, crean el entorno adecuado para el tercer de los grupos relevantes durante la fermentación del cacao, las bacterias del ácido acético (BAA). Las especies pertenecientes a esta comunidad se caracterizan por la oxidación del etanol y del ácido láctico previamente acumulados por las levaduras y las bacterias del ácido láctico hasta ácido acético (Gutiérrez, 2017). El tercero de los metabolitos acumulado, el manitol, puede potencialmente ser utilizado por las BAAs para sintetizar fructosa, pero la proporción en la que se da dicha utilización es muy baja, en comparación a las otras dos moléculas, e incluso algunas especies del grupo no muestran esa capacidad (Moens *et al.*, 2014). De hecho, la utilización del manitol como sustrato por BAAs se suele producir únicamente cuando las dos fuentes citadas están ausentes (Illegghems *et al.*, 2016), situación que no se da en el proceso aquí descrito, y en el cual no se observó ni un repunte en los niveles de fructosa, ni un descenso en los de manitol. Perfiles semejantes a este ya han sido descritos con anterioridad (Papalexandratou *et al.*, 2013), y puede considerarse como positivo el hecho de que no se produzca la generación de fructosa a partir de manitol, ya que la acumulación de la primera en la parte final del proceso puede generar efectos negativos como consecuencia de su potencial papel como sustrato nutricional útil para el desarrollo de hongos o bacterias alterantes, grupos microbianos nada deseables (Moens *et al.*, 2014). Por otra parte, y considerando otra perspectiva, el hecho de que el manitol se asocie preferentemente a la actividad microbiana, es decir, tenga origen fermentativo, y que sus niveles máximos se den en la parte final de la biotransformación, ha llevado a algunos autores a postular la utilización de este compuesto como biomarcador del proceso (Megías-Pérez *et al.*, 2018).



### 4.3. PROCESO FERMENTATIVO: COMUNIDADES MICROBIANAS.

Los granos de cacao que se encuentran en el interior de la vaina presentan una escasa e incluso nula población microbiana (Nielsen *et al.*, 2007b). Sin embargo, ese estado cambia en el mismo momento en el que dicha vaina es abierta, ya que a los granos accede una diversa microbiota procedente del entorno con el que entran en contacto y que incluye a manipuladores, superficie de la vaina, utensilios de manipulación, superficies, etc. (Visintin *et al.*, 2016). En la correcta sucesión poblacional, la cual depende de la concurrencia de las adecuadas condiciones ambientales y nutricionales, dicha microbiota propicia un proceso biotransformativo a cuya finalización se obtiene un producto final con propiedades organolépticas mejoradas en relación con su posterior uso alimentario (Pereira *et al.*, 2012).

Las comunidades microbianas que determinan de forma mayoritaria la idoneidad del proceso fermentativo son, en sucesión cronológica, levaduras, bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético (Moreira *et al.*, 2013). Puntualmente, pueden desempeñar cierta funcionalidad al final del proceso especies pertenecientes al género *Bacillus* o al grupo de los hongos miceliares (Schwan *et al.*, 2015), microorganismos ambos que, como ya se ha dicho antes, pueden conferir ciertas características organolépticas no deseables (Arana-Sánchez *et al.*, 2015).

En el presente epígrafe se detallan los resultados obtenidos a partir del estudio metagenómico realizado a partir de las muestras extraídas diariamente de las cajas de fermentación a lo largo de todo el proceso. Para una mayor comprensión de los datos y de su interpretación, el estudio se desglosa en función de la naturaleza de las poblaciones analizadas, eucariotas y procariotas.

#### 4.3.1. Estudio de la población eucariota asociada al proceso fermentativo.

Las comunidades microbianas de interés en la biotransformación del grano de cacao se encuadran tanto dentro del grupo de los procariotas como de los eucariotas. Entre estos últimos, y considerando aquellos que ejercen una acción positiva, destacan las levaduras, cuya actividad en la etapa inicial del proceso resulta fundamental, propiciando la acumulación de etanol. El etanol favorece la lisis del embrión, lo que



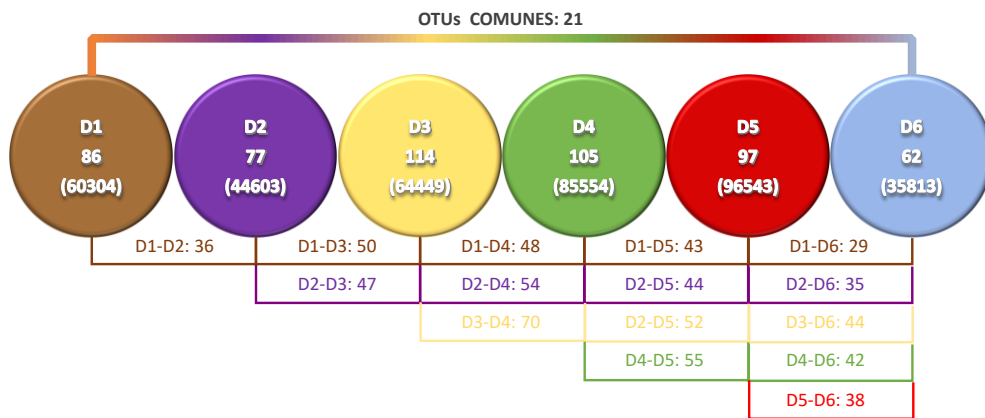
desencadena una serie de eventos bioquímicos de gran importancia en el desarrollo de las propiedades organolépticas (De Vuyst y Weckx., 2015; Koné *et al.*, 2016). Adicionalmente, este alcohol puede posteriormente ser utilizado como sustrato por las bacterias del ácido acético, grupo que también desempeña un papel esencial en la fermentación y sobre el que las levaduras ejercen una segunda acción a través de la relajación de la estructura pectínica, lo que permite el grado de aireación necesario para el desarrollo de las BAA (Ho *et al.*, 2014). Por otra parte, y aunque a menor escala que otras especies participantes, algunas levaduras participan en la síntesis de precursores del sabor (Kostinek *et al.*, 2008).

Dada la importancia de las levaduras en el proceso, su estudio ha sido centro de atención en numerosas investigaciones, las cuales ponen de manifiesto la existencia de un factor geográfico a la hora de establecer la identidad de las especies dominantes (Koffi *et al.*, 2017b). Así, no es posible definir una población universal que caracterice el proceso, independientemente de su localización o sus características, lo que, a su vez, incide sobre las propiedades finales del producto generado y propicia la existencia de matices específicos asociados a ambas características. Por tanto, se hace necesaria la realización de estudios individualizados que desvelen la naturaleza de la comunidad levaduriforme actuante en cada caso.

En el presente caso, el análisis metagenómico de la microbiota eucariota asociada al proceso revela una comunidad relativamente diversa, en la que el número de OTUs asciende durante la primera mitad del proceso y desciende en la parte final (Figura 4.5.). El número máximo de OTUs se detectó en el tercer día de fermentación (114), mientras que el menor correspondió al día final del proceso (62). Estas cifras de OTUs, que en el caso de especies procariontas serían consideradas pobres, resultan elevadas en el caso de microorganismos de naturaleza fúngica, en los que se suelen reportar comunidades con menor riqueza de especies (Illeghems *et al.*, 2012; Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018). El número total de OTUs diferentes acumulado, considerando la totalidad del proceso, ascendió a 240, también superior a lo descrito en otros procesos (Serra *et al.*, 2019). De estos, solo 21 fueron detectados a lo largo de todo el proceso, lo que parece apuntar a la existencia de un núcleo poblacional permanente, microbiota residente, en contraposición a una población de transición, considerablemente más numerosa y variable, que va cambiando en función de su nivel de adaptación a las condiciones puntuales en las que se encuentra el proceso, tal y como describen Meersman *et*



al. (2013). En dicho trabajo, se señala la posible importancia que esa microbiota levaduriforme residente puede desempeñar en lo concerniente a la calidad organoléptica final del producto de fermentación y en la minimización de la variabilidad existente entre procesos.



**Figura 4.5.** Número de OTUs eucariotas detectado en cada uno de los días de fermentación y OTUs compartidos entre distintos días. Entre paréntesis se muestra el número de lecturas asociado en cada caso.

Como se puede observar en la Figura 4.5., el número de OTUs compartidos fue superior entre los muestreos correspondientes a las fases intermedias. En el caso de muestras sucesivas localizadas en las fases inicial y final, la microbiota común fue netamente inferior, casi semejante a los valores encontrados entre muestras situadas en fases extremas. Esto concuerda con lo reflejado por el índice cualitativo de Sorensen-Dice en los correspondientes emparejamientos (Tabla 4.2.).

**Tabla 4.2.** Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos eucariotas.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
D1		0,71±0,19	0,69±0,08	0,52±0,05	0,48±0,05	0,49±0,05
D2	0,44±0,04		0,93±0,10	0,52±0,12	0,38±0,15	0,49±0,10
D3	0,50±0,01	0,49±0,08		0,50±0,11	0,35±0,11	0,46±0,08
D4	0,47±0,04	0,59±0,11	0,64±0,07		0,84±0,12	0,93±0,07
D5	0,44±0,04	0,56±0,07	0,49±0,03	0,54±0,05		0,86±0,05
D6	0,36±0,02	0,50±0,05	0,50±0,04	0,50±0,02	0,48±0,03	

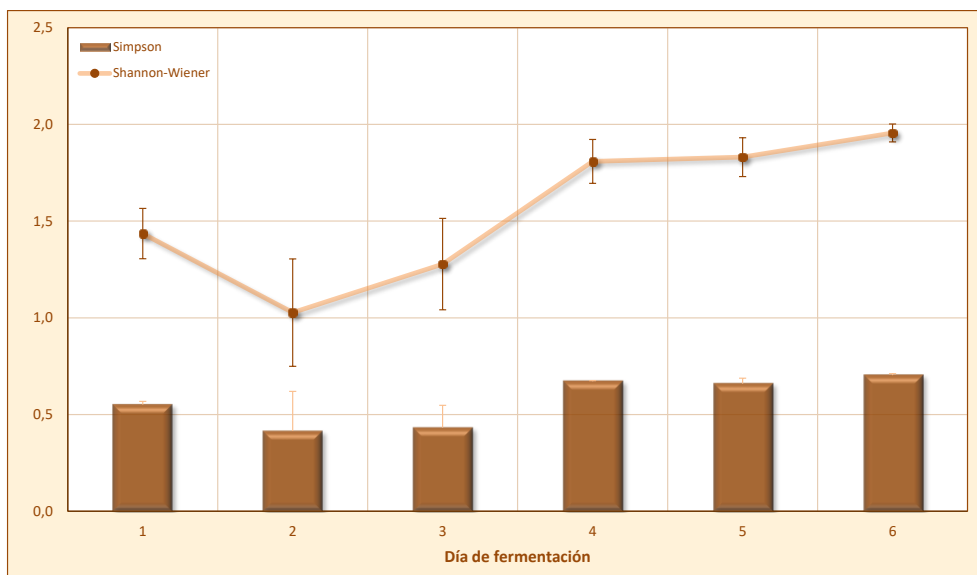


Así, el máximo nivel similitud se dio entre el tercer y el cuarto día de fermentación, con un 64% de homología entre los OTUs presentes, mientras que el mínimo se detectó entre los días inicial y final, con un 36%. Sin embargo, estos niveles de semejanza en cuanto a la identidad de las especies presentes no fueron extrapolables cuando se consideraron además niveles poblacionales de tales especies. De hecho, la semejanza de las comunidades correspondientes a los días tres y cuatro, pareja con mayor grado de homología a nivel cualitativo, solo alcanzó un 50%. En este caso, la mayor coincidencia se observó entre los días dos y tres, 93%, así como entre los días cuatro y seis, con valores altos, superiores al 80%, mantenidos durante toda la etapa final de proceso, incluso superiores a los encontrados en los días correspondientes a la fase inicial. Sin duda, los datos cuantitativos arrojan una imagen más cercana a la realidad, dado que el grado de influencia que ejerce una determinada especie sobre un proceso se encuentra más ligado a su abundancia relativa que a su mera presencia. En este sentido, la comunidad fúngica asociada al proceso parece cambiar de forma más acentuada durante la primera parte del proceso, para luego pasar, en la segunda mitad, a una etapa más estable y uniforme. Esa estabilidad de la comunidad fúngica en la parte de final del proceso probablemente no esté basada en una disminución de la carga poblacional eucariota, perfil usual en diversos procesos (Nielsen *et al.*, 2007b; Ganeswari *et al.*, 2015), ya que el número de lecturas encontrado en los diversos muestreos mostró, salvo en el día final, un patrón de crecimiento. La ausencia de esa reducción final en los niveles presenciales de especies levaduriformes puede ser debido a los registros térmicos alcanzados en esa fase, en torno a 40 °C, inferiores a los descritos en numerosos procesos (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007; Meersman *et al.*, 2013), y que no resultan lo suficientemente elevados como para ejercer un efecto inhibitorio sobre este grupo microbiano (Daniel *et al.*, 2009). Se podría entender, por tanto, que, asociado a la evolución del proceso, se produce un efecto selectivo por el cual, las especies más adaptadas a las condiciones ambientales y nutricionales van desarrollándose en mayor proporción que el resto, hasta hacerse dominantes (Samagaci *et al.*, 2016). Ese efecto selectivo, por otra parte, no implicaría la desaparición de las especies menos adaptadas, ya que estas permanecerían de forma mayoritaria, sino de una redistribución de las abundancias relativas según la cual gran parte de las especies menos adaptadas aparecerían de forma testimonial, frente a los niveles dominantes del bajo número de especies adaptadas.





Esta hipótesis parece ser sustentada por los índices de diversidad  $\alpha$  (Figura 4.6.), ya que los valores correspondientes a la segunda parte del proceso muestran una comunidad con los niveles más altos de biodiversidad, ligeramente por debajo de 2, según Shannon-Wiener, y los mayores valores para el Índice de Simpson, entre 0,65 y 0,70, indicativo de una población más heterogénea.



**Figura 4.6.** Diversidad fúngica observada a lo largo del proceso fermentativo, expresada según los índices de Shannon-Wiener y Simpson.

Los valores encontrados para los índices de Shannon-Wiener y Simpson fueron similares a los descritos en otros procesos (Serra *et al.*, 2019), lo que viene a ratificar la normalidad del proceso en cuanto a su diversidad eucariótica, con independencia de la composición concreta de la comunidad. No obstante, resulta complicado fijar un rango estándar de normalidad en este sentido, dado que la variabilidad en procesos como este, en los que la microbiota actuante proviene de forma exclusiva del entorno (Jamili *et al.*, 2016), es alta, tal y como atestiguan numerosos estudios (Daniel *et al.*, 2009; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; De Vuyst y Weckx, 2016). En cualquier caso, resulta complicado establecer comparaciones a través de índices de biodiversidad, dado que no es un parámetro habitualmente determinado en procesos de fermentación del cacao, más focalizados en el discernimiento de las



especies más influyentes en las características organolépticas y no tanto en la diversidad de la microbiota.

El hecho de que, de forma mayoritaria, los estudios hayan centrado su atención en las especies más determinantes es lógico, ya que son las que van a definir las acciones biotransformativas dominantes en el proceso y, por tanto, las características finales del producto y, en consecuencia, su calidad comercial (Agyrifo *et al.*, 2019). En ese sentido, el porcentaje de especies que alcanzan cargas poblacionales significativas en relación con el total detectado suele ser bajo. En el presente caso, de los diferentes 240 OTUs identificados, sólo 17 mostraron niveles de abundancia relativa superiores al 0,1% en al menos uno de los días de fermentación, reduciéndose la cifra hasta cinco cuando el límite se estableció en el 1%. Sin duda, un estudio más exhaustivo de esas especies permite alcanzar un conocimiento más profundo de los posibles eventos que tienen lugar durante la fermentación y una mayor comprensión de las correspondencias entre las especies levaduriformes dominantes y la evolución de los principales compuestos asociados al proceso, indicadores de la correcta evolución de este.

**Tabla 4.3.** Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos eucariotas, considerando exclusivamente OTUs con abundancias relativas por encima de 0,1% en al menos una muestra.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
D1		0,71±0,19	0,65±0,08	0,55±0,05	0,56±0,05	0,57±0,05
D2	0,87±0,05		0,95±0,10	0,52±0,13	0,38±0,16	0,49±0,10
D3	0,94±0,02	0,94±0,05		0,53±0,11	0,43±0,11	0,56±0,08
D4	0,94±0,00	0,94±0,05	1,00±0,06		0,89±0,11	0,99±0,04
D5	0,91±0,01	0,91±0,06	0,97±0,06	0,97±0,06		0,87±0,05
D6	0,91±0,00	0,91±0,07	0,97±0,06	0,97±0,04	0,94±0,04	

En el caso de la fermentación aquí estudiada, los OTUs eucariotas dominantes fueron los mismos a lo largo de todo el proceso, tal y como se deduce de los valores recogidos en la Tabla 4.3., correspondientes al índice de Sorensen cualitativo. El nivel de homología hallado en lo que respecta a la identidad de los OTUs con un 0,1% de abundancia relativa al menos en uno de los días de fermentación fue considerablemente alto. Así lo confirma el hecho de que el porcentaje mínimo



encontrado fue del 87%, lo que parece significar la estabilidad de la población levaduriforme a lo largo del proceso y confirma la hipótesis anteriormente planteada respecto a la existencia de una microbiota residente, asociada al proceso. Sin embargo, los datos cuantitativos introducen matices importantes que muestran un escenario distinto, en el que se pone de manifiesto la existencia de etapas diferenciadas en cuanto a las especies dominantes. Así, se puede hablar de dos etapas en las que la comunidad eucariota mostró una elevada semejanza, días 1-3 y días 4-6, especialmente estos últimos, si bien la homología entre días pertenecientes a cada una de estas etapas, entre el 38% y el 57% no es nada despreciable.

Las afiliaciones taxonómicas de los OTUs dominantes, así como sus abundancias absolutas y relativas, expresadas mediante el número de lecturas, se muestran en la Figura 4.7. Todos ellos fueron asignados al filo Ascomycota, con una única excepción, el OTU menos abundante, que quedó encuadrado en el filo Basidiomycota, concretamente en el género *Malassezia*, que pertenece a la familia Malasseziaceae. A niveles taxonómicos inferiores, el mayor porcentaje de lecturas se observó para las familias Saccharomycetaceae y Saccharomycodaceae, siendo la primera dominante en la parte final del proceso y la segunda en la inicial, lo que explica el cambio poblacional comentado anteriormente, y la diferenciación del proceso en dos etapas, de acuerdo con la identidad de las especies dominantes en cada una de ellas. A la primera de las familias pertenecen los géneros *Kazachstania* y *Saccharomyces*, mientras que *Hanseniaspora* y *Saccharomycodes* se encuadran en la segunda. Estos fueron los géneros que, cuantitativamente, dominaron el proceso. En el caso de los primeros, *Kazachstania* mostró un perfil ligeramente creciente en los días iniciales, que se incrementó forma espectacular en el día 4 y se mantuvo constante hasta el final del proceso. *Saccharomyces*, por el contrario, mostró su nivel máximo en el día inicial, el cual se vio reducido en las siguientes 24 h en más de un 50%, nivel que se mantuvo con ligeras fluctuaciones hasta el final del proceso. Entre la familia Saccharomycodaceae, *Saccharomycodes* mostró un perfil evolutivo similar a *Kazachstania*, si bien los niveles en este caso fueron claramente inferiores, mientras que para *Hanseniaspora* se detectaron niveles excepcionalmente altos en la primera mitad de la fermentación, que descendieron en la segunda de forma drástica, pero manteniendo aún abundancias de considerable importancia.

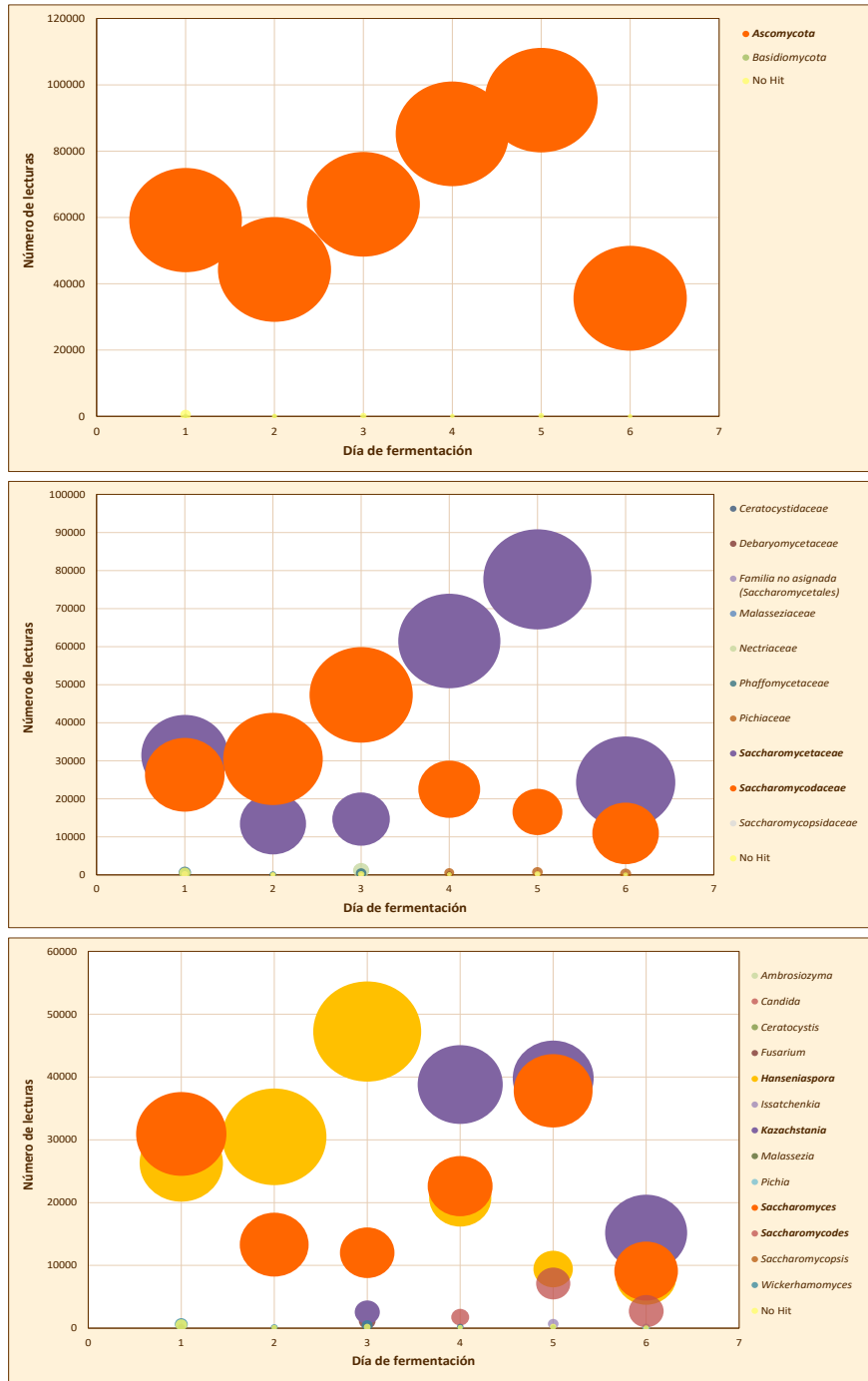


Figura 4.7. Abundancias absolutas (número de lecturas) y relativas (tamaño de burbuja) de los OTUs eucariotas dominantes para distintos niveles taxonómicos (filo, familia y género).

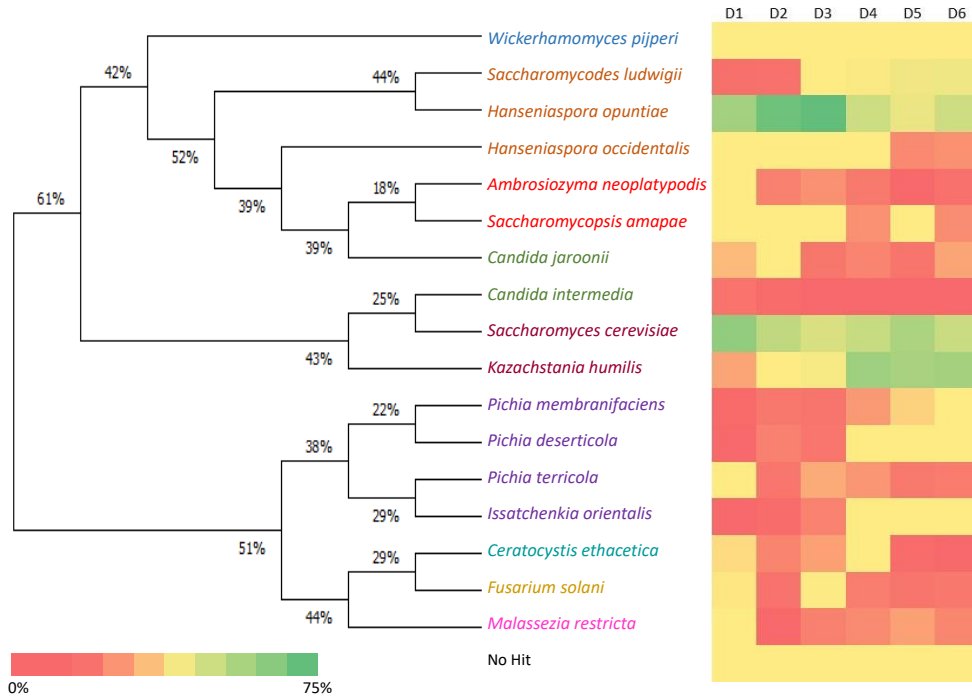


Tal y como se ha referenciado previamente, la identidad de la comunidad microbiana que regula el proceso de fermentación del cacao no muestra una distribución universal, ya que se ve afectada por factores tales como la localización geográfica, las prácticas procesales o la variedad cultivar. No obstante, a pesar de esas divergencias, es posible establecer una pequeña comunidad de levaduras que, de forma mayoritaria, puede ser definida como el núcleo eucariota de la fermentación del cacao. En ese núcleo se incluyen miembros de los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Saccharomyces* y, en menor medida, *Candida*, *Issatchenkia*, *Kazachstania* y *Kluyveromyces* (Daniel *et al.*, 2009; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2017; Koffi *et al.*, 2017b). Como se observa, las levaduras dominantes en el proceso aquí descrito se encuentran entre las habitualmente referenciadas en relación con la biotransformación del cacao, con la excepción de *Saccharomyces*. Especies pertenecientes a este género, aunque no son típicas de la fermentación del cacao, sí se asocian a otros procesos fermentativos propios de la industria alimentaria, como es el caso de la producción de bebidas alcohólicas, y en especial la de cervezas con bajo contenido en alcohol (Liu *et al.*, 2011; De Francesco *et al.*, 2015).

El estudio al máximo nivel taxonómico analizado, el de especie, reveló la identidad de las levaduras que, desde un punto de vista cuantitativo, dominaron el proceso (Figura 4.8.). Así, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae* fueron detectadas durante todos los días de fermentación, como ya se ha descrito (Papalexandratou y De Vuyst, 2011), y siempre con abundancias relativas de consideración, aunque más elevadas en la primera mitad del proceso. *S. cerevisiae* fue la especie mayoritaria en el día uno, con niveles superiores al 50%, mientras que *H. opuntiae* alcanzó niveles máximos en torno al 70%, en los días dos y tres. A partir del cuarto día, *Kazachstania humilis* tomó el relevo de ambas especies, manteniéndose en abundancias relativas por encima del 40% hasta el final, en los que coexistió con los niveles aún importantes de las dos especies anteriormente mencionadas. En este segundo tramo también apareció una cuarta especie, *Saccharomyces ludwigii*, cuya presencia en la fase inicial del proceso fue meramente testimonial, sin superar nunca el 0,1% de abundancia relativa. En el cuarto día, inicio de la parte final del proceso, ya sobrepasó el 2% de abundancia relativa, para situarse en torno al 7,5% en los dos días finales. De forma conjunta, estas cuatro especies dominaron de forma absoluta el proceso fermentativo, dado

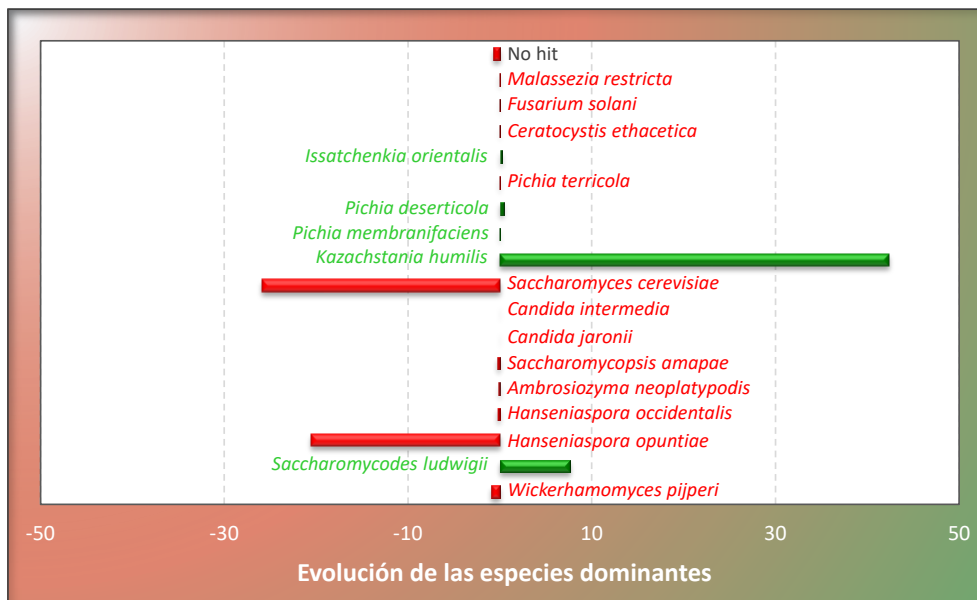


que la sumatoria de sus abundancias relativas en cada uno de los días de biotransformación nunca fue inferior al 94,5%.



**Figura 4.8.** Relaciones evolutivas inferidas de las secuencias pertenecientes a las especies eucariotas con abundancias relativas superiores al 0,1% en al menos una de las muestras y la evolución cronológica de sus abundancias relativas (*Wickerhamomycetaceae*; *Saccharomycodaceae*; *Saccharomycopsidaceae*; Sin familia asignada; *Saccharomycetaceae*; *Pichiaceae*; *Ceratocystidaceae*; *Nectriaceae*; *Malasseziaceae*).

En la Figura 4.9. se puede observar claramente la dominancia en el proceso de estas cuatro especies, en la que se muestran los niveles de variación entre los días inicial y final de cada uno de los OTUs con abundancias relativas superiores al 0,1% en alguno de los días de fermentación. Claramente se aprecia que el resto de especies no experimentaron fluctuaciones dignas de mención, también como consecuencia de su escasa presencia, por lo que no resulta aventurado suponer que la acción de las levaduras ha de ser principalmente atribuida a las cuatro especies mencionadas.



**Figura 4.9.** Niveles de variación entre los días inicial y final de la fermentación para las especies levaduriformes dominantes.

Las características de *S. cerevisiae*, en concreto, su tolerancia al etanol y su capacidad para persistir a temperaturas relativamente elevadas (Ramos *et al.*, 2014), así como su elevada capacidad fermentativa (Batista *et al.*, 2015), le permiten ser dominante y persistir en un proceso como el de la fermentación del cacao. De hecho, en numerosos procesos ha sido descrita como la levadura más abundante en el proceso, si no en su totalidad, si al menos en parte de él (Jespersen *et al.*, 2005; Papalexandratou *et al.*, 2013; Arana-Sánchez *et al.*, 2015; De Vuyst y Weckx, 2016), y se le atribuye un papel importante en el grado de calidad que alcanza el producto final (Lefebvre *et al.*, 2012) y en la producción de ciertos precursores organolépticos, especialmente compuestos volátiles (Kostinek *et al.*, 2008; Koné *et al.*, 2016). Así mismo, influye en el desarrollo de la fermentación, a través de la degradación de las pectinas presentes en la pulpa (Schwan *et al.*, 2015), acción que contribuye a disminuir el grado de viscosidad y, por tanto, a facilitar la aireación (Crafack *et al.*, 2103) y a liberar glucosa, que favorece la actividad fermentativa (Ozturk y Young, 2017). Por otra parte, se ha visto que presenta una elevada variedad intraespecífica (Koffi *et al.*, 2017b),



factor que podría explicar en parte su distribución universal en los procesos de fermentación del cacao, independientemente de su localización geográfica y que propiciaría su pertenencia a la denominada microbiota residente del proceso (Meersman *et al.*, 2013).

Al igual que *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae* redujo su presencia en la segunda parte del proceso, a pesar de lo cual se mantuvo aun en niveles suficientemente altos como para seguir ejerciendo cierta influencia en el proceso. Sin duda, durante la primera parte del proceso, y atendiendo a los niveles poblacionales estimados según la abundancia relativa, *H. opuntiae* fue la especie más determinante. Esta levadura ha sido detectada como dominante especialmente en procesos localizados en el continente africano (Daniel *et al.*, 2009; Hamdouche *et al.*, 2015; Jamili *et al.*, 2016), aunque también ha sido destacada en fermentaciones realizadas en otras geografías (Pereira *et al.*, 2013; Romanens *et al.*, 2018), por lo que se postula su distribución universal (Nielsen *et al.*, 2013), aunque no siempre sea la especie más destacada. Tal y como se ha apuntado en el presente estudio, su dominancia se asocia de forma mayoritaria a la fase inicial del proceso (De Vuyst y Weckx, 2016), en la que las condiciones concernientes a temperatura y niveles de etanol resultan más adecuadas a sus características (Cafrack *et al.*, 2013), así como la presencia de elevadas concentraciones de sustratos fermentables generadoras de altas presiones osmóticas, a las que *H. opuntiae* muestra tolerancia (Fernández Maura *et al.*, 2016). Adicionalmente, esta levadura no compete por los nutrientes utilizados por las bacterias del ácido láctico que coexisten en esa etapa (Romanens *et al.*, 2018), por lo que no se ve afectada por su presencia. No obstante, su persistencia con posterioridad a la fase inicial, aunque sea a niveles claramente inferiores, también ha sido reportada (Meersman *et al.*, 2013), lo que pone de manifiesto su adaptación al ecosistema asociado a la fermentación del cacao (Papalexandratou y De Vuyst, 2011), y la convierte en integrante de ese limitado grupo que constituye la microbiota levaduriforme residente. En calidad de miembro destacado de la comunidad eucariota, se ha relacionado positivamente con la formación de precursores organolépticos (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018), y se postula como fundamental para el correcto desarrollo del proceso fermentativo (Papalexandratou *et al.*, 2013; Ooi *et al.*, 2020). De hecho, también es habitual en otros procesos fermentativos de interés en el sector alimentario, tales como la





producción de vino, café o zumos (Fernández Maura *et al.*, 2016), procesos en los que desempeña, al igual que en el caso del cacao y, entre otras propiedades, un importante papel en relación con la síntesis de compuestos de interés en el desarrollo del aroma y el sabor (Luan *et al.*, 2018). Un valor añadido de *H. opuntiae*, al igual que sucede con otros microorganismos típicos de la comunidad microbiana del cacao, reside en su capacidad para actuar como agente de biocontrol frente a especies de hongos filamentosos (Lara-Hidalgo *et al.*, 2017; Romanens *et al.*, 2019), nada deseables en el proceso biotransformativo del cacao como consecuencia de las malas características que le puede inferir, tanto a nivel organoléptico como higiénico-sanitario.

*Kazachstania humilis*, la tercera de las especies destacada en el proceso, no es una especie desconocida en los procesos de fermentación del cacao, pero no suele ostentar papeles dominantes (Arana-Sánchez *et al.*, 2015; Papalexandratou *et al.*, 2019), salvo en localizaciones muy concretas (Schwan y Fleet, 2015). Al igual que sucede en el caso de *S. cerevisiae*, *K. humilis* muestra también una alta diversidad intraespecífica (Huys *et al.*, 2013), lo que puede favorecer su distribución universal. Esta levadura, bien adaptada a entornos de alta acidez (Guerzoni *et al.*, 2013), exhibe también mayor tolerancia al acetato que otras especies habituales en el proceso (Carbonetto *et al.*, 2020), lo que favorece su presencia en estados avanzados de la fermentación, como sucede en el presente caso, en los que la acumulación de este compuesto se ve potenciada por la actividad de las bacterias del ácido acético. Además, sin alcanzar los niveles de *S. cerevisiae*, ha demostrado capacidad para sintetizar ciertos niveles de etanol, así como otros compuestos de interés organoléptico, lo que resalta su potencial importancia en el proceso (Pereira *et al.*, 2012). Otro factor que puede sustentar su presencia en procesos de fermentación del cacao es su coexistencia con otro de los grupos microbianos asociados a la comunidad de este tipo de hábitats, como son las bacterias del ácido láctico (Fleet, 2007). Otra asociación documentada en fermentaciones alimentarias es la establecida entre *Saccharomyces ludwigii*, la última de las levaduras para la que se detectaron abundancias relativas de importancia, y bacterias del ácido acético (Malbaša *et al.*, 2008). Tanto una como otras alcanzaron los mayores niveles de presencialidad en la etapa final del proceso, lo que parece reafirmar esta coexistencia. Esta levadura ya ha sido referenciada como integrante de la microbiota asociada a la fermentación del cacao, si bien no suele encontrarse entre



las especies que juegan un papel primario (Daniel *et al.*, 2009; Takrama *et al.*, 2015). Entre sus características metabólicas se encuentra, como sucede con otras especies propias del proceso, la síntesis de etanol y de otros compuestos con propiedades organolépticas (Romano *et al.*, 2006).

El resto de especies eucariotas detectadas, pertenecientes mayoritariamente a los géneros *Candida* y *Pichia*, además de *Ambrosyozima*, *Ceratocystis*, *Issatchenkia*, *Saccharomycopsis* y *Wickerhamomyces*, se encuadran dentro de la microbiota habitualmente descrita en relación con este tipo de hábitats (Ho *et al.*, 2014; Schwan *et al.* 2014; De Vuyst y Weckx, 2016; Gutiérrez, 2017), aunque muchas de sus actuaciones se puedan considerar como secundarias. Otras especies, como por ejemplo el hongo filamentoso *Fusarium solani*, o la levadura *Malassezia restricta*, integrante de la microbiota epidérmica y que, en determinados sujetos actúa como agente estimulante de dermatitis (Sugita *et al.*, 2004), probablemente deban su presencia a las condiciones específicas del entorno en el que se desarrolló el proceso y al contacto humano. De hecho, en el caso de *Fusarium*, estudios previos han referenciado la presencia de especies pertenecientes a este género en la parte final de la fermentación (Mounjoeunpou *et al.*, 2008; Copetti *et al.*, 2011b) y aunque muchas de ellas sintetizan toxinas con capacidad para afectar a seres humanos y animales, con lo que su presencia supondría un importante riesgo, no es el caso de *F. solani* (Munkvold, 2017).

#### 4.3.2. Estudio de la población procarriota asociada al proceso fermentativo.

Las condiciones con las que comienza el proceso fermentativo de los granos de cacao favorecen el dominio inicial de especies levaduriformes. Sin embargo, a medida que estas van actuando, se produce un cambio en dichas condiciones, que propicia el paso de una microbiota preferentemente eucariota a otra dominada por especies procarriotas (Agyrifo *et al.*, 2019). En una primera fase, el grupo bacteriano que se adapta en mayor medida al nuevo entorno, y que incluso coexiste con las levaduras es el de las bacterias del ácido láctico (BALs), cuya acción se traduce, además de en la síntesis de importantes cantidades de ácido láctico, en la producción de etanol, ácido acético, glicerol, manitol, acetaldehído, acetoína, diacetilo y butanodiol (Ho *et al.*, 2015). Glucosa, fructosa y ácido cítrico son los



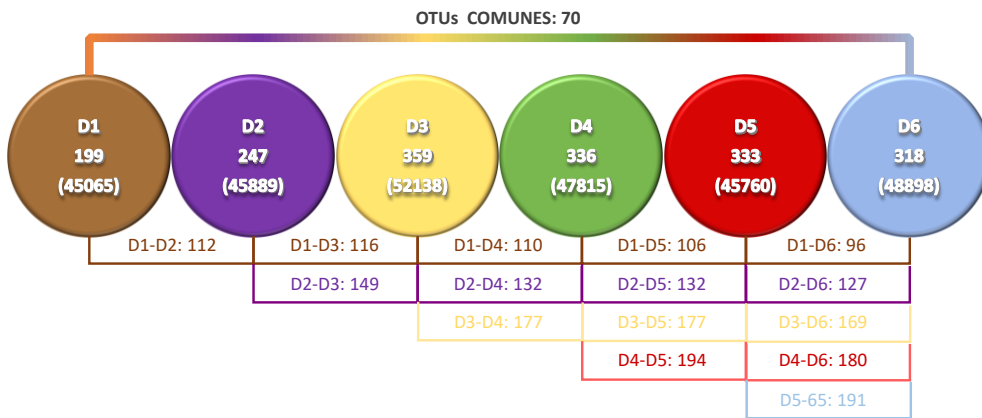
sustratos que, de forma mayoritaria sustentan estas actividades metabólicas (Lefeber *et al.*, 2011a). El cambio paulatino a condiciones aeróbicas, propiciado por la creciente degradación de la pulpa y su drenaje (Lefeber *et al.*, 2010), y la acumulación de algunos de los compuestos citados, tales como el ácido láctico o el manitol, estimulan el desarrollo de un tercer grupo microbiano, el de las bacterias del ácido acético (BAAs) (De Vuyst *et al.*, 2015), las cuales además oxidan parte del etanol acumulado a partir del metabolismo levaduriforme (Camu *et al.*, 2007). Los productos que resultan de estas actividades son, básicamente, ácido acético y acetoína (Illeghems *et al.*, 2016).

La presencia en concentraciones importantes de ciertos compuestos, principalmente ácido acético y etanol, en conjunción con las relativamente elevadas temperaturas que derivan de la actividad metabólica, propician la muerte del embrión, lo que a su vez promueve la liberación de contenidos intracelulares susceptibles de ser transformados por acción de enzimas hidrolíticas en precursores organolépticos (Moreira *et al.*, 2013). Paralelamente, se reduce la presencia de compuestos típicos del cacao que confieren características negativas, principalmente polifenoles (Wollgast y Anklam, 2000; Balogu y Onyeagba, 2017). Resulta, por tanto, obvia la trascendencia de la comunidad procariota en las propiedades finales que presenta el cacao fermentado y la influencia que ejerce en la calidad del chocolate generado a partir de él. Pero, tal y como se apuntó con respecto a la comunidad levaduriforme, existen diversos factores (variedad de cacao, localización geográfica, tipo de fermentación, etc.) que determinan la composición concreta de la población bacteriana, independientemente de que existan ciertas similitudes genéricas en relación con la presencia de ciertas especies (Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020). Y al igual que en el caso de la microbiota eucariota, no se ajusta a la realidad asumir una comunidad bacteriana única en relación con la biotransformación del cacao, lo que refuerza la necesidad de investigar proceso a proceso la importancia relativa de cada especie, no sólo para conocer de forma específica la fermentación objeto de estudio, sino para contribuir a incrementar la información global referida a este entorno y establecer de esta manera la existencia o no de una comunidad “residente”.

El perfil evolutivo en lo concerniente al número de OTUs detectados a lo largo del proceso se muestra en la Figura 4.10. En el gráfico se observa claramente como



la cantidad de OTUs procariotas ascendió desde el mínimo detectado al inicio de la fermentación (199), hasta su valor máximo asociado a las muestras procedentes de las muestras correspondientes al tercer día de biotransformación (359). Los niveles posteriores, aunque ligeramente inferiores, se mantuvieron en niveles cercanos a los máximos. Este patrón confirma las fases habitualmente diferenciadas en la fermentación del cacao, según las cuales la comunidad procariota adquiere mayor protagonismo tras la actuación de la comunidad levaduriforme, dominante al inicio del proceso (Schwan *et al.*, 2015; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019).



**Figura 4.10.** Número de OTUs procariotas detectado en cada uno de los días de fermentación y OTUs compartidos entre distintos días. Entre paréntesis se muestra el número de lecturas asociado en cada caso.

El número total de OTUs diferentes detectados a lo largo de todo el proceso fue de 829, una cifra superior a la encontrada en procesos similares (Serra *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2020), lo que dibuja un proceso de una gran riqueza bacteriana desde una perspectiva global. Por otra parte, el hecho de que solo 70 de esos más de 800 OTUs estuvieran presentes de forma continua refleja el elevado dinamismo de la comunidad procariota, si bien la evolución se produce de forma escalonada, como apunta el hecho de que el número de OTUs compartidos entre muestreos disminuyó de forma inversamente proporcional a la distancia existente entre dichos muestreos. No obstante, un mayor número de OTUs compartidos no necesariamente implica un mayor nivel de semejanza entre las dos muestras comparadas, dado que en tal consideración también es



obligatorio tener en cuenta el número absoluto de OTUs presentes en cada una de ellas, tal y como hace el índice cualitativo de Sorensen-Dice (Tabla 4.4.). De acuerdo con los valores encontrados para este índice, el nivel de semejanza existente entre las distintas muestras osciló entre el 40% y el 50%, con la excepción de la fase final, los días cuatro, cinco y seis, para los cuales el número de OTUs compartido hizo ascender el grado de semejanza hasta el 55-59%. Desde una perspectiva cuantitativa, en cambio, el hecho de compartir un mayor número de OTUs no se correspondió con un mayor nivel de similitud. La toma en consideración de las abundancias relativas de cada una de las especies puso de manifiesto una mayor semejanza entre las muestras correspondientes a la primera parte del proceso que entre las muestras procedentes de la parte final, lo que parece apuntar a la existencia de mayor dinamismo en ese tramo final en lo que respecta a la comunidad bacteriana.

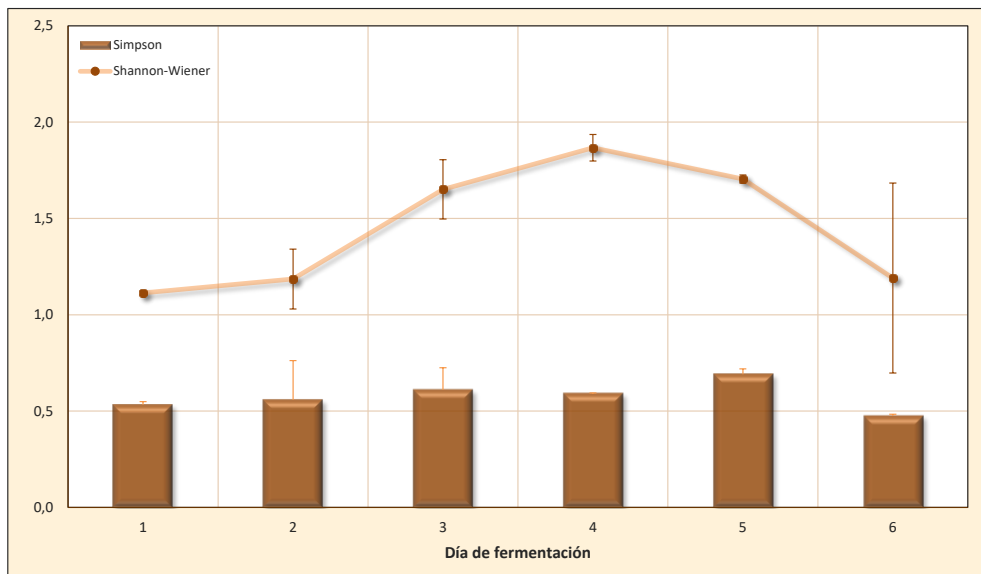
**Tabla 4.4.** Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos procariotas.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
D1		0,84±0,13	0,69±0,01	0,57±0,03	0,36±0,01	0,11±0,07
D2	0,50±0,03		0,81±0,09	0,69±0,07	0,44±0,03	0,15±0,06
D3	0,42±0,05	0,49±0,01		0,80±0,04	0,49±0,04	0,21±0,09
D4	0,41±0,05	0,45±0,02	0,51±0,01		0,62±0,02	0,36±0,09
D5	0,40±0,05	0,45±0,02	0,51±0,05	0,58±0,01		0,68±0,09
D6	0,37±0,05	0,45±0,02	0,50±0,04	0,55±0,02	0,59±0,03	

Los cambios experimentados por las poblaciones microbianas presentes a lo largo de la fermentación se han atribuido de forma mayoritaria a aspectos de carácter nutricional (Lee *et al.*, 2019). Recientemente, y complementando esta argumentación, se ha postulado que la dominancia cronológica de determinados grupos microbianos puede también estar asociada a fenómenos de quorum sensing y, especialmente, quorum quenching (Almeida *et al.*, 2020). Estos eventos, detectados para diversas especies de importancia en la fermentación del cacao, tanto eucariotas como procariotas, adquirirían más importancia transcurridas las primeras 48 h del proceso y facilitarían, en conjunción con criterios nutricionales, efectos estimulatorios o inhibitorios de determinadas poblaciones bacterianas.



Este perfil bacteriano, según el cual la comunidad bacteriana se mostró más estática al inicio del proceso en contraste al mayor dinamismo detectado con posterioridad quedó confirmado con los valores encontrados para los índices de biodiversidad, especialmente el índice de Shannon-Wiener (Figura 4.11.). Sin embargo, y en términos absolutos, no se puede decir que el proceso aquí descrito presente una elevada diversidad, dado que en ningún caso los niveles fueron superiores a dos. No obstante, coinciden con lo descrito para otros procesos de esta naturaleza, en los que el rango fluctúa entre 0,5 y 4,5 (Mota-Gutiérrez et al., 2018; Serra *et al.*, 2019; Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020).



**Figura 4.11.** Diversidad procarionota observada a lo largo del proceso fermentativo, expresada según los índices de Shannon-Wiener y Simpson.

En cualquier caso, y aunque los niveles de diversidad sean más o menos elevados, el número de organismos que desempeñan un papel determinante suele ser escaso, por lo que adquiere más importancia la presencia de tales especies que el hecho de que exista una amplia variedad de especies. En relación con esas especies dominantes, los valores encontrados para el índice cualitativo de Sorensen-Dice restringido a los OTUs presentes en al menos un 0,5% en algunas de las muestras (Tabla 4.5.), muestran la práctica inexistencia de



variabilidad a lo largo del proceso. Así, la composición de la comunidad procariota dominante, en lo que respecta a identidades, permaneció constante a lo largo de todo el proceso. Sin embargo, eso no implicó que el dominio en las distintas etapas correspondiese a las mismas bacterias, tal y como demuestra el índice cuantitativo de Sorensen-Dice. En este caso, los valores encontrados dibujan un proceso profundamente cambiante, de manera que, aunque los OTUs presentes fuesen los mismos durante toda la fermentación, la abundancia relativa de cada uno de ellos varió de forma considerable en cada una de las etapas. Así, un nivel de homología cualitativa del 91% entre las muestras correspondientes al primer y último día de proceso, se traduce en sólo un 11% de semejanza cuando se consideran términos cuantitativos. Sin duda, estos resultados definen un proceso en el que los participantes bacterianos se encuentran ya en el material de partida y permanecen a lo largo de todo el proceso, aunque el peso relativo de cada uno de los integrantes de esa comunidad evoluciona de acuerdo con la cronología del proceso.

**Tabla 4.5.** Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos procariotas, considerando exclusivamente OTUs con abundancias relativas por encima de 0,5% en al menos una muestra.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
D1		0,85±0,14	0,71±0,02	0,59±0,04	0,37±0,01	0,11±0,06
D2	0,97±0,03		0,84±0,10	0,71±0,08	0,44±0,03	0,14±0,07
D3	0,97±0,02	1,00±0,08		0,83±0,04	0,50±0,04	0,20±0,09
D4	0,94±0,03	0,97±0,06	0,97±0,04		0,64±0,02	0,35±0,09
D5	0,94±0,03	0,97±0,06	0,97±0,06	1,00±0,02		0,69±0,09
D6	0,91±0,04	0,94±0,05	0,94±0,02	0,97±0,05	0,97±0,05	

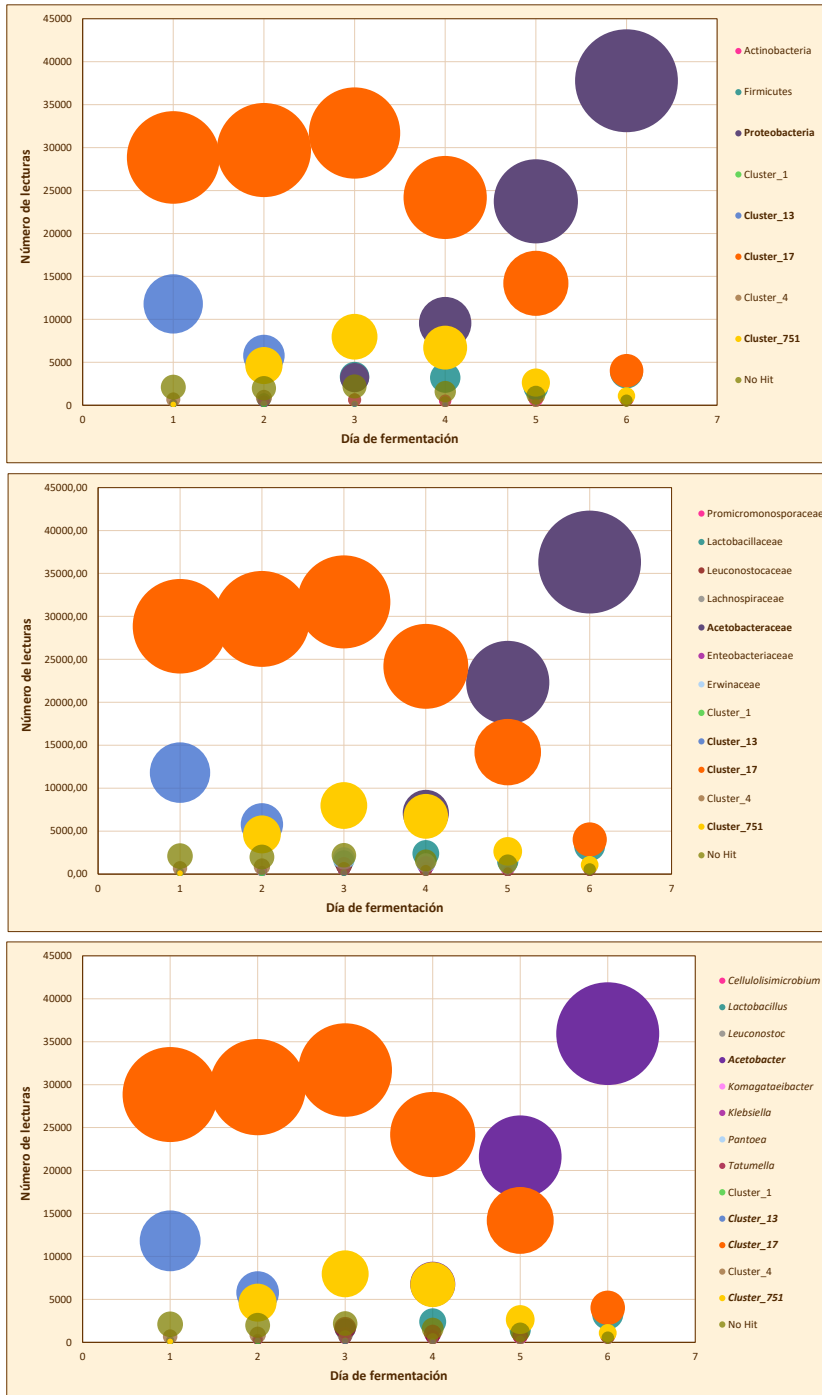
A pesar de la mayor o menor diversidad descrita en relación con la microbiota procariota, la mayor parte de la bibliografía disponible coincide en señalar la dominancia de un número bajo de especies (Ardhana y Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007; García-Armisen *et al.*, 2010; Hamdouche *et al.*, 2019). Se puede afirmar que, de forma casi exclusiva, esas especies dominantes pertenecen a los grupos de las bacterias del ácido láctico y acético (Lefeber *et al.*, 2011a; Papalexandratou *et al.*, 2011b), aunque puntualmente, bacterias pertenecientes a otros grupos puede llevar a cabo acciones de interés o alcanzar abundancias



relativas de cierta relevancia, como sucede con algunos representantes del género *Bacillus* (Yao *et al.*, 2105) o del grupo de las enterobacterias (García-Armisen *et al.*, 2010).

En la Figura 4.12. se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la asignación taxonómica de los OTUs dominantes (presencias superiores al 0,5% en al menos alguna de las muestras) a nivel de filo, familia y género, así como sus niveles de presencialidad absoluta (número total de lecturas) y relativa (porcentaje de lecturas con respecto al total obtenido para la muestra). En lo que respecta al nivel taxonómico superior, sólo tres filos tuvieron representación entre las especies dominantes: Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria. No obstante, sólo las proteobacterias alcanzaron niveles de presencialidad realmente dominantes, en especial en la parte final del proceso, etapa en la que destacaron de manera sustancial sobre los representantes de cualquier otro filo. Integrantes de los filos Firmicutes y, sobre todo, Actinobacteria, aparecieron en concentraciones considerablemente inferiores, sin llegar a despuntar en ninguno de los días de fermentación. En este último caso, la representatividad se limitó a un solo género, *Cellulosimicrobium*, mientras que *Lactobacillus* y *Leuconostoc* fueron los géneros presentes entre los mayoritarios asignados al filo Firmicutes. En cambio, las proteobacterias mostraron mayor variedad, con miembros pertenecientes a los géneros *Komagataeibacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Tatumella* y, sobre todo, *Acetobacter*. De acuerdo con los resultados recogidos en literatura, la comunidad bacteriana en los procesos de fermentación del cacao suele estar dominada por miembros de los filos Proteobacteria y Firmicutes, mientras que la presencia de los pertenecientes a Actinobacteria suele ser testimonial (Illegghems *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Bortolini *et al.*, 2016). *Lactobacillus* y *Leuconostoc* forman parte de las poblaciones Gram positivas habitualmente asociadas a la fermentación del cacao (Serra *et al.*, 2019), proceso en el que, como ya se ha referido anteriormente, las Bacterias del Ácido Láctico, grupo en el que ambos géneros están incluidos, desempeñan un papel protagonista (De Vuyst y Leroy, 2020). En el caso del filo Proteobacteria, el grupo más influyente suele ser el de las Bacterias del Ácido Acético, cuyo principal representante es *Acetobacter*, género determinante en el proceso biotransformativo del cacao (Pelicaen *et al.*, 2019).

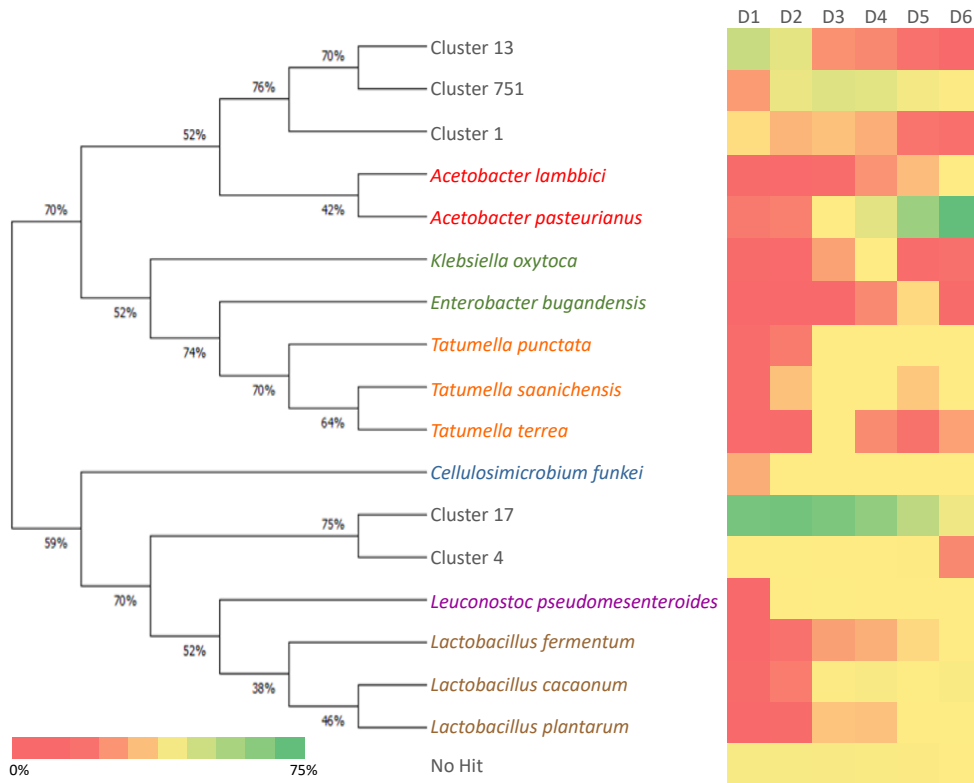




**Figura 4.12.** Abundancias absolutas (número de lecturas) y relativas (tamaño de burbuja) de los OTUs procariontas dominantes para distintos niveles taxonómicos (filo, familia y género).



La asignación de los OTUs a nivel de especie, junto con la evolución de sus abundancias relativas, se muestra en la Figura. 4.13. La observación de este gráfico permite deducir el número limitado de especies bacterianas que dominaron el proceso. Así, únicamente cuatro fueron las especies que, en algún momento de la fermentación sobrepasaron el 10% de abundancia relativa. Curiosamente, sólo una de ellas pudo ser identificada a partir de las secuencias depositadas en las bases de datos utilizadas, quedando las tres restantes sin asignar a ningún nivel taxonómico.



**Figura 4.13.** Relaciones evolutivas inferidas de las secuencias pertenecientes a las especies procarionas con abundancias relativas superiores al 0,5% en al menos una de las muestras y la evolución cronológica de sus abundancias relativas (*Acetobacteraceae*; *Enterobacteriaceae*; *Erwiniaceae*; *Promicromonosporaceae*; *Leuconostocaceae*; *Lactobacillaceae*).

El OTU cuya secuencia encontró correspondencia con las bases de datos fue *Acetobacter pasteurianus*, bacteria perteneciente al grupo de las Bacterias del Ácido



Acético, y que se asocia habitualmente al proceso de fermentación del cacao (Papalexandratou *et al.*, 2013; Moens *et al.*, 2014; Visintin *et al.*, 2016; Pelicaen *et al.*, 2019), hasta el punto de que se ha propuesto numerosas veces como especie candidata para un potencial consorcio aplicado como inóculo (Lefeber *et al.*, 2012; Craffack *et al.*, 2013; Illegghems *et al.*, 2015). En el proceso aquí descrito, su presencia fue testimonial en la fase inicial, inferior al 1%, mientras que en la final, su abundancia relativa se fue incrementando de forma considerable hasta superar el 72%. Esta evolución concuerda con lo descrito para esta especie (Camu *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007b; García-Armisen *et al.*, 2010), cuyo protagonismo en el proceso se centra de forma mayoritaria en la segunda mitad, cuando las condiciones nutricionales y ambientales le resultan más favorables. De forma concreta, esta especie puede utilizar los sustratos derivados de la actividad metabólica de las especies que le preceden, tales como etanol, manitol y ácido láctico (Moreira *et al.*, 2013). Su acción, además, resulta de gran importancia, ya que propicia las condiciones, incremento de temperatura y acumulación de ácido acético, que dan lugar a la muerte de los embriones (Lefeber *et al.*, 2011a). Esta última acción, como ya se ha citado con anterioridad favorece la liberación de contenidos intracelulares, los cuales desempeñan un papel primario en el desarrollo de las propiedades organolépticas.

Los tres restantes OTUs para los que se detectaron abundancias relativas de importancia no pudieron ser asignados a ninguna afiliación conocida, tal y como se ha comentado previamente. Sin embargo, el análisis de sus relaciones evolutivas con respecto a los restantes OTUs seleccionados por su nivel de presencialidad, los asocia a los grupos dominantes del proceso. Así, los OTUs identificados como Clúster 13 y Clúster 751 agruparon con representantes del género *Acetobacter*, mientras que el OTU 17 lo hizo con miembros de las Bacterias del Ácido Láctico. La ausencia de referentes en las bases de datos no es un hecho tan infrecuente ya que, a pesar de su constante enriquecimiento, la enorme diversidad procariota que se presume propicia que un importante porcentaje de ella aun permanezca inaccesible (Federhen, 2012). Por otra parte, no siempre se llega a definir una afiliación taxonómica estricta, quedando la identificación limitada en algunos casos a la integración en un grupo o clúster bacteriano específico (De Vuyst *et al.*, 2008; Kostinek *et al.*, 2008). En este caso, las relaciones filogenéticas sitúan los OTUs no identificados relativamente cercanos a grupos procariotas de gran importancia en la biotransformación del cacao. El clúster 17, relacionado con las Bacterias del Ácido



Láctico, mostró niveles de abundancia relativa considerablemente elevados, especialmente en la primera parte del proceso, hasta el punto de que fue la especie dominante durante los primeros cuatro días. En este sentido, parece suplir la escasa presencia de los representantes oficialmente asignados al grupo de las BALs, cuyos niveles durante la primera parte del proceso fue testimonial y solo en el segundo tramo de la fermentación uno de ellos, *Lactobacillus cacaonum*, fue detectado en porcentajes relativamente importantes, entre 1,5% y 4,2%. *Lactobacillus* es el género más comúnmente relacionado con la fermentación del cacao, aunque son las especies *L. plantarum* y *L. fermentum* las que se destacan como conductoras del proceso entre las BALs (Lee *et al.*, 2019), con la primera dominando el inicio de la fermentación y la segunda la parte final (García-Armisen *et al.*, 2010). *L. cacaonum*, bacteria descrita por primera vez hace relativamente poco tiempo (De Bruyne *et al.*, 2009), se suele considerar una especie secundaria, tanto por los niveles en los que se referencia como por asiduidad en el proceso (Schwan *et al.*, 2015). Sin embargo, las propiedades que caracterizan a esta especie permiten su adaptación a las condiciones que acompañan al proceso biotransformativo del cacao: microaerofilia, tolerancia a la acidez y al etanol y capacidad para utilizar fructosa (De Vuyst y Weckx, 2016; Romanens *et al.*, 2018), lo que la habilita para ser potencialmente importante en la fermentación. Adicionalmente, sus capacidades metabólicas también le permiten contribuir a la generación de compuestos organolépticos, tales como la acetoína (Lefeber *et al.*, 2011b). Por otra parte, la presencia de *L. cacaonum* en las semillas del cacao, al contrario de lo que se supone para la mayor parte de la microbiota existente en el inicio de la fermentación, puede no tener su origen en la etapa post-cosecha, tal y como ha apuntado algún autor (Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020), que postula su asociación directamente con la planta y no con el hábitat del entorno fermentativo.

La última de las especies perteneciente al grupo de las BALs, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, alcanzó sus niveles máximos, con abundancias relativas entre 1% y 1,7%, en la parte intermedia del proceso. Al igual que otros miembros del grupo, *L. pseudomesenteroides* puede desarrollarse en presencia de niveles relativamente altos de etanol y muestra mayor capacidad de acidificación que los habituales miembros de *Lactobacillus* asociados al proceso (Visintin *et al.*, 2016). Como ellos, también puede utilizar fructosa y se desarrolla de forma óptima en condiciones de microaerofilia (Romanens *et al.*, 2018). Probablemente la conjunción de todas estas

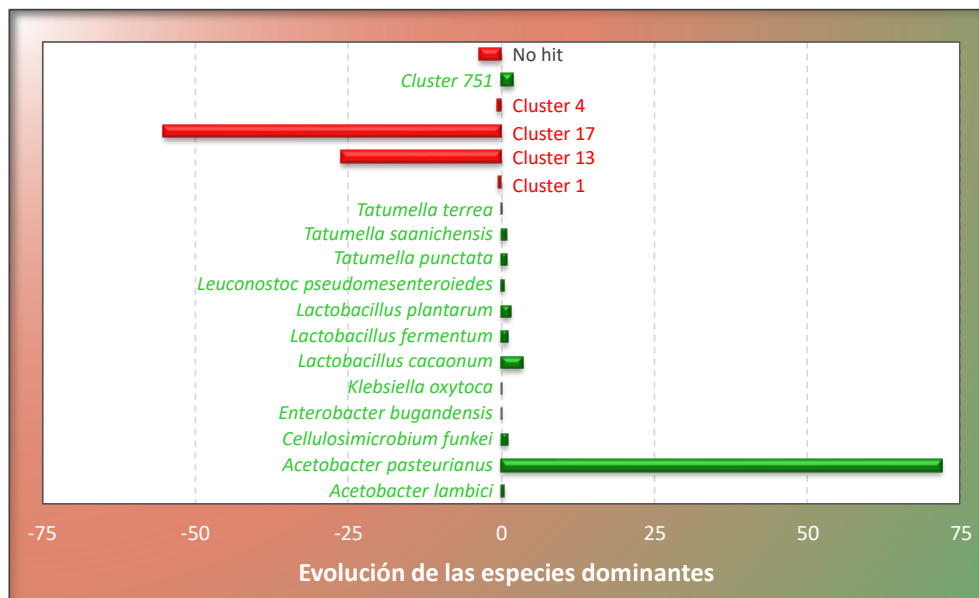


características sea la que propicia su mayor abundancia en la primera parte del proceso y su posterior descenso en la parte final, lo que propicia que este sea el perfil evolutivo de la especie en la mayoría de procesos (Camu *et al.*, 2007; Papalexandratou *et al.*, 2013; Romanens *et al.*, 2018). Desde una perspectiva biosintética, *L. pseudomesenteroides* contribuye a la formación de manitol (Wiselink *et al.*, 2002), uno de los sustratos que sustenta el desarrollo de las Bacterias del Ácido Láctico (Ho *et al.*, 2015) y, en especial, de *Acetobacter pasteurianus* (Camu *et al.*, 2008b), principal representante de este grupo en el proceso aquí descrito.

El grupo de OTUs con abundancias relativas superiores al 0,5% se completó con especies asignadas al filo Proteobacteria, además de *Cellulosimicrobiun funkei*, perteneciente al filo Actinobacteria. Esta última fue la que mostró niveles de presencialidad más elevados en este último grupo, con valores en tono al 1,4% en la parte final del proceso. Esta actinobacteria muestra potencial para degradar polímeros vegetales (Wang *et al.*, 2018), por lo que no es sorprendente encontrarla referenciada en procesos en los que se utilizan sustratos portadores de este tipo de compuestos (Kim *et al.*, 2016), como es el caso del cacao, si bien hasta el momento no se conoce su presencia en este proceso. Adicionalmente, esta especie ha sido propuesta como agente de control frente a toxinas usuales en el sector alimentario, como es la aflatoxina B<sub>1</sub> (Kim *et al.*, 2017), toxina de origen fúngico que puede aparecer en el cacao y sus derivados fermentados (Copetti *et al.*, 2011). Entre las proteobacterias no pertenecientes al grupo de las BAAs, su presencia en términos cuantitativos no fue especialmente relevante, ya que sólo sobrepasaron de forma puntual el 1% de abundancia relativa. Se detectaron cinco especies diferentes pertenecientes al grupo de las Enterobacterias, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter bugandensis*, y tres representantes del género *Tatumella* (*T. punctata*, *T. saachinensis* y *T. terreia*). Tanto unas como otras suelen formar parte de la microbiota secundaria asociada a la fermentación del cacao (Osturk y Young, 2017; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019; Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020), aunque el género *Tatumella* se ha asociado a las fermentaciones en las que las variedades utilizadas pertenecen al denominado grupo del cacao fino o de aroma (Papalexandratou *et al.*, 2019), como es el caso. El papel que estas especies pueden jugar no está tan definido como en el caso de los grupos que protagonizan el proceso (levaduras, BALs y BAAs). Se postula que pueden contribuir al consumo de citrato, así como en el proceso de pectinólisis (Illegheems *et al.*, 2015) y, en el caso de *Tatumella*, a la producción de ácido glucónico



(Lefeber et al., 2011a; Papalexandratou *et al.*, 2011a). Este último compuesto parece mostrar capacidad para penetrar en el interior de las semillas (Papalexandratou *et al.*, 2019), junto con el ácido acético y el etanol, por lo que podría contribuir también en el proceso de liberación de los contenidos intracelulares, tan importantes en la formación de las propiedades organolépticas del cacao. Adicionalmente, también puede ser utilizado como sustrato por las BAAs (Schwan *et al.*, 2015) e incluso por algunas levaduras (Peinado *et al.*, 2003), aunque las primeras también pueden sintetizarlo en aquellos casos en los que existe una elevada disponibilidad de glucosa (Moens *et al.*, 2014). Desde otra perspectiva, no es deseable la acumulación de cantidades importantes de este compuesto, dado que, por un lado, limita la disponibilidad de azúcares fermentables para actividades más deseables y, por otro, incrementa la acidez a niveles no adecuados (De Vuyst y Weckx, 2016), por lo que productos finales con altos niveles de este ácido se suelen asociar a procesos inusuales en los que las comunidades microbianas y su orden de sucesión se alejan de lo esperado (Papalexandratou *et al.*, 2011a). Así, la presencia de miembros del género *Tatumella* en bajas proporciones se puede considerar, hasta cierto punto, como un factor positivo en el proceso.



**Figura 4.14.** Niveles de variación entre los días inicial y final de la fermentación para las especies procariotas dominantes.



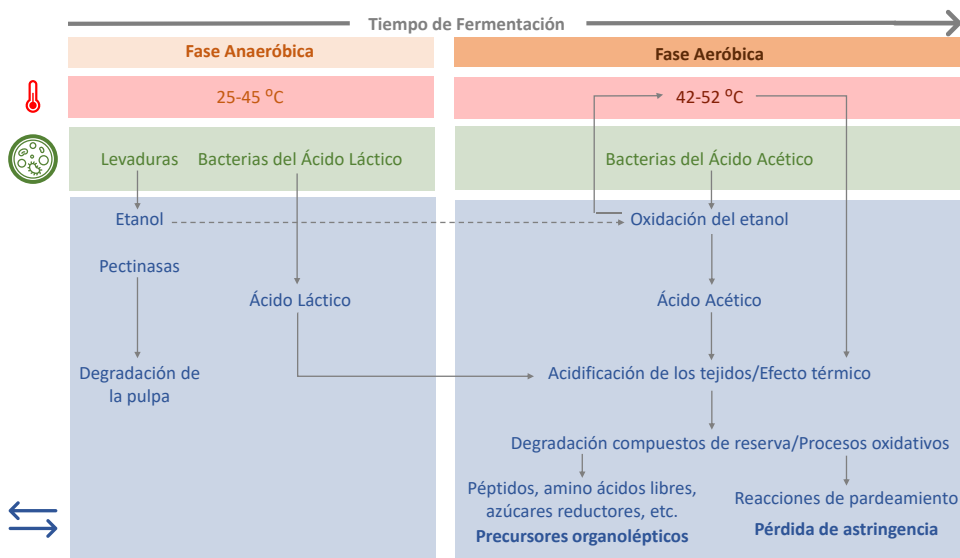
La evolución poblacional de las especies dominantes, recogida en la Figura 4.14., ilustra de forma clara que el proceso mostró un alto grado de estabilidad en lo que respecta a la comunidad procariota presente en los días inicial y final del proceso, con la clara excepción de *A. pasteurianus* y los OTUs no identificados correspondientes a los clústeres 13 y 17. El perfil mostrado en ambos casos fue opuesto, de manera que mientras la BAA pasó de concentraciones testimoniales al inicio de la fermentación a suponer más del 70% de la población bacteriana en el día final, los dos OTUs no identificados desaparecieron, en el caso del clúster 13, o redujeron su presencia hasta sólo un octavo de la abundancia inicial, en el del clúster 17. Previamente se ha comentado, a partir del análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies detectadas, que el clúster 13 agrupa con las BAAs, mientras que el clúster 17 lo hace con las BALs. Atendiendo a este resultado, se puede postular la sustitución del clúster 13 por *A. pasteurianus*, probablemente como consecuencia de la mejor adaptación de ésta a las condiciones que se van dando a medida que avanza la fermentación, tal y como ratifican las numerosas referencias en las que aparece citada y que la destacan como una de las especies más importantes en la biotransformación del cacao (Illegheems *et al.*, 2013; Moens *et al.*, 2014; Visintin *et al.*, 2016; De Roos y De Vuyst, 2018; Pelicaen *et al.*, 2019). En el caso del clúster 17, la disminución observada puede adjudicarse a su potencial pertenencia al grupo de las BALs, que suelen desempeñar un papel más destacado en las fases iniciales del proceso (Viesser *et al.*, 2020).

#### 4.3.4. Relaciones microbiota/parámetros físico-químicos.

Las transformaciones que experimenta el cacao durante el proceso fermentativo y, por tanto, la adquisición de características que influyen sobre la calidad del producto final y sus derivados, están condicionadas por diversos factores. La significancia de tales factores adquiere proporciones relevantes como consecuencia de la falta de homogeneidad asociada al proceso, dado que, en un porcentaje muy elevado, tales procesos se llevan a cabo de forma artesanal y con un bajo grado de tecnificación (Santander Muñoz *et al.*, 2020). La variedad de cacao, la localización geográfica, la metodología de procesado o las prácticas post-cosecha determinan en gran medida el transcurrir de la fermentación y, en especial, la naturaleza cuali y cuantitativa de la comunidad microbiana actuante (Lee *et al.*,



2019). Esta, a su vez, es responsable de los cambios acaecidos durante el periodo de fermentación, por lo que la concurrencia de las adecuadas poblaciones microbianas en el momento correcto propicia la desaparición de los compuestos indeseables y la acumulación de los deseables (Aprotosoia *et al.*, 2016; Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020). Así, la actividad de dichos microorganismos provoca, por una parte, la eliminación de sustratos que confieren al cacao su típico sabor astringente y, por otra, facilitan la modificación de macromoléculas y la posterior acumulación de precursores de compuestos organolépticos (Kadow *et al.*, 2015). Existe, por tanto, una relación de interdependencia entre microorganismos y compuestos (Figura 4.15.).



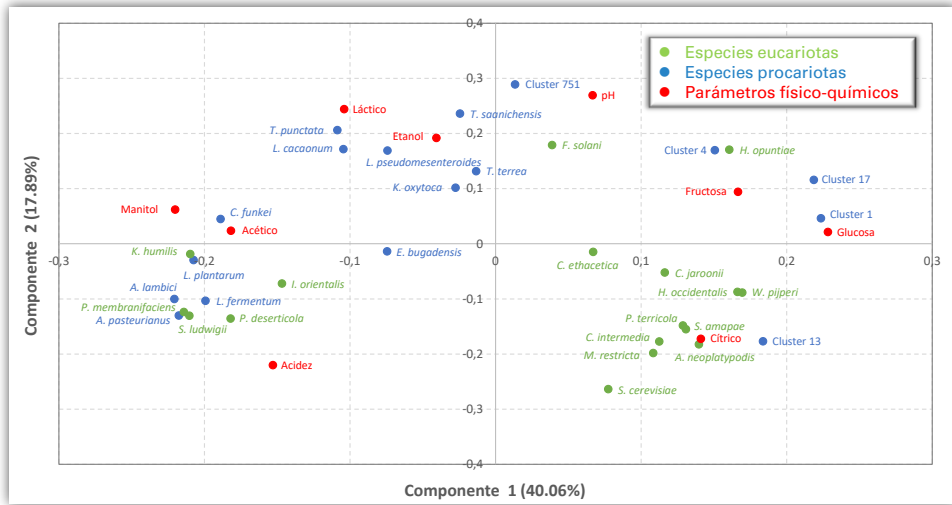
**Figura 4.15.** Comunidades microbianas y eventos bioquímicos acaecidos durante el proceso de fermentación del cacao (adaptado de Kadow *et al.*, 2015).

Como en todos los procesos en los que se establecen relaciones de dependencia entre los distintos elementos participantes, el sentido de la relación no es la misma en todos los casos. Incluso, no todos los elementos muestran dependencia entre sí. En este sentido, las herramientas de análisis estadístico permiten discernir ambas casuísticas, la existencia real de correlaciones pareadas





entre elementos y el sentido de dichas correlaciones, así como el establecimiento de grupos constituidos por elementos que ejercen efectos similares, además de su potencial influencia en el proceso.



**Figura 4.16.** Análisis de componentes principales de los parámetros microbianos y físico-químicos estudiados durante el proceso.

El Análisis de Componentes Principales, una de las herramientas estadísticas citadas, muestra que la contribución acumulada de los dos componentes principales alcanzo un 57,95% (Figura 4.16.). Los elementos con mayor grado de influencia en el caso del componente principal 1 fueron Glucosa y Manitol, entre los parámetros físico-químicos, y los Clústeres 17 y 1 y las dos especies de *Acetobacter*, *lambici* y *pasteurianus*, entre las variables microbianas. En el caso del componente 2, las variables con mayor grado de contribución fueron pH, Ácido láctico y Acidez titulable, y *Saccharomyces cerevisiae*, Clúster 751 y *Tatumella saanichensis* entre los parámetros físicos-químicos y microbianos, respectivamente. Sin duda, este análisis pone claramente de manifiesto el destacado papel que desempeñaron en el proceso variables de tipo metabólico, químico y microbiano. Entre las primeras, glucosa y manitol ejercieron una clara influencia, la glucosa sustentando la actividad microbiana, y el manitol como producto de ésta. En el caso de variables de carácter



químico, las tres más relevantes de acuerdo con el análisis realizado se relacionaron con los niveles de acidez, lo que ratifica la importancia de este parámetro en el desarrollo del proceso (Guehi *et al.*, 2010b; Kadow *et al.*, 2015). Finalmente, y en lo que respecta a la comunidad microbiana, además de los OTUs sin asignación taxonómica, se significaron tres microorganismos claramente vinculados con la fermentación del cacao, como es el caso de miembros del género *Acetobacter* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las primeras, caracterizadas por la producción de ácido acético y el aumento de la temperatura, resultan esenciales en la parte final del proceso y condicionan diversos eventos fundamentales en etapas posteriores a la fermentación (Romero-Cortés *et al.*, 2012). *S. cerevisiae*, en cambio, resulta más determinante en la fase inicial del proceso, periodo en el que participa de forma destacada en la producción de etanol (Batista *et al.*, 2015), sustrato vital para el posterior desarrollo de las BAAs (Ramos *et al.*, 2014), aunque también contribuye a la producción de compuestos organolépticos (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018).

El análisis de correlaciones (Tabla 4.6.) permite conocer las interdependencias existentes entre los distintos elementos de interés en el proceso, así como la significancia o no de la evolución cronológica de cada uno de ellos. En relación con este último aspecto, los valores encontrados para el coeficiente de Spearman ayudaron a diferenciar entre aquellos parámetros que mostraron una tendencia clara y definida durante el desarrollo del proceso y los que no variaron o lo hicieron sin adecuarse a un perfil evolutivo concreto. En este sentido, destaca la fuerte correlación negativa existente entre el tiempo y los tres compuestos analizados (ácido cítrico, glucosa y fructosa) a los que se les asigna el papel de fuentes nutricionales. El sentido inverso de dicha correlación confirma su reducción a medida que la fermentación transcurría, lo que confirma la utilización de los tres compuestos por parte de la microbiota presente. En cambio, manitol y ácido acético, dos de los compuestos atribuidos a la actividad biosintética microbiana, mostraron una relación directa, significativa al 99%, con la cronología del proceso. Por el contrario, los dos restantes compuestos generados por la microbiota propia del proceso, ácido láctico y etanol, no se relacionaron de forma significativa con el tiempo, probablemente como consecuencia de que su producción se asocia mayoritariamente a la fase inicial del proceso y son posteriormente utilizados por las poblaciones dominantes en la fase final, bacterias del ácido acético, lo que da lugar a un perfil cambiante a lo largo del proceso.



**Tabla 4.6.** Matriz de correlaciones de Spearman. En verde, correlaciones positivas y en rojo, negativas; mayor intensidad de color representa significancia a  $P < 0,01$  y menor a  $P < 0,05$ .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44													
Día	1																																																								
pH	2																																																								
Acidez	3																																																								
Etanol	4																																																								
Acido lactico	5																																																								
Acido acetico	6																																																								
Acido citrico	7																																																								
Fructosa	8																																																								
Glucosa	9																																																								
Manitol	10																																																								
<i>I. orientalis</i>	11																																																								
<i>P. membranifaciens</i>	12																																																								
<i>P. terricola</i>	13																																																								
<i>P. deserticola</i>	14																																																								
<i>K. humilis</i>	15																																																								
<i>S. cerevisiae</i>	16																																																								
<i>S. ludwigii</i>	17																																																								
<i>H. occidentalis</i>	18																																																								
<i>H. opuntiae</i>	19																																																								
<i>A. neoplatypodis</i>	20																																																								
<i>S. amapae</i>	21																																																								
<i>W. pipperi</i>	22																																																								
<i>C. intermedia</i>	23																																																								
<i>C. jaronii</i>	24																																																								
<i>C. ethacetica</i>	25																																																								
<i>F. solani</i>	26																																																								
<i>M. restricta</i>	27																																																								
<i>A. lambici</i>	28																																																								
<i>A. pasteurianus</i>	29																																																								
<i>C. funkei</i>	30																																																								
<i>E. bugadensis</i>	31																																																								
<i>K. oxytoca</i>	32																																																								
<i>L. cacaonum</i>	33																																																								
<i>L. fermentum</i>	34																																																								
<i>L. plantarum</i>	35																																																								
<i>L. pseudomesenteroides</i>	36																																																								
<i>T. punctata</i>	37																																																								
<i>T. saanichensis</i>	38																																																								
<i>T. terrea</i>	39																																																								
Cluster 1	40																																																								
Cluster 13	41																																																								
Cluster 17	42																																																								
Cluster 4	43																																																								
Cluster 751	44																																																								



Desde una perspectiva microbiana, las importantes variaciones de especies tales como *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomycodes ludwigii* o *Kazachstania humilis*, entre los OTUs eucariotas, y *Acetobacter pasteurianus* y los clústeres 13 y 17, entre los procariotas, generaron correlaciones cronológicas significativas, tanto directas como inversas. Pero adicionalmente, se pusieron de manifiesto otras asociaciones significativas para especies con niveles de abundancia considerablemente más modestos. Este fue el caso de los miembros de los géneros *Pichia* y *Lactobacillus*, de *Acetobacter lambici* y de *Cellulosimicrobium funkei*. La importancia de especies integradas en los dos géneros citados, especialmente *Lactobacillus*, en la fermentación del cacao ha sido descrita con anterioridad (Ozturk y Young, 2017), si bien en el caso de *Pichia*, las identificadas en el presente proceso no son las encontradas habitualmente en fermentaciones de esta naturaleza (Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Igualmente sucede con *A. lambici*, bacteria de reciente descripción que se asocia principalmente a procesos de producción de cervezas lámbicas (Spitaels *et al.*, 2014). Y más inusual aun es el caso de *C. funkei*, bacteria que, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, no ha sido referenciada en relación con la biotransformación del cacao, aunque sí el grupo al que pertenece, el de las actinobacterias, filo que puntualmente se ha relacionado con dicho proceso (Illegheems *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Bortolini *et al.*, 2016; Viesser *et al.*, 2020).

Especialmente interesante, por lo que implica en cuanto a la caracterización del proceso, puede resultar el establecimiento de correlaciones entre los principales compuestos que lo definen y las especies microbianas participantes. Así, en el caso de los sustratos nutricionales, dichas correlaciones pueden poner de manifiesto la identidad de las especies mayoritariamente implicadas en su utilización y, por tanto, principales responsables de los cambios asociados a su metabolización. En este caso, tal papel fue desempeñado por los clústeres 1, 13 y 17, únicos OTUs positivamente relacionados con las tres fuentes carbonadas analizadas (ácido cítrico, fructosa y glucosa), lo que confirma su importancia en el proceso. Por otra parte, la conexión directa entre estos microorganismos y los sustratos nutricionales parece confirmar, además de su versatilidad metabólica, su afiliación a los grupos microbianos apuntados por el estudio filogenético, BALs y BAAs. Por el contrario, los OTUs asignados a estos grupos en función de su homología con secuencias depositadas en bases de datos (*L. cacaonum*, *L.*



*fermentum*, *L. plantarum*, *A. lambici* y *A. pasteurianus*), mostraron una fuerte relación inversa con tales compuestos, lo que probablemente sea consecuencia de una mayor adaptación a las condiciones imperantes en la parte final del proceso, en la que la disponibilidad de los sustratos carbonados considerados mostró sus niveles mínimos. La distribución porcentual de especies pertenecientes a un mismo grupo en distintas etapas de la fermentación no es un hecho insólito, dado que las características propias de cada una de ellas propician la existencia de pequeñas diferencias en lo que respecta a las condiciones nutricionales óptimas de desarrollo (Miescher Schwenninger *et al.*, 2016). Así, en el caso de las BAAs, *A. pasteurianus*, aunque muestra capacidad para adaptarse al entorno asociado a cada una de las etapas, se desarrolla de forma mucho más intensa en la segunda mitad del proceso, cuando las condiciones ambientales y nutricionales le suelen resultar más favorables (Illegheems *et al.*, 2016). Por el contrario, otras especies del género, tales como *A. fabarum*, *A. ghanensis* o *A. senegalensis*, aparecen más frecuentemente al inicio de la fermentación (Moens *et al.*, 2014), lo que podría ser consecuencia de una posible menor tolerancia a condiciones de mayor acidez (Pacheco-Montealegre *et al.* 2020). En cualquier caso, y aunque su participación se asocia mayoritariamente a las etapas más tardías del proceso, las BAAs pueden aparecer desde el inicio del proceso (Romero-Cortés *et al.*, 2012). En lo que respecta al grupo de las BALs, *L. fermentum* puede ser desplazado por especies levaduriformes u otras especies bacterianas en cuanto al uso de glucosa y fructosa (Papalexandratou *et al.*, 2019), lo que podría explicar su relación inversa con ambos compuestos en el presente proceso. Por otra parte, se han descrito diferencias entre cepas de esta especie en cuanto a la utilización de compuestos tales como fructosa o la eficiencia en la asimilación de glucosa (Adler *et al.*, 2013).

Los principales metabolitos resultantes de la actividad microbiana analizados en el presente trabajo (ácidos acético y láctico, etanol y manitol) mostraron, en general, los perfiles de correlaciones esperados, con alguna excepción, principalmente centrada en el etanol. En este caso, y en contra de lo esperado, la correlación entre este compuesto y la especie productora por excelencia, *Saccharomyces cerevisiae*, fue de carácter negativo, siendo de carácter positivo para las especies *Lactobacillus cacaonum* y *Tatumella saanichensis*. La escasa abundancia de la enterobacteria a lo largo de todo el proceso relativiza la importancia de este resultado, mientras que en el caso de *L. cacaonum*, pertenece



al grupo de las BALs que presenta tolerancia al etanol (De Vuyst y Weckx, 2016), lo que puede explicar su desarrollo en detrimento de otras especies del mismo grupo en presencia de concentraciones de alcohol relativamente importantes. En el caso de la levadura, se podría considerar el efecto contrario al comentado en el caso de *T. saanichensis*, es decir, la elevada abundancia de *S. cerevisiae* a lo largo de todo el proceso, siempre superando el 18% del total de la población eucariota, permitiría la producción de etanol en niveles importantes, incluso cuando se observaron reducciones en su presencionalidad en relación con el inicio del proceso, punto en el que más del 50% de la comunidad eucariota se correspondía con esta levadura. De esta manera, coincidirían perfiles opuestos en ambas variables, descenso en la abundancia relativa de la levadura e incremento en la concentración de etanol, que explicarían el inesperado signo de la relación entre dos parámetros con toda probabilidad asociados.

La producción de ácido láctico se relacionó positivamente de forma mayoritaria con microorganismos procariontos, tales como miembros del género *Tatumella*, y *Klebsiella oxytoca*, además de representantes de la LABs, como *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Lactobacillus cacaonum*. *Kazachstania humilis*, entre las especies eucariotas, también mostró correlación directa con este compuesto. Además de mostrar una elevada tolerancia a valores bajos de pH (Guerzoni *et al.*, 2013), esta levadura ha sido descrita asiduamente en masas panarias, hábitat en el que suele establecer asociaciones mutualistas con representantes del género *Lactobacillus* (De Vuyst *et al.*, 2016), hecho que puede ser responsable, de forma indirecta, de esta interdependencia con el ácido láctico. Las restantes especies citadas, tanto enterobacterias como BALs, son reconocidas productoras de este metabolito (De Bruyne *et al.*, 2009; Sangproo *et al.*, 2012). En el caso de las últimas, las dos destacadas aquí, si bien no suelen ostentar en papel protagonista entre las BALs participantes en la fermentación del cacao, en ocasiones han sido referidas como mayoritarias (Papalexandratou *et al.*, 2011a). Dada que esa es la situación en el proceso aquí descrito, es lógico que sean principales responsables de la producción de ácido láctico.

Los niveles de ácido acético, como era de esperar, mostraron una fuerte correlación positiva con las dos especies integradas en el género *Acetobacter*, dado que es la principal actividad metabólica asociada a dichas especies (Illegghems *et al.*, 2016). En concreto. *A. pasteurianus*, tal y como sucede en el proceso aquí descrito,



ostenta en numerosas ocasiones el papel protagonista entre las BAAs y, como consecuencia, en la producción de ácido acético (Adler *et al.*, 2014). Aunque menos reconocida, la actividad de las BALs en relación con la producción ácido acético también puede alcanzar niveles de consideración, tal y como parece desprenderse de los resultados mostrados por el análisis de correlaciones, aunque las vías sintéticas sean diferentes a las desarrolladas por las BAAs (Ho *et al.*, 2018). Las levaduras también han sido referenciadas como microorganismos productores de ácido acético (Swiegers *et al.*, 2005), hecho corroborado en el presente proceso, en el que tres especies levaduriformes (*P. membranifaciens*, *P. deserticola* y *S. ludwigii*) se relacionaron positivamente con este ácido.

El último de los compuestos analizado, el manitol, mostró correlaciones positivas con prácticamente todas las especies procariontas con abundancias relativas superiores al 0,1%, con la excepción de los OTUs sin asignación definida, los cuales, como ya se ha mencionado con anterioridad, dominaron el inicio del proceso y redujeron su presencia de forma significativa en la segunda mitad del proceso, etapa en la que aparece el citado compuesto, por lo que el carácter negativo de su interrelación no debe resultar sorprendente. De igual manera, tampoco ha de extrañar el signo también negativo de la relación con las fuentes carbonadas analizadas (citrato, fructosa y glucosa), dado que son los sustratos que posibilitan su síntesis. Entre las especies que dieron lugar a relaciones positivas se encontraron tanto BALs, como BAAs y enterobacterias. Son las primeras las que tradicionalmente han sido vinculadas a la producción de manitol (Pereira *et al.*, 2013b), mientras que las segundas ven potenciado su crecimiento por la presencia de este compuesto (Almeida *et al.*, 2020; Pacheco-Montealegre *et al.*, 2020). Este último factor explica también la detección de una fuerte correlación positiva entre manitol y ácido acético, tal y como han postulado otros autores (Camu *et al.*, 2007; De Vuyst *et al.*, 2015). En el caso de las enterobacterias, su acción en la biotransformación se asocia fundamentalmente con la hidrólisis de la fracción pectinolítica (De Vuyst y Weckx, 2016), aunque se ha apuntado la posibilidad de que puedan intervenir en otros aspectos, dada su permanencia durante toda la fermentación (García-Armisen *et al.*, 2010). Además de especies procariontas, las correlaciones positivas con el manitol se detectaron también en relación con algunos representantes eucariotas, sobre todo pertenecientes al género *Pichia*. Aunque las levaduras se asocian mayoritariamente a la producción de etanol, su



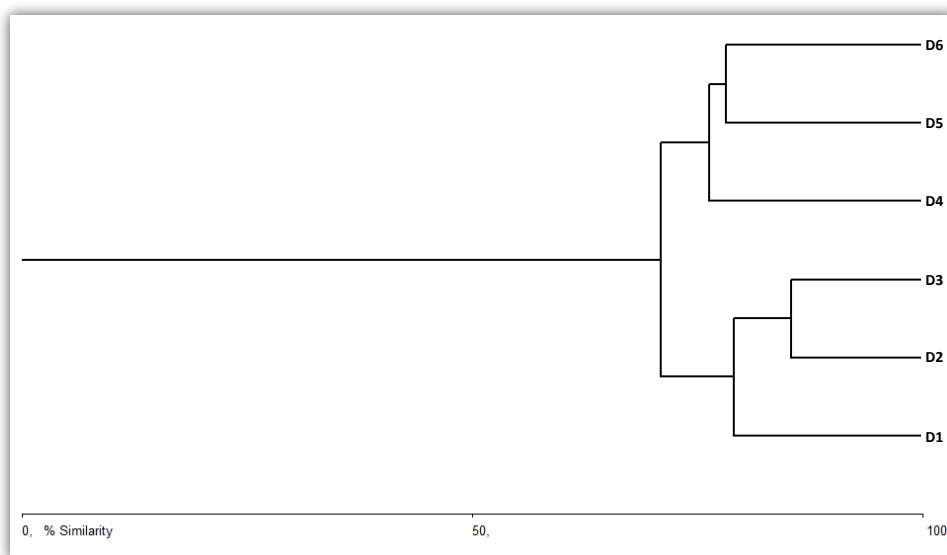
capacidad para sintetizar manitol ha sido referenciada (Takrama *et al.*, 2015), por lo que no es descartable su implicación en esta actividad, especialmente a la vista del resultado derivado del análisis estadístico.

A partir de los análisis de correlaciones y de componentes principales se pudieron también establecer las conexiones entre especies microbianas. Así, los resultados obtenidos permitieron la creación de dos grupos principales, el primero de ellos constituido por *P. terrícola*, *A. neoplatypodis*, *W. pijperi*, *H. occidentalis*, *H. opuntiae*, *C. ethacetica*, *C. jaronii* y los OTUs procariotas sin asignación, especies cuyos niveles de abundancia relativa fueron claramente superiores en la primera parte del proceso. En oposición, el segundo grupo, caracterizado por mostrar mayor presencialidad en la mitad final de la fermentación, quedó integrado por *P. membranifaciens*, *P. deserticola*, *K. humilis*, *S. ludwigii*, *A. pasteurianus*, *A. lambici*, *C. funkei*, *E. bugadensis*, *L. fermentum* y *L. plantarum*. Dos de las especies más influyentes en función de sus abundancias relativas, *S. cerevisiae* y *L. cacaonum*, generaron perfiles de correlaciones diferenciados que, aun compartiendo algunas de las asociaciones incluidas en los grupos establecidos, no compartieron la suficiente cantidad de correlaciones como para considerar su integración en cualquiera de ellos. La complejidad de las comunidades microbianas en el proceso de fermentación del cacao, tanto en lo que respecta a su actividad metabólica como a la naturaleza de las relaciones que establecen entre ellas, es realmente elevada (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2019). Si se considera, además, que se hipotetiza sobre la posible trascendencia que pueden alcanzar especies escasamente representadas (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018), la comprensión de la ecología microbiana del proceso se incrementa aún más. Aunque el conocimiento con respecto a esta fermentación es cada vez mayor, son muchas las incógnitas que aun quedan por resolver, especialmente si se tiene en cuenta la variabilidad que muestra y que propicia la existencia de importantes diferencias entre las poblaciones microbianas detectadas (Ardhana y Fleet, 2003). No obstante, es lógico suponer el establecimiento de relaciones de interdependencia entre distintas especies, ya sean pertenecientes al mismo grupo microbiano o no, tal y como sucede en otras fermentaciones de tipo alimentario (Vogelmann y Hertel, 2011; Furukawa *et al.*, 2013; Fiorda *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2018), en las que se referencian numerosas interacciones directas entre levaduras y BALs, así como entre BAAs y otras especies, e indirectas entre la mayor parte de ellas.



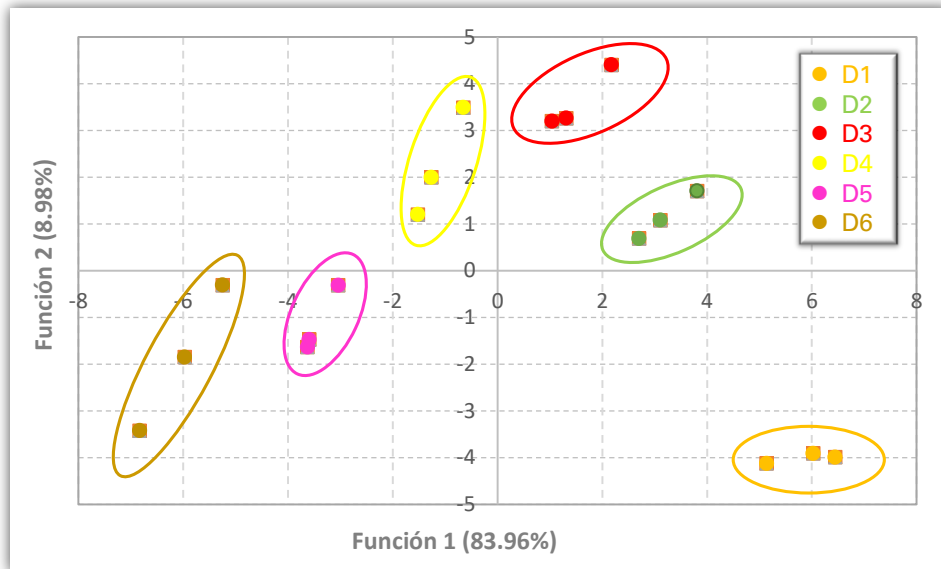


Otro aspecto de interés revelado por los sucesivos análisis realizados, tomando en consideración la totalidad de variables analizadas, tanto de carácter físico-químico como microbiano, fue la diferenciación del proceso en dos etapas principales que, a su vez, quedaron estructuradas por días. Así se infiere de los análisis de conglomerados y discriminante, recogidos, respectivamente, en las Figuras 4.17. y 4.18.



**Figura 4.17.** Análisis de conglomerados obtenido a partir de la matriz de similitud de Bray-Curtis, considerando abundancias relativas de especies microbianas y variables físico-químicas.

A lo largo del presente documento se ha hecho referencia constante a la existencia de dos etapas diferenciadas en el proceso fermentativo. Tradicionalmente, en bibliografía, se describen fases en el proceso asociadas mayoritariamente a la concurrencia de determinadas comunidades microbianas y a las acciones de ellas derivadas (Samagaci *et al.*, 2014; Hamdouche *et al.*, 2015). El análisis aquí realizado avala claramente la separación del proceso en etapas, e incluso establece niveles internos de separación correspondientes a cada uno de los días durante los cuales se prolongó la fermentación.

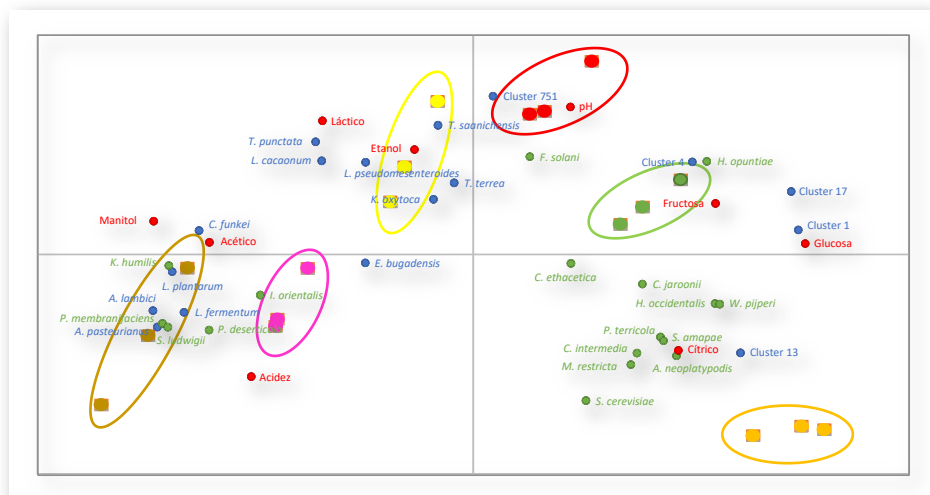


**Figura 4.18.** Diferenciación cronológica del proceso fermentativo según análisis discriminante.

De acuerdo con los resultados derivados de ambos análisis estadísticos, las dos etapas diferenciadas estarían constituidas, en el caso de la primera, por los días del uno al tres, y en el de la segunda, por los días del cuatro al seis. Dentro de la primera fase, el principal cambio se apreció transcurridas las primeras 24 horas de fermentación, tiempo tras el cual las condiciones alcanzaron cierto grado de estabilidad, lo que propició una menor diferenciación entre el segundo y el tercer día. En ese punto se produjo nuevamente un cambio en las propiedades de la matriz fermentativa que dio lugar al paso a la segunda fase, iniciada durante el cuarto día, y que, aunque con menor intensidad, se prolongó hasta el quinto día, momento en el que el proceso comenzó a estabilizarse. Si se superponen los gráficos representativos de los análisis de componentes principales y discriminante (Figura 4.19.), es posible establecer potencialmente las variables que, de forma más intensa, influyeron sobre cada una de las fases diferenciadas. Así, durante el primer día, se observó una clara dominancia de especies eucariotas, con especial relevancia de *S. cerevisiae* y la acción del clúster 13 como único OTU procarionta presente. Por otra parte, el ácido cítrico parece ser la fuente nutricional que



sustentó de forma mayoritaria la acción microbiana durante este primer día de fermentación. En el segundo día, la influencia de las levaduras cayó de forma drástica, quedando reducida a la acción de *H. opuntiae*, perteneciente a un género que muestra mayor tolerancia a la presencia de ácidos y a la incidencia de temperaturas más elevadas (Sarbu y Csutak, 2019). Fueron los clústeres 1, 4 y 17, de naturaleza bacteriana, los que dirigieron esta etapa de la fermentación, utilizando para ello preferentemente fructosa y glucosa. Con posterioridad, en el tercer y último día de esta etapa, el único cambio reseñable fue el papel protagonista que adquirió el clúster 751. Este patrón evolutivo, con dominancia inicial de levaduras, escasa presencia de bacterias, que rápidamente desplazan a las especies eucariotas, y todo ello apoyado en la energía proporcionada por los principales sustratos asociados al cacao (citrato, fructosa y glucosa), es el habitualmente descrito para este tipo de procesos (Moreira *et al.*, 2013; Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018), si bien cada caso puede mostrar matices diferenciadores en cuanto a la identidad de las especies participantes (Meersman *et al.*, 2013; Koffi *et al.*, 2017b).



**Figura 4.19.** Potencial relación entre las fases diferenciadas en el proceso y las variables de interés físico-químico y microbiano.



La segunda fase principal, iniciada en el cuarto día de fermentación, se asoció a la presencia de BALs y proteobacterias, y la acumulación de etanol y ácido láctico, condiciones que cambiaron en la parte final del proceso, días quinto y sexto. Así, la fermentación concluyó con la fuerte aparición de las BAAs asignadas al género *Acetobacter*, la recuperación de especies levaduriformes, *K. humilis* y miembros del género *Pichia*, y la sustitución de *L. cacaonum* y *L. pseudomesenteroides* por *L. fermentum* y *L. plantarum*. Desde el punto de vista metabólico, etanol y ácido láctico dejaron paso a manitol y ácido acético. Estos dos compuestos se asocian de forma mayoritaria a la actividad biosintética de BALs y BAAs (Santander Muñoz *et al.*, 2020), respectivamente, lo cual es coherente con la evolución de las poblaciones microbianas descrita. Las especies procariontas concurrentes en esta parte final del proceso están consideradas entre las bacterias más influyentes en la biotransformación del cacao (Viesser *et al.*, 2020) y, aunque ya han sido localizadas en esta misma etapa en otros procesos (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018), en el caso de las BALs se asocian más a la parte intermedia (Papalexandratou *et al.*, 2011b). No obstante, si que se ha constatado el hecho de que *L. cacaonum* o *L. pseudomesenteroides*, de forma mayoritaria, aparecen en etapas más tempranas del proceso que *L. fermentum* (Papalexandratou *et al.*, 2013; De Vuyst y Weckx, 2016). En el caso de las levaduras, aunque no suelen ser especies de referencia en la finalización del proceso (Daniel *et al.*, 2009; Papalexandratou y De Vuyst, 2011), sí que se han descrito procesos en los que determinados miembros de este grupo aparecen en niveles relativamente importantes (Jespersen *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2016). *K. humilis* fue la especie que destacó sobremanera en esta etapa y, si bien no se considera como integrante habitual de la microbiota levaduriforme asociada a la fermentación del cacao, sus características le permiten una buena adaptación a las condiciones propias de este entorno (Pereira *et al.*, 2012) y, en especial, a las imperantes en la parte final del proceso (Papalexandratou *et al.*, 2019).

La variabilidad existente en relación con la fermentación del cacao, tanto desde una perspectiva tecnológica como cultivar, dificulta la estandarización del proceso y la universalización de las condiciones en las que transcurre. No obstante, y a pesar de las diferencias encontradas, resulta indiscutible la identificación de una serie de aspectos globales que se repiten, independientemente de las características de cada proceso. Tales aspectos se relacionan con la presencia de



determinados compuestos, que confieren valor organoléptico al producto, con los procesos metabólicos que propician la síntesis de dichos compuestos, y con las comunidades microbianas responsables de tales procesos. Sin embargo, un análisis más detallado, que profundice en las particularidades de cada fermentación, permite establecer matices propios que confieren a cada producto final propiedades diferenciadoras. En el presente caso, y en lo que respecta a las comunidades microbianas actuantes, las particularidades del proceso aquí descrito se centran en el peso relativo de la población levaduriforme, con incidencia en la etapa final de una especie poco habitual, como es el caso de *Kazachstania humilis*, y la aparentemente baja presencia de Bacterias del Ácido Láctico. No obstante, este último aspecto es necesario matizarlo, dada la detección de OTUs sin asignación taxonómica, pero evolutivamente relacionados con este grupo, lo que podría suponer la detección de nuevas especies con relevancia en las condiciones fermentativas específicas de este proceso. Sin duda, es necesario poner en consideración la especificidad del proceso en lo que respecta a presencia y, sobre todo, relevancia de microorganismos poco habituales, no sólo para comprenderlo en mayor medida, sino para gestionar de modo más eficaz la optimización de la fermentación, especialmente en lo concerniente a la potencial utilización de inoculantes.





## 5. CONCLUSIONES







A partir de los resultados obtenidos, y tras los análisis correspondientes, las conclusiones extraídas son las siguientes:

1. Las condiciones en las que se ha realizado el proceso, tanto en lo concerniente a aspectos referidos a etapas previas a la fermentación como a los que se relacionan con el propio proceso fermentativo, se han mostrado adecuadas para permitir el correcto desarrollo de éste.
2. Las características imperantes durante el proceso propician la existencia de dos fases claramente diferenciadas, de tres días de duración cada una de ellas y asociadas a diferentes grupos microbianos y compuestos químicos.
3. La primera etapa, en la que destacan especies levaduriformes y bacterias sin asignación taxonómica definida, pero evolutivamente cercanas a bacterias del ácido láctico y del ácido acético, se caracteriza principalmente por una importante actividad catabólica, sustentadas por los sustratos carbonados presentes, ácido cítrico, fructosa y glucosa.
4. La segunda etapa, inicialmente dominada por bacterias del ácido láctico y enterobacterias y posteriormente por bacterias del ácido láctico y del ácido acético, además de algunas levaduras, queda definida por la acumulación de metabolitos procedentes de la actividad microbiana, tales como ácido láctico y etanol en la primera parte, y ácido acético y manitol en la segunda.
5. Entre la comunidad levaduriforme, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae* controlan el proceso en su fase inicial, mientras que en la final destaca *Kazachstania humilis*. En el caso de la población procariota, además de las especies sin asignación taxonómica, destacan *Acetobacter pasteurianus* entre las bacterias del ácido acético, y *Lactobacillus cacaonum* entre las del ácido láctico.
6. La presencia de especies sin asignación taxonómica y con especial relevancia en el proceso confirma un patrón habitual referenciado en la fermentación del cacao, como es el hecho de mostrar características únicas en cuanto a la identidad de las especies que ostentan el liderazgo del proceso.
7. El papel relevante jugado por OTUs no identificados, así como por especies poco habituales, ha de tenerse en cuenta a la hora de optimizar las condiciones en las que se desarrolla el proceso, especialmente en lo que respecta a la utilización de algunas de ellas como potenciales inoculantes.

## CONCLUSIÓN GENERAL:

La individualidad asociada a los procesos fermentativos de las semillas de cacao queda confirmada con los resultados observados en el presente estudio, en el que la presencia de las comunidades microbianas habitualmente descritas en el proceso, así como su cronología, se ve matizada por la identidad de las especies concretas que dirigen las principales transformaciones. En este sentido, la escasa información disponible en México en relación con este proceso, acentúa la relevancia de los datos obtenidos, los cuales pueden contribuir de forma significativa a las estrategias recientemente implementadas en relación con la recuperación del sector cacaotero en el país azteca.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

---





- Abdulai, I., Jassogne, L., Graefe, S., Asare, R., Van Asten, P., Läderach, P., Vaast, P. 2018. Characterization of cocoa production, income diversification and shade tree management along a climate gradient in Ghana. *PLoS One*, 13: e0195777.
- Abdulai, I., Vaast, P., Hoffman, M.P., Asare, R., Jassogne, L., Van Asten, P., Rötter, R., Graefe, S. 2017. Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. *Global Change Biology*, 24: 276-286.
- Adenet, S., Regina, F., Rogers, D., Bharath, S., Argout, X., Rochefort, K., Cilas, C. 2020. Study of the genetic diversity of cocoa populations (*Theobroma cacao* L.) of Martinique (FWI) and potential for processing and the cocoa industry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-11.
- Adler, P., Bolten, C.J., Dohnt, K., Hansen, C.E., Wittman, C. 2013. Core fluxome and metafluxome of lactic acid bacteria under simulated cocoa pulp fermentation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 5670-5681.
- Adler, P., Frey, L.J., Berger, A., Bolten, C.J., Hansen, C.E., Wittmann, C. 2014. The key to acetate: Metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation-simulating conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 4702-4716.
- Afoakwa, E.O. 2015. Cocoa processing and chocolate technology. Schwann, R.F., Fleet, G.H. (Eds.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. CRC Press, Boca Ratón, EE.UU., pp. 271-307.
- Afoakwa, E.O., Budu, A.S., Mensah-Brown, H., Takrama, J.F., Akomanyi, E. 2014. Changes in biochemical and physico-chemical qualities during drying of pulp preconditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, 2: 1-8.
- Afoakwa, E.O.; Paterson, A. 2010. Cocoa fermentation: Chocolate flavour quality. En: Heldman, D.R., Hoover, D.G., Wheeler, M.B. (Eds.). *Encyclopedia of Biotechnology in Agricultura and Food*. Taylor & Francis Publishing Inc., Abingdon, Reino Unido, pp. 457-468.
- Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 1-18.
- Afoakwa, E.O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A.S., Saalia, F.K. 2013. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50: 1097-1105.



- Agyrifo, D.S., Wamalwa, M., Otwe, E.P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., Ngeranwa, J. 2019. Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. *Helyon*, 5: e02170.
- Akinnuli, B.O., Bekunmi, O.S., Osueke, C.O. 2015. Design concepts towards cocoa winnowing mechanization for nibs production in manufacturing industries. *British Journal of Applied Science & Technology*, 8: 35-45.
- Alean, J., Chejne, F., Rojano, B. 2016. Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *Journal of Food Engineering*, 189: 99-105.
- Almeida, O.G.G., Pinto, U.M., MatC.B., Frazilio, D.A., Braga, V.F., von Zeska-Kress, M.R., De Martinis, E.C.P. 2020. Does quorum sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An *in silico* perspective. *Food Research International*, 131: 109034.
- Alverson, W.S., Whitlock, B.A., Nyffeler, R., Bayer, C., Baum, D.A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. *American Journal of Botany*, 86: 1474-1486.
- Amoa-Awua, W.K. 2015. Methods of cocoa fermentation and drying. En: Schwan, R.F., Fleet, G.H. (Eds.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, EE.UU., pp. 71-128.
- Andrade Aguirre, C.M. 2007. La viabilidad económica del cultivo del cacao en México a través de una economía sostenible. Tesis de Licenciatura, Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Aneani, F., Takrama, J.F. 2006. Practices that influence the quality of cocoa in Ghana: Perception of cocoa farmers. Conference Proceeding of the 15<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica.
- Angeletti, S. 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 138: 20-29.
- AOAC. 1996. Official methods of analysis, 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, EE.UU.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis, 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, EE.UU.
- Apotsoaie, A.C., Luca, S.V., Miron, A. 2016. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 73-91.



- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L.E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., Gschaedler-Mathis, A. 2015. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 359-369.
- Ardhana, M.M., Fleet, G.H. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 87-99.
- Arevalo-Gardini, E., Meinhardt, L.W., Zuñiga, L.C., Arevalo-Gardini, J., Motilal, L., Zhang, D. 2019. Genetic identity and origin of “Piura Porcelana”, a fine-flavored traditional variety of cacao (*Theobroma cacao*) from the Peruvian Amazon. *Tree Genetics & Genomes*, 15: 11.
- Ascrizzi, R., Flamini, G., Tessieri, C., Pistelli, L. 2017. From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchemical Journal*, 133: 474-479.
- Avendaño-Arrazate, C.H., Villareal-Fuentes, J.M., Campos-Rojas, E., Gallardo-Méndez, R.A., Mendoza-López, A.J.F., Aguirre-Medina, J.F., Sandoval-Esquivel, A., Espinosa-Zaragoza, S. 2011. Diagnóstico de cacao en México. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México.
- Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., Sikora, M. 2015. Cocoa agronomy, quality, nutritional, and health aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 620-659.
- Balogu, T.V., Onyeagba, A.R. 2017. Polyphenol and microbial profile on-farm cocoa beans fermented with selected microbial consortia. *Applied Food Biotechnology*, 4: 229-240.
- Batista, N.N., Ramos, C.L., Ribeiro, D.D., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F. 2015. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 63: 221-227.
- Batista, N.N., Ramos, C.L., Ribeiro, D.D., Pinheiro, A.C.M., Schwan, R.F. 2016. The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 1101-1110.
- Beckett, S.T. 2008. *The science of chocolate*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.



- Beckett, S.T. 2009. Industrial chocolate manufacture and use. Blackwell Publishing, York, Reino Unido.
- Beg, M.S., Ahmad, S., Jan, K., Bashir, K. 2017. Status, supply chain and processing of cocoa. A review. Trends in Food Science and Technology, 66: 108-116.
- Bennett, J.S., Jolley, K.A., Earle, S.G., Corton, C., Bentley, S.D., Parkhill, J., Maiden, M.C.J. 2012. A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus *Neisseria*. Microbiology, 158: 1570-1580.
- Bernaert, H., Blondeel, I., Allegaert, L., Lohmueller, T. 2012. Industrial treatment of cocoa in chocolate production: health implications. En: Paoletti, R., Poli, A., Conti, A., Visioli, F. (Eds.). Chocolate and Health. Springer-Verlag, Milán, Italia, pp. 17-30.
- Bertazzo, A., Comai, S., Mangiarini, F., Chen, S. 2013. Composition of cacao beans. En: Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. (Eds.). Chocolate in Health and Nutrition. Humana Press, Tototwa, EE.UU., pp. 105-117.
- Bessede, E., Angla-Gre, M., Delagarde, Y., Sep Hieng, S., Menard, A., Megraud, F. 2010. MALDI Biotyper, experience in the routine of a University hospital. Clinical Microbiology and Infection, 17: 533-538.
- Bharath, S., Bowen-O'Connor, C. 2008. Assessing drying rates of cacao beans using small samples. Cocoa Research Unit, U.W.J. Annual Report, St. Augustine, Trinidad, pp. 929-938.
- Bisbal, F., Gil, J.V., Ramón, D., Martínez-Culebras, P.V. 2009. ITS-RFLP characterization of black Aspergillus isolates responsible for ochratoxin A contamination in cocoa beans. European Food Research and Technology, 229: 751-755.
- Blaser, W.J., Opong, J., Yeboah, E., Six, J. 2017. Shade trees have limited benefits for soil fertility in cocoa agroforests. Agriculture, Ecosystems & Environment, 243: 83-91.
- Bordin Schumacher, A., Brandelli, A., Schumacher, E.W., Carrion Macedo, F., Pieta, L., Venzke Klug, T., Vogt de Jong, E. 2009. Development and evaluation of a laboratory scale conch for chocolate production. International Journal of Food Science & Technology, 44: 616-622.
- Bortolini, C., Patrone, V., Puglisi, E., Morelli, L. 2016. Detailed analysis of the bacterial populations in processed cocoa beans of different geographic origins, subject to varied fermentation conditions. International Journal of Food Microbiology, 236: 98-106.





- Boza, E.J., Iris, B.M., Meerow, A.W., Tondo, C.L., Rodríguez, O.A., Ventura-López, M., Gómez, J.A., Moore, J.M., Zhang, D., Motamayor, J.C., Schnell, R.C. 2013. Genetic diversity, conservation, and utilization of *Theobroma cacao* L.: genetic resources in the Dominican Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 605-619.
- Braga, S.C.G.N., Oliveira, L.F., Hashimoto, J.C., Gama, M.R., Efraim, P., Poppi, R.J., Augusto, F. 2018. Study of volatile profile in cocoa nibs, cocoa liquor and chocolate production process using GCxGC-QMS. *Microchemical Journal*, 141, 353-361.
- Bridgemoham, P., Mohammed, M. 2019. The eco-physiology of abiotic and biotic stress on the pollination and fertilization of cacao (*Theobroma cacao* L.; formerly Sterculiaceae family). En: De Oliveira, A.B. (Ed.). *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen, Londres, Reino Unido, cap. 2.
- Brito-Vega, H., Gómez-Méndez, E., Salaya-Domínguez, J.M. 2018a. The cacao agrosystem in Tabasco, México. En: de Oliveira, A.B. (Ed.). *Sustainability of Agroecosystems*. IntechOpen, Londres, Reino Unido, pp. 79-87.
- Brito-Vega, H., Salaya-Domínguez, J.M., Gómez-Méndez, E., Gómez-Vázquez, A., Antele-Gómez, J.B. 2018b. Physico-chemical properties of soil and pods (*Theobroma cacao* L.) in cocoa agroforestry systems. *Journal of Agronomy*, 17: 48-55.
- Cacao México. 2009. Cacao en México. En: [https://cacaomexico.org/?page\\_id=1051](https://cacaomexico.org/?page_id=1051) (Fecha de consulta: 19 de agosto de 2020).
- Cafrack, M., Keul, H., Eskildsen, C.E., Petersen, M.A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S. 2014. Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63: 306-316.
- Caligiani, A., Marseglia, A., Prandi, B., Palla, G., Sforza, S. 2016. Influence of fermentation level and geographical origin on cocoa bean oligopeptide pattern. *Food Chemistry*, 211: 431-439.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vannanneyt, M., De Vuyst, L. 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1809-1824.



- Camu, N., De Winter, T., Addo, S.K., Takrama, J.S., Bernaert, H., de Vuyst, L. 2008a. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 2288-2297.
- Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., takrama, J.S., Addo, S.K., De Vuyst, L. 2008b. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 86-98.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., Srikumar, S. 2017. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1829.
- CAOBISCO-ECA-FCC. 2015. Cocoa beans. Chocolate and cocoa industry quality requirements. En: End, M.J., Dand, R. (Eds.). Cocoa Research Centre, University of West Indies, Trinidad.
- Carbonelle, F., Grohs, P., Jacquier, H., Day, N., Tenza, S., Dewailly, A., Vissouarn, O., Rottman, M., Herrmann, J.L., Podglajen, I., Raskine, L. 2012. Robutness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *Journal of Microbiological Methods*, 89: 133-136.
- Carbonelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44: 104-109.
- Carbonetto, B., Nidelet, T., Guezenc, S., Pérez, M., Segond, D., Sicard, D. 2020. Interaction between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in sourdough. *Microorganisms*, 8: 240.
- Carr, F.J., Child, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28: 281-370.
- Carr, J.G., Davies, P.A., Dougan, J. 1979. Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia II. University of Bristol Research Station, Long Ashton, Briston and Tropical Products Institute, Londres, Reino Unido.
- Carr, M.K.V., Lockwood, G. 2011. The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma cacao* L.): A review. *Experimental Agriculture*, 47: 653-676.
- Cevallos-Cevallos, J.M., Gysel, L., Maridueña-Zavala, M.G., Molina-Miranda, M.J. 2018. Time-related changes in volatile compounds during fermentation of bulk



- and fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of Food Quality*, 2018: 1-14.
- Chen, B., Sun, L., Zhang, X. 2017. Integration of microbiome and epigenome to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 83: 31-42.
- Christopher, H. 2013. Cacao's relationship with Mesoamerican society. *Spectrum*, 3: 48-60.
- Cidell, J.L., Alberts, H.C. Constructing quality: The multinational histories of chocolate. *Geoforum*, 37: 999-1007.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole, P.W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, 38: e200.
- Cleenwerck, I., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., De Vuyst, L. 2008. *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2180-2185.
- Clement, C.R., De Cristo-Araújo, M., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Alves Pereira, A., Picanço-Rodrigues, D. 2010. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diver*, 2: 72-106.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K. 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 29-43.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Frisvad, J.C., Pereira, J.L., Taniwaki, M.H. 2011a. Mycobiota of cocoa: from farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28: 1499-1504.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Mororó, R.I., Pereira, J.L., Frisvad, J.C. 2012. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, 155: 158-164.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J.L., Fungaro, M.H., Taniwaki, M.H. 2011b. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 141-144.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pitt, J.I., Taniwaki, M.H. 2014. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 178: 13-20.



- Counet, C., Camellien, D., Ouwerx, C., Collin, S. 2002. Use of gas chromatography-olfactrometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5: 2385-2391.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., Collin, S. 2004. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6243-6249.
- Countinho, F.H., Gregoracci, G.B., Walter, J.M., Thompson, C.C., Thompson, F.L. 2018. Metagenomics sheds light on the ecology of marine microbes and their viruses. *Trends in Microbiology*, 26: 955-965.
- Crafack, M., Mikkelsen, M.B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S. 2013. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 103-116.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 380-407.
- Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., Hartl, C., Moran Hernandez, N., Schieberle, P. 2008. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language base don odour qualities of defined aqueous solution. *European Food Research and Technology*, 228: 265-273.
- Dand, R. 2011. The international cocoa trade. Woodhead Publishing Limited, Sawston, Reino Unido.
- Daniel, H.M., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P., De Vuyst, L. 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9: 774-783.
- de Almeida, A.A.F., Valle, R.R. 2008. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19: 425-448.
- De Araújo, J.A., Ferreira, N.R., da Silva, S.H.M., Oliveira, G., Monteiro, R.C., Alves, Y.F.M., Lopes, A.S. 2019. Filamentous fungi diversity in the antural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. *Annals of Microbiology*, 69: 975-987.
- De Bruyne, K., Camu, N., De Vuyst, L., Vandamme, P. 2009. *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. and *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from



- Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 7-12.
- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G. 2015. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 121: 113-121.
- De la Cruz-Landero, E., Córdova-Ávalos, V., García-López, E., Bucio-Galindo, A., Jaramillo-Villanueva, J.L. 2015. Manejo agronómico y caracterización socioeconómica del cacao en Comalcalco, Tabasco. *Foresta Veracruzana*, 17: 33-40.
- De Roos, J., De Vuyst, L. 2018. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 45: 115-119.
- de Schawe, C.C., Durka, W., Tschardtke, T., Hensen, I., Kessler, M. 2013. Gene Flow and genetic diversity in cultivated and wild cacao (*Theobroma cacao*) in Bolivia. *American Journal of Botany*, 100: 2271-2279.
- de Schawe, C.C., Kessler, M., Hensen, I., Tschardtke, T. 2018. Abundance and diversity of flower visitors on wild and cultivated cacao (*Theobroma cacao* L.) in Bolivia. *Agroforestry Systems*, 92: 117-125.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I. 2008. Validation of the (GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR fingerprinting techniques for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 79-90.
- De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., Leroy, F. 2016. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, 239: 26-34.
- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Camu, N. 2010. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. En: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, pp. 301-325.
- De Vuyst, L., Leroy, F. 2020. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, fuaa014.
- De Vuyst, L., Weckx, S. 2015. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. En: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria-Novel Applications*, 2<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell, Ames, EE.UU., pp. 248-278.



- De Vuyst, L., Weckx, S. 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystems analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121: 5-17.
- Dillinger, T.L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, E., Salazar Lowe, D., Grivetti, L.E. 2000. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *The Journal of Nutrition*, 130: 2057S-2072S.
- Dircks, H.D. 2009. Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. Tesis doctoral, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Nueva Gales del Sur, Sidney, Australia.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clement, J.C., Quince, C., Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27: 2194-2200.
- Engeseth, N.J., Pangan, M.F.A. 2018. Current context on chocolate flavor development. A review. *Current Opinion in Food Science*, 21: 84-91.
- Engler, A., Toledo, R. 2010. An analysis of factors affecting the adoption of economic and productive data recording methods of Chilean farmers. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37: 101-109.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 297-314.
- Everaert, H., De Wever, J., Tang, T.K.H., Vu, T.L.A., Maebe, K., Rottiers, H., Lefever, S., Smagghe, G., Dewettinck, K., Messens, K. 2020. Genetic classification of Vietnamese cacao cultivars assessed by SNP and SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, 16: 43.
- Fang, Y., Li, R., Chu, Z., Zhu, K., Gu, F., Zhang, Y. 2020. Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation. *Food Science & Nutrition*, 8: 4121-4133.
- Farah, D.M.H., Zaibunnisa, A.H., Misnawi, S. 2012. Optimization of cocoa beans roasting process using response Surface methodology base don concentration of pyrazine and acrylamide. *International Food Research Journal*, 19: 1355-1359.
- Farrell, A.D., Rhiney, K., Eitzinger, A., Umaharan, P. 2018. Climate adaptation in a minor crop species: is the cocoa breeding network prepared for climate change? *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 42: 812-833.
- Federhen, S. 2012. The NCBI taxonomy database. *Nucleid Acid Research*, 40: D136-D143.



- Fernández Maura, Y., Balzarini, T., Clapé Borges, P., Evrard, P., De Vuyst, L., Daniel, H.M. 2016. The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233: 34-43.
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutiérrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z.J., González-Ríos, O., Cocolin, L., Suárez-Quiroz, M.L. 2019. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301: 41-50.
- Fiorda, F.A., Pereira, G.V.M., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., Pagnoncelli, M.G.B., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R. 2017. Microbiological, biochemical and functional aspects of sugary-kefir fermentation A review. *Food Microbiology*, 66: 86-95.
- Fleet, G.H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 170-175.
- Flood, J., Murphy, R. 2004. *Cocoa futures*. CAB International, Londres, Reino Unido.
- Fluck, C. 2014. Closing the gap between the current and potential conditions in the cocoa (production) industry. Comparing Colombia and Mexico. Tesis de Licenciatura, Universidad de Twente, Enschede, Países Bajos.
- Fold, N., Neilson, J. 2016. Sustaining supplies in smallholder dominated value chains: Corporate governance of the global cocoa sector. En: Squicciarini, M.P., Swinnen, J. (Eds.). *Economics of Chocolate*. Oxford University Press, Oxford, reino Unido, pp. 195-212.
- Fonseca-Santos, B., Funagoshi, E.E., Oliveira, J.R.S.D., Sacramento, L.V.S.D., Santos, A.G.D., Leonardi, G.R., Chorilli, M. 2017. Organic cocoa extract-loaded surfactant-based systems intended to skin bioadhesion. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53: e00051.
- Fountain, A.C., Hütz-Adams, F. 2018. *Cocoa barometer*. VOICE Network, Países Bajos.
- Fournier, P.E., Lagier, J.C., Dubourg, G., Raoult, D. 2015. From culturomics to taxonomogenomics: A need to change the taxonomy of prokaryotes in clinical microbiology. *Anaerobe*, 36: 73-78.
- Fowler, M.S. 2009. Cocoa beans: from tree to Factory. En: Beckett, S.T. (Ed.). *Industrial Chocolate manufacture and Use*. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, pp. 10-47.
- Franzen, M., Mulder, M.B. 2007. Ecological, economic and social perspectives on cocoa production worldwide. *Biodiversity and Conservation*, 16: 3835-3849.



- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28: 3150-3152.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Toyama, H., Moronaga, Y. Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116: 533-539.
- Ganeswari, I., Bariah, S.K., Amizi, M.A., Kim, Y.P. 2015. Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*, 22: 70-76.
- Gänzle, M.G. Lactic metabolism revisited: metabolism of acid lactic bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2: 106-117.
- García-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L., Cornelis, P. 2010. Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 2281-2292.
- Gayi, S.K., Tsowou, K. 2016. Cocoa industry: Integrating small farmers into the global value chain. *United Nations Conference on Trade and Development*, 7: 1-39.
- Giacometti, J., Jolić, S.M., Josić, D. 2015. Cocoa processing and impact on composition. En: Preedy, V.R. (Ed.). *Processing and impact on active components in food*. Academic Press, Londres, Reino Unido, pp. 605-612.
- Gilmour, M., Lindblom, M. 2008. Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. En: Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R., Visconti, A. (Eds.). *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade*. CABI, Wallingford, Reino Unido, pp. 231-243.
- Gopaulchan, D., Motilal, L.A., Bekele, F.L., Clause, S., Ariko, J.O., Ejang, H.P., Umarahan, P. 2019. Morphological and genetic diversity of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Uganda. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25: 361-375.
- Gordial, J., Ronholm, J. 2018. Metagenomics meets read clouds. *Nature Biotechnology*, 36: 1049-1051.
- Graefe, S., Meyer-Sand, L.F., Chauvette, K., Abdulai, I., Jassogne, L., Vaast, P., Asare, R. 2017. Evaluating farmers' knowledge of shade trees in different cocoa agro-ecological zones in Ghana, 45: 321-332.





- Greub, G. 2012. Culturomics: a new approach to study the human microbiome. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 1157-1159.
- Greweling, P.P. 2007. *Chocolates and confections. Formula, theory, and techniques for the artisan confectioner*. The culinary institute of America. John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido.
- Grupo Hydro Environment. 2018. Producción de cacao en México. Hidroponia.mx, Blog de Hydro Environment. En: <https://hidroponia.mx/produccion-de-cacao-en-mexico/> (Fecha de consulta: 19 de agosto de 2020).
- Guda, P., Gadhe, S. 2017. Primary processing of cocoa. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 7: 457-462.
- Guehi, S.T., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D.K., Zahouli, G.I.B., 2010. Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advanced Journal of Food Science and technology*, 2: 163-171.
- Guehi, S.T., Dadie, A.T., Koffi, K.P.B., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, K.D., Nemlin, G.J. 2010. Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 2508-2514.
- Guerrero, J. 2011. Estudio del proceso de mezclado en la elaboración del chocolate en tabletas en la fábrica Carolina de la ciudad de Ambato y sus beneficios en la optimización de la producción. Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Guerzoni, M.E., Serrazanetti, D., Vernocchi, P., Gianotti, A. 2013. Physiology and biochemistry of sourdough yeasts. En: Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M.G., Gobetti, M. (Eds.). *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, Heidelberg, Alemania, pp. 155-181.
- Gutiérrez, T.J. 2017. State of the art chocolate manufacture: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 1313-1344.
- Gutiérrez, T.J., Pérez, E. 2015. Significant quality factors in the chocolate processing: Cocoa post harvest, and its manufacture. En: Pérez-Sira, E. (Ed.). *Chocolate, Cocoa Byproducts Technology, Rheology, Styling and Nutrition*. Nova Publishers, Nueva York, EE.UU., pp. 1-48.
- Gyedu-Akoto, E., Amon-Armah, F., Oddoye, E.O. 2015. Production and marketing of cocoa butter and shea butter based body pomades as a small scale business in Ghana. *Asian Journal of Business and Management*, 3: 385-391.



- Hamdouche, Y., Guehi, T., Durand, N., Kedjebo, K.B.D., Montet, D., Meile, J.C. 2015. Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: towards the identification of molecular markers. *Food Control*, 48: 117-122.
- Hamdouche, Y., Meile, J.C., Lebrun, M., Guehi, T., Boulanger, R., Teyssier, C., Montet, D. 2019. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. *Food Research International*, 119: 477-491.
- Hartemink, A.E. 2005. Nutrient stocks, nutrient cycling, and soil changes in cocoa ecosystems: A review. *Advances in Agronomy*, 86: 227-253.
- Harwani, D. 2013. The great plate count anomaly and the unculturable bacteria. *Microbiology*, 2: 350-351.
- Henderson, J.S., Joyce, R.A., Hall, G.R., Hurst, W.J., McGovern, P.E. 2007. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 18937-18940.
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P.A., Ramírez-Guillermo, M.A., Guerra Ramírez, D., Caballero Pérez, J.F., 2016. Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science & Nutrition*, 4: 690-695.
- Hinne, M., Semanhyia, E., Van de Walle, D., De Winne, A., Tzompa-Sosa, D.A., Scalone, G.L.L., De Meulenaer, B., Messens, K., Van Durme, J., Afoakwa, E.O., De Cooman, L., Dewettinck, K. 2018. Assessing the influence of pod storage on sugar and free amino acid profiles and the implications on some Maillard reaction related flavor volatiles in Forastero cocoa beans. *Food Research International*, 111: 607-620.
- Hinne, M., Van de Walle, D., Tzompa-Sosa, D.A., De Winne, A., Termote, S., Messens, K., Van Durme, J., Afoakwa, E.O., de Cooman, L., Dewettinck, K. 2019. Turning the aroma profiles of Forastero cocoa liquors by varying pod storage and bran roasting temperature. *Food Research International*, 125: 108550.
- Ho, V.T.T., Zhao, J., Fleet, G. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 72-87.
- Ho, V.T.T., Zhao, J., Fleet, G. 2015. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205: 54-67.
- Ho, V.T.T., Fleet, G., Zhao, J. 2018. Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 279: 43-56.



- Huang, Z.G., Luo, H.B., Chneg, T.Y., Li, G.H. 2008. Real-time detection and establishment of mathematical model of temperature change curve of fermented grains in fermentation process. *Liquor-Making Science & Technology*, 10.
- Huang, Y., Barringer, S.A. 2011. Monitoring of cocoa volátiles produced during roasting by selected ion Flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science*, 76: C279-C286.
- Humphreys, J., Navas-Alemán, I. 2010. Value chains, donor interventions and poverty reduction: a review of donor practice. Research Report, Vol 2010, No 63. Institute for Development Studies, Universidad de Sussex.
- Huys, G., Daniel, H.M., De Vuyst, L. 2013. Taxonomy and biodiversity of sourdough Yeasts and lactic acid bacteria. En: Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M.G., Gobetti, M. (Eds.). *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, Heidelberg, Alemania, pp. 105-154.
- Illegghems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z., Weckx, S. 2012. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS One*, 7: e38040.
- Illegghems, K., De Vuyst, L., Weckx, S. 2013. Complete genoma sequence and comparative analysis of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a strain well-adapted to the cocoa bean fermentation ecosystem. *BMC Genomics*, 14: 526.
- Illegghems, K., Pelicaen, R., De Vuyst, L., Weckx, S. 2016. Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of *Acetobacter ghanensis* and *Acetobacter senegalensis* to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach. *Food Microbiology*, 58: 68-78.
- Illegghems, K., Weckx, S., De Vuyst, L. 2015. Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. *Food Microbiology*, 50: 54-63.
- Ioannone, F., Di Mattia, C.D., De Gregorio, M., Sergi, M., Serafini, M., Sacchetti, G. 2015. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperatura and time of processing. *Food chemistry*, 174: 256-262.
- Jagoret, P., Michel, I., Ngnogué, H.T., Lachenaud, P., Snoeck, D., Malézieux, E. 2017. Structural characteristics determine productivity in complex agroforestry systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 37: 60.



- Jamal, P., Idris, Z.M., Alam, M.Z. 2011. Effects of physicochemical parameters on the production of phenolic acids from palm oil mil effluent under liquid-state fermentation by *Aspergillus niger* IBS-103ZA. *Food Chemistry*, 124: 1595-1602.
- Jamili, J., Yanti, N.A., Susilowati, P.E. 2016. Diversity and role of yeast in spontaneous cocoa bean fermentation form Southeast Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 17: 90-95.
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Hønholt, S., Jakobsen, M. 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5: 441-453.
- Jolić, S.M., Radojčić Redovniković, I., Marković, K., Šipušić D.I., Delonga, K. 2011. Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa bean processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 46: 1793-1800.
- Joshi, M.N., Dhebar, S.V., Dhebar, S.V., Bhargava, P., Pandit, A., Patel, R.P., Saxena, A., Bagatharia, S.B. 2014. Metagenomics of petroleum muck: reveling microbial diversity and depicting microbial syntrophy. *Archives of Microbiology*, 196: 531-544.
- Júnior, P.C.G., dos Santos, V.B., Lopes, A.S., de Souza, J.P.I., Pina, J.R.S., Júnior, G.C.A.C., Marinho, P.S.B. 2020. Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation. *Food Control*, 108: 106887.
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S., Lieberei, R. 2015. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) – Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT – Food Science and Technology*, 62: 357-361.
- Kaufman, T., Justeson, J. 2007. The history of the word for cacao in ancient Mesoamérica. *Ancient Mesoamérica*, 18: 192-237.
- Kedjebo, K.B.D., Guehi, T.S., Kouakou, B., Durand, N., Aguilar, P., Fontana, A., Montet, D. 2016. Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in raw cocoa beans. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33: 157-166.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. 2006. The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.). *The Prokaryotes*, Springer, Nueva York, EE.UU., pp. 163-200.



- Kieck, J.S., Zug, K.L.M., Huamaní Yupanqui, H.A., Gómez Aliaga, R., Cierjacks, A. 2016. Plant diversity effects on crop yield, pathogen incidence, and secondary metabolism on cacao farms in Peruvian Amazonia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 222: 223-234.
- Kim, D.Y., Lee, M.J., Cho, H.Y., Lee, J.S., Lee, M.H., Ching, C.W., Shin, D.H., Rhee, Y.H., Son, K.H., Park, H.Y. 2016. Genetic and functional characterization of an extracellular modular GH6 endo- $\beta$ -1,4-glucanase from an earthworm symbiont, *Cellulosimicrobium funkei* HY-13. *Antonie Leeuwenhoek*, 109: 1-12.
- Kim, Y., Koh, I., Rho, M. 2015. Deciphering the human microbiome using next-generation sequencing data and bioinformatics approaches. *Methods*, 79-80: 52-59.
- Kim, S., Lee, H., Lee, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Yoon, Y., Choi, K.H. 2017. Microbe-mediated aflatoxin decontamination on dairy products and Feeds. *Journal of Dairy Science*, 100: 871-880.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primer for classical and next-generation-sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41: e1.
- Koffi, A.S., Yao, N., Bastide, P., Bruneau, D., Kadjo, D. 2017a. Homogenization of cocoa beans fermentation to upgrade quality using an original improved fermenter. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 11: 558-563.
- Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B., Niamke, S. 2017b. Diversity of yeasts involved in cocoa fermentation of six major cocoa-producing regions in Ivory Coast. *European Scientific Journal*, 13: 496-516.
- Koné, M.K., Guéhi, S.T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A.F., Brou, K., Boulanger, R., montet, D. 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89: 910-917.
- Kongor, J.E., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa, E.O., Boeckx, P., Dewttinck, K. 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile-A review. *International Food Research*, 82: 44-52.
- Kothe, L., Zimmermann, B.F., Galensa, R. 2013. Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chemistry*, 141: 3656-3663.



- Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W., Franz, C. 2008. Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Current Microbiology*, 56: 306-314.
- Kouamé, L.M., Koua, G.A.Y., Niamke, J.A., Goualie, B.G., Niamke, S.L. 2015. Cocoa fermentation from Agnéby-Tiassa: Biochemical study of microflora. *American Journal of Bioscience*, 3: 203-211.
- Kozicka, M., Tacconi, F., Horna, D., Gotor, E. 2018. Forecasting cocoa yields for 2050. *Biodiversity International*, Roma, Italia.
- Laëtitia, G., Pascal, D., yann, D. 2014. The citrate metabolism in homo- and heterofermentative LAB: A selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 953-969.
- Lagier, J.C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., Trape, J.F., Koonin, E.V., La Scola, B., raoult, D. 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 1185-1193.
- Lagunes-Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M., Guiraud, J.P. 2007. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 124-130.
- Lara-Hidalgo, C.E., Hernández-Sánchez, H., Hernández-Rodríguez, C., Dorantes-Álvarez, L. 2017. Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin Journal of Nutrition & Metabolism*, 4: 1045.
- Larentis, M., Alfreider, A. 2011. Comparative evaluation of prokaryotic 16S rDNA clone libraries and SSCP in groundwater samples. *Journal of Basic Microbiology*, 51: 330-335.
- Laughter, J., Brown, B.B., Anantheswaran, R.C. 2012. Manufacturing chocolate for entrepreneurial endeavors. En: Zhao, Y. (Ed.). *Specialty Foods. Processing, Technology, Quality and Safety*. CRC Press, Nueva York, EE.UU., pp. 157-177.
- Lee, A.H., Neilson, A.P., O'Keefe, S.F., Ogejo, J.A., Huang, H., Ponder, M., Chu, H.S.S., Jin, Q., Pilot, G., Stewart, A.C. 2019. A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*, 245: 511-519.
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., De Vuyst, L. 2011a. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria



- during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28: 457-464.
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., De Vuyst, L. 2011b. Simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria reveal interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 6694-6698.
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., De Vuyst, L. 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 7708-7716.
- Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Goert, W., Camu, N., De Vuyst, L. 2012. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiology*, 30: 379-392.
- Li, W., Godzik, A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 26: 1658-1659.
- Li, Y., Zhu, S., Feng, Y., Xu, F., Ma, J., Zhong, F. 2014. Influence of alkalization treatment on the color quality and the total phenolic and anthocyanin contents in cocoa powder. *Food Science and Biotechnology*, 23: 59-63.
- Lim, T.K. 2012. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Lima, L.J.R., Almeida, M.H., Nout, M.J.R., Zwietering, M.H. 2011a. *Theobroma cacao* L., "the food of the gods": quality determinants of comercial cocoa beans, with particular reference to the impact of the fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 731:761.
- Lima, L.J.R., Kamphuis, H.J., Nout, M.R., Zwietering, M.H. 2011b. Microbita of cocoa poder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiology*, 28: 573-582.
- Lima, L.J.R., van der Velpen, V., Wolkers-Rooijackers, J., Kamphuis, H.J., Zwietering, M.H., Nout, M.J.R. 2012. Microbiota dynamics and diversity at different stages of industrial processing of cocoa beans into cocoa powder. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 2904-2913.
- Liu, J., Liu, M., He, C., Song, H., Guo, J., Wang, Y. Yang, H., Su, X. 2015. A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: realtionship to sensory perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 1362-1372.



- Liu, Y., Li, H., Du, J.H. 2011. Non-alcoholic beer production by *Saccharomyces ludwigii*. *Food Science*, 32: 186-190.
- López-Juárez, S.A., Hipólito-Romero, E., Cerdán-Cabrera, C.R., Ortiz-Ceballos, G.C., Reyes-López, D. 2019. Association between cocoa (*Theobroma cacao* L.) and vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) crops in agroforestry system in Comalcalco, Tabasco. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22: 613-629.
- Loret, S., Deloyer, P., Dandrifosse, G. 2005. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples. *Food Chemistry*, 89: 519-525.
- Luan, Y., Zhang, B.Q., Duan, C.Q., Yan, G.L. 2018. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT-Food Science and Technology*, 92: 11-186.
- Ludlow, C.L., Cromie, G.A., Garmendia-Torres, C., Sirr, A., Hays, M., Field, C., Jeffery, E.W., Fray, J.C., Dudley, A.M. 2016. Independent origin of yeast associated with coffee and cacao fermentation. *Current Biology*, 26: 965-971.
- Luxananil, P., Promchai, R., Wanasen, S., Kamdee, S., Thepkasikul, P., Plengvidhya, V., Visessanguan, W., Valyasevi, R. 2009. Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of Nham, a traditional Thai pork sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 312-315.
- Malan, B.B. 2018. Reconfiguration of the cocoa industry and poverty reduction in Cote D'ivoire. En: [www.gtap.agecon.purdue.edu/resources/res\\_display.asp?RecordID=4365](http://www.gtap.agecon.purdue.edu/resources/res_display.asp?RecordID=4365) (Última consulta: 14 de agosto de 2020)
- Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M. 2008. Comparison of the products of kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106: 1039-1045.
- Martín, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 17: 10-12.
- Martínez, I.B., Nelson, M.R., Flamand, M.C., Bertin, P. 2015. Genetic diversity and population structure of anciently introduced Cuban cacao *Theobroma cacao* plants. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62: 67-84.
- Martínez-Salvador, L.E., Martínez-Salvador, C. 2020. Innovación social en organizaciones cacaoteras en Tabasco, México. Aproximaciones desde la gobernanza territorial y la participación femenina en la agricultura. *Estudios Sociales-Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 30: 55.





- Maura, Y.F., Balzarini, T., Borges, P.C., Evrard, P., De Vuyst, L., Daniel, H.M. 2016. The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 6166-6176.
- Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Alegria, A., Leite, A.M.O., Peixoto, R.S., Delgado, S. 2014. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current Genomics*, 15: 293-309.
- McShea, A., Leissle, K., Smith, M.A. 2009. The essence of chocolate: A rich, dark, and well-kept secret. *Nutrition*, 25: 1104-1105.
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, J.P., Saels, V., Struyf, N., Bernaert, H., Vrancken, G., Verstrepen, K.J. 2013. Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa fermentations reveals a core and variable microbiota. *PLoS One*, 8: e81559.
- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G., Verstrepen, K.J. 2016. Turning chocolate through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 732-746.
- Megías-Pérez, R., Grimbs, S., D'Souza, R.N., Bernaert, H., Kuhnert, N. Profiling, quantification and classification of cocoa beans based on chemometric analysis of carbohydrates using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*, 258: 284-294.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J.H.M., Piceno, Y.M., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332: 1097-1100.
- Merkus, H.G. 2014. Chocolate. En: Merkus, H.G., Meesters, G.M.H. (Eds.). *Particulate Products: Tailoring Properties for Optimal Performance*. Springer International Publishing, Dordrecht, Países Bajos, pp. 253-272.
- Metzker, E.R. 2010. Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 31-46.
- Miescher Schwenninger, S., Freimüller Leischfeld, S., Gantenbein-Demarchi, C. 2016. High-throughput identification of the microbial biodiversity of cocoa bean fermentation by MALDI-TOF MS. *Letters in Applied Microbiology*, 63: 347-355.
- Miguel, M.G.D.C-P., de Castro Reis, L.V., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., Schwan, R.F. 2017. Cocoa fermentation: microbial identification by MALDI-TOF MS, and



- sensory evaluation of produced chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 362-369.
- Misnawi, J.S., Jamilah, B., Nazamid, S. 2004. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference*, 15: 403-409.
- Moens, F., Lefeber, T., De Vuyst, L. 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 1848-1857.
- Mohamadi Alasti, F., Asefi, N., Maleki, R., SeiiedlouHeris, S.S. 2019. Invstigating the flavor compounds in the cocoa powder production process. *Food Science & Nutrition*, 7: 3892-3901.
- Molina Martínez, R., Ramos Martínez, M.F. 2020. Determinants that influenced Mexican cocoa beans exports during 1996-2016. En: Kavoura, A., Kefallonitis, E., Theodoridis, P. 2020. *Strategic Innovative Marketing and Tourism*. Springer, Cham, Suiza, pp. 917-924.
- Moreira, I.M.V., Miguel, M.G.C.P., Duarte, W.F., Días, D.R., Schwan, R.F. 2013. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54: 9-17.
- Moreno-Trujillo, T.R., Verardo, V., Guerra-Hernández, E. Fiorenza Carboni, M., Pérez, E., García-Villanova, B. 2013. Effect of technological processes on Maillard reaction and acrylamide formation in cocoa. *Abstract Book of the International Conference on FoodOmics, Cesena, Italia*, pp. 86.
- Morgan, H.H., du Toit, M., Setati, M.E. 2017. The grapevine nad wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8: 820.
- Morganelli, A. *The biography of chocolate*. Crabtree Publishing Company, Nueva York, EE.UU.
- Mota-Gutiérrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I., Cocolin, L. 2019. Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients*, 11: 884.
- Mota-Gutiérrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., Cocolin, L. 2018. Dynamics and biodiversity of bacterial and yeasts communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmetnal Microbiology*, 84: e01164-18.



- Motamayor, J.C., Lachenaud, P., Silva e Mota, J.W., Loor, R., Kuhn, D.N., Brown, J.S., Schnell, R.J. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.).
- Motamayor, J.C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89: 380-386.
- Mounjoeunpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P.R., Guiraud, J.P. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 234-241.
- Munkvold, G.P. 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. En: Moretti, A., Susca, A. (Eds.). *Mycotoxigenic Fungi*, Humana Press, Nueva York, EE.UU., pp. 51-106.
- Müntener, K. 2010. Conching: Back to the basics. *Manufacturing Confectioner*, 90: 65-77.
- Nair, K.P. 2010. The agronomy and economy of important tree crops of the developing world. Elsevier, Londres, Reino Unido.
- Nair, B., Kumar, V. 2014. Cocoa butter and its alternatives. A review. *Journal of Bioresource Engineering and Technology*, 2: 1-11.
- Nazaruddin, R., Seng, L.K., Hassan, O., Said, M. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24: 87-94.
- Nelson, V., Phillips, D. 2018. Sector, landscape or rural transformations? Exploring the limits and potential of agricultural sustainability initiatives through a cocoa case study. *Business Strategy and the Environment*, 27: 252-262.
- Nielsen, D.S., Arneborg, N., Jespersen, J. 2015. Mixed microbial fermentations and methodologies for their investigation. En: Schwan, R.F., Fleet, G.H. (Eds.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, EE.UU., pp. 1-41.
- Nielsen, D.S., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Holzapfel, W.H., Jakobsen, M. 2007a. *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile acid lactic bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 57: 1468-1472.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., Holzapfel, W.H. 2007b. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using



culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 168-186.

Nielsen, D.S., Cafrack, M., Jespersen, L., Jakobsen, M. 2013. The microbiology of cocoa fermentation. En: Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S. (Eds.). *Chocolate in Health and Nutrition*. Humana Press, Nueva York, EE.UU., pp. 39-60.

Niether, W., Schneidewind, U., Armengot, L., Adamtey, N., Schneider, M., Gerold, G. 2017a. Spatial-temporal soil moisture dynamics under different cocoa production systems. *Catena*, 158: 340-349.

Niether, W., Smit, I., Armengot, L., Schneider, M., Gerold, G., Pawelzik, E. 2017b. Environmental growing conditions in five production systems induce stress response and affect chemical composition of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 10165-10173.

Niether, W., Smit, I., Armengot, L., Schneider, M., Gerold, G., Pawelzik, E. 2018. Physiological response in beans of three cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivars to micro-environmental growing conditions in cacao agroforestry systems and monocultures under conventional and organic management. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*, Lima, Perú. *International Cocoa Organization (ICCO)*.

Nocker, A., Burr, M., Camper, A.K. 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54: 276-289.

Nunes, C.S.O., da Silva, M.L.C., Camilloto, G.P., Machado, B.A.S., Hodel, K.V.S., Koblitz, M.G.B., Carvalho, G.B.M., Uetanabaro, A.P.T. 2020. Potential applicability of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L) as and adjunct for beer production. *The Scientific World Journal*, Article ID 3192585.

Ofori-Frimpong, K., Afrifa, A.A., Acquaye, S. 2010. Impact of shade and cocoa plant densities on soil organic carbon sequestration rates in a cocoa growing soil of Ghana. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4: 621-624.

Okongor, G.N., Afangideh, I.A., Obong, L.B. 2013. Impact of rainfall regime on cocoa production in Etung local government area, Cross River-State, Nigeria. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 1: 243-251.

Oluyole, K., Sanusi, E.O., Aigbekaen, E.O., Oni, O.A. 2011. Food security status among cocoa farming households in Nigeria: a discriminant analysis approach. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7: 617-623.

Ooi, T.S., Ting, A.S.Y., Siow, L.F. 2020. Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids



- of Malasya cocoa beans: a simulation study. *LWT-Food Science and Technology*, 122: 108977.
- Oomes, N., Tieben, B., Laven, A., Ammerlaan, T., Appelman, R., Biesenbeek, C., Buunk, E. 2016. Market concentration and price formation in the global cocoa value chain. *SEO Amsterdam Economics*, Amsterdam, Países Bajos.
- Op de Beeck, M.O., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. 2014. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLOS One*, 9: e97629.
- Oracz, J., Nebesny, E. 2019. Effect of roasting parameters on the physicochemical characteristics of high-molecular-weight Maillard reaction products isolated from cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups. *European Food Research and Technology*, 245: 111-128.
- Oracz, J., Nebesny, E. 2014. Influence of roasting conditions on the biogenic amine content in cocoa beans of different *Theobroma cacao* cultivars. *Food Research International*, 55: 1-10.
- Ordoñez-Araque, R.H., Landines-Vera, E.F., Urresto-Villegas, J.C., Caicedo-Jaramillo, C.F. 2020. Microorganisms during cocoa fermentation: systematic review. *Foods and raw Materials*, 8: 155-162.
- Ortega Andrade, S., Páez, G.T., Fera, T.P., Muñoz, J. 2017. Climate change and the risk of spread of the fungus from the high mortality of *Theobroma cacao* in Latin America. *Neotropical Biodiversity*, 3: 30-40.
- Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., Gervaise Rovedas, L. 2009. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical*, 59: 119-127.
- Ouattara, D.H., Ouattara, H.G., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., Niamke, S.L. 2017. Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, 256: 11-19.
- Ouattara, D.H., Ouattara, H.G., Goualie, B.G., Kouamé, L.M., Niamke, S.L. 2014. Biochemical and functional properties of lactic acid bacteria isolated from Ivorian cocoa fermenting beans. *Journal of Applied Biosciences*, 77: 6489-6499.
- Ouattara, H.G., Reverchon, S., Niamke, S.L., Nasser, W. 2011. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 28: 1-8.



- Owolarafe, O.K., Ogunsina, B.S., Gbadamosi, A.S., Fabunmi, O.O. 2007. Application of coefficient of friction to the separation of cocoa husk-beans mixture. *Journal of Food Process Engineering*, 30: 584-592.
- Owusu, M. 2010. Influence of raw material and processing on aroma in chocolate. Tesis Doctoral. Universidad de Copenhague, Dinamarca.
- Owusu, M., Petersen, M.A., Heimdal, H. 2012. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volátiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36: 446-456.
- Ozturk, G., Young, G.M. 2017. Food evolution: the impact of society and science on the fermentation of cocoa beans. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 431-455.
- Pacheco-Montealegre, M.A., Dávila-Mora, L.L., Botero-Rute, L.M., Reyes, A., Caro-Quintero, A. 2020. Fine resolution analysis of microbial communities provides insight into the variability of cocoa bean fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 11, Artículo 650.
- Papalexandratou, Z., De Vuyst, L. 2011. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Research*, 11: 564-574.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J.C., Amores, F., Daniel, H.M., De Vuyst, L. 2011a. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7698-7714.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P., De Vuyst, L. 2011b. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28: 1326-1338.
- Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G., De Vuyst, L. 2011c. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28: 964-973.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H.M., De Vuyst, L. 2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these



- microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35: 73-85.
- Papalexandratou, Z., Kaasik, K., Villagra Kauffmann, L., Skorstengaard, A., Bouillon, G., Espensen, J.L., Hansen, L.H., Jakobsen, R.R., Blennow, A., Krych, L., Castro-Mejía, J.L., Nielsen, D.S. 2019. Linking cocoa varietals and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *International Journal of Food Microbiology*, 304: 106-118.
- Páramo, D., García-Alamilla, P., Salgado-Cervantes, M.A., Robles-Olvera, V.J., Rodríguez-Jimenes, G.C. 2010. Mass transfer of water and volatile fatty acids in cocoa beans during drying. *Journal of Food Engineering*, 99: 276-283.
- Patel, R. 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, 61: 100-111.
- Peinado, R.A., Moreno, J.J., Ortega, J.M., Mauricio, J.C. 2003. Effect of gluconic acid consumption during simulation of biological aging of sherry wines by a flor yeast strain on the final volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6198-6203.
- Peláez, P.P., Guerra, S., Contreras, D. 2016. Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria*, 7: 111-119.
- Pelicaen, R., Gonze, D., Teusink, B., De Vuyst, L., Weck, S. 2019. Genome-scale metabolic reconstruction of *Acetobacter pasteurianus* 386B, a candidate functional starter culture for cocoa bean fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10: 281.
- Pereira, G.V.M., Alvarez, J.P., Neto, D.P.C., Soccol, V.T., Tanobe, V.O.A., Rogez, H., Góes-Neto, A., Soccol, C.R. 2017. Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *LWT-Food Science and Technology*, 84: 290-297.
- Pereira, G.V.M., Magalhães-Guedes, K.T., Schwan, R.F. 2013a. rDNA-based DGGE analysis and electron microscopic observation of cocoa beans to monitor microbial diversity and distribution during the fermentation process. *Food Research International*, 53: 482-486.
- Pereira, G.V.M., Magalhães, K.T., De Almeida, E.G., Coelho, I.S., Schwan, R.F. 2013. Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless



- steel tank: influence on dynamics of microbial populations and physicochemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161: 121-133.
- Pereira, G.V.M., Miguel, M.G.C.P., Ramos, C.L., Schwan, R.F. 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 5395-5405.
- Pereira, G.V.M., Soccol, V.T., Soccol, C.R. 2016. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 7: 50-57.
- Pipitone, L. 2018. Cocoa boom & bust: A review of cocoa market developments. *Development*, 25: 26.
- Poelmans, E., Swinnen, J.F.M. 2019. A brief economy history of chocolate. LICOS Discussion Paper, no. 142, Universidad Católica de Lovaina. LICOS Centre for Institutions and Economic Performance, Lovaina, Bélgica.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28: 848-861.
- Predan, G.M.I., Lazăr, D.A., Lungu, I.I. 2019. Cocoa industry. From plant cultivation to cocoa drinks production. En: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.). *Caffeinated and Cocoa Based Beverages*. Woodhead Publishing, Duxford, Reino Unido, pp. 489-507.
- Puspita, I.D., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K., Nakatsu, C.H., 2012. Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes and Environments*, 27: 356-366.
- Quelal-Vásquez, M.A., Lerma-García, M.J., Pérez-Esteve, E., Talens, P., Barat, J.M. 2020. Roadmap of cocoa quality and authenticity control in the industry: A review of conventional and alternative methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 448-478.
- Quiñones-Muñoz, T. Gallegos-Infante, J.A., Rocha, Guzmán, N.E., Ochoa-Martínez, L.A., Morales-Castro, J., González-Laredo, R.F., Medina-Torres, L. 2011. Mixing and tempering effect on the rheological and particle size properties of dark chocolate coatings. *CyTA-Journal of Food*, 9: 109-113.
- Ramírez, E. 2011. Reingeniería del proceso productivo de chocolate en barra en una industria alimentaria. Tesis de Pregrado. Escuela de Ingeniería Química, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.





- Ramli, N., Hassan, O., Said, M., Samsudin, W., Idris, N.A. 2006. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30: 280-298.
- Ramos, C.L., Dias, D.R., Miguel, M.G.C.P., Schwan, R.F. 2014. Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64: 908-918.
- Rani, K.Y., Rao, V.R. 1999. Control of fermenters – A review. *Bioprocess Engineering*, 21: 77-88.
- Raspor, P., Goranovic, D. 2008. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 101-124.
- Ravelomanana, R. Guiraud, J.P., Vincent, J.C., Galzy, P. 1985. The yeast flora of cocoa bean fermentation in the Ivory Coast. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Bioechnology*, 1: 319-326.
- Razzauti, M., Galan, M., Bernard, M., Maman, S., Klopp, C., Charbonnel, N., Vayssier-Taussat, M., Eloit, M., Cosson, J.F. 2015. A comparison between transcriptome sequencing and 16S metagenomics for detection of bacterial pathogens in wildlife. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9: e0003929.
- Reineccius, G. 2006. *Flavour chemistry and technology*. CRC Press, Boca Ratón, EE.UU.
- Rihtman, B., Meaden, S., Clokie, M.R.J., Koskella, B., Millard, A.D. 2016. Assessing Illumina technology for the high-throughput sequencing of bacteriophage genomes. *Peer J*, 4: e2055.
- Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Contreras-Ramos, S.M., Orózco-Ávila, I., Jaramillo-Flores, E., Lugo-Cervantes, E. 2012. Effect of fermentation time and drying temperatura on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132: 277-288.
- Rodríguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orózco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., Jaramillo-Flores, M.E. 2011. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal component analysis. *Food Research International*, 44: 250-258.
- Romanens, E., Freimüller Leistchtfeld, S., Volland, A., Stevens, M.J.A., Krähenmann, U., Isele, D., Fischer, B., Meile, L., Miescher Schwenninger, S. 2019. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 262-272.



- Romanens, E., Näf, R., Lobmaier, T., Pedan, V., Leischtfeld, S.F., Meile, L., Schwenninger, S.M. 2018. A lab-scale model system for cocoa bean fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 3349-3362.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, J. 2006. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. En: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.). *Yeasts in Food and Beverages*, Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania, pp. 13-53.
- Romero-Cortés, T., Robles-Olvera, V., Rodríguez-Jimenes, G., Ramírez-Lepe, M. 2012. Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 339-347.
- Rottiers, H., Tzompa Sosa, D.A., De Winne, A., Ruales, J., De Clippeleer, J., De Leersnyder, I., De Wever, J., Everaert, H., Messens, K., Dewettinck, K. 2019. Dynamics of volatile compounds and flavour precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 245: 1917-1937.
- SAGARPA, 2017. Planeación Agrícola Nacional. Cacao Mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Ciudad de México, México. En: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B\\_sico-Cacao.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256425/B_sico-Cacao.pdf) (Fecha de consulta: 19 de agosto de 2020).
- Saltini, R., Akkerman, R., Frosch, S. 2013. Optimizing chocolate production traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29: 167-187.
- Samagaci, L., Ouattara, H.G., Goualié, B.G., Niamke, S.L. 2014. Growth capacity of yeasts potential starter strains under cocoa fermentation stress conditions in Ivory Coast. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26: 861-870.
- Sandhya, M.V.S., Yallapa, B.S., Varadaraj, M.C., Puranaik, J., Jaganmohan Rao, L., Janardhan, P., Murthy, P.S. 2016. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 65: 731-738.
- Sangproo, M., Polyiam, P., Jantama, S.S., Kanchanatawee, S., Jantama, K. 2012. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5a1 to produce optically pure D-lactate in mineral salts medium. *Bioresource Technology*, 119: 191-198.
- Santander Muñoz, M., Rodríguez Cortina, Vaillant, F.E., Escobar Parra, S. 2020. An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60: 1593-1613.



- Sarbu, I, Csutak, O. 2019. The microbiology of cocoa fermentation. En: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.). Caffeinated and Cocoa Based Beverages. Woodhead Publishing, Sawston, Reino Unido, pp. 423-446.
- Schwan, R.F., Fleet, G.H. 2015. Cocoa and Coffee Fermentation. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.
- Schwan, R.F., Pereira, G.V.M., Fleet, G.H. 2015. Microbial activities during cocoa fermentation. En: Schwan, R.F., Fleet, G.H. (Eds.). Cocoa and Coffee Fermentations. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, EE.UU., pp. 129-192.
- Schwan, R.F., Wheals, A.E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44: 205-221.
- Schwendimann, L., Kauf, P., Fieseler, L., Gantenbein-Demarchi, C., Miescher-Schwenninger, S. 2015. Development of a quantitative PCR assay for rapid detection of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* in cocoa bean fermentation. Journal of Microbiological Methods, 115: 94-99.
- Seguine, E., Mills, D., Marelli, J., Motamayor, J., Da Silva, I. 2014. Micro-fermentation of cocoa Patent. US Patent 20140199437 A1. Presentada el 12/08/2011, aprobada en 2014.
- Serra, J.L., Moura, F.G., Pereira, G.V.M., Soccol, C.R., Rogez, H., Darnet, S. 2019. Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. LWT-Food Science and Technology, 106: 229-239.
- Shin, J.M., Luo, T., Lee, K.H., Guerreiro, D., Botero, T.M., McDonald, N.J., Rickard, A.H. 2018. Deciphering endodontic microbial communities by next-generation sequencing. Journal of Endodontics, 44: 1080-1087.
- Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S., Eiler, A. 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the Illumina platform. PLoS One, 10: e0116955.
- Slavova, G. 2017. Global and domestic bulgarian production of cocoa and chochoalte articles for the period 2013-2016. Trakia Journal of Sciences, 15: 10-17.
- Sokmen, A., Gunes, G. 2006. Influence of some bulk sweeteners on rheological properties of chocolate. LWT-Food Science and Technology, 39: 1053-1058.
- Solieri, L., Dakal, T.C., Giudici, P. 2012. Next-generation sequencing and its potential impact on food microbial genomics. Annals of Microbiology, 63: 21-37.



- Somarriba, E., Beer, J. 2011. Productivity of *Theobroma cacao* agroforestry systems with timber or legume service shade trees. *Agroforestry Systems*, 81: 109-121.
- Spitaels, F., Li, L., Wieme, A., Balzarini, T., Cleenwerck, I., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Vandamme, P. 2014. *Acetobacter lambici* sp. nov., isolated from fermenting lambic beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 1083-1089.
- Srivastav, R., Suneja, G. 2019. Recent advances in microbial genome sequencing. En: Tripathi, V., Kumar, P., Tripathi, P., Kishore, A., Kamle, M. *Microbial Genomics in Sustainable Agrosystems*, Springer Nature Singapore, Singapur, pp. 131-144.
- Suárez-Venero, G.M., Avendaño-Arrazate, C.H., Ruiz-Cruz, P.A., Estrada de los Santos, P. 2019. Estructura e impacto de la diversidad taxonómica en cacao del Soconusco, Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana*, 30: 353-365.
- Sugita, T., Tajima, M., Amaya, M., Tsuboi, R., Nishikawa, A. 2004. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiology and Immunology*, 48: 755-759.
- Sukha, D.A., Ramnath, N., Butler, D.R. 2008. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, 226: 405-413.
- Svanberg, L., Ahrn, L., Lorén, N., Windhab, E. 2011. Effect of sugar, cocoa particles and lecithin on cocoa butter crystallisation in seeded and non-seeded chocolate model systems. *Journal of Food Engineering*, 104: 70-80.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 139-173.
- Takrama, J.F., Kumi, W.O., Otoo, G., Addo, K., Camu, N. 2015. Optimization of cocoa pulp juice fermentation with yeast starter cultures of cocoa heap fermentations. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*. 1: 22-33.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 771-778.
- Tara, T., Kamran, K., Ullah, Z., Aziz, S., Mehmood, A. 2019. Advanced analytical techniques for next generation sequencing: A narrative review. *Annals of Allied Health Sciences*, 5: 3-6.



- Teodorowicz, M., Van Neerven, J., Savelkoul, H. 2017. Food processing: The influence of the Maillard reaction on immunogenicity and allergenicity of food proteins. *Nutrients*, 9: 835.
- Tezara, W., Urich, R., Jaimez, R., Coronel, I., Araque, O., Azocar, C., Chacón, I. 2016. Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics than Forastero? *Botanical Sciences*, 94: 563-574.
- Toker, O.S., Palabiyik, I., Konar, N. 2019. Chocolate quality and conching. *Trends in Food Science & Technology*, 91: 446-453.
- Toker, O.S., Palabiyik, I., Pirouzian, H.R., Aktar, H., Konar, N. 2020. Chocolate aroma: Factors, importance and analysis. *Trends in Food, Science & Technology*, 99: 580-592.
- Torres-Moreno, M., Tarrega, A., Costell, E., Blanch, C. 2012. Dark chocolate acceptability: influence of cocoa origin and processing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 404-411.
- Tothmihaly, A. 2017. How low is the price elasticity in the global cocoa market? *GlobalFood Discussion Paper 102*, Universidad de Goettingen, Países Bajos.
- Trognitz, B., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Forestier-Chiron, N., Ayestas, E., Kuant, A., Schedelman, X., Hermann, M. 2013. Diversity of cacao trees in Waslala, Nicaragua: Associations between genotype spectra, product quality and yield potential. *PLoS ONE*, 8: e54079.
- Tuenter, E., Delbaere, C., De Winne, A., Bijttebier, S., Custers, D., Foubert, K., Van Durme, J., Messens, K., Dewettinck, K., Pieters, L. 2020. Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. *Food Research International*, 130: 108943.
- Tyl, C., Sadler, G.D. 2017. pH and titratable acidity. En: Nielsen, S.S. (ed.). *Food Analysis*, 5ª ed. Springer, Cham, Suiza, pp. 389-406. *Agroforestry Systems*, 88: 947-956.
- UNCTAD. 2006. Market information on cocoa. Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo, Ginebra, Suiza.
- Urbańska, B., Kowalska, L. 2019. Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world. *Antioxidants*, 8: 283.
- Urwyler, S.K., Glaubitz, J. 2015. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications. *Letters in Applied Microbiology*, 62: 130-137.



- Utrilla-Vázquez, M.C., Rodríguez-Campos, J., Avendaño-Arazate, C.H., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E. 2020. Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, 129: 108834.
- Vaast, P., Somarriba, E. 2014. Trade-offs between crop intensification and ecosystem services: the role of agroforestry in cocoa cultivation. *Agroforestry Systems*, 88: 947-956.
- Van Dijk, E.L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., Thermes, C. 2018. The third revolution in sequencing technology. *Trends in Genetics*, 34: 666-681.
- Van Veen, S.Q., Claas, E.C., Kuijper, E.J. 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in routine medical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 900-907.
- Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G. 2010. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309: 1-7.
- Vázquez-Ovando, A., Chacón-Martínez, L., Betancur-Ancona, D., Escalona-Buendía, H., Salvador-Figueroa, M. 2015. Sensory descriptors of cocoa beans from cultivated trees of Soconusco, Chiapas, Mexico. *Food Science and Technology*, 35: 285-290.
- Vázquez-Ovando, J.A., Molina-Freaner, F., Núñez-Farfán, J., Ovando-Medina, I., Salvador-Figueroa, M. 2014. Genetic identification of *Theobroma cacao* L. trees with high Criollo ancestry in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Genetics and Molecular Research*, 13: 10404-10414.
- Verna, R. 2013. The history and science of chocolate. *The Malaysian Journal of Pathology*, 35: 111-121.
- Viaud, M., Pasquier, A., Brygoo, Y. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-of ITS. *Mycological Research*, 104: 1027-1032.
- Vieira, L.R., Efraim, P., Van de Walle, D., De Clercq, N., Dewettinck, K. 2015. Influence of Brazilian geographic region and organic agriculture on the composition and crystallization properties of cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 92: 1579-1592.
- Viesser, J.A., Pereira, G.V.M., Neto, D.P.C., Vandenberghe, L.P.S., Azevedo, V., Brenig, B., Rogez, H., Góes-Neto, A., Socol, C.R. 2020. Exploring the contribution of fructophilic lactic acid bacteria to cocoa beans fermentation: Isolation, selection and evaluation. *Food Research International*, 136: 109478.



- Visintin, S., Alessandria, V., Valente, A., Dolci, P., Cocolin, L. 2016. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 216: 69-78.
- Vogelmann, S.A., Hertel, C. 2011. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 28: 583-589.
- Voigt, J., Lieberei, R. 2015. Biochemistry of cocoa fermentation. En: Schwan, R.F., Fleet, G.H. (Eds.). *Cocoa and Coffee Fermentations*, CRC Press, Boca Raton, EE.UU., pp. 193-226.
- Voorra, V., Bermúdez, S., Larrea, C. 2019. Global market report: Cocoa. International Institute for Sustainable Development, Winnipeg, Canadá.
- Wang, L., Naegelé, T., Doerfler, H., Fagner, L., Chaturvedi, P., Nukarinen, E., Bellaire, A., Huber, W., Weiszmann, J., Engelmeier, D., Ramsak, Z., Gruden, K., Weckwerth, W. 2016. System level analysis of cacao seed ripening reveals a sequential interplay of primary and secondary metabolism leading to polyphenol accumulation and preparation of stress resistance. *Plant Journal*, 87: 318-332.
- Wang, W., Yu, Y., Dou, T.Y., Wang, J.Y., Sun, C. 2018. Species of family Promicromonosporaceae and family Cellulomonadaceae that produce cellulosome-like multiprotein complexes. *Biochemistry Letters*, 40: 335-341.
- Wartenberg, A.C., Blaser, W.J., Gattinger, A., Roshetko, J.M., Van Noordwijk, M., Six, J. 2017. Does shade tree diversity increase soil fertility in cocoa plantations? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 248: 190-199.
- Whitefield, R. 2005. *Making chocolates in the factory*. Kennedy's Publications, Londres, Reino Unido.
- Whitkus, R., de la Cruz, M., Mota-Bravo, L., Gómez-Pompa, A. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 621-627.
- Wiselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., Grobber, G.J. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12: 151-161.
- Wollgast, J., Anklam, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33: 423-447.
- Wood, G.A.R., Lass, R.A. 2008. *Cocoa*. Blackwell Science, Oxford, Reino Unido.



- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Girio, F. 2006. Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 376-384.
- Yao, W., Outtara, H.G., Doué, G., Goualié, B.G., Koua, G.A., Niamké, S.L. 2015. Emphasis on techno-functional properties of *Bacillus* strains involved in Ivorian cocoa fermentation towards their use as potential starter. *British Microbiology Research Journal*, 10: 1-10.
- Yoroba, F., Kouassi, B.K., Diawara, A., Yapo, L.A.M., Kouadio, K., Tiemoko, D.T., Kouadio, Y.K., Koné, I.D., Assamoi, P. 2019. Evaluation of rainfall and temperature conditions for a perennial crop in tropical wetland: a case of study of cocoa in Côte d'Ivoire. *Advances in Meteorology*, Article ID 9405939.
- Zahouli, G.I.B., Guehi, S.T., Fae, A.M., Nemlin, J.G. 2010. Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. *Journal of Food Science*, 2: 184-190.
- Zambrano, T.Y.M., Castro, I.C.G., Plaza, C.L.M., Farfan, R.M. 2019. Recovery of ancestral knowledge for production of traditional Manabí cocoa paste. *International Journal of Life Sciences*, 3: 71-78.
- Zequeira, L.C. 2012. La producción del cacao en México: Tabasco, estudio de caso. Tesis Doctoral, Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Zhang, D., Motilal, L. 2016. Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity. En: Bailey, B., Meinhardt, L. (Eds.). *Cacao Diseases*. Springer, Cham, Suiza, pp. 3-31.
- Zheng, X., Liu, F., Li, X., Shi, X., Ni, Y., Li, B., Zhuge, B. 2018. Evaluating the microbial ecology and metabolite profile in Kazak artisanal cheeses from Xinjiang, China. *Food Research International*, 111: 130-136.
- Ziegler, G. 2009. Flavour development in cocoa and chocolate. En: Beckett, S.T. (Ed.). *Industrial Chocolate manufacture and Use*. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido, pp. 169-191.
- Zwir, R. 2012. Institute of food Technologists (IFT) Education division competition 2011 winner – Cocoa powders: Are they all created equal? *Journal of Food Science Education*, 11: 1-4.
- Żyżelewicz, D., Krysiak, W., Oracz, J., Sosnowska, D., Budryn, G., Nebesny, E. 2016. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. *Food Research International*, 89: 918-929.





## **7. ANEXOS**





## ANEXO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Grabado en el que se representa el consumo de productos derivados del cacao en la cultura maya.	P. 9
<b>Figura 1.2.</b> Hitos en la relación cacao-humanidad.	P. 10
<b>Figura 1.3.</b> Países productores de cacao y niveles de producción.	P. 12
<b>Figura 1.4.</b> Principales países transformadores del cacao y niveles de procesado.	P. 13
<b>Figura 1.5.</b> Árbol y fruta del cacao.	P. 15
<b>Figura 1.6.</b> Ciclos de conectividad entre producción y precio del cacao.	P. 19
<b>Figura 1.7.</b> Empresas de procesado de cacao y comercializadoras de sus derivados: volumen de cacao transformado, en t (x1000), y porcentaje sobre el total catalogado como cacao “certificado”.	P. 21
<b>Figura 1.8.</b> Histórico de la producción y consumo de cacao en México en el periodo 2003-2016 y previsiones de futuro hasta el año 2030.	P. 24
<b>Figura 1.9.</b> Regiones productoras y con potencial productor de cacao en México.	P. 25
<b>Figura 1.10.</b> Histórico de la producción de cacao (t) en Tabasco y Chiapas, principales regiones cacaoteras de México.	P. 26
<b>Figura 1.11.</b> Etapas en la cadena de valor del cacao, desde el cultivo hasta su consumo.	P. 29
<b>Figura 1.12.</b> Plataforma para secado natural del cacao.	P. 31
<b>Figura 1.13.</b> Adquisición de color como consecuencia del tratamiento de alcalinización del cacao.	P. 35
<b>Figura 1.14.</b> Máquina de conchado de cacao.	P. 37
<b>Figura 1.15.</b> Rueda de sabores del cacao y del chocolate.	P. 39
<b>Figura 1.16.</b> Factores de influencia en la calidad del cacao a lo largo de su procesado primario.	P. 40
<b>Figura 1.17.</b> Reacciones de Maillard durante la etapa de torrefacción y ejemplos de moléculas organolépticas formadas: a) tetrametilpirazina, b) 2-metilpropanal, c) 2-fenilacetaldehído.	P. 44
<b>Figura 1.18.</b> Redistribución del sabor en la masa de cacao durante el proceso de conchado.	P. 46
<b>Figura 1.19.</b> Eventos bioquímicos en la semilla durante la fermentación.	P. 52
<b>Figura 1.20.</b> Cajas de fermentación en pisos.	P. 53
<b>Figura 1.21.</b> Protocolos de las sucesivas generaciones de secuenciación.	P. 68
<b>Figura 3.1.</b> Diseño experimental seguido a lo largo del trabajo.	P. 79
<b>Figura 3.2.</b> Captura de Google Maps de la localización geográfica de la zona en la que se desarrolló el cultivo y la etapa fermentativa.	P. 80
<b>Figura 3.3.</b> Semillas del cacao Criollo Carmelo.	P. 80
<b>Figura 3.4.</b> Quebrado del cacao.	P. 81



<b>Figura 3.5.</b> Distribución tridimensional de los nueve puntos de muestreo seleccionados en la conformación de las muestras.	P. 82
<b>Figura 4.1.</b> Perfil térmico observado durante la fermentación.	P. 92
<b>Figura 4.2.</b> Evolución del pH y de la acidez titulable durante la fermentación.	P. 93
<b>Figura 4.3.</b> Evolución de compuestos que son utilizados como fuentes de carbono por la microbiota participante en el proceso fermentativo.	P. 96
<b>Figura 4.4.</b> Evolución de metabolitos asociados a la microbiota propia del proceso fermentativo.	P. 98
<b>Figura 4.5.</b> Número de OTUs eucariotas detectado en cada uno de los días de fermentación y OTUs compartidos entre distintos días.	P. 103
<b>Figura 4.6.</b> Diversidad fúngica observada a lo largo del proceso fermentativo, expresada según los índices de Shannon-Wiener y Simpson.	P. 105
<b>Figura 4.7.</b> Abundancias absolutas (número de lecturas) y relativas (tamaño de burbuja) de los OTUs eucariotas dominantes para distintos niveles taxonómicos (filo, familia y género).	P. 108
<b>Figura 4.8.</b> Relaciones evolutivas inferidas de las secuencias pertenecientes a las especies eucariotas con abundancias relativas superiores al 0,1% en al menos una de las muestras y la evolución cronológica de sus abundancias relativas.	P. 110
<b>Figura 4.9.</b> Niveles de variación entre los días inicial y final de la fermentación para las especies levaduriformes dominantes.	P. 111
<b>Figura 4.10.</b> Número de OTUs procariotas detectado en cada uno de los días de fermentación y OTUs compartidos entre distintos días.	P. 116
<b>Figura 4.11.</b> Diversidad procariota observada a lo largo del proceso fermentativo, expresada según los índices de Shannon-Wiener y Simpson.	P. 118
<b>Figura 4.12.</b> Abundancias absolutas (número de lecturas) y relativas (tamaño de burbuja) de los OTUs procariotas dominantes para distintos niveles taxonómicos (filo, familia y género).	P. 121
<b>Figura 4.13.</b> Relaciones evolutivas inferidas de las secuencias pertenecientes a las especies procariotas con abundancias relativas superiores al 0,5% en al menos una de las muestras y la evolución cronológica de sus abundancias relativas.	P. 122
<b>Figura 4.14.</b> Niveles de variación entre los días inicial y final de la fermentación para las especies procariotas dominantes.	P. 126
<b>Figura 4.15.</b> Comunidades microbianas y eventos bioquímicos acaecidos durante el proceso de fermentación del cacao.	P. 128
<b>Figura 4.16.</b> Análisis de componentes principales de los parámetros microbianos y físico-químicos estudiados durante el proceso.	P. 129



<b>Figura 4.17.</b> Análisis de conglomerados obtenido a partir de la matriz de similitud de Bray-Curtis, considerando abundancias relativas de especies microbianas y variables físico-químicas.	P. 137
<b>Figura 4.18.</b> Diferenciación cronológica del proceso fermentativo según análisis discriminante.	P. 138
<b>Figura 4.19.</b> Potencial relación entre las fases diferenciadas en el proceso y las variables de interés físico-químico y microbiano.	P. 139

#### ANEXO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Clasificación taxonómica del cacao.	P. 14
<b>Tabla 1.2.</b> Compañías multinacionales líderes en el sector de la producción de derivados del cacao.	P. 20
<b>Tabla 1.3.</b> Geografía del consumo de chocolate y otros derivados del cacao.	P. 22
<b>Tabla 1.4.</b> Comparativa de las principales regiones cacaoteras de México.	P. 25
<b>Tabla 1.5.</b> Compuestos volátiles de influencia en las propiedades aromáticas del cacao procesado.	P. 48
<b>Tabla 1.6.</b> Especies levaduriformes identificadas durante la fermentación del cacao en diferentes localizaciones geográficas.	P. 56
<b>Tabla 1.7.</b> Principales BALs identificadas durante la fermentación del cacao en diferentes localizaciones geográficas.	P. 58
<b>Tabla 1.8.</b> Principales BAAs identificadas durante la fermentación del cacao en diferentes localizaciones geográficas.	P. 61
<b>Tabla 3.1.</b> Condiciones de amplificación: cebadores y ciclos de amplificación utilizados.	P. 85
<b>Tabla 3.2.</b> Índices usados para estimar la diversidad microbiana a lo largo de la fermentación.	P. 87
<b>Tabla 4.1.</b> Análisis estadístico (Prueba de Normalidad y Análisis de Varianza/Mediana) de los metabolitos generados por la actividad microbiana.	P. 99
<b>Tabla 4.2.</b> Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos eucariotas.	P. 103
<b>Tabla 4.3.</b> Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos eucariotas, considerando exclusivamente OTUs con abundancias relativas por encima de 0,1% en al menos una muestra.	P. 106



**Tabla 4.4.** Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos procariotas. P. 117

**Tabla 4.5.** Índices cuali y cuantitativo de Sorensen-Dice, en los cuadrantes inferior y superior, respectivamente, para las comparativas pareadas entre muestreos procariotas, considerando exclusivamente OTUs con abundancias relativas por encima de 0,5% en al menos una muestra. P. 119

**Tabla 4.6.** Matriz de correlaciones de Spearman. En verde, correlaciones positivas y en rojo, negativas; mayor intensidad de color representa significancia a  $P < 0,01$  y menor a  $P < 0,05$ . P. 131

