

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y
AGROALIMENTARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

TRABAJO FIN DE MÁSTER



“Estudio de la ecología microbiana en las fermentaciones de cacao”

Autor: Jonatan Baruc Moreno Reyes

Directora: María del Carmen Vargas García

Curso Académico 2019 – 2020

“Estudio de la ecología microbiana en las fermentaciones de cacao”

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	3
1. Interés y objetivos.....	4
1.1. Justificación.....	4
1.2. Objetivo.....	4
2. Introducción.....	5
2.1. Generalidades.....	5
2.2. Origen y distribución actual.....	5
2.3. Importancia económica.....	7
2.4. Características botánicas y agronómicas.....	9
2.5. Composición química del grano cacao.....	11
2.6. Procesado y transformación	12
2.6.1 Secado.....	12
2.6.2. Etapa de torrefacción.....	13
2.6.3. Procesos adicionales.....	13
3. Factores relacionados con la fermentación y los perfiles organolépticos.....	15
3.1. Proceso general y metodologías utilizadas para la fermentación.....	15
3.2. Factores que condicionan sabor y aroma.....	16
3.2.1. Variedades y su influencia.....	16
3.2.2. Producción de compuestos durante las etapas del procesamiento.....	17
3.2.3. Otros factores que condicionan sabor y aroma.....	19
3.3. Perfil organoléptico del producto procesado.....	19
3.4. Importancia de los microorganismos en la fermentación.....	20
4. Ecología microbiana durante la fermentación.....	21
4.1. Dinámica y biodiversidad.....	21
4.2. Levaduras.....	23
4.3 Bacterias del ácido láctico.....	27
4.4. Bacterias del ácido acético.....	31
4.5. Otros microorganismos participantes.....	33
4.5.1. Bacterias aerobias formadoras de esporas - <i>Bacillus</i> sp.....	33
4.5.2. Otras especies bacterianas.....	35
4.5.3. Hongos filamentosos.....	35
5. Cultivos iniciadores.....	38
5.1. Fermentaciones controladas.....	38
6. Conclusiones.....	39
7. Bibliografía.....	40

Resumen: La producción del cacao y sus productos derivados ha sido objeto de investigación debido a la buena consideración que tienen entre los consumidores, no solo por propiedades organolépticas, sino también por los beneficios como antioxidante que ofrece para la salud. En los últimos años la demanda del cacao ha aumentado significativamente, con un crecimiento anual de 7,3%, y las previsiones plantean un aumento de 8,6 billones de dólares desde 2017 hasta los 18 billones en 2025. La primera etapa de la producción de chocolate, que es llevada a cabo por campesinos autóctonos, radica en una fermentación microbiana de aproximadamente siete días, que permite la degradación del mucilago que rodea los granos de cacao. El proceso fermentativo, que muestra una gran complejidad, implica una sucesión de comunidades microbianas, que comienza con una amplia gama de levaduras, a las que siguen bacterias del ácido láctico y, finalmente, bacterias del ácido acético. Durante este proceso, la temperatura alcanza los 50 °C y se generan metabolitos microbianos, como etanol, ácido láctico y ácido acético, que permiten la degradación del tejido de los granos y provoca la creación de precursores del sabor. La fermentación descontrolada y excesiva propicia un aumento de hongos filamentosos y especies de *Bacillus* que, por lo general dan lugar a propiedades no deseables. El conocimiento, cada vez mayor, del que se dispone en relación con los eventos transformadores que se dan durante la fermentación, ha permitido optimizar el desarrollo del proceso, optimización en la que se incluye la utilización de inoculantes externos, y que ha desembocado en la obtención de productos de mayor calidad. No obstante, aún quedan numerosos aspectos por mejorar y controlar, tanto desde una perspectiva logística, como biológica, lo que redundará en beneficio de los pequeños agricultores que, en gran medida, sustentan el sector cacaotero.

Abstract: The production of cocoa and its derivative products has been the subject of research due to their consideration by consumers both because of their good organoleptic properties and antioxidant characteristics. In recent years, the demand for cocoa has increased significantly with an annual growth of 7.3%, and forecasts suggest an increase of 8.6 billion dollars from 2017 to 18 billion in 2025. The first stage of the production of cocoa, which is carried out by farmers in the area, is based on a microbial fermentation of approximately seven days, that allows the degradation of the pectinaceous mucilage that surrounds the cocoa beans. The fermentation process turns out to be complex and generally consists of a successive process of microorganisms, beginning with a wide range of yeasts, followed by lactic acid bacteria and finally by acetic acid bacteria. During this process, the temperature reaches 50 °C and microbial metabolites, such as ethanol, lactic acid and acetic acid, are produced, which allows the degradation of the grain tissue and cause the creation of flavor precursors. Uncontrolled and excessive fermentation generates an increase in filamentous fungi and *Bacillus* species that, generally, cause off-flavors. The physiological functions of the currently dominant species are reasonably better understood, thanks to which the fundamental importance of an orderly microbial succession that allows obtaining an adequate cocoa aroma has been determined. Due to the increase in our knowledge, the development of more optimized processes, including the use of inoculant starters, which leads to the obtention of higher quality products. However, there are some improvements that have yet to take place, from a logistic point of view but also from a biological perspective. Such improvements will benefit small farmers which are the main supporters of the cocoa sector.

1. Interés y objetivos

1.1. Justificación

En la actualidad, el mercado del cacao genera anualmente en torno a 8,6 billones de dólares, aunque la creciente demanda existente, especialmente en lo que respecta a productos de elevada calidad, prevé crecimientos hasta los 18 billones para el año 2025, con tasas de incremento anual del 7,3%. Una de las principales características del sector reside en el escaso grado de control que se ejerce durante las etapas de cultivo y procesado inicial, lo que deja un amplio margen de mejora. Una de las razones que se apunta para ello es el nivel económico de los países productores, mayoritariamente en vías de desarrollo (Voora *et al.*, 2019), y del estatus social y económico de los agricultores, que también son los primeros transformadores del grano de cacao. Se estima que alrededor de 50 millones de personas asocian su modo de vida a este cultivo, la mayor parte de ellas consideradas como de bajos recursos y con una elevada propensión a la pobreza, condición que limita las opciones de sofisticación de los protocolos de procesamiento e incide directamente en la falta de homogeneidad de los productos generados en las primeras etapas de procesado, tan importantes en las características finales de los derivados elaborados. Por otra parte, existen otros factores que contribuyen a esa variabilidad, tales como el cultivar utilizado, la localización geográfica del cultivo o la metodología de procesado, que a su vez condicionan la naturaleza de las comunidades microbianas actuantes.

Precisamente, el papel que desempeñan los microorganismos a lo largo del procesado del cacao, con especial incidencia en la etapa fermentativa, es objeto de estudio de una gran parte de las investigaciones que se realizan en relación a este producto. De forma concreta, la posibilidad de establecer cultivos iniciadores que controlen en mayor medida los eventos metabólicos que tienen lugar durante esta fase, unido a la optimización y unificación de los sistemas de fermentación, podrían permitir a los pequeños agricultores el desarrollo de procesos más estandarizados dirigidos a la obtención de un producto de mayor calidad y a limitación de pérdidas. Una herramienta fundamental en el éxito de este tipo de estudios son las tecnologías –ómicas, que facilitan la caracterización y el discernimiento de las poblaciones microbianas involucradas en la fermentación y, por tanto, el acceso a un mayor nivel de control.

El impacto de estas estrategias de mejora derivadas de un mayor conocimiento de la ecología microbiana asociada al procesado del cacao y, en especial, a su etapa fermentativa, incidiría directamente en los propios agricultores, ya que son ellos los encargados de ejecutar esta etapa. En este sentido, tales mejoras se traducirían directamente en un incremento en el nivel de vida de estas personas y, de forma global, en un comercio más justo.

1.2. Objetivo

La presente revisión pretende recopilar el conocimiento que, hasta el momento, existe en relación con la ecología microbiana asociada al proceso fermentativo del cacao, así como en torno a la secuencia cronológica de las distintas comunidades participantes y el posible establecimiento de diferentes fases en función de este criterio. Adicionalmente, se pretende, evaluar el potencial de diversas especies como cultivos iniciadores, en función de su peso relativo en el proceso, tanto desde una perspectiva cuantitativa como cualitativa.

2. Introducción

2.1. Generalidades

El origen del cacao se remonta hasta la cultura de mayas y aztecas. Fueron probablemente ellos los que en el 400 d.C. cultivaron por primera vez la planta, y al igual todas las especies vegetales domesticadas, la planta de cacao de la que se dispone hoy no es más que el resultado de un largo proceso de cruzamientos y selección. Aunque no todos los pueblos precolombinos le daban el mismo tipo de procesado al fruto del cacao, gran parte de ellos compartían metodologías. Así, el tratamiento más común implicaba la molienda de los granos secos, su disolución en agua y la incorporación final de canela y pimienta, lo que generaba bebidas altamente amargas, pero con grandes efectos vigorizantes y estimulantes. Esta bebida tuvo varios nombres, pero fue “Xocolat” el que tendría impacto a futuro (Verna, 2013).

Los primeros movimientos expansivos del cacao se conectan con la colonización española, evento que propició la llegada de las primeras semillas al viejo continente. Su expansión tuvo lugar de forma más o menos rápida, convirtiéndose en comunes por toda Europa, especialmente entre las clases altas, las bebidas a base de cacao. No obstante, tales bebidas fueron ajustándose a los gustos de los nuevos consumidores, lo que condujo a un cambio en las especias adicionadas, siendo sustituidas las de carácter picante por vainilla, azúcar y canela. Esta nueva receta, mucho más sutil, se hizo popular entre las clases adineradas lo que generó el famoso nombre de alimento de los dioses, *Theobroma cacao*, gracias al naturalista sueco Carl von Linné. (Cidell y Alberts, 2006).

El inicio de la comercialización del cacao por territorios antes impensables se dio gracias al desarrollo de motores a vapor, que permitió desarrollar la molturación del cacao de forma mecánica, y el desarrollo de prensas de cacao, llevado a cabo por el químico holandés Conrad Van Houten, que posibilitó la separación entre el polvo y la manteca. Ambas innovaciones dieron lugar a un procesado más eficiente del cacao y a la generación de derivados con características más parecidas a los que conocemos en la actualidad. Adicionalmente, incrementaron los ritmos de producción y facilitaron la llegada de grandes volúmenes al consumidor.

2.2. Origen y distribución actual

La localización geográfica de los ancestros salvajes de la planta del cacao se distribuye entre América del Sur y América Central, aunque no se puede ubicar con plena seguridad cuál es su origen concreto, ya que según otros autores dicho punto se encontraba en la zonas de influencia de los ríos Orinoco y Amazonas (Henderson *et al.*, 2007). Los estudios genéticos desarrollados en los últimos años sitúan la ubicación más probable en zonas de Colombia y Venezuela, a partir de las cuales se produjo la expansión progresiva hacia América Central, gracias al comercio y al movimiento humano.

Las variedades a partir de las cuales se dio la distribución por el continente fueron dos. La primera, variedad “criolla”, que provenía de Venezuela, dio lugar a la expansión en dirección norte hacia Mesoamérica, mientras que en zonas del Ecuador y el norte de Brasil, la expansión se atribuyó a la variedad “Forastero” (Motamayor *et al.*, 2002). Dado que los inicios de la colonización se asocian mayoritariamente a la zona central del continente, fue la variedad

“Criollo” la que, en principio, fue diseminada por los conquistadores europeos, principalmente españoles, portugueses y franceses, por diversos territorios que incluían numerosas islas del Caribe, tales como Jamaica, Martinica y Trinidad. Los subsiguientes movimientos colonizadores exportaron la semilla hasta Santo Tomé, en África Occidental, y desde allí se favoreció su paso hacia la vecina Isla Príncipe y posteriormente hasta Ghana, que fue el punto de difusión para el continente. Las condiciones en esta zona del planeta son muy similares a las presentes en el territorio de origen, por lo que la implantación del cultivo fue exitosa. Los holandeses se encargaron de introducir la especie en Asia a través de la Isla Célebes, en Indonesia, y posteriormente en Java, durante la segunda mitad del siglo XVI. A principios del siglo XVII, los españoles introdujeron la variedad “Criollo” en Filipinas, mientras que la llegada a Sri Lanka, procedente de Trinidad, no se produjo hasta finales del siglo XVIII. Desde este país, ya transcurrido cierto tiempo, se expandió hacia varios países de Oceanía (Bailey y Meinhardt, 2016).

Cocoa production and consumption

In thousand tonnes, 2017-18

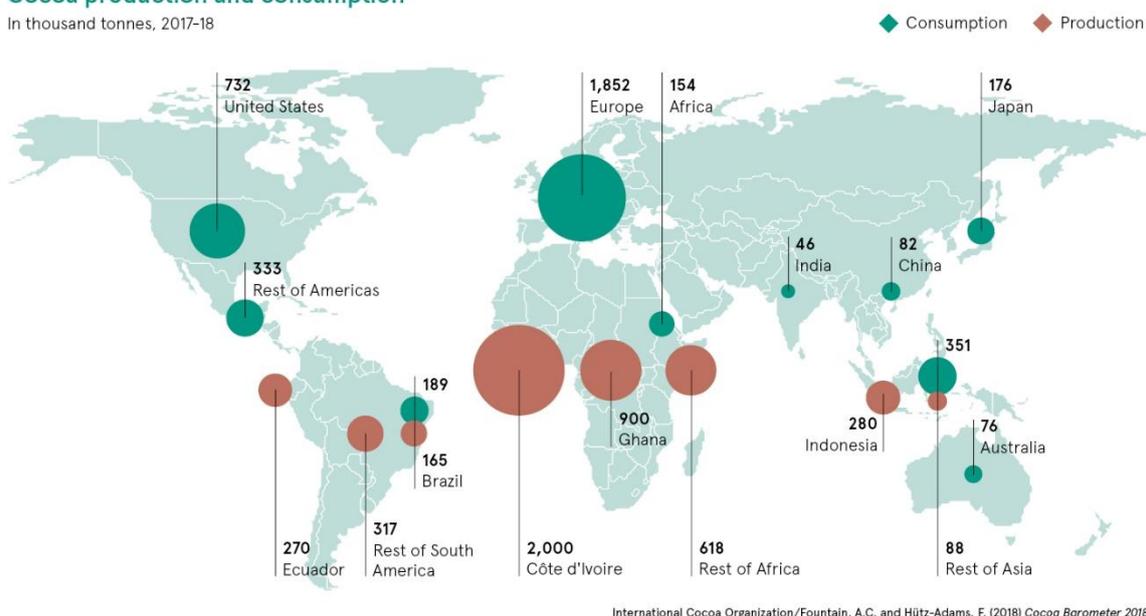


Figura 1. Niveles de producción y consumo de cacao (Cocoa Barometer, 2018).

Los principales productores de cacao se reparten entre América Latina y África Occidental. En África encontramos a Costa de Marfil, Camerún, Ghana, Nigeria y Santo Tomé, mientras que entre los productores en Sudamérica están Ecuador, Belice, Brasil, Costa Rica, México, Perú. Finalmente, en Asia destacan Indonesia, Malasia y Papúa Nueva Guinea. Costa de Marfil es el productor número uno del mundo, sin posibilidades de que algún país lo alcance. Las casi 2000 toneladas que cosechan cada año, y que van en aumento, representan más que la totalidad de todos los demás productores de África juntos. En 2018, el continente africano generó hasta el 76% de la producción mundial, frente al 16% de Latinoamérica y el 7% de Asia (Verna, 2013). Cabe recalcar que del total de la producción mundial, el 70% proviene de pequeños productores que no tienen más de 5 ha e involucra, como ya se ha mencionado, un entorno laboral entre 40

y 50 millones de personas. Es importante mencionar que la mayoría de los trabajadores de esta industria son de escasos recursos, factor que posiblemente se deba a que los países productores muy pocas veces también son procesadores del producto, lo que reduce su margen de beneficio (Ozturk y Young, 2017).

El cacao de Latinoamérica, denominado cacao de fino aroma, se caracteriza principalmente por su calidad. Este cacao es producido particularmente en la zona del Caribe, que acumula el 80% de la producción de esta variedad, debido a sus características climáticas tan específicas. El restante 20% se encuentra cultivado en zonas de Asia, África y Oceanía. Esta variedad actualmente no representa un porcentaje importante en la producción mundial, ya que permanece en niveles secundarios de producción. Una de las causas de esta escasa incidencia radica en que en el pasado se ha dado prioridad a aumentar las fronteras agrícolas de las variedades ordinarias, destinando el cacao de fino aroma para uso específico en recetas tradicionales de alta calidad (Papalexandratou *et al.*, 2019). No obstante, en la actualidad, el uso de las variedades de fino aroma comienza a tener mayor acogida en mercados de todo el mundo. La continuidad de esta tendencia dará lugar a que, en un futuro no muy lejano, se dé un incremento en la relación de producción de esta variedad frente a las ordinarias, lo que podría devolverle a Latinoamérica un protagonismo acorde a su papel histórico en relación con el cacao.

2.3. Importancia económica

A pesar de que el cacao sigue siendo un cultivo mayoritariamente utilizado con enfoques de producción de productos tradicionales, y su procesamiento en la mayoría de las zonas no ha sufrido una tecnificación considerable, este ha logrado superar una productividad anual de más de $4 \cdot 10^6$ t año. En los últimos años el comercio, oferta y demanda, ha aumentado significativamente en torno a este producto, llegando a alcanzar en 2017 el valor de 8,6 billones de dólares, estimándose que para el 2025 se alcancen los 18 billones con tasas de crecimiento anual de 7,3% (Voora *et al.*, 2019).

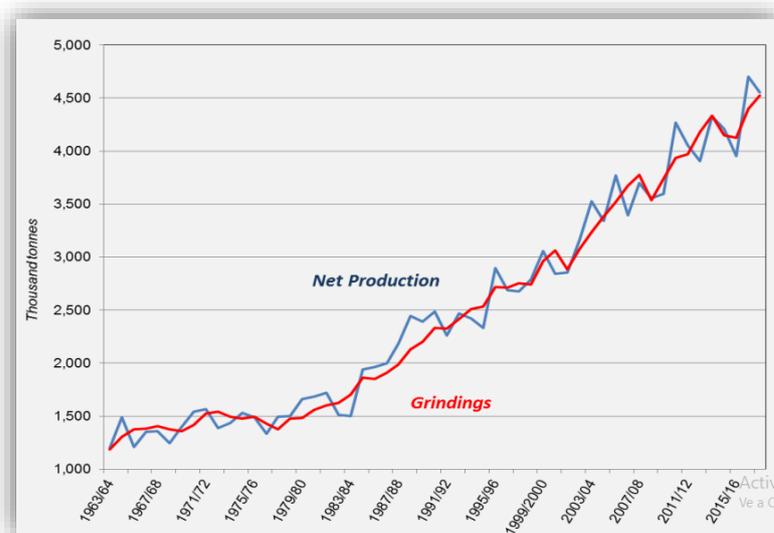


Figura 2. Situación del mercado cacaotero. Tendencias en oferta y demanda (Pipitone, 2018).

En otra escala, el comercio del cacao supone el sustento de en torno a 50 millones de pequeños productores a lo largo de todo el mundo, aunque se distribuyen en su mayor parte entre países en vías de desarrollo. El nivel económico de estos productores primarios se sitúa en el umbral de la pobreza, dado el escaso beneficio que, en la actualidad, proporciona el cacao a los encargados de producirlo. Este escaso margen de beneficio sea probablemente consecuencia, por una parte, de la alta tasa de fluctuación del precio final y, por otra, del monopolio que ejercen las multinacionales del sector, encargadas del procesado final del cacao fermentado. En relación con este último factor, sólo seis grandes empresas (Mondelēz International, Ferrero Group, Mars Inc., Nestlé S.A., Lindt y Sprüngli AG, y Hershey Foods Corp.) controlan más del 40% de la producción mundial de cacao, lo que favorece un control férreo del mercado y de los precios de salida (Beg *et al.*, 2017), que repercuten de forma directa sobre los pequeños productores, sin que tal tendencia pueda ser evitada por las leyes antimonopolio que, en principio, penalizan semejantes comportamientos por parte de las grandes empresas. En los últimos años, y en un intento de romper la dependencia con respecto de estas multinacionales, se ha desarrollado el concepto de “cacao certificado”, mediante el que se intenta potenciar sistemas de producción sostenibles, tanto ambiental como laboralmente, y prácticas de comercio justo, favoreciendo así el desarrollo económico de los pequeños productores. En este sentido, incluso estas empresas dominantes comienzan a cubrir parte de su cuota de mercado con cacao etiquetado como certificado, dado que supone un valor añadido para una parte importante de los consumidores. Adicionalmente, gran parte de los países productores, que hasta el momento habían desatendido las demandas del sector, dejando de lado esta actividad económica, empiezan a implementar estrategias dirigidas a su potenciación, entre las que se incluye el establecimiento de una incipiente industria transformadora, de manera que se limite la cuota exportadora y se incremente el valor añadido del cacao nativo, permitiendo así un mayor beneficio económico para los productores primarios (Oomes *et al.*, 2016).

Tabla 1. Compañías multinacionales líderes en el sector de la producción de derivados del cacao (adaptado de Neilsen *et al.*, 2018).

Compañía	Ventas (millones \$)	Demanda de cacao (miles t)	Marcas
Mars Inc (EE.UU.)	18.400	390	Snickers, Galaxy, Mars, MyM'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 ySprüngli AG (Suiza)	4.171	100	Lindt

En el periodo comprendido entre 2015 y 2017 el cacao registró una devaluación de su precio hasta el 50%, lo que ratificó la necesidad de realizar mejoras referentes a la adopción de prácticas que garanticen la producción del cacao certificado y de confianza, y den lugar a un comercio más justo (Voora *et al.*, 2019). En los últimos años, el interés también se ha centrado en otros aspectos, tales como la diversificación de la gama de productos en los que se requiere el uso de cacao, o la búsqueda de nuevos sectores de utilización potencial, como la cosmética. En ambos casos, se pretende aumentar el número de opciones disponibles, de modo que no se propicie una concentración del mercado en un número restringido de aplicaciones y, de forma indirecta, se incremente también el número de compañías implicadas, elemento este que puede minimizar en un futuro los riesgos típicos asociados a la limitación de actores protagonistas (Oomes *et al.*, 2016).

La elaboración de productos derivados del cacao ha aumentado en los últimos años, siendo dicho aumento especialmente relevante en países en vías de desarrollo. Si esta tendencia se mantiene, sumado al consumo en países desarrollados, como Alemania y Estados Unidos, en poco tiempo se alcanzará un escenario en el que difícilmente se podrán cubrir de forma plena las necesidades de cacao, con el consecuente aumento de valor que eso supondrá. Desde la perspectiva climática, factor esencial a tener en cuenta a corto plazo, las previsiones de productividad y aumento de terreno dedicado a este cultivo, resultan ser esperanzadoras para cubrir dichas demandas. El cambio climático, que influye sobre el nivel de precipitaciones y propicia movimientos de tierra que pueden generar cambios en ciertas zonas geográficas de cultivo, podría incidir sobre los niveles de productividad, tomando en consideración las tres variedades tradicionales: Forastero, Criollo y Trinitario. Esta productividad se podría ver aún más afectada si se confirman posibles alteraciones en el grado de sensibilidad que la planta muestra frente a diferentes plagas. La diversidad genética en un nuevo escenario como este podría desempeñar un importante papel para la adaptación de las plantas, lo que, considerando que la variabilidad se localiza primordialmente en América Latina, podría conceder a esta región un papel fundamental para la generación de variedades con superiores cualidades y con resistencia a la acción de nuevas condiciones y plagas (Kieck *et al.*, 2016).

2.4. Características botánicas y agronómicas

Theobroma cacao, nombre científico del árbol del cacao, también es conocido como cacaotero. Es una planta diploide de naturaleza perenne que, en condiciones de cultivo, alcanza los 5 m de altura, mientras que de manera natural puede llegar hasta los 15 m. Su raíz es de tipo pivotante, extendiéndose de manera longitudinal hasta 1,5 m, y con escasa presencia de raíces secundarias laterales, las cuales se ubican principalmente dentro de los primeros 30 cm del suelo. Mientras la raíz longitudinal se encarga principalmente del anclaje y sostén de la planta, las raíces secundarias se asocian a la captura de nutrientes (Hartemink, 2005).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del cacao.

Nivel taxonómico	
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	Theobroma

La planta de cacao demanda climas caracterizados por temperaturas y pluviosidades moderadamente altas, como es el caso de los bosques tropicales lluviosos (Yoroba *et al.*, 2019). Se localiza, por tanto, desde la cuenca del río Amazonas hasta la región meridional de México, en lo que respecta al continente americano y, en las zonas de expansión, en las regiones comprendidas en el denominado cinturón cacaotero, que abarca 20 ° al norte y el sur del Ecuador (Verna, 2013). Las especies pertenecientes al género *Theobroma* son árboles ramificados de hoja simple, que poseen frutos indehiscentes carnosos, es decir de mazorca. *Theobroma cacao* es un árbol semicaducifolio, de tallo glabro o parcialmente pubescente, y sus hojas son cartáceas o coriáceas simples, enteras o también ligeramente sinuadas y con forma general ovadas. Sus inflorescencias resultan ser cimosas, con flores hermafroditas y pentámeras.

De la gran cantidad de flores que una planta puede arrojar durante su desarrollo, la mayor parte de ellas no son fertilizadas, por lo que sólo un número reducido de ellas se convertirán en frutos (Bridgemohan y Mohammed, 2019). Las flores se autopolinizan de manera natural, dado que los estambres se encuentran rodeados por un anillo de estaminodios. Los insectos que ayudan a la polinización de esta especie son en su mayoría del género *Forcipomyia* (Mohamed *et al.*, 2017), pero también hay otros actores involucrados como las hormigas, y en muy pocos casos el viento.

Como se ha mencionado en epígrafes anteriores, existen tres principales cultivares de cacao; Criollo, Forastero y Trinitario. La variedad Criollo se caracteriza por árboles delgados en los que los frutos presentan un revestimiento delgado y una pigmentación rojiza. Las formas Criollo exponen caracteres de depresión endogámica y suelen ofrecer rendimientos más bajos, así como mayor susceptibilidad a plagas. En países de Latinoamérica "Criollo" 'es comúnmente traducido como "nativo" o "popular" y agrupa no sólo las formas típicas de Criollo, sino también todos los cultivares tradicionales. Entre el 5 y 10 % de la producción mundial se origina a partir de variedades Criollo (Graefe *et al.*, 2017).

Los cultivares catalogados como Forastero comprenden las variedades de cacao que no son Criollo ni de origen híbrido. Estas se identifican primariamente por su fruto verde, un pericarpio grueso, un mesocarpio fuertemente lignificado, semillas ovaladas y levemente aplanadas y cotiledones de color violeta (de Souza *et al.*, 2018). Esta variedad se cultiva principalmente en Brasil, América Central, África Occidental, y el Caribe, con cerca del 80% de la producción mundial.

La tercera de las variedades, Trinitario, es de origen híbrido entre las dos anteriores (Wickramasuriya y Dunwell, 2018). Este es un grupo muy heterogéneo desde una perspectiva genética, y presenta polimorfía desde el punto de vista morfológico, lo que no dificulta el reconocimiento de características comunes. Las plantas suelen ser muy robustas, con frutos verdes o pigmentados y con semillas violeta claro u oscuro. Representan entre el 10 y 15 % de la producción mundial.

Las exigencias climáticas de la planta marcan límites en lo que se refiere a los valores térmicos óptimos para su desarrollo en el rango comprendido entre 20 °C y 32 °C, con un mínimo situado en 10 °C, a partir del cual se crean serios daños en la planta. Con respecto a la pluviosidad, el rango idóneo se encuentra entre 1150-2500 mm anuales (Ramírez Gil, 2016); por encima de este

rango se favorece la aparición de enfermedades, mientras que por debajo, el agua sería escasa para cubrir los niveles de evapotranspiración. Otro factor que se debe considerar durante el cultivo de cacao es el sombreado, factor esencial para obtener una buena productividad, dado que está involucrado en el mantenimiento de la humedad del suelo y la fertilidad (Deheuvels *et al.*, 2014). En realidad, la ausencia de vegetación acompañante que proporcione sombra puede tener también aspectos positivos, como la menor incidencia de enfermedades, por lo que es necesario alcanzar un equilibrio o tomar decisiones adecuadas en función de las condiciones particulares (Graefe *et al.*, 2017). Debido a este último factor los sistemas de cultivo utilizados se clasifican *grosso modo* de la siguiente manera:

1. Sistema de cultivo intensivo, llevado a cabo en ausencia de sombra o con sombreado homogéneo. En este tipo de cultivo se seleccionan las variedades que se incorporan y se lleva un amplio control de las cantidades de fertilizantes y fitosanitarios empleadas.
2. Sistema agroforestal, en este sistema el cacao coexiste con otras especies, las cuales pueden tener una finalidad de ser explotadas comercialmente o no. Se asocia a la gran mayoría de pequeños agricultores.

Habitualmente el volumen de cultivo varía entre 1000 y 1500 árboles por hectárea. Las necesidades nutricionales requeridas por hectárea rondan en torno a 300 kg de potasio, 200 kg de nitrógeno, 25 kg de fósforo y 140 kg de calcio. Algo que es especialmente llamativo es la gran demanda de potasio, elemento que otorga a la planta la capacidad de tolerancia frente al estrés hídrico (Gattward *et al.*, 2012). El cacao requerirá entre 3 y 5 años para liberar sus primeros frutos, pero su productividad puede extenderse varias décadas. Estos frutos contienen alrededor de 40-50 semillas que están rodeadas por una pulpa ácida semidulce, denominada mucilago, la cual tarda en torno a seis meses para desarrollarse y madurar, lo que restringe la producción a dos cosechas por año. Finalmente, la productividad varía en función de las condiciones de cultivo, aunque de forma general se producen entre 80 y 4000 kg ha⁻¹ (Jagoret *et al.*, 2017).

2.5. Composición química del grano cacao

El grano de cacao muestra dos fracciones claramente diferenciadas en cuanto a su composición, que se corresponden con los cotiledones y la pulpa. Los primeros presentan un porcentaje de agua entre el 32 y 39%, proteínas 8-10%, grasas 30-32%, polifenoles 5-6%, almidón 4-6%, celulosa 2-3%, teobromina 1-3% y cafeína 0,2-1% (Bertazzo *et al.*, 2013). La pulpa del cacao, también llamado mucilago, se compone de un 1-2% de pectina y otros polisacáridos similares, 10-15% de azúcares, 0,5-2% de ácido cítrico, así como también cantidades de proteínas, aminoácidos, vitamina y minerales, en menor proporción (Meersman *et al.*, 2017).

Numerosos estudios de carácter nutricional en relación con las distintas variedades evidencian de manera general que la grasa es el nutriente mayoritario (> 40%), seguida por los carbohidratos (> 32%) y las proteínas (12-13%). No obstante, y a pesar de compartir ciertas características nutricionales, la composición varía según el origen geográfico. Los análisis estadísticos muestran que hay diferencias significativas entre variedades, principalmente en el contenido de humedad, carbohidratos, fibra y grasa. Otros valores como el de las proteínas y cenizas no demuestran valores de diferencia que sean significativos (Torres-Moreno *et al.*, 2015).

2.6. Procesado y transformación

Las características del fruto del cacao, específicamente sus componentes químicos, imposibilitan su comercialización directa. La presencia de moléculas que le confieren un sabor astringente y amargo, hacen obligatorio su procesado de forma previa a su consumo (Afoakwa *et al.*, 2008). Las etapas de transformación habituales incluyen fermentación, secado, torrefacción y molienda, siendo las dos primeras efectuadas de forma mayoritaria por parte de los agricultores en la misma zona de cultivo y recolección, mientras que el resto del proceso suele ser ejecutado por las empresas alimentarias (Santander Muñoz *et al.*, 2020). A continuación, se describen de forma concisa las diferentes etapas comprendidas en el procesado del cacao. La fermentación, en consideración a su importancia en la definición de las propiedades finales del cacao procesado, se tratará en mayor profundidad.

2.6.1 Secado

Los granos de cacao fermentados presentan un elevado grado de humedad que, en caso de no ser reducido, favorece el desarrollo de variedades fúngicas, alarga en exceso la actividad microbiana y eleva la probabilidad de alterar los granos durante la etapa de almacenamiento. Adicionalmente, la etapa de secado propicia la volatilización de algunos compuestos que, presentes en exceso, alterarían la calidad organoléptica del producto (Chinenye *et al.*, 2010). El objetivo del secado es reducir la humedad hasta un 8%, procurando no bajar del 6%, ya que valores inferiores propician que el grano se torne frágil.

El proceso de secado también ayuda a desarrollar el color, a través de una cadena de reacciones de carácter oxidativo. Los compuestos polifenólicos son convertidos en quinonas por medio de enzimas polifenol oxidasas, y estos compuestos a su vez, se enfrentan a procesos condensativos con grupos sulfhidrilo y amino libres que terminan en la formación de compuestos pardos (Aprotosoai *et al.*, 2016). Otros compuestos como los denominados de Amadori, predecesores de las reacciones de Maillard, se dan a lo largo del secado y resultan de la interacción de la glucosa y aminoácidos.



Figura 3. Gama de colores desarrollado por los granos de cacao después de la etapa de secado. De izquierda a derecha: marrón, marrón-púrpura, púrpura y pizarra (Sulaiman y Yang, 2015).

El secado por vía natural da lugar a mejores resultados, dado que, a diferencia del secado mediante hornos, no genera aromas desagradables. Sin embargo, el secado por vía natural posee un bajo nivel de control, y por tanto suele ser poco sostenible, ya que es dependiente de las condiciones ambientales. Otro factor a tomar en consideración es la velocidad de secado, ya

que una excesiva rapidez produce que la parte interna del grano permanezca con un indeseable porcentaje de humedad y con restos de ácido acético altos (Kongor *et al.*, 2016).

Una vez que los granos son extendidos en capas de 10 cm de altura, se dejan a exposición de las condiciones climáticas aproximadamente siete días, rastrillando y moviendo el grano cuando es necesario. En zonas de producción donde las precipitaciones son continuas, las capas de grano se extienden sobre plataformas que se exponen a calor. Las temperaturas aplicadas se encuentran entre 40 °C y 60 °C, factor que debe ser constantemente controlado para avalar el adecuado desarrollo de las características organolépticas (Alean *et al.*, 2016).

2.6.2. Etapa de torrefacción

Una vez que el grano de cacao está seco, se somete a un proceso de torrefacción, lo que involucra una limpieza, un tratamiento térmico y un aventado. El tratamiento térmico, cuya realización depende de la variedad de cacao implicada, se aplica por un breve intervalo de tiempo y con alta intensidad, con temperaturas entre 130 y 150 °C y tiempos de exposición de 15 a 45 min (Belitz *et al.*, 2009). Las características del tratamiento propician que sea la zona superficial la afectada en mayor medida, mientras que la región central experimenta un menor grado de alteración. Así, se limita la aparición de reacciones no deseadas y se favorece la separación de la cáscara. De forma adicional, esta etapa también ayuda a eliminar o reducir la presencia de compuestos no deseados, tales como los ácidos volátiles, específicamente ácido acético, o compuestos polifenólicos. Esta última acción tiene un efecto claramente positivo en lo referente a la reducción de los niveles de astringencia (Jinap *et al.*, 2004), pero también puede afectar negativamente al reducir capacidad antioxidante (Ioannone *et al.*, 2015).

Durante esta etapa también se ven afectadas las propiedades organolépticas, tanto en lo que respecta al aroma y el sabor, como al color y a la textura (Zyzelewic *et al.*, 2016). Así, compuestos de naturaleza peptídica y otros como los azúcares reductores, interaccionan mediante reacciones de Maillard y generan bases Schiff. A su vez, estos compuestos experimentan reacciones de reordenamiento de Amadori, generando compuestos intermediarios que serán transformados mediante diferentes rutas (Oracz y Nebesny, 2019). Una de estas rutas, de especial relevancia es la de Strecker que, tras varias etapas, finaliza con la producción de compuestos volátiles orgánicos, como aldehídos y pirazinas, que son de gran importancia organoléptica (Huang y Barringer, 2011).

2.6.3. Procesos adicionales

Junto a las etapas clásicas que se dan durante el procesado del cacao, existen una serie de tratamientos adicionales que se aplican en función de las características del cacao utilizado o de las propiedades que se desean en el producto final (Ogunsina *et al.*, 2017). Gran parte de estos tratamientos se relaciona con la potenciación de propiedades como sabor y color, además de fortalecer las características del producto. Uno de ellos es la impregnación del cacao con una base, como NaOH o K₂CO₃ (Rodríguez *et al.*, 2009), proceso conocido como “Dutching”, el cual también mejora la capacidad de dispensabilidad en bebidas del cacao pulverizado. Este proceso mejora las características del cacao procesado, ya que actúa reduciendo la astringencia relacionada con el aumento en el nivel de polimerización de los flavonoides, lo que puede afectar directamente a la calidad sensorial del producto (Huang y Barringer, 2011).

Adicionalmente, promueve el oscurecimiento del grano de cacao y el incremento de los valores de pH (Valverde *et al.*, 2020).

En la molienda, también conocida como molturación, se produce cacao en polvo o licor de cacao. Gracias a la acción mecánica del proceso, se genera calor que funde las grasas (Beg *et al.*, 2017), dando lugar a un producto líquido que, subsiguientemente, puede refinarse a temperaturas cercanas a los 100 °C. A partir del este último producto ya se podrán obtener nuevos derivados, tales como manteca de cacao, chocolate o cacao en polvo. De forma secundaria, este proceso también ayuda a la higienización de la materia prima.

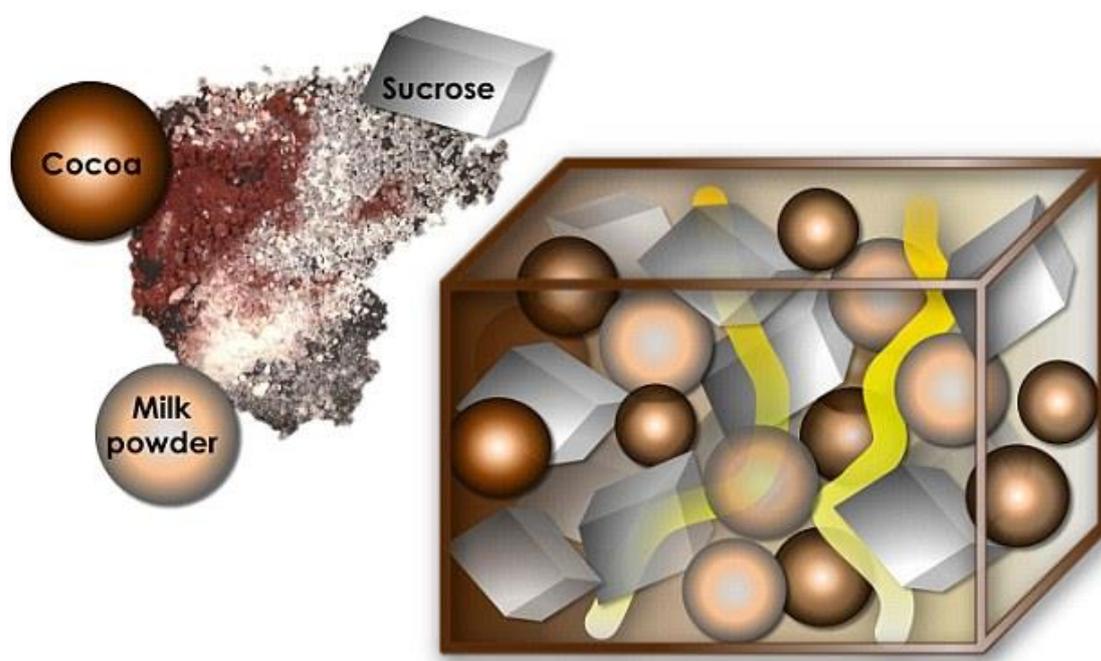


Figura 4. Estructura cristalina formada durante la etapa de conchado (www.dailymail.co.uk).

Para obtener el chocolate, principal derivado del cacao, se necesitan varios procesos que ayuden a la generación de un producto con textura homogénea y libre de compuestos organolépticos indeseables. Estos procesos involucran el mezclado, donde en las grandes industrias, se utilizan generalmente mezcladoras continuas que, gracias a diversas combinaciones de tiempo y temperatura, propician una textura plástica y consistente (Afoakwa, 2010). En función del producto que se esté buscando, se mezclarán en distintas proporciones manteca de cacao, licor de cacao, grasa de leche, azúcar y leche en polvo. Otra de las etapas necesarias en la elaboración del chocolate es el refinado, cuyo objetivo es generar una textura suave mediante la depuración de partículas de tamaño excesivo, generalmente que sobrepasen los 30 μm , aunque en algunos casos lo que se busca es tener distintos tamaños de partículas que aporten diferentes texturas en el producto final (Sokmen y Gunes, 2006). El conchado, que es de los últimos tratamientos, le confiere al chocolate su viscosidad, textura, y sabor final (Toker *et al.*, 2019), tratando de garantizar que todas las partículas se recubran con una capa grasa. Durante el conchado el chocolate es agitado por unas horas a temperaturas sobre los 50 °C

(Owusu *et al.*, 2012), lo que favorece la pérdida de agua y otras moléculas volátiles no deseables, como ácido acético y fenoles, además de estabilizar la viscosidad y promover la caramelización. Este proceso también afecta a numerosos compuestos organolépticos, ya presentes, de manera que ven incrementada su concentración, si bien la intensidad de dicho aumento dependerá de las condiciones concretas que se apliquen durante esta fase (Counet *et al.*, 2002). Así por ejemplo, el chocolate con leche tiene un conchado entre 10 y 16 h a temperatura entre 49 y 52 °C, mientras que para un chocolate negro, se necesitaran 8 h a 70-82 °C (Afoakwa *et al.*, 2013b). En general el conchado tiene tres etapas durante las cuales se producen cambios importantes (Albak y Tekin, 2016). Así, en la primera fase, fase seca, la fracción de grasa envuelve las partículas (González *et al.*, 2021)) y se volatilizan algunos compuestos, incluyendo un porcentaje de agua. En la segunda etapa, llamada fase pastosa, se pierde otro porcentaje de agua y se asientan las propiedades como fluido de la pasta (Bolenz *et al.*, 2007). En la última fase, conocida como fase líquida, la pasta se homogeniza mediante un licuado. Al finalizar el conchado se atempera el producto para favorecer la formación de cristales de grasa, responsables de la textura y el crocante (Afoakwa *et al.*, 2009). El atemperado transcurre en una primera etapa a 50°C, en la que se funde el producto, seguido por la cristalización a 32 °C, una segunda cristalización que ayudara a terminar de establecer los cristales de grasa a 27 °C, y una última fase, entre los 29°C y 31 °C, en la que se modifican las formas polimórficas inestables (Gutiérrez, 2017).

3. Factores relacionados con la fermentación y los perfiles organolépticos

La etapa de fermentación resulta determinante en lo que respecta a la adquisición de las características finales adecuadas para el cacao procesado. Durante esta etapa, se generan compuestos que actúan como precursores de moléculas de interés organoléptico, y se reduce la presencialidad de otros que ejercen un efecto negativo sobre las propiedades deseables. De manera previa a su realización, y en aquellos casos en los que el valor de pH de la pulpa sea bajo, parte del mucilago debe ser retirado al objeto de evitar problemas asociados a la acidez (Schwan y Wheals, 2004). La retirada, entre el 25% y el 30% del total presente, se puede llevar a cabo mediante técnicas mecánicas o enzimáticas, siendo en este último caso las enzimas de carácter pectinolítico.

3.1. Proceso general y metodologías utilizadas para la fermentación

La etapa fermentativa se caracteriza por la sucesión cronológica de diferentes comunidades microbianas, adaptadas a las condiciones imperantes en cada momento. Al inicio del proceso, las condiciones, baja disponibilidad de oxígeno, pH ácido como consecuencia de la elevada presencia de citrato y alto contenido en azúcares fermentables, son favorables al desarrollo de levaduras (Koné *et al.*, 2016). Durante las primeras 24 h, este grupo microbiano domina la fermentación, generando cantidades importantes de alcohol etílico y, en conjunción con las bacterias del ácido láctico (BAL), degradan el ácido cítrico (Mota-Gutiérrez *et al.*, 2018; Ouattara *et al.*, 2017), actividad que provoca un aumento en el valor del pH. Esta última comunidad sustituye a las levaduras como grupo dominante transcurridas 24-48 h de proceso, y exhibe como aspecto más destacado la conversión de azúcares en ácido láctico. La acción de levaduras

y BALs ocasiona un cambio importante en las condiciones del hábitat, de manera que el descenso en los niveles de acidez y el incremento en los de oxígeno dan paso como población microbiana mayoritaria a las bacterias del ácido acético (BAA). La presencia de estas bacterias da lugar a la oxidación del etanol y del ácido láctico hasta ácido acético (Lefeber *et al.*, 2011) y, dado el carácter exotérmico de esta transformación, a un aumento de temperatura, que puede llegar a alcanzar hasta los 40-45 °C (Sarbu y Csutak, 2019).

Las condiciones a las que dan lugar las diversas poblaciones microbianas, acumulación de etanol y compuestos ácidos y temperaturas elevadas, provocan la muerte del embrión (Papalexandratou *et al.*, 2011a), la liberación de la cutícula y la adquisición por parte de los cotiledones de una coloración marrón, causada por reacciones de tipo enzimático (Jinap *et al.*, 2003). De forma paralela, se produce un aumento en el tamaño del grano y un proceso de hidrólisis proteica que se traduce en liberación de aminoácidos.

Las metodologías existentes para ejecutar la fase fermentativa son variadas (Pereira *et al.*, 2016), aunque las que implican la utilización de pilas y cajas son los más habituales, especialmente las primeras, dada la escasa demanda de estructura que presenta, lo que la hace accesible a los pequeños productores. De forma general, el material se dispone sobre una plataforma levemente inclinada, para permitir el drenaje, y adoptando una forma cónica con una altura máxima de 90-100 cm, para evitar compactación. Suele ser habitual cubrir el material con hojas de plátano (Ganeswari *et al.*, 2015) para preservar la temperatura y la humedad del sistema, aunque evitando la creación de condiciones limitantes en la disponibilidad de oxígeno. El proceso se prolonga entre cinco y seis días, y se caracteriza por una elevada heterogeneidad microbiana, no sólo cronológica, sino espacial, dada las diferencias de condiciones que se pueden dar en las distintas zonas de la pila. Para evitar estas diferencias, se suelen realizar prácticas de volteo (Koffi *et al.*, 2017) que propicien que todo el material a fermentar quede expuesto a las condiciones existentes en cada ubicación de la pila, ya que esto favorece la generación de un producto fermentado más homogéneo (Bariah, 2015).

La fermentación en cajas, con un coste algo superior, mejora las condiciones y el control del proceso, a la vez que reduce las posibilidades de contaminación. Las cajas, tanto en la base como en las paredes, presentan orificios que permiten drenar y airear la materia. En la mayor parte de los casos, disponen de una doble pared en la que se ubica algún tipo de residuo agrícola que ejerza funciones de aislante. Al igual que en las plataformas, se suelen utilizar hojas de plátano para cubrir el material a fermentar y los volteos se realizan habitualmente mediante trasvases entre cajas, por lo que es común que el número de cajas sea superior al de fermentaciones. Además de las plataformas, pilas o cajas, también se pueden utilizar cestas, toneles o bandejas, aunque son usados en menor medida (De Vuyst y Weckx, 2016). En cualquier caso, la elección de la metodología empleada se debe abordar con seriedad, dado que es un factor de gran influencia en la calidad del producto generado (Guehi *et al.*, 2010b).

3.2. Factores que condicionan sabor y aroma

3.2.1. Variedades y su influencia

Las variedades tradicionalmente establecidas (Forastero, Criollo y Trinitario) presentan tanto distintas concentraciones de las moléculas de interés (proteínas, carbohidratos y polifenoles) en

el procesado comercial del cacao, como niveles de actividad enzimática en el grano, lo que provoca diferencias en las propiedades organolépticas de los productos generados. La variedad Forastero se considera de menor calidad (Smulders *et al.*, 2008), debido a que posee menor potencial de desarrollo de perfiles organolépticos como consecuencia de una menor presencia de compuestos aromáticos. Esta inferior presencia de precursores organolépticos se traduce en ausencia de ciertos matices en el producto final. Además, las diferencias de composición de esta variedad genera niveles de pH más elevados durante la fermentación, lo que tiene un alto impacto sobre la actividad microbiana, si bien da lugar a derivados de menor astringencia y sabores amargos (Santander Muñoz *et al.*, 2020).

En el caso de la variedad Criollo, los niveles absolutos de compuestos fenólicos suelen ser similares a los detectados en otras variedades, si bien sí se han descrito diferencias cualitativas referidas a la naturaleza de tales compuestos (Elwers *et al.*, 2009). Por otra parte, también se han detectado elevados niveles de precursores organolépticos, azúcares reductores y aminoácidos (Giacometti *et al.*, 2015). Tales diferencias permiten generar productos con un perfil aromático particular y mayoritariamente más apreciado, caracterizado por aromas y sabores suaves, con toques terrosos y florales, y reminiscencias de nueces y té (Aprotosiae *et al.*, 2016). De hecho, estas particularidades llevan a calificar el cacao de la variedad Criollo como “fino de aroma” (Castro-Alayo *et al.*, 2019).

La variedad Trinitario, que como ya se ha dicho es un híbrido entre Criollo y Forastero, presenta características más cercanas a este último, ya que comparten los porcentajes de compuestos polifenólicos (Elwers *et al.*, 2009). También sus productos finales muestran propiedades similares. Esta variedad se diferencia gracias a un carácter muy específico de sabor a vino (Giacometti *et al.*, 2015), que muchas veces es deseable en función del tipo de producto final que se desee generar.

Una última variedad tradicional, diferenciada mediante los estudios genéticos realizados en los últimos años y originaria de Ecuador (Afoakwa *et al.*, 2011), es la denominada Nacional, la cual está categorizada como cacao de fino aroma (Chetschik *et al.*, 2018), aunque se ha visto que posee concentraciones significativamente menores de pirazinas. El producto final elaborado con esta variedad presenta fuertes aromas de tipo floral, así como también notas a diferentes especias (Kongor *et al.*, 2016).

3.2.2. Producción de compuestos durante las etapas del procesamiento

Uno de los factores más importantes a la hora de condicionar el desarrollo del sabor es la etapa de secado post fermentación (Utrilla-Vázquez *et al.*, 2020). En relación con el método que se utilice se pueden favorecer ciertos perfiles organolépticos u otros. El secado al sol, que es el más tradicional, es el que mejores perfiles genera y se asocia a un chocolate de buena calidad (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012). En contraposición a este método están los métodos artificiales, en los que se utilizan hornos y otros mecanismos que favorecen la aparición de ciertos matices de goma y gasolina (Aprotosiae *et al.*, 2016). De manera general, es recomendable usar temperaturas de secado no excesivamente altas y prolongadas ya que estas condiciones favorecerán la aparición de sabores demasiado ácidos. En los tratamientos artificiales se ha visto que resulta beneficioso utilizar temperaturas de secado no superiores a los 70 °C durante 8 h,

ya que valores que sobrepasen este límite eliminan de forma importante la presencia de compuestos fenólicos (Abhay *et al.*, 2016). Entre los principales eventos que se dan durante el secado, además de la ya citada reducción de polifenoles, a causa de la difusividad y las reacciones de Maillard, se encuentran el descenso de alcoholes, debido a la degradación y evaporación, y el aumento de los ácidos grasos en general, exceptuando ácidos grasos volátiles, gracias a la actividad de lipasas endógenas de las vainas. Por otra parte, los tratamientos térmicos entre 30 °C y 50 °C tienden a promover el aumento en la concentración de pirazinas que, en exceso, pueden dar notas demasiado herbáceas, volviéndose un elemento negativo para el producto final. Ya que el tiempo de secado esta dictaminado por el criterio del agricultor, esto puede generar riesgos en cuanto a la idoneidad del producto en relación a las propiedades que ha adquirido hasta el momento (Rodríguez-campos *et al.*, 2011).

Durante la torrefacción, también conocida como tueste, que es un proceso llevado a cabo ya en las industrias chocolateras, se continúa desarrollando el perfil organoléptico del cacao procesado. Al igual que en la etapa de secado, temperaturas elevadas durante este proceso causan una disminución del contenido de polifenoles, pero también generan mayores niveles de compuestos aromáticos volátiles (Santander Muñoz *et al.*, 2020), por lo que es fundamental establecer un punto adecuado en el que exista un equilibrio para la generación de propiedades organolépticas deseadas y los compuestos nutraceuticos se mantengan. Cabe recalcar que los polifenoles pueden afectar a las propiedades organolépticas si se encuentran en concentraciones elevadas, ya que durante el tratamiento térmico interaccionan con distintas moléculas precursoras del aroma. Las reacciones de Maillard son importantes para la formación de compuestos organolépticos, gracias a que los azúcares reductores, junto con las aminas, dan lugar a la formación de compuestos como pirazinas y aldehídos, y otras moléculas en menor proporción, como cetonas, alcoholes, éteres, furanos, éteres y triazoles (Kongor *et al.*, 2016). Durante el tostado del cacao se ha identificado la generación de más de 600 compuesto distintos que son parte del aroma y sabor (Huang y Barringer, 2011). Dentro de estos los más destacados, ya que le confieren al chocolate notas de sabor a frutas, caramelo, nueces, horneado y flores, son el 3-metilbutanal, acetofenona, 2-metilpropeno, benzaldehído, 2-metilbutanal, trimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 2-fenilacetaldehido y tetrametilpirazina. A pesar de generarse compuestos deseables durante esta etapa, las condiciones de la misma también permiten la formación de compuestos indeseables por su actividad tóxica. Un claro ejemplo de esto son las aminas biogénicas, compuestos nitrogenados con alta actividad biológica, cuya formación es promovida en presencia de grupos carbonílicos y amino, y valores elevados de temperatura y humedad (Rottiers *et al.*, 2019).

El conchado, que como ya se citó, es el último proceso secundario en la producción de chocolate, ayuda a potenciar sabor y aroma, debido a que reduce compuestos de efecto negativo por evaporación, lo que permite una ganancia del peso relativo de los compuestos que permanecen. No obstante, si el proceso se extiende por mucho tiempo y en combinación con valores térmicos elevados, también se reducirán los compuestos de interés, específicamente aldehídos, alcoholes y esterres (Owusu *et al.*, 201). Así, si este proceso es llevado a cabo correctamente, los compuestos de influencia organoléptica se concentrarán, mientras que, si por el contrario, no es bien gestionado, aparecerán nuevos compuestos de influencia no

deseable. El conchado también permite la movilidad de moléculas que puedan estar concentradas entre las partículas de cacao y manteca, lo que permitirá mayor uniformidad y homogeneidad en conjunto con el azúcar (Afoakwa *et al.*, 2013b).

3.2.3. Otros factores que condicionan sabor y aroma

Existen otros factores determinantes en la generación de sabores y aromas. La localización geográfica determina en cierta medida la composición nutricional de la semilla y, por tanto, la calidad organoléptica del producto final. Adicionalmente, este factor también puede determinar la concentración de compuestos bioactivos con actividad antioxidante. Las prácticas agrícolas cambian según la zona, variando la duración del cultivo, el modo de recolección y otros aspectos; si además se consideran también las condiciones climáticas, específicamente los niveles de radiación, la pluviosidad, y las características del suelo, que determinan los parámetros nutricionales, la influencia que el factor geográfico ejerce sobre el perfil organoléptico del cacao resulta evidente (Oracz *et al.*, 2015). La variación en los niveles de grasa, compuestos fenólicos y otras moléculas, son fundamentales debido a los precursores que generan para la adquisición de una buena cristalización y consistencia. Un ejemplo claro de la importancia de este factor lo han determinado ciertas investigaciones que revelaron que la maduración de la vaina bajo condiciones de sequía era primordial para la generación de mayores niveles de compuestos fenólicos (Toker *et al.*, 2020).

Otro factor no excesivamente considerado es el almacenamiento de las vainas después de su recolección y de forma previa a su apertura. Esto causa cambios químicos relacionados con el descenso tanto de azúcares reductores como no reductores, proteínas, grasas y polifenoles (Guehi *et al.*, 2010a). Durante este periodo, y dependiendo de las condiciones de almacenamiento de la vaina, se pueden desarrollar especies contaminantes que posteriormente afecten también la fermentación (Hamdouche *et al.*, 2019). En cuanto a la composición química, se han evidenciado aumentos de la cantidad de alcoholes (Afoakwa *et al.*, 2013a), exceptuando etanol, lo que se relaciona con la actividad de levaduras beneficiada por la baja actividad de bacterias ácido lácticas, como consecuencia de la disponibilidad de oxígeno. A diferencia de los alcoholes, compuestos como ésteres y ácidos tienden a reducirse mientras aumenta el tiempo de almacenamiento de las vainas. De todas maneras, la investigación de esta fase de almacenamiento continúa ofreciendo datos contradictorios, debido sobre todo a la ausencia de un control generalizado a la hora de ejecutarla. Algunas investigaciones le asignan un carácter negativo, mientras que otras aseguran que esta etapa puede ser una herramienta para perfilar las características organolépticas que se desean, a través de la alteración de la composición química antes de la fermentación (Afoakwa *et al.*, 2013b).

3.3. Perfil organoléptico del producto procesado

Entre los compuestos que poseen mayor impacto sobre las propiedades de sabor y aroma están incluidos alcoholes, amidas, ácidos, aldehídos, cetonas, aminas, fenoles, ésteres, furanos, parafinas, hidrocarburos y terpenos (Alasti *et al.*, 2019). La generación de los compuestos mencionados se da a partir de precursores identificados como oligopéptidos, azúcares reductores, aminoácidos libres y cianidina-3-galactósil, clasificado este último como antocianina

que, junto a las catequinas y proantocianidinas conforman la fracción polifenólica del cacao (Aprotosoie *et al.*, 2016).

Entre los compuestos de naturaleza ácida volátil destaca el ácido acético, aunque también contribuyen al perfil organoléptico los ácidos propiónico, isovalérico e isobutírico (Yusep *et al.*, 2002). Cuando estos compuestos se encuentran en concentraciones muy elevadas confieren aromas no deseados, tales como notas a mantequilla o a grasa rancia, por lo que su reducción se hace fundamental en etapas posteriores a la fermentación. Por otro lado, compuestos como cetonas y aldehídos generan aromas y sabores agradables que son frecuentes en productos malteados y chocolates, principalmente aquellos con notas florales. Los principales aldehídos y cetonas responsables de estas acciones son 3-metilbutanal, 2-metilbutanal y 5-metil-2-fenilhexenal, que además participan en la formación de pirazinas (Counet *et al.*, 2002). Estas últimas muestran el mayor impacto organoléptico en el cacao procesado, incorporando aromas a nueces, tostado y tierra. El número de pirazinas que está involucrado en el desarrollo de características organolépticas se postula entre 80 y 100, destacando de forma general las alquipirazinas con un 90% de la totalidad y, de forma especial, trimetilpirazinas y tetrametilpirazinas. La interacción de estos compuestos permite la generación de aromas específicos, tales como los asociados a la 2,3-dimetilpirazina, que proviene del 2-fenil-2-butenal (Fang *et al.*, 2020).

Otro grupo de compuestos volátiles fundamental en las características organolépticas son los ésteres, los cuales aportan matices frutales. Este tipo de compuestos proviene mayoritariamente de la actividad de levaduras durante la fermentación. Un problema con estos compuestos es que durante las etapas de conchado y torrefacción, específicamente aquellos de cadena corta como el 2-fenilacetato, se pierden a causa de las condiciones de dichos procesos (Meersman *et al.*, 2013).

Otros compuestos como los alcoholes, producto de la actividad microbiana pero también de la degradación térmica de aminoácidos, son causantes de ciertas notas florales y frutales mayoritariamente causados por el linalool, que también es considerado como terpeno, y es una molécula generada abundantemente en variedades de cacao fino (Kongor *et al.*, 2016).

3.4. Importancia de los microorganismos en la fermentación

Durante la etapa fermentativa se dan las reacciones primordiales que permiten la obtención de un producto final comercializable, dentro de las cuales no solo está el desarrollo de características organolépticas, sino también transformaciones físico-químicas fundamentales, todas ellas dependientes de la actividad de microorganismos (Vinícius *et al.*, 2013).

El cacao posee, como muchas materias primas vegetales, sustancias en elevada concentración que le otorgan sabores astringentes indeseables, como polifenoles, o amargor como las metilxantinas (Peláez *et al.*, 2016). Durante la etapa fermentativa cierto porcentaje unos y otras se elimina, generalmente por procesos oxidativos catalizados por enzimas polifenol oxidasas. Mientras estos compuestos son reducidos otros se generan, como precursores de aroma y sabor, y durante todo el proceso biosintético la actividad de distintas comunidades microbianas es esencial. Ya que la actividad individual de los microorganismos favorece la sucesión de otros, debido a los compuestos y condiciones que se van generando, se comprende

a la fermentación como un proceso que transcurre en diversas subetapas, en cada una de las cuales suele haber una comunidad microbiana específica y dominante.

La composición del mucilago del cacao estimula la acción microbiana, a partir de la cual se generan de alcohol y ácidos, y se libera energía. La conjunción de todos estos eventos de origen microbiano favorece el deterioro de los cotiledones del cacao y, finalmente, su muerte celular. Este proceso se considera esencial, ya que permite la liberación de compuestos intracelulares como enzimas y sustratos, ambos fundamentales en la evolución de los parámetros organolépticos de las semillas (Gutiérrez, 2017).

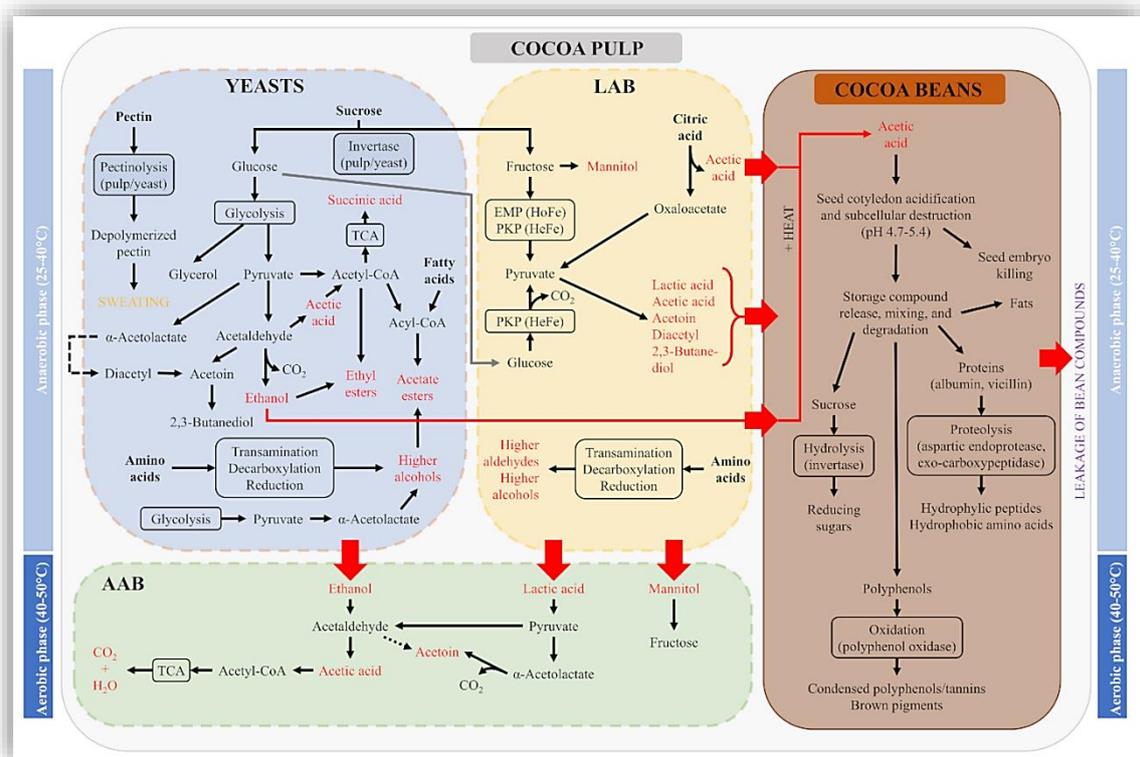


Figura 5. Eventos bioquímicos concurrentes durante el proceso fermentativo y grupos microbianos responsables (De Vuyst y Leroy, 2020).

4. Ecología microbiana durante la fermentación

4.1. Dinámica y biodiversidad

Como ya se ha descrito repetidamente en este trabajo, las condiciones iniciales incentivan el desarrollo de levaduras, gracias a la concentración de azúcares, al bajo pH y a la disponibilidad limitada de oxígeno. Esta actividad de las levaduras, entre las primeras 24-36 h de fermentación crea un ambiente con elevada concentración de etanol, que puede llegar hasta un 7%, aunque lo normal es que no supere el 4% (Ho *et al.*, 2014). Sin embargo, la distribución no es homogénea, dado que el proceso transcurre de forma menos activa en el centro de la masa fermentada y mucho más rápida en las zonas externas. De forma simultánea, y como

consecuencia del carácter exotérmico de estas acciones, se da un aumento moderado de la temperatura. De inicio, y potenciado por los leves cambios que se asocian a la actividad de las levaduras, las BAL comienzan también a adquirir importancia, llegando a alcanzar concentraciones entre 10^8 - 10^9 UFC/g entre las 24 y 48 h (Moreira *et al.*, 2013). El papel de levaduras y BAL no se restringe a la producción de etanol y ácido láctico, respectivamente. Así, pulpa y cotiledones se ven afectados por la producción de enzimas pectinolíticas por parte de las levaduras. La disminución del ácido cítrico asociada a la acción de ambos grupos microbianos, y la transformación de fructosa hasta manitol por algunas especies BAL heterofermentadoras, como *Lactobacillus fermentum*, son otras de las funciones fundamentales (Sarbu y Csutak, 2019).

Se ha documentado la presencia de hongos filamentosos en algunos procesos durante las primeras 36 h de fermentación (Schwan *et al.*, 2014), si bien la naturaleza de su influencia crea controversia entre los investigadores, ya que mientras una fracción considera que dicha presencia se debe considerar como una contaminación consecuencia de un mal manejo, y responsable de generar un impacto negativo sobre la calidad organoléptica y sanitaria del cacao fermentado (Copetti *et al.*, 2015), otros apuntan a un posible efecto positivo, derivado de su acción pectinolítica (Ardhana y Fleet, 2003).

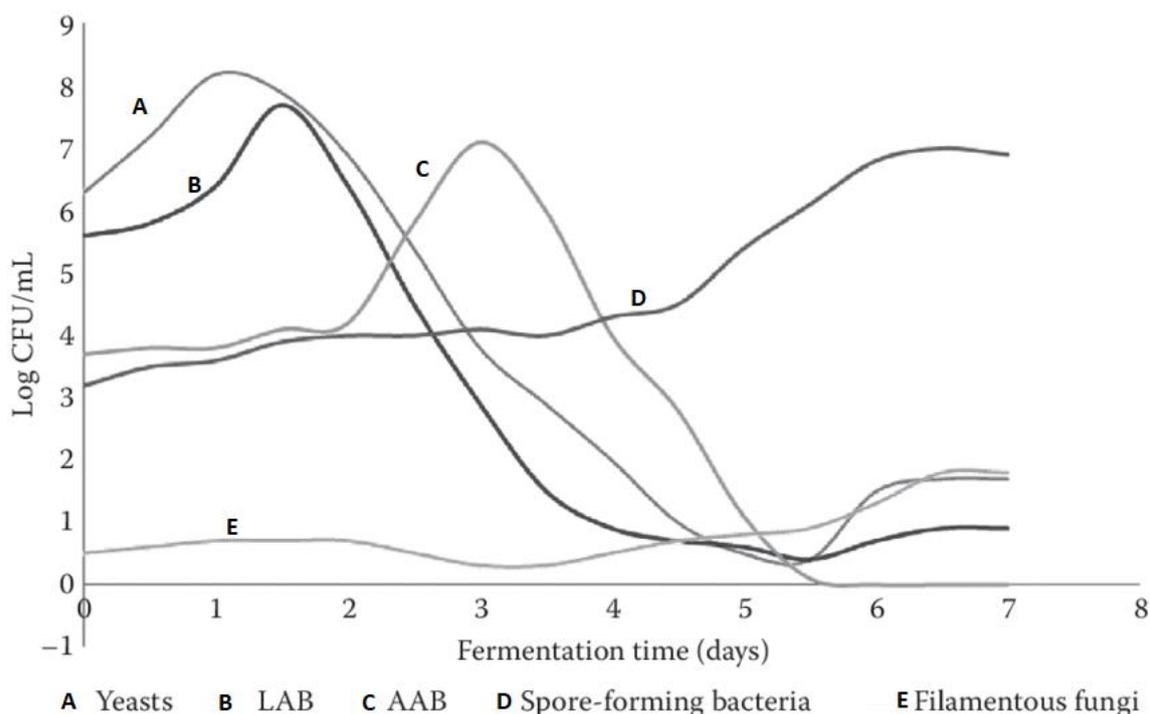


Figura 6. Evolución de las principales comunidades microbianas durante la fermentación (Schwan, 2015).

La descomposición de la pulpa a causa de la actividad microbiana y los cambios del sistema generan que los líquidos y el agua retenida en ella lixivie hacia los orificios de las cajas de fermentación, lo que aumenta la aireación de la masa, favoreciendo el crecimiento de bacterias del ácido acético (Soumahoro *et al.*, 2020). Las BAA crecen desde niveles bajos e incluso no

detectables desde el inicio de la fermentación, de manera que ya a las 48 h pueden alcanzar niveles de concentración de 10^7 - 10^8 UFC/g, aunque los máximos niveles suelen detectarse en torno a las 72 h, tiempo tras el cual es habitual que se produzca un descenso (De Vuyst y Leroy, 2020). El desarrollo de las BAA se ve estimulado mayoritariamente por la presencia de oxígeno, dado el carácter eminentemente aeróbico de este grupo, aunque se ha visto que algunas cepas son capaces de crecer en condiciones con reducida tensión de oxígeno (Schwan, 2015).

Las bacterias del ácido acético degradan el etanol formado inicialmente mediante un proceso de carácter exotérmico, que puede prolongarse hasta la metabolización total, con producción de agua y dióxido de carbono. Como consecuencia de esta reacción oxidativa, se produce un segundo incremento de temperatura (Lefeber *et al.*, 2011), alcanzado valores entre 45 °C y 50 °C o incluso superiores. Ya al final de la fermentación, y gracias al aumento del pH y las concentraciones de oxígeno, el entorno se vuelve favorable el crecimiento de *Bacillus* sp., que puede llegar a concentraciones de 10^8 UFC/g (Sarbu y Csutak, 2019). El papel de las especies pertenecientes a este género aún no está claro. Así, la actividad enzimática de estos microorganismos permite la generación de ácidos grasos de cadena corta que pueden llegar a generar aromas indeseables en el producto final. Por el contrario, se dice también que la actividad de estos microorganismos podría ser positiva, ya que son capaces de producir enzimas pectinolíticas beneficiosas durante la fermentación (Ouattara *et al.*, 2008), aunque este argumento se desvaloriza por el hecho de que, durante los primeros días de fermentación, cuando la descomposición de la pectina es un proceso primordial, la concentración de *Bacillus* sp. se encuentra en números muy bajos.

4.2. Levaduras

La comunidad levaduriforme asociada a la fermentación del cacao suele mostrar un alto grado de diversidad. De forma mayoritaria, dicha comunidad suele estar dominada por el complejo *Hanseniaspora guilliermondii/opuntiae*, especialmente durante las primeras horas del proceso (Illegheems *et al.*, 2012). Tras 24-36 h de fermentación, la población de levaduras aumenta a 10^8 UFC/g, para después experimentar un descenso constante durante lo que queda de la fermentación. Las especies del género *Hanseniaspora* suelen presentar una baja tolerancia al etanol, lo que, unido a la ausencia de mecanismos de resistencia frente a otro tipo de estreses, tales como térmico y osmótico, condiciona su dominancia en etapas avanzadas del proceso, aunque persiste en todas las etapas (Papalexandratou y De Vuyst, 2011). Las condiciones imperantes durante la segunda mitad de la fermentación favorecen la presencia de otras especies, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* o *Issatchenkia orientalis* (Ho *et al.*, 2014), aunque nunca en concentraciones tan elevadas como las presentes en la primera parte del proceso (Koffi *et al.*, 2017).

Estudios recientes revelan que *Hanseniaspora guilliermondii/opuntiae* probablemente muestra una distribución universal en relación con la fermentación del cacao, dado que se ha detectado en procesos ejecutados a lo largo de todo el mundo (Papalexandratou y De Vuyst, 2011). Sin embargo, estudios filogenéticos parecen establecer ciertas diferencias en función de la localización geográfica del proceso, lo que apuntaría a la existencia de cepas pertenecientes a una misma especie, pero dependientes de su localización (Schwan, 2015). Así, las comunidades

levaduriformes presentes en procesos geográficamente diferenciados no serían poblaciones clónicas que se dispersan a lo largo del planeta, sino que serían grupos asociados a nichos y regiones concretas evolutivamente adaptados a las características específicas de cada zona, lo que desvelaría la existencia de complejos patrones migratorios (Ludlow *et al.*, 2016). En este sentido, las distintas cepas de levaduras presentes en la fermentación parecen no mostrar nexo de unión con aquellas propias de la región de procedencia de las plantas, lo que sugiere la existencia de eventos de combinaciones alélicas entre Europa, Asia y América del Norte, propiciados por las actividades y movimientos humanos. Finalmente, se ha determinado que las levaduras dominantes son diferentes en territorios alejados, mientras que en territorios cercanos o dentro del mismo país, pocas veces se identifican composiciones de poblaciones de levaduras diferentes (Ludlow *et al.*, 2016).

De forma general, la detección molecular de las levaduras asociadas a procesos localizados en zonas con altos niveles de producción de cacao, tales como Ecuador, Brasil, Ghana, Costa de Marfil o Malasia, señala a *Hanseniaspora sp.*, seguida por *Issatchekia orientalis* y *Saccharomyces cerevisiae* como especies más abundantes. En cualquier caso, no resulta prudente generalizar, ya que además de los factores geográficos, la identidad de la comunidad levaduriforme se encuentra condicionada por aspectos tales como la metodología de fermentación utilizada, que puede determinar en gran medida las especies que actuarán como dominantes en un mismo territorio (De Vuyst y Weckx, 2016).

Tabla 3. Especies dominantes (negrita) y principales especies de levaduras presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Levaduras en la fermentación del cacao			
País	Método de fermentación	Cultivar	Levaduras dominantes - especies involucradas
República Dominicana	Cajas (100 kg)	Trinitario	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Candida inconspícua</i> , <i>H. valbyensis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Ecuador	Cajas (100 kg)	Nacional y Trinitario	<i>Pichia manshurica</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida magnoliae</i> , <i>C. Sorbosivorans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>
Ecuador	Plataforma (100 kg)	Nacional y Trinitario	<i>Pichia manshurica</i> , <i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida magnoliae</i> , <i>C. sorbosivorans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>Rhodotorula minuta</i>
Ecuador	Caja/plataforma (NA)	NA	<i>Hanseniaspora sp.</i> , <i>Debaryomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Issatchekia terricola</i>

Tabla 3 (Cont.). Especies dominantes (negrita) y principales especies de levaduras presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Trinidad	Cajas (500 kg)	Trinitario	<i>Candida krusei</i> , <i>Hansenula anomala</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>elipsoides</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>
Australia	Caja (75 kg)	Trinitario	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>P. burtonii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Candida sorbisivorans</i> , <i>C. quercitrusa</i> , <i>Zygoascus hellenicus</i>
Brasil	Caja (800 kg)	Forastero	<i>Candida bombi</i> , <i>C. rugopelliculosa</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> , <i>Lodderomyces zlongisporus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> , <i>Torulaspora pretoriensis</i>
Brasil	Caja (1500 kg)	Criollo y Forastero	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. stellimalicola</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Brasil	Caja (1000 kg)	Criollo y Forastero	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Wickerhamomyces</i> sp., <i>Candida ethanolica</i> , <i>C. inconspicua</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. xylopsoci</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>Debaryomyces etchellsii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Indonesia	Caja (1000 kg)	Trinitario y Forastero	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kloeckera apis</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>C. humicola</i> , <i>K. javanica</i> , <i>K. africana</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>R. glutinis</i>
Ghana	Montón (500 kg)	Forastero	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>C. quercitrusa</i> , <i>C. diversa</i> , <i>C. sorboxylosa</i> , <i>C. zemplanina</i> , <i>C. cylindracea</i> , <i>C. michaelii</i> , <i>C. ethanolica</i> , <i>Saccharomycopsis crataegensis</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. pijperi</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>I. hanoiensis</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Torulaspora asahii</i>

Tabla 3 (Cont.). Especies dominantes (*negrita*) y principales especies de levaduras presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Ghana	Bandeja (100 kg)	Forastero	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Candida diversa</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>C. stellimalicola</i> , <i>C. quercitrusa</i> , <i>C. ethanolica</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>Saccharomycopsis crataegensis</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>I. occidentalis</i> , <i>Rhodotorula glutini</i> , <i>Torulaspota delbreuckii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Ghana	Montón (1000 kg)	Forastero	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Trichosporon asahii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>C. amapae</i> , <i>C. stellimalicola</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>C. neodendra/diddensiae</i> , <i>C. stellimalicola</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>C. friedrichii</i> , <i>Issatchenkia hanoiensis</i> , <i>Saccharomycopsis vini</i>
Costa de Marfil	Caja (70 kg)	Forastero	<i>Candida lactativorus</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. sake</i> , <i>C. valida</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>K. corticis</i> , <i>K. wickerhamii</i> , <i>Pichia membranaifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>chavalieri</i>
Costa de Marfil	Caja (NA)	NA	<i>Hanseniaspora</i> sp. , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hyphopichia burtonii</i> , <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Pichia veronae/fabianni</i>
Malasia	Caja (2500 kg)	Trinitario	<i>Candida</i> sp., <i>Debaryomyces</i> sp., <i>Hansenula</i> sp., <i>Kloeckera</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Torulopsis</i> sp.
Malasia	Caja (NA)	NA	<i>Hanseniaspora</i> sp. , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>

Aunque las características metabólicas de la comunidad levaduriforme presentan un alto grado de uniformidad en cuanto a su distribución entre las especies participantes en el proceso, es posible establecer cierta diferenciación en el peso relativo que cada una de ellas ejerce en las diversas acciones asociadas a estos microorganismos. Así, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora* sp. muestran más relación con la síntesis de precursores del sabor (Ramos *et al.*, 2014; Visintin *et al.*, 2017), mientras que especies de los géneros *Pichia* y *Candida* se encuentran involucradas en mayor medida en el aumento del pH derivado de la reducción en los niveles de ácido cítrico (Pereira *et al.*, 2017). Otras, como es el caso de *Kluyveromyces marxianus*, gracias a su tolerancia alcohólica, pueden continuar metabolizando azúcares aun incluso cuando la fermentación alcohólica se encuentra en fase avanzada, además de actuar sobre la fracción pectinolítica mediante la acción de las enzimas correspondientes (Leal *et al.*, 2008). Con respecto

a este último proceso, especies como *Kluyveromyces thermotolerans* o *Saccharomyces cerevisiae* también participan (Sarbu y Csutak, 2019). No obstante, y tomando en consideración las particularidades de cada proceso y la influencia que eso ocasiona en los perfiles de la comunidad microbiana, las propiedades del producto fermentado dependerán de la identidad de las especies dominantes en cada caso (Hernández-Hernández *et al.*, 2016). Así, si la especie dominante es *S. cerevisiae*, los niveles de etanol durante la fermentación serán mayores que los presentes en aquellos casos en los que las especies mayoritarias pertenezcan a los géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* o *Hanseniaspora* (Ho *et al.*, 2014).

Las levaduras fermentan los azúcares hasta etanol a través de la vía glucolítica y de la ruta de las pentosas fosfato, además del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. También muestran capacidad para utilizar el ácido cítrico, aunque en menor medida que las bacterias del ácido láctico y, como ya se ha mencionado, la producción de enzimas pectinolíticas, mayoritariamente endopoligalacturonasas, les permiten participar en los procesos de degradación de la pulpa y los cotiledones. Desde una perspectiva organoléptica, las levaduras contribuyen al desarrollo de las propiedades de aroma y sabor a través de la síntesis de, sobre todo, compuestos volátiles, asociados a sabores afrutados. Se han identificado más de 30 compuestos aromáticos generados por levaduras tales como *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Geotricum candidum* o *S. cerevisiae*, entre los que se encuentran alcoholes superiores (isoamílico e isobutanol), ésteres (acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, acetato de etilo, propil acetato o feniletil acetato) o ácidos (isovalérico) (Koné *et al.*, 2016).

4.3 Bacterias del ácido láctico

Después del primer día de fermentación, en el cual las levaduras han generado concentraciones de etanol considerables, las condiciones comienzan a ser favorables para que las BAL entren en su etapa de actividad máxima. Durante el segundo y el tercer día, las BAL consumen los azúcares remanentes, generando ácido láctico. En ese periodo de tiempo, las BAL se desarrollan hasta niveles poblacionales en torno a 10^8 UFC/g, valores que suelen decaer con posterioridad como consecuencia del cambio de las condiciones y del agotamiento del sustrato (Schwan, 2015).

Las bacterias del ácido láctico llevan a cabo varias reacciones durante la fermentación. Dentro de estas se encuentra la reducción de azúcares de la pulpa, específicamente la metabolización de glucosa y fructosa hasta la síntesis de ácido láctico, compuesto que también deriva de la utilización de ácido cítrico, junto a ácido acético y compuestos volátiles (Ho *et al.*, 2018). En concreto, los compuestos de esta naturaleza descritos incluyen diacetilo, 2,3-butanodiol, acetaldehído y acetoina (Ho *et al.*, 2015). Algunas especies pueden también llevar a cabo la conversión de fructosa en manitol (Lefeber *et al.*, 2011). La actividad de las BAL, por tanto, está relacionada significativamente con la modulación del pH de los cotiledones, acción que permite el crecimiento de otras bacterias, así como la funcionalidad de enzimas endógenas (Ho *et al.*, 2015).

Durante la fermentación las especies de BAL mayormente involucradas pertenecen a los géneros: *Lactobacillus* (*L.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Leuconostoc* (*Leuc.*), *Pediococcus* (*P.*), y *Weissella* (*W.*). Las primeras investigaciones realizadas Ostovar y Keeney (1973), pudieron determinar las

especies principales de BAL presentes en la fermentación de cacao, las cuales fueron: *L. fermentii*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. plantarum* y *Streptococcus thermophilus*. Estudios actuales han revelado que para fermentaciones en pila y bandeja los perfiles muestran un relativamente alto porcentaje de similitud en la mayoría de los casos. Así, *L. plantarum* y *L. fermentum* resultan ser los microorganismos que dominan el proceso fermentativo, siendo la primera mayoritaria durante las primeras etapas de la fermentación y la segunda en las etapas finales (Illeghems *et al.*, 2015). También se ha encontrado un factor geográfico en la preponderancia de una u otra, de manera que *L. fermentum* parece asociarse en mayor medida a procesos localizados en Ecuador, Costa de Marfil o Malasia, mientras que *L. plantarum* lo hace a fermentaciones en Nigeria, República Dominicana o Australia. El resto de especies lácticas suele variar dependiendo de factores tales como ubicación y métodos de fermentación. Entre las detectadas, cabe citar *Enterococcus casseliflavus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, especies de *Pediococcus*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Lactobacillus ghanaensis*, *Lactobacillus cacaonum*, *Weissella fabaria*, o *Weissella ghanaensis* (Schwan, 2015). En casos concretos, las dos especies dominantes de *Lactobacillus* ceden su papel protagonista a algunas de las citadas.

Tabla 4. Especies dominantes (*negrita*) y principales especies de BAL presentes durante la fermentación de cacao (*adaptado de Schwan, 2015*).

BAL en la fermentación del cacao			
País	Método de fermentación	Cultivar	BAL dominantes - especies involucradas
República Dominicana	Cajas (100 kg)	Trinitario	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>L. pentosus</i>
Ecuador	Cajas (100 kg)	Nacional y Trinitario	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. farraginis</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>Fructobacillus tropaeoli-like</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Weissella fabaria</i>
Ecuador	Plataforma (100 kg)	Nacional y Trinitario	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Fructobacillus tropaeoli-like</i> , <i>L. fabifermentans</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. cacaonum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lac. garvieae</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>E. saccharolyticus</i> , <i>Fructobacillus ficulneus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>Leuc. fallax</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>Streptococcus salivarius</i>
Australia	Caja (75 kg)	Trinitario	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>

Tabla 4. Especies dominantes (*negrita*) y principales especies deBAL presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Trinidad	Cajas (500 kg)	Trinitario	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Australia	Caja (75 kg)	Trinitario	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
Brasil	Caja (1200 kg)	Criollo y Forastero	<i>Lactobacillus nagelii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. durianis</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Brasil	Caja (1500 kg)	Criollo y Forastero	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Fructobacillus sp.</i> , <i>F. pseudoficulneus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>Weissella sp.</i>
Brasil	Caja (1000 kg)	Mix de variedades	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Weissella fabaria/ghanensis</i>
Brasil	Contenedor plástico (500 kg)	Criollo y Forastero	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. vaccinoferus</i>
Indonesia	Caja (1000 kg)	Trinitario y Forastero	<i>Lactobacillus cellobiosus (L. fermentum)</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. hilgardii</i>
Ghana	Montón (500 kg)	Forastero	<i>Lactobacillus collinoides</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i>
Ghana	Bandeja (100 kg)	Forastero	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Leuconostoc pseudoficulneum</i>
Ghana	Montón (1000 kg)	Forastero	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. mali</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Weissella sp.</i> , <i>W. ghanaensis</i> , <i>W. ghanaensis</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. kimchii</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. paramesenteroide</i> . <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>

Tabla 4. Especies dominantes (*negrita*) y principales especies deBAL presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Costa de Marfil	Montón (150 kg)	Trinitario y Forastero	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Costa de Marfil	Caja (1200 kg)	Trinitario y Forastero	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
Malasia	Caja (2500 kg)	Forastero	<i>Lactobacillus collinoides</i> , <i>L. plantarum</i>
Nigeria	Caja (NA)	NA	<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>

El ambiente ácido, azucarado y microaerobio que caracteriza la masa cacaotera es óptimo para el crecimiento de las BAL. Su tolerancia al etanol y a la temperatura (Chen *et al.*, 2013; Liu y Quereshi, 2009) les permiten prolongar su presencia más allá del inicio del proceso, aunque la diversidad y la dinámica poblacional que muestran es compleja. De forma mayoritaria, las especies más determinantes muestran carácter heterofermentativo (Zaunmüller *et al.*, 2006), caracterizadas por la asimilación de azúcares mediante la vía de las pentosas fosfato. Por el contrario, las especies homofermentativas, que suelen jugar un papel menos dominante, utilizan la ruta Embden-Meyerhof-Parnas. Tal diferenciación metabólica da lugar a que las primeras generen etanol, ácido acético, manitol y dióxido de carbono, además de ácido láctico, mientras que las segundas producen básicamente solo este último. El ácido láctico generado difunde en parte hasta los cotiledones y en parte es utilizado por las bacterias del ácido acético (Schwan *et al.*, 2015). La capacidad de utilización del ácido cítrico también se considera importante, ya que contribuye a la formación de compuestos organolépticos de importancia, tales como acetoína o 2,3-butanodiol (Ouattara *et al.*, 2016). En el caso de la conversión de fructosa en manitol, las especies que exhiben esta capacidad destinan menor cantidad de este azúcar para la síntesis de ácido láctico, lo que da lugar a valores de pH menos ácidos en los cotiledones.

Aunque no se ha dilucidado de forma definitiva, parece ser que la actividad de las BAL en relación con el cacao no muestra niveles significativos de proteólisis, lipólisis o pectinólisis, por lo que probablemente no altere la estructura de los cotiledones en lo que respecta a este tipo de compuestos. Por el contrario, las transformaciones que propician en los azúcares dan lugar también a diversos compuestos secundarios, como alcoholes, ésteres, ácidos orgánicos, cetonas y aldehídos, que acceden a los cotiledones y les aportan nuevos perfiles organolépticos. Además de la producción de compuestos orgánicos, se sabe que las BAL pueden producir sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas, que podrían afectar a la variedad de microorganismos en la fermentación, pero que también podrían mostrar actividad frente a especies toxigénicas de naturaleza fúngica no sólo durante la fermentación, sino también en las posteriores etapas de secado y almacenamiento (Essia Ngang *et al.*, 2015).

4.4. Bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético están involucradas en la producción de múltiples bebidas fermentadas, como la kombucha, el vinagre, el kéfir o los derivados del cacao (Lynch *et al.*, 2019). Durante la fermentación del cacao, estas bacterias usan el etanol y el ácido láctico como sustrato para la producción de ácido acético, compuesto que, como ya se ha referenciado con anterioridad, difunde hasta los cotiledones y participa en las reacciones de generación de color y de formación de precursores del sabor.

A pesar de que las bacterias ácido acéticas están presentes saprofitamente en la pulpa desde el comienzo de la fermentación, su capacidad para crecer y metabolizar los azúcares del medio se ve restringida por las condiciones insuficientes de oxígeno (De Vuyst y Leroy, 2020). La actividad de estas bacterias alcanza su fase exponencial cerca de las 50 horas y su pico de actividad cerca del inicio del tercer día de fermentación, momento en el que su población se sitúa en concentraciones cercanas a las 10^9 UFC/g. Su principal acción reside en la oxidación del etanol presente en el medio hasta ácido acético, produciendo llegar a producir concentraciones de hasta 20 mg/g de pulpa. Esta reacción es la que mayor potencial exotérmico posee a lo largo de toda la fermentación, por lo que desempeña un papel fundamental a la hora de provocar la muerte de los cotiledones y una buena fermentación de los mismos (Schwan, 2015).

Además de la influencia organoléptica que el ácido acético generado por BAA ejerce sobre los granos de cacao, este compuesto también cumple funciones secundarias derivadas de su capacidad antimicrobiana. Así, el desarrollo de especies sensibles, tanto bacterias como hongos y levaduras, algunas de ellas con capacidad alterante, puede verse minimizado como consecuencia de la presencia de este compuesto (Ruggirello *et al.*, 2019). Por otra parte, se postula que las BAA pueden intervenir en la síntesis de algunas moléculas de interés organoléptico, tales como aldehídos y cetonas, aunque son necesarios más datos que confirmen tal actividad (Ho *et al.*, 2018).

De acuerdo con la bibliografía existente, las especies BAA que con frecuencia son dominantes en el proceso fermentativo son *Acetobacter pasteurianus*, *A. ghanensi*, *A. aceti*, *A. tropicalis* y *Gluconobacter oxydans*. Los primeros estudios llevados a cabo por Roelofsen y Giesberger en 1947 detectaron *Gluconobacter oxydans* como especie dominante dentro de las primeras 24-32 h de fermentación, mientras que *A. pasteurianus* ocupaba dicha posición a partir de las 40 h y en etapas posteriores. En la actualidad, se sabe que no es posible generalizar los perfiles microbianos asociados a la fermentación del cacao, de manera que para evaluar la evolución que muestra la población acética es necesario tener en cuenta las condiciones en las que se realiza el proceso (Camu *et al.*, 2007). Así, diversos estudios de ecología microbiana han determinado que, en zonas como Brasil, o Ghana, son, *A. aceti*, *A. pasteurianus* y *G. oxydans* las especies que, de forma recurrente, ostentan mayor protagonismo en el proceso, aunque esta última con presencialidad inferior a las dos primeras (De Vuyst *et al.*, 2008; Papalexandratou *et al.*, 2011b). En cambio, fermentaciones localizadas en Costa de Marfil se asocian a la presencia de *A. pasteurianus* y *A. aceti*, además de otras especies de este género, pero no a la de *Gluconobacter* sp. de manera persistente (Soumahoro *et al.*, 2020). Otras especies habitualmente encontradas son *A. tropicalis* y *A. syzygii*, con aislamientos ocasionales de *A.*

malorum. De forma global, y considerando todos los factores de influencia, la especie más destacada dentro del grupo de las BAA es *A. pasteurianus*, hasta el punto de que se cataloga como especie autóctona del proceso fermentativo y es utilizado de manera frecuente y con éxito como especie inoculante (Sarbu y Csutak, 2019).

Tabla 5. Especies dominantes (**negrita**) y principales especies de BAA presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

BAA en la fermentación			
País	Método de fermentación	Cultivar	BAA dominantes - especies involucradas
República Dominicana	Cajas (100kg)	Trinitario	<i>Acetobacter lovaniensis</i>
Ecuador	Cajas (100kg)	Nacional y Trinitario	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. malorum/cerevisiae</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. cibirongensis</i> , <i>Gluconobacter sp.</i> , <i>G. oxydans</i>
Ecuador	Plataforma (100kg)	Nacional y Trinitario	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. fabarum</i> , <i>A. peroxydans</i> , <i>A. cibirongensis</i> , <i>A. malorum/indonesiensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. malorum/cerevisiae</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis/fabarum</i>
Trinidad	Cajas (500kg)	Trinitario	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. roseus</i> , <i>A. suboxydans</i>
Australia	Caja (75 kg)	Trinitario	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Asaia siamensis</i>
Brasil	Caja (800 kg)	Forastero	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquefaciens</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. peroxydans</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>
Brasil	Caja (1500 kg)	Criollo y Forastero	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Gluconacetobacter oxydans</i>
Brasil	Caja (1000 kg)	Mix de variedades	<i>Acetobacter tropicalis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. pomorum</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>Gluconobacter sp.</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>Asaia sp.</i>

Tabla 5 (Cont.). Especies dominantes (*negrita*) y principales especies deBAA presentes durante la fermentación de cacao (*adaptado de Schwan, 2015*).

Brasil	Contenedor plástico (500 kg)	Criollo y Forastero	<i>Acetobacter tropicalis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. cerevisiae</i> , <i>A. ghanensis</i>
Indonesia	Caja (1000 kg)	Trinitario y Forastero	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. aceti</i>
Ghana	Montón (500 kg)	Forastero	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. syzigii</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>A. malorum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>
Ghana	Bandeja (100 kg)	Forastero	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. syzigii</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>A. malorum</i>
Ghana	Montón (1000 kg)	Forastero	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. tropicalis</i> , <i>A. ghanaensis</i> , <i>A. senegalensis</i> , <i>A. syzygii</i> , <i>A. lovaniensis</i>
Costa de Marfil	Contenedores (20 kg)	Trinitario y Forastero	<i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. ghanensis</i> , <i>A. senegalensis</i>
Malasia	Caja (2500 kg)	Forastero	<i>Acetobacter rancens</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. xylinum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>

El hábitat con el que se encuentran las BAA cuando las condiciones son favorables para su desarrollo se caracteriza por la escasa presencia de glucosa o fructosa, por lo que enfocarán su metabolismo hacia el etanol sintetizado por las levaduras, y el ácido láctico procedente de las BAL. Esta última acción adquiere especial relevancia, ya que la disminución en los niveles de ácido láctico minimiza la posible afectación de las propiedades organolépticas del producto final que este compuesto puede ocasionar. El principal producto generado por el metabolismo acético, el ácido acético, puede ser reducido en cierta medida hasta CO₂ y agua. Otro producto generado, especialmente a partir de la transformación del ácido láctico, es acetoína.

Gran parte de las reacciones de interés que se dan durante la fermentación destinadas a generar un producto de calidad se dan durante esta etapa. Las condiciones imperantes, alta temperatura y elevados niveles de ácido acético, propician junto a la actividad enzimática endógena, la muerte de los cotiledones. Dicha actividad enzimática permite también la producción de compuestos importantes para el desarrollo de las cualidades organolépticas, en unión a la derivada de glicosidasas y endoproteasas propias de las BAA, identificadas entre las escasas enzimas microbianas actuantes durante el proceso en este sentido.

4.5. Otros microorganismos participantes

4.5.1. Bacterias aerobias formadoras de esporas - *Bacillus* sp.

La presencia de especies pertenecientes al género *Bacillus* ha sido habitualmente documentada en relación con la fermentación del cacao, lo cual no debe considerarse como un hecho sorprendente, dada la versatilidad metabólica que exhiben y la plasticidad funcional que les caracteriza (Alcaraz *et al.*, 2010). En este proceso concreto, el aumento de los niveles

térmicos y de los valores de pH permiten el desarrollo de este grupo microbiano, llegando en ocasiones a prolongar su presencialidad hasta el producto final (Pereira *et al.*, 2020).

Tabla 6. Especies dominantes (negrilla) y principales especies de *Bacillus spp* presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Bacterias aerobias formadoras de esporas - <i>Bacillus spp</i>			
País	Método de fermentación	Cultivar	<i>Bacillus spp</i> dominantes - especies involucradas
Trinidad	Cajas (500 kg)	Trinitario	<i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i>
Brasil	Caja (800 kg)	Forastero	<i>B. brevis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pasteurii</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i>
Brasil	Caja (1200 kg)	Criollo y Forastero	<i>B. subtilis</i>
Brasil	Caja (1000 kg)	Mix de variedades	<i>B. subtilis</i> , <i>B. flexus</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> , <i>B. flexus</i>
Brasil	Contenedor plástico (500 kg)	Mix de variedades	<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i>
Indonesia	Caja (1000 kg)	Trinitario y Forastero	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i>
Ghana	Montón (500 kg)	Forastero	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
Ghana	Bandeja (100 kg)	Forastero	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. sphaericus</i>
Ghana	Caja (2500 kg)	Forastero	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
Costa de Marfil	Caja (500 kg)	Mix de variedades	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringensis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. fusiformis</i> , <i>B. pumilus</i>
Malasia	Caja (2500 kg)	Forastero	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>

Aunque la actividad y el papel que estas bacterias desempeñan en las fermentaciones de cacao todavía no ha sido claramente definido, se ha observado que tienen la capacidad de liberar liasas y poligalacturonasas que podrían ejercer una función relevante durante el proceso (Ouattara *et al.*, 2008). Las primeras detecciones que se realizaron fueron en Ghana, donde se identificaron especies como *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* (Nielsen *et al.*, 2007). A medida que las investigaciones avanzaron se estimó que la comunidad de *Bacillus* relacionada

con la fermentación de cacao parecía ser simple, ya que en Ghana solo se identificaron especies como *B. subtilis*, mientras que en Malasia únicamente *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilis* (Ardhana y Fleet, 2003). Estudios posteriores arrojan resultados contradictorios, ya que mientras algunos hablan de comunidades restringidas únicamente a 2-4 especies, otros referencian una mayor complejidad, entre 8 y 14 especies diferentes (Schwan, 2015).

Las especies de este género sintetizan diversos tipos de enzimas de carácter extracelular, tales como lipasas, amilasas, proteasas y pectinasas, las cuales podrían verse involucradas en la fermentación de los cotiledones (Castro-Alayo *et al.*, 2019). Otros compuestos de interés y que tienen alta relevancia en las características organolépticas del chocolate, como las pirazinas, son también producidos por *Bacillus* (Hashim *et al.*, 1998), además de diferentes concentraciones de ácido acético, ácido láctico, y 2,3-butanediol. Desde una perspectiva negativa, se ha postulado la participación de los ácidos grasos libres C₃-C₅, producidos por diversas especies del género, en la generación de olores no deseables (Schwan *et al.*, 2015).

4.5.2. Otras especies bacterianas

Además de BAL, BAA y representantes del género *Bacillus*, existen otras especies bacterianas involucradas en la fermentación de cacao, tales como las pertenecientes a los géneros *Tatumella*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Zymomonas*, *Brevundimonas*, o *Xanthomonas* (Agyrifo *et al.*, 2019). Por lo general, estas bacterias acceden a la masa cacaotera desde el entorno, y tienen como origen mayoritario las hojas de plátano empleadas para tapar las masas fermentativas, las superficies de la vaina, los recipientes fermentadores, las manos de los agricultores y hasta el suelo (Schwan *et al.*, 2015). Algunos de los microorganismos mencionados son reconocidos fitopatógenos, pero su presencia se limita en la mayoría de las ocasiones a la fase inicial del proceso, ya que las condiciones que se van dando con posterioridad restringen su persistencia. No obstante, si la fermentación se prolonga en exceso y las condiciones reducen su nivel de exigencia, algunas de ellas pueden reaparecer en la parte final del proceso (Sarbu y Csutak, 2019).

Con la información disponible hasta el momento, se desconoce si estas bacterias desempeñan una función trascendental en la fermentación o si su actividad puede tener un efecto positivo o negativo en la calidad organoléptica del producto. Si están perfectamente establecidas las actividades metabólicas que estos microorganismos pueden exhibir, algunas de las cuales podrían encontrar utilidad entre los eventos que tienen lugar durante la fermentación, tales como la capacidad pectinolítica, de interés en la degradación de la pulpa, o la metabolización del citrato (Hamdouche *et al.*, 2015).

4.5.3. Hongos filamentosos

Representantes del grupo de los hongos filamentosos han sido detectados en pequeñas concentraciones en algunos casos, especialmente en zonas donde la masa fermentativa presenta condiciones de oxígeno óptimas y temperaturas más bajas. Los niveles suelen ser mayores al inicio y al final del proceso, ya que las condiciones ambientales les son más favorables y no tienen que afrontar la competencia ejercida por otros grupos microbianos más adaptados a este tipo de hábitats. No obstante, su presencia en niveles superiores a 10⁶ UFC/g suele causar

problemas de carácter organoléptico (Copetti *et al.*, 2011). Las especies más habituales pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium* (Sarbu y Csutak, 2019).

Algunos estudios adjudican un papel relativamente importante a los hongos filamentosos, debido a su gran potencial enzimático o a la capacidad para generar compuestos de interés organoléptico a partir de la fracción grasa del grano (de Araújo *et al.*, 2019). Sin embargo, y al igual que sucede con *Bacillus*, tal hecho no ha sido establecido de forma fehaciente. De hecho, los resultados obtenidos hasta el momento apuntan más a su influencia negativa, asociada al desarrollo de procesos tales como el enranciamiento, o a la contaminación por micotoxinas (Kreibich *et al.*, 2016).

Tabla 7. Especies dominantes (*negrita*) y principales especies de Hongos filamentosos presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Hongos Filamentosos		
País	Etapa del proceso	Hongos filamentosos dominantes - especies involucradas
Guinea Ecuatorial y Ecuador	Fermentación y secado al sol	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. tamari</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>nidulans</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. griseoroseum</i> , <i>P. olsonii</i> , <i>Eupenicillium cinnamopurpus</i> , <i>Eupenicillium tropicum</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Cladosporium oxysporum</i> , <i>Emericella rugolosa</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> , <i>E. chevalieri</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>P. medicagninis</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>
Brasil	Fermentación en Caja	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Paecilomyces varioti</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. implicatus</i> , <i>P. spinosum</i> , <i>Thielaviopsis ethacetica</i> , <i>Trichoderma viridae</i> , <i>Mycelia sterilia</i>
Brasil	Fermentación en Caja	<i>Monascus ruber</i> , <i>Penicillium paneum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> group, <i>A. ochraceus</i> group, <i>A. parasiticus</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.
Brasil	Caja (1000 kg)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. westerdijkiae</i>

Tabla 7. Especies dominantes (*negrita*) y principales especies de Hongos filamentosos presentes durante la fermentación de cacao (adaptado de Schwan, 2015).

Brasil	Contenedor plástico (500 kg)	<i>Absidia corymbifera</i> , <i>Penicillium paneum</i> , <i>Aspergillus</i> sp. nov. (related to <i>A. tamarii</i>) , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Eurotium chevalieri</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> group, <i>A. ochraceus</i> group, <i>A. sydowii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Eurotium rubrum</i> , <i>E. amstelodam</i> , <i>Dematiaceous hyphomycetes</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Syncephalastrum</i> sp.
Brasil	Almacenado	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. melleus</i>
Brasil	Almacenado	<i>Eurotium amstelodami</i> , <i>E. chevalieri</i> , <i>E. rubrum</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus penicillioides</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> group , <i>Aspergillus</i> sp. nov. (related to <i>A. tamarii</i>) , <i>A. sydowii</i> , <i>Penicillium paneum</i> , <i>Syncephalastrum</i> sp. , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. ochraceus</i> group, <i>A. parasiticus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. fellutanum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Dematiaceous hyphomycetes</i> , <i>Emericella nidulans</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Wallemia sebi</i>
Indonesia	Fermentación en Caja	<i>Penicillium citrinum</i> , unidentified basidiomycete , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Penicillium purpurogenum</i> , <i>P. ochrochloron</i>
Cameroon	Fermentación en Montón	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>P. sclerotiorum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Trichoderma</i> sp.
Cameroon	Fermentación en Caja	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Syncephalastrum racemosum</i>
Cameroon	Secado	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>P. sclerotiorum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Geotrichum</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Trichoderma viride</i>

5. Cultivos iniciadores

5.1. Fermentaciones controladas

El aumento de la demanda por parte del consumidor de chocolates de alta calidad y la producción de fermentados de cacao con perfiles organolépticos bien desarrollados, supone un nuevo desafío para los agricultores y la industria del chocolate. Los investigadores han propuesto varias combinaciones de cultivos iniciadores provenientes, tanto de aislados propios de la fermentación, como de otras fuentes naturales, para favorecer la obtención de productos finales con tales niveles de calidad. A pesar de esto, sigue sin haber un inoculante dominante en el mercado, probablemente como consecuencia de la influencia de factores geográficos en el perfil microbiano de los procesos (Figuroa-Hernández *et al.*, 2019). Algunos estudios han revelado que la utilización de estos cultivos iniciadores, en general, tiene un efecto positivo, ya que aceleran el proceso (Ramos *et al.*, 2014) y contribuyen a estabilizarlo, gracias a que reducen las probabilidades de contaminación como consecuencia de la capacidad antimicrobiana de la mayor parte de las especies utilizadas (Batista *et al.*, 2015).

En general, los estudios se centran en buscar especies de microorganismos que, primero, sean de preferencia parte de la microbiota natural de la fermentación o, en su defecto, que tengan capacidad de resistencia al estrés y posean las herramientas metabólicas necesarias para degradar los compuestos carbonados presentes en el proceso. Aunque se han observado comportamientos variables, como que los cultivos iniciadores pierdan su dominio durante las primeras etapas del proceso en beneficio de las especies saprófitas, o levaduras autóctonas que co-dominan con los cultivos iniciadores, parece claro que pueden ejercer un impacto significativo sobre el producto final (Schwan, 2015).

Una de las especies más comúnmente utilizadas es *S. cerevisiae*, ya que propicia una buena descomposición de la pulpa. Las conclusiones apuntan a que las levaduras que tienen actividad pectinolítica son adecuadas en calidad de cultivos iniciadores, debido a que liberan compuestos de interés, facilitan la degradación de la pulpa y permiten la generación de condiciones aerobias. Otras levaduras que han ofrecido buenos resultados en este sentido son *Candida saitoana*, *Pichia norvensis* y *P. kluyveri*, especie esta última que ha generado productos finales con buena consideración en lo que respecta a la presencia de compuestos organolépticos deseables (Figuroa-Hernández *et al.*, 2019). En el lado opuesto, se ha descrito como fermentaciones en las que se ha inoculado *Kluyveromyces marxianus* han dado lugar a productos con sabores astringentes y amargos (Crafack *et al.*, 2013) En este sentido, la utilización de especies con escasa actividad pectinolítica, como es el caso de *K. marxianus*, causa una degradación débil de la pulpa, lo que provoca perfiles organolépticos poco desarrollados y un sistema fermentativo propenso a favorecer la presencia de especies patógenas.

El desarrollo de inoculantes mixtos, en los que combinan diversas especies, tanto de carácter levaduriforme como bacteriano, ha abierto la posibilidad de obtener productos con perfiles organolépticos diferenciados, aunque algunos de los estudios realizados hasta ahora postulan la escasa influencia de las especies bacterianas en el resultado final (Dircks, 2009). Sin embargo, no todos los ensayos apuntan en la misma dirección (Moreira *et al.*, 2017)), ya que se han descrito casos en los que la ausencia de especies procariotas en el inóculo se traduce en bajos

niveles de ácido acético, mayor acidez y menor concentración de compuestos organolépticos. Aunque no se han establecido las causas de tales diferencias, puede ser que un incorrecto de las condiciones en cuanto a su adecuación a los valores demandados por las especies inoculadas, sea el principal argumento que explique estos contradictorios resultados. En relación a este aspecto, es necesario remarcar la necesidad de seleccionar especies capacitadas para tolerar las exigentes condiciones que se dan durante la fermentación (Pereira *et al.*, 2012). El diseño de los recipientes en los que tiene lugar la fermentación también es un factor a tener en cuenta, ya que pueden contribuir a un mayor grado de regulación térmica o a facilitar las operaciones de volteo (Fleet, 2007).

6. Conclusiones

- El proceso fermentativo del cacao muestra un alto grado de complejidad y se ve influenciado por un elevado número de factores, tanto de carácter agrícola, como geográfico y metodológico, lo que hace imprescindible la adquisición de un mayor conocimiento, tanto de las particularidades como de las generalidades, que permita generar perfiles organolépticos de mayor calidad.
- El carácter tradicional de un alto porcentaje de los procesos realizados hace que el nivel de control sea bajo y que los productos generados presentan escasa homogeneidad. La variabilidad microbiana entre procesos, derivada de la diversidad de condiciones citada, actúa como primera causa de heterogeneidad.
- Aún no se dispone del conocimiento suficiente de la ecología microbiana asociada a la fermentación del cacao y los efectos concretos que las distintas comunidades microbianas ejercen sobre las cualidades del producto generado.
- El desarrollo económico-social de los países productores de cacao, considerados en su práctica totalidad como zonas en vías de desarrollo, repercute negativamente sobre la calidad del producto final. La mejora del sector y de los actores en él implicados pasa necesariamente por la industrialización del proceso, permitiendo el paso de una actividad tradicional y con bajo nivel de control a otra tecnificada, que dé mayor consistencia, previsibilidad y valor al producto.
- La tecnificación del sector cacaotero ha de fundamentarse en el mayor conocimiento de los eventos bioquímicos que tienen lugar durante la fermentación, en el papel que las distintas comunidades microbianas desempeñan en dichos eventos, y la forma en que tales comunidades se ven afectadas por las condiciones nutricionales, ambientales y físico-químicas y las propiedades metodológicas que caracterizan cada proceso.

7. Bibliografía

- Afoakwa, E., Kongor, J. E., Takrama, J., & Budu, A. S. (2013). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (theobroma cacao) beans. *International Food Research Journal*, 20, 1843–1853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1009/s14198-011-2033-4>
- Afoakwa, E., 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, 840–857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2009). Influence of tempering and fat crystallization behaviours on microstructural and melting properties in dark chocolate systems. *Food Research International*, 42, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.10.007>
- Afoakwa, E., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011). Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (Theobroma cacao) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 755–764. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.581224>
- Agyirifo, 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. *Heliyon*, 5, e02170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02170>
- Albak, F., & Tekin, A. R. (2016). Variation of total aroma and polyphenol content of dark chocolate during three phase of conching. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 848–855. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2036-4>
- Alean, J., Chejne, F., & Rojano, B. (2016). Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *Journal of Food Engineering*, 189, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.026>
- Aprotosoai, 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Bailey, B. A., & Meinhardt, L. W. (2016). Cacao diseases: A history of old enemies and new encounters. In *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.051>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>
- Bolenz, S., Kutschke, E., Lipp, E., & Senkpiehl, A. (2007). Pre-dried refiner flakes allow very short or even continuous conching of milk chocolate. *European Food Research and Technology*, 226, 153–160. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0520-9>
- Bridgemohan, P., & Mohammed, M. (2019). The Ecophysiology of Abiotic and Biotic Stress on the Pollination and Fertilization of Cacao (*Theobroma cacao* L.; formerly *Sterculiaceae*)

- family). *Abiotic and Biotic Stress in Plants*, 524, 141–157. <https://doi.org/DOI:10.5772/intechopen.84528>
- Camu, N., Winter, T. De, Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M., & Vuyst, L. De. (2007). Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *American Society for Microbiology*, 73, 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5, 2–29. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Chinenye, N. M. M., Ogunlowo, A. S., & Olukunle, O. J. (2010). Cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) drying kinetics. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 633–639. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392010000400014>
- Cidell, J., & Alberts, H. (2006). Constructing quality : The multinational histories of chocolate. *Elsevier*, 37, 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2006.02.006>
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., & Taniwaki, M. H. (2011). Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28, 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.005>
- Counet, C., Allemien, D. E. C., Uwerx, C. A. O., & Ollin, S. O. C. (2002). Use of Gas Chromatography–Olfactometry To Identify Key Odorant Compounds in Dark Chocolate. Comparison of Samples before and after Conching. *Agricultural and Food Chemistry*, 7, 2385–2391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf0114177>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- de Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., & da Costa, F. B. (2018). Cacao— *Theobroma cacao*. *Exotic Fruits*, 3, 69–76. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 5–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- De Vuyst, Luc, Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., & Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)5-rep-PCR fingerprinting technique 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.030>
- De Vuyst, Luc, & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 44, 432–453. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- Deheuvels, O., Rousseau, G. X., Soto Quiroga, G., Decker Franco, M., Cerda, R., Vílchez Mendoza, S. J., & Somarriba, E. (2014). Biodiversity is affected by changes in management intensity of cocoa-based agroforests. *Agroforestry Systems*, 88, 1081–1099. <https://doi.org/10.1007/s10457-014-9710-9>
- Dircks, H. D. (2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology , chemistry and flavour. *University of New South Wales School of Chemical*

Sciences and Engineering, 1, 5–418.

- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 229, 937–948. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1132-y>
- Essia Ngang, J. J., Yadang, G., Sado Kamdem, S. L., Kouebou, C. P., Youte Fanche, S. A., Tsochi Kougan, D. L., Tsoungui, A., & Etoa, F. X. (2015). Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Science and Technology*, 25, 245–259. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.969195>
- 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 and Nutrition*, 30, 1–13. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1701>
- Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010>
- Ganeswari, I., Khairul Bariah, S., Amizi, M., & Sim, K. (2015). Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*, 22, 70–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1005/s14195-019-213-0>
- Gattward, J. N., Almeida, A. A. F., Souza, J. O., Gomes, F. P., & Kronzucker, H. J. (2012). Sodium-potassium synergism in *Theobroma cacao*: Stimulation of photosynthesis, water-use efficiency and mineral nutrition. *Physiologia Plantarum*, 146, 350–362. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01621.x>
- 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. *Human Ecology*, 45, 321–332. <https://doi.org/10.1007/s10745-017-9899-0>
- Guehi, T. S., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02424.x>
- Gutiérrez, T. J. (2017). State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 1313–1344. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12301>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.031>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.001>
- Hartemink, A. E. (2005). Nutrient Stocks, Nutrient Cycling, and Soil Changes in Cocoa Ecosystems: A Review. *Advances in Agronomy*, 86, 227–253. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)86005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86005-5)
- Hashim, P., Selamat, J., Muhammad, S. K. S., & Ali, A. (1998). Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation.

- Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 543–550. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199812\)78:4<543::aid-jsfa152>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199812)78:4<543::aid-jsfa152>3.0.co;2-2)
- Henderson, J. S., Joyce, R. A., Hall, G. R., Hurst, J., & McGovern, P. E. (2007). Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18937–18940. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708815104>
- 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 and Nutrition*, 4, 690–695. <https://doi.org/10.1002/fsn3.333>
- Ho, V. T. T., Fleet, G. H., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Huang, Y., & Barringer, S. A. (2011). Monitoring of Cocoa Volatiles Produced during Roasting by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science*, 76, 279–286. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01984.x>
- Illegheems, 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, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038040>
- 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 temperature and time of processing. *Food Chemistry*, 174, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.019>
- Jagoret, P., Michel, I., Ngnogué, H. T., Lachenaud, P., Snoeck, D., & Malézieux, E. (2017). Structural characteristics determine productivity in complex cocoa agroforestry systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 37–60. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0468-0>
- Jinap, S., Misnawi, A., 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. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00097-1)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.02.006>
- Koffi, O., Samagaci, L., Goualie, B., & Niamke, S. (2017). Diversity of Yeasts Involved in Cocoa Fermentation of Six Major Cocoa-Producing Regions in Ivory Coast. *European Scientific Journal*, 13, 496–516. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n30p496>
- Koné, K., Guéhi, T., Durand, N., Koffi, B., Berthiot, L., & Fonata, T. (2016). Contribution of

- predominant yeast to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910–917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Kongor, J. E., Hinneh, M., de Walle, D. Van, Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - A review. *Food Research International*, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & Vuyst, L. De. (2011). 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>
- Ludlow, C. L., Cromie, G. A., Garmendia-Torres, C., Sirr, A., Hays, M., Field, C., Jeffery, E. W., Fay, J. C., & Dudley, A. M. (2016). Independent Origins of Yeast Associated with Coffee and Cacao Fermentation. *Current Biology*, 26, 965–971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.012>
- Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P., & Saels, V. (2013). Detailed Analysis of the Microbial Population in Malaysian Spontaneous Cocoa Pulp Fermentations Reveals a Core and Variable Microbiota. *PLoS ONE*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559>
- Meersman, E., Struyf, N., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Santiago, J. S., Baert, E., Hemdane, S., Vrancken, G., Verstrepen, K. J., Courtin, C. M., Hendrickx, M., & Steensels, J. (2017). Characterization and Degradation of Pectic Polysaccharides in Cocoa Pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9726–9734. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03854>
- Mohamadi, A., Asefi, N., Maleki, R., & SeiedlouHeris, S. S. (2019). Investigating the flavor compounds in the cocoa powder production process. *Food Science and Nutrition*, 7, 3892–3901. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1244>
- Mohamed, A., Garvin, P., Euphemia, C., Kim, S., Puran, B., & Ronell, S. B. (2017). Cocoa floral phenology and pollination: Implications for productivity in Caribbean Islands. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 9, 106–117. <https://doi.org/10.5897/jpbcs2016.0598>
- Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M. G., Santos, C., Lima, N., & Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a Microbial Cocktail Used as a Starter Culture on Cocoa Fermentation and Chocolate Flavor. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22, 2–15. <https://doi.org/10.3390/molecules22050766>
- Moreira, I. M. da V., Miguel, M. G. da C. P., Duarte, W. F., Dias, 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Mota-gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., & Dolci, P. (2018). Dynamics and Biodiversity of Bacterial and Yeast Communities during Fermentation of Cocoa Beans. *American Society for Microbiology*, 84, 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89, 380–386. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
- Neilson, J., Pritchard, B., Fold, N., & Dwiartama, A. (2018). Lead Firms in the Cocoa–Chocolate

- Global Production Network: An Assessment of the Deductive Capabilities of GPN 2.0. *Economic Geography*, 94, 400–424. <https://doi.org/10.1080/00130095.2018.1426989>
- Ogunsina, B. S., Adeyemi, M. A., Morakinyo, T. A., Aremu, O. J., & Bamgboye, A. I. (2017). Direct energy utilization in the processing of cocoa beans into powder. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 19, 213–218. <https://doi.org/https://doi.org/1.12.16/j.foodres.2013.76.004>
- Oomes, N., Tieben, B., Laven, A., Ammerlaan, T., Appleman, R., Biesenbeek, C., & Buunk, E. (2016). Market Concentration and Price Formation in the Global Cocoa Value Chain. *Commissioned by the Ministry of Foreign Affairs, The Netherlands Market*, 79, 2–122. http://www.cocoaconnect.org/sites/default/files/publication/the_full_report.pdf
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3144-y>
- Ouattara, H. D., Ouattara, H. G., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., & Niamke, S. L. (2017). International Journal of Food Microbiology 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008>
- Ouattara, H., Koffi, B. L., Karou, G. T., Sangaré, A., Niamke, S. L., & Diopoh, J. K. (2008). Implication of Bacillus sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1753–1760. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9683-9>
- Owusu, M., Petersen, M. A., & Heimdal, H. (2012). Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00602.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12264>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00747.x>
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H., & Vuyst, L. De. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77, 7698–7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- Papalexandratou, Z., Kaasik, K., Kauffmann, L. V., 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 varieties 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.012>
- Peláez, P., Bardón, I., & Camasca, P. (2016). Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. *Scientia Agropecuaria*, 7, 355–365. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.04.01>

- Pereira, A., Stellari, H. A., Vilela, L. F., Schwan, R. F., & Sant'Ana, A. S. (2020). Dynamics of *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus* spores inoculated in different time intervals during simulated cocoa beans fermentation. *Lwt Food Science and Technology*, *120*, 108941. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108941>
- Pereira, D. M., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Elsevier*, *7*, 50–57. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001>
- Pereira, G., Alvarez, J., Neto, D. P., Soccol, V., Tanobe, V., Rogez, H., Góes-Neto, A., & Soccol, C. (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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>
- Pipitone, L. (2018). A Review of Cocoa Market Developments Commodities and Development. *United Nations Conference on Trade and Development*, *10*, 1–16. https://unctad.org/system/files/non-official-document/MYEM2018_Laurent_Pipitone_25042018.pdf
- Ramírez Gil, J. (2016). Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en la hacienda Theobroma, Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, *31*, 42–49.
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. da 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Rodríguez-campos, J., Escalona-buendía, H. B., Orozco-avila, 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 components analysis. *FRIN*, *44*, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>
- Rodríguez, P., Pérez, E., & Guzmán, R. (2009). Effect of the types and concentrations of alkali on the color of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*, 1186–1194. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3573>
- Rottiers, H., Amelia, D., Sosa, T., Winne, A. De, Ruales, J., Clippeleer, J. De, Leersnyder, I. De, Wever, J. De, Everaert, H., Messens, K., & Dewettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, *245*, 1917–1937. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>
- Santander, M., Rodríguez, J., 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. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The microbiology of cocoa fermentation. In D. of G. Faculty of Biology (Ed.), *Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Volume 8. The Science of Beverages* (pp. 423–446). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Schwan, R. F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 1477–1483. <https://doi.org/10.1128/aem.64.4.1477-1483.1998>
- Schwan, R., Pereira, G., & Fleet, G. (2014). Microbial activities during cocoa fermentation. *Cocoa and Coffee Fermentations*, *13*, 129–192.

- Schwan, R., & Wheals, A. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*, 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Smulders, M. J. M., Esselink, D., Amores, F., Ramos, G., Sukha, D. a, Butler, D. R., Vosman, B., & Van Loo, E. N. (2012). Identification of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Varieties with Different Quality Attributes and Parentage Analysis of Their Beans. *Plant Research International*, *11*, 1–13. <https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/237666150> Identification
- Sokmen, A., & Gunes, G. (2006). Influence of some bulk sweeteners on rheological properties of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, *39*, 1053–1058. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.002>
- Soumahoro, S., Ouattara, H. G., Droux, M., Nasser, W., Niamke, S. L., & Reverchon, S. (2020). Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species diversity and performance in acetic acid production. *Journal of Food Science and Technology*, *57*, 1904–1916. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04226-2>
- Sulaiman, K. B., & Yang, T. A. (2015). Color characteristics of dried cocoa using shallow box fermentation technique. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, *9*, 1277–1281. <https://doi.org/http://doi.org/10.5281/zenodo.1110824>
- Toker, O. S., Palabiyik, I., & Konar, N. (2019). Chocolate quality and conching. *Trends in Food Science and Technology*, *91*, 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.047>
- Toker, O. S., Palabiyik, I., Pirouzian, H. R., Aktar, T., & Konar, N. (2020). Trends in Food Science & Technology Chocolate aroma : Factors , importance and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, *99*, 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.035>
- Torres-Moreno, M., Torrescasana, E., Salas-Salvadó, J., & Blanch, C. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*, *166*, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.141>
- Utrilla-Vázquez, M., 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*, 108–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>
- Verna, R. (2013). The history and science of chocolate. *Malaysian Journal of Pathology*, *35*, 111–121. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362474/>
- Vinícius, G., Pereira, D. M., Teixeira, K., Gonzaga, E., Almeida, D., Coelho, S., & Freitas, R. (2013). International Journal of Food Microbiology Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank : In fl uence on the dynamics of microbial populations and physical – chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, *161*, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004>
- Voora, V., Bermúdez, S., & Larrea, C. (2019). Global Market Report. In *International Institute for Sustainable Development (IISD)* (Vol. 22). <http://www.jstor.com/stable/resrep22025>
- Wickramasuriya, A., & Dunwell, J. (2018). Accepted Article Cacao biotechnology: current status and future prospects. *School of Agriculture*, *38*, 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

- 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 Study of Cocoa in Côte d'Ivoire. *Advances in Meteorology*, *19*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/9405939>
- Yusep, I., Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2002). Influence of carboxypeptidases on free amino acid, peptide and methylpyrazine contents of under-fermented cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *82*, 1584–1592. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1232>
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Uden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*, 421–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0514-3>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.026>