

SELECCIÓN DE CULTIVOS INICIADORES PARA LA FERMENTACIÓN DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)

Autores: ¹Villalba Tindel, F., ¹Guillén, J. M., ¹Alvarenga Raggini., L., ²McGahan., S.

¹ Estudiante de Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud y el Deporte, Universidad San Lorenzo, Sede Central.

² Docente, Facultad de Ciencias de la Salud y el Deporte, Universidad San Lorenzo, Sede Central.

***Autor de correspondencia:** fabby.villalba@gmail.com

RESUMEN

El aroma y sabor del grano de cacao son las principales características de aceptación y calidad. La fermentación reduce la astringencia y el amargor, produce compuestos precursores del aroma (CPA). Los CPA son producidos por la descomposición enzimática de azúcares en la pulpa y proteínas en las semillas; por levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. Este artículo de revisión tiene por objetivo realizar un análisis ensayos de selección de cultivos iniciadores para la fermentación del cacao (*Theobroma cacao L.*), con la finalidad de determinar los microorganismos ideales que deben estar presentes en el proceso de fermentación del grano para reproducir la misma calidad de producto que se obtendrá en cada grano cosechado, para ello, es fundamental la presencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniospora Opuntiae*, así como bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), quienes son responsables de la producción de alcohol y ácido.

Palabras-Clave: Cacao, fermentación, bacterias, ácido lácticas, ácido acéticas.

INTRODUCCIÓN

El grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) es la principal materia prima utilizada en la producción de chocolate. La fermentación es fundamental para eliminar la pulpa que envuelve la semilla y para desarrollar precursores de sabor y aroma del chocolate. Durante el proceso de fermentación, un consorcio de levaduras naturales, así como bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA), son responsables de la producción de alcohol y ácido (Tavares et al., 2016).

Para lograr una fermentación correcta que conduzca al perfil deseado de aroma y sabor en el grano de cacao, es ideal utilizar un cultivo iniciador que permita replicar las mismas cualidades del producto, en cada grano fermentado (Dicks, 2009). El cultivo iniciador es una combinación de microorganismos seleccionados para iniciar el proceso de fermentación de un alimento (Figueroa-Hernández et al., 2019).

El sabor del grano de cacao es uno de los atributos de calidad más importantes, ya que el sabor es esencial para la aceptabilidad de los granos de cacao y los productos del cacao como el chocolate. La composición compleja del sabor del grano de cacao depende del genotipo del grano, el procesamiento posterior a la cosecha, como el pretratamiento de la pulpa, la fermentación y el secado, los procesos industriales, como el tostado, así como el tipo de suelo y la edad del árbol de cacao. El genotipo del grano determina la composición química del grano, en particular el contenido de proteínas de almacenamiento, polisacáridos y polifenoles en el grano. Esto determina la cantidad y el tipo de precursores formados durante los procesos de fermentación y secado que conducen a la formación del sabor y, por lo tanto, influyen tanto en el tipo como en la intensidad del sabor (Kongor et al., 2016).

La fermentación y el secado de los granos de cacao dan como resultado la descomposición de la proteína almacenada por proteasas endógenas en aminoácidos y oligopéptidos de cadena corta, mientras que la invertasa también descompone los polisacáridos en glucosa y fructosa. Los aminoácidos, los oligopéptidos, la glucosa y la fructosa reaccionan entre sí durante el proceso de tostado para producir los volátiles característicos con sabor a cacao. Los polifenoles también son oxidados por el polifenol oxidasa durante la fermentación y el secado, lo que reduce la astringencia y el amargor de los granos de cacao, mejorando así el sabor de los granos de cacao (Teneda Llerena, 2016).

DESARROLLO

Fermentación de Cacao

En la producción de chocolate se utilizan principalmente tres variedades genéticas de cacao (*Theobroma cacao L.*): Forastero, Trinitario y Criollo, las cuales se caracterizan por su aroma, característica que determina su calidad. El cacao criollo es de la más alta calidad y se utiliza en la elaboración de chocolate fino por su aroma afrutado. El aroma del cacao criollo se define por compuestos volátiles como pirazinas y aldehídos generados durante el tostado del grano a partir de precursores del aroma (azúcares reductores y aminoácidos libres) generados en el interior del grano por reacciones enzimáticas durante la fermentación; Por esta razón, la fermentación es el proceso más importante en la cadena de valor (Castro-Alayo et al., 2019).

La fermentación del cacao consiste en una serie de cambios fisicoquímicos que provocan el desarrollo del sabor y aroma del chocolate, con un cambio en la pigmentación interna de púrpura a marrón claro, la conversión del sabor astringente de los cotiledones y la conversión de azúcares en alcoholes por la levadura, que a su vez son convertidos en ácido acético por las bacterias acéticas (Teneda Llerena, 2016). Durante este proceso, existe una relación ordenada entre los microorganismos y los cambios de temperatura, pH y humedad para formar alcoholes, ácidos y compuestos polifenólicos que matan el grano, reducen el sabor amargo y desencadenan las reacciones bioquímicas que forman el chocolate.

Los cambios químicos dentro del grano de cacao dependen de la muerte celular en los cotiledones, en los que sus membranas celulares se degradan y aumentan su permeabilidad, permitiendo el contacto entre varios componentes celulares. Por lo tanto, los polifenoles astringentes pueden luego difundirse hacia las células vecinas, donde se encuentran con varias enzimas que provocan reacciones hidrolíticas debido a las condiciones anaeróbicas del grano. Si no se descomponen, pasan a grano seco, provocando el color morado de las almendras, lo que indica errores en el proceso de fermentación (Teneda Llerena, 2016).

Por otro lado, aspectos como la genética, las condiciones ambientales, la fermentación, el secado y el tostado son factores que influyen en la calidad y composición bioquímica del cacao (Kongor et al., 2016).

La fermentación reduce la astringencia y el amargor y permite la creación de compuestos precursores del sabor y el aroma, como compuestos volátiles, péptidos y aminoácidos. Estos compuestos se forman durante la descomposición enzimática de azúcares y proteínas, primero en la pulpa y luego en las semillas; debido a levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA). Las levaduras y las BAL son los microorganismos predominantes en la etapa inicial de la fermentación (Romanens et al., 2018). Las levaduras producen enzimas pectinolíticas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa a través de la actividad invertasa, facilitando la difusión de ácidos orgánicos (cítrico, acético y láctico) y etanol, elevando la temperatura de los granos de cacao (Zamudio-Palacios, 2021). Asimismo, las levaduras son las mayores productoras de ésteres y alcoholes superiores, que pueden contribuir a la compleja mezcla de compuestos volátiles que caracterizan el sabor del chocolate (Tavares et al., 2016).

Fases de la fermentación

La fermentación se divide en tres fases: en la primera fase actúan las levaduras, en la segunda fase se desarrollan las bacterias ácido lácticas y en la tercera fase se desarrollan las bacterias ácido acético. Cuando se extraen los granos de cacao, estos se encuentran estériles, pero colonizados por una variedad de microorganismos, provenientes de la propia vaina, de las manos de los trabajadores, de insectos, de los contenedores utilizados para el transporte, etc. Los microorganismos juegan un papel importante en el proceso de fermentación de los granos de cacao (Teneda Llerena, 2016).

La fermentación dura 5 días o 120 horas. Muchos cambios fisicoquímicos ocurren dentro y fuera de los granos de cacao, como la aparición y desaparición de sustancias polifenólicas como: las cianidinas, que desaparecen por completo entre el tercer y quinto día de fermentación, integrándose parte de las reacciones bioquímicas que han tenido lugar, y las leucocianidinas, que aparecen entre el segundo y tercer día pero luego desaparecen al combinarse con las proteínas. A continuación se mencionan las tres fases descritas por Teneda Llerena (2016):

Primera Fase: Los primeros microorganismos en desarrollarse son las levaduras, gracias a las condiciones iniciales en la pulpa del grano de cacao, como el ambiente anaeróbico y el bajo pH. La fase inicial consiste en la fermentación alcohólica realizada por levaduras, pertenecientes a los géneros *Saccharomyces spp.*, *Candida*, *Dedaryomyces*, *Hansenulaa*, *Kloeckera*, *Pichia*,

Rhodotorula, y *Torulopsis*. Las especies encontradas con mayor frecuencia son *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* y *Schizosaccharomyces pombe*.

Segunda Fase: A 50 °C, las levaduras dejan de crecer y son reemplazadas por bacterias acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, que aprovechan la aireación y el etanol para producir ácido acético. Este es un punto crucial en el proceso ya que el ácido acético dará como resultado una mayor reducción en el pH que, combinado con el calor de la fermentación, matará los brotes en las semillas, pero no inactivará los brotes creados cuando se formaron esos brotes. Además, los microorganismos presentes durante la fermentación producen ésteres de acetato a partir del ácido acético, que le dan al chocolate su sabor especial.

Tercera fase: los granos de cacao deben ser removidos o volteados. La acción de volteo tiene el efecto inmediato de enfriarlo, liberando CO₂ y aumentando la aireación y por lo tanto la actividad de las bacterias ácido acéticas. El propósito de esta actividad es asegurar el grado de fermentación uniforme. El volteo debe comenzar 48 horas después del inicio de la fermentación, luego cada 24 horas, es decir, una vez al día durante los 2 o 3 días restantes dependiendo del tipo de cacao fermentado, pero siempre a la misma hora. Gracias a la remoción que enriquece el ambiente con oxígeno y la reducción del pH, el etanol obtenido puede transformarse en ácido acético (CH₃COOH) por oxidación del alcohol, es decir, h tiene lugar una fermentación oxidativa. La temperatura ideal para el proceso de fermentación del ácido acético está entre 28 y 30 °C y el pH óptimo es de alrededor de 4,5.

Actividad de las levaduras en la fermentación

Las levaduras son el microorganismo predominante en la fermentación del cacao, especialmente en las primeras etapas del proceso, además de que la levadura se considera fundamental durante este proceso y en el desarrollo del sabor a chocolate (Nigam, 2014).

La actividad más importante de las levaduras es la producción de etanol a partir de carbohidratos, especialmente glucosa, produciendo dióxido de carbono y diversos metabolitos secundarios, como alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos, cetonas,

azufre y compuestos nitrogenados, estos metabolitos pueden variar dependiendo de la especie de levadura que domine el proceso. El azúcar es metabolizado por las células de levadura a través de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo del ácido tricarboxílico. La producción de etanol se realiza en condiciones anaeróbicas, ácidas y ricas en carbohidratos, pero también provoca un aumento de la temperatura que alcanza valores entre 35 y 40 °C durante 48 horas después del inicio de la fermentación. Algunas levaduras pueden metabolizar el ácido cítrico provocando una disminución de la acidez del grano (Nigam, 2014). Por otro lado, las levaduras pueden producir enzimas pectinolíticas, que son deseables en la fermentación del cacao, porque su secreción reduce la viscosidad de la pulpa, aumenta la disponibilidad de oxígeno al mezclar los granos y proporciona una fuente adicional de carbohidratos (Lima et al., 2011). Las enzimas producidas por las levaduras son hidrolasas como las endo- y exo-poligalacturonosidasas, sin embargo, las últimas son las que se producen generalmente por las cepas de levadura presentes en la fermentación de cacao (Sarbu & Csutak, 2019).

Hay muchas levaduras presentes durante la fermentación, sin embargo, en el proceso predominan los géneros *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida* y *Torolospura*. La especie *Hanseniaspora* generalmente inicia la fermentación debido a su baja tolerancia al etanol y al calor, buena tolerancia a ambientes ácidos y no competitividad con las bacterias ácido lácticas creando condiciones necesarias para el crecimiento de la especies *Saccharomyces* y *Pichia*, que pueden crecer en ambientes ácidos, con etanol y algunas son termoresistentes (Ho et al., 2014).

Actividad de las bacterias ácido lácticas en la fermentación

Las bacterias ácido lácticas están presentes desde el comienzo de la fermentación, pero dominan las levaduras. La actividad de las levaduras se inhibe por la concentración del alcohol, el incremento de pH y aumento de la aireación. Después de 48-96 horas, las condiciones se vuelven favorables para las bacterias ácido lácticas, las cuales dominan la población microbiana en este tiempo. Las bacterias ácido lácticas convierten una variedad de azúcares y algunos ácidos orgánicos en ácido láctico, lo que contribuye a la descomposición de la pulpa, la formación del sabor y la inhibición de los microorganismos que la deterioran (Nigam, 2014).

Los productos del metabolismo de las bacterias ácido lácticas son el ácido láctico, etanol, ácido acético y otros ácidos orgánicos como el glicerol, manitol, dióxido de carbono y volátiles (Lagunes et al., 2007).

Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas dominan la fermentación, utilizan glucosa mediante la ruta de las pentosas fosfato, sin embargo, este metabolismo produce ácido láctico con un rendimiento de 50 %. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas usan glucosa mediante la glucólisis para producir ácido láctico con un rendimiento mayor a 85 %. Las cepas heterofermentativas y homofermentativas están involucradas en la fermentación de los granos de cacao, pero la pulpa de cacao representa un sustrato ideal para las bacterias heterofermentativas debido a la alta concentración de fructosa y ácido cítrico. La producción de ácidos reduce el pH de la pulpa. Sin embargo, en los primeros días de fermentación, esta caída no es tan drástica ya que las levaduras pueden absorber ácido láctico y el ácido cítrico es consumido por las bacterias ácido lácticas a través de la vía del oxalacetato. La actividad de las levaduras y las bacterias ácido lácticas reducen los azúcares a niveles residuales (Lagunes Gálvez et al., 2007).

Las bacterias ácido lácticas comúnmente involucradas en la fermentación de cacao incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella*. Al comienzo de la fermentación, se pueden encontrar especies como *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Fructobacillus tropeoli*, *Liquorilactobacillus cacaonum*, *Limosibacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Sin embargo, las bacterias ácido lácticas de la especie *Limosibacillus fermentum* y *Lactiplantibacillus plantarum* predominan en la fermentación del cacao (Sarbu & Csutak, 2019).

Actividad de las bacterias ácido acéticas en la fermentación

El consumo de la pulpa de los granos provoca un aumento de temperatura y aireación de la masa fermentativa. Esto permite el crecimiento de bacterias ácido acéticas, que metabolizan el etanol y el ácido láctico, producen ácido acético a través del ciclo del ácido tricarboxílico. Es importante reducir el lactato presente en los granos porque, en altas concentraciones, el ácido láctico afecta la calidad sensorial de los granos de cacao beneficiados (Sarbu & Csutak, 2019). Las bacterias ácido acéticas pueden existir tanto en ambientes neutrófilos como acidófilos y su metabolismo para producir ácido acético es

un proceso exotérmico que eleva la temperatura de los granos de cacao a más de 50 °C (Ho et al., 2015).

El ácido acético aumenta la acidez de los granos y, cuando se difunde, conduce a la muerte de los cotiledones, lo que conduce a la activación de enzimas endógenas del grano de cacao con actividad hidrolítica, como las carboxipeptidasas, endoproteasas y galactosidasas. Estas modificaciones bioquímicas en el interior del grano conllevan a la síntesis de los precursores de color y sabor del cacao (Lagunes Gálvez et al., 2007).

Estudios fermentativos de cacao

Los estudios de la fermentación de cacao surgen para lograr identificar los microorganismos más eficaces para obtener y replicar los aromas y sabores característicos del chocolate que se obtienen únicamente durante un buen proceso de fermentación del grano.

Investigación de fermentación de Cacao inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae*

Los experimentos de fermentación realizados por Tavares et al. (2016), se procesaron en la finca de cacao Vale do Juliana en Igrapiúna, Bahía, Brasil, donde se empleó un consorcio iniciador conformado por *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniaspora uvarum*, resultando en la formación de 67 compuestos volátiles en el grano fermentado, que fueron detectados sensorialmente en el chocolate y mostraron intensas notas frutales.

En este estudio se inoculó *S. cerevisiae* CA11 en fermentaciones de diferentes variedades de cacao (CCN51, PS1030, FA13 y CEPEC 2004) con el fin de evaluar las características sensoriales y químicas del chocolate. La población general de *S. cerevisiae* se estudió mediante el método de cultivo independiente (qPCR), que proporciona una alternativa más rápida y fiable para identificar y cuantificar las levaduras durante la fermentación (Hierro et al., 2007).

De igual forma, Koné et al., (2016), informaron de la formación de 33 compuestos volátiles a partir de cultivos únicos de 6 levaduras en medio de Sabouraud. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia galeiformis*, *Galactomyces geotrichum* y *Wickerhamomyces anomalus*, fueron aisladas, identificadas

y seleccionadas por ser predominantes en tres diferentes métodos de fermentación espontánea con cultivares mixtos de cacao de Costa de Marfil, identificando 31 compuestos volátiles. Sobre esta base, el objetivo de este trabajo fue estudiar la fermentación del cacao utilizando un consorcio de levaduras aisladas de la fermentación espontánea del cacao para determinar su influencia en la formación de compuestos precursores del aroma (Koné et al., 2016).

Estudio de un consorcio de levaduras durante la fermentación de cacao

Un estudio realizado con semillas de cacao criollo de una plantación de Tikul, Yucatán, México (Zamudio-Palacios, 2021) en el que se realizaron dos tipos de fermentaciones: 1) cultivos puros (CP) con cada una de las levaduras seleccionadas y 2) cultivo mixto (CM) con la presencia de todas las levaduras. Todos los cultivos se llevaron a cabo en un fermentador para cacao (diseño CIATEJ A.C.) El cultivo inóculo de cada levadura se realizó colocando una asada en 50 mL de MPC esterilizado a 105 °C / 5 minutos (Meersman et al., 2017) e incubando a 30 °C durante 24 horas (Zamudio-Palacios, 2021).

El comportamiento cinético de las 4 levaduras en los cultivos puros (Tabla 1) y el cultivo mixto (Tabla 2) se observó por conteo diferencial. En los cultivos puros se observaron que las levaduras L1 y L2 mostraron su fase exponencial en las primeras 24 horas y alcanzaron una concentración celular de 9.00×10^7 UFC/g para L1 y 4.22×10^8 UFC/g para L2. Posteriormente, la levadura L1 mantuvo su presencia en el cultivo en la fase estacionaria, mientras que la levadura L2 disminuyó su concentración celular. Por otro lado, las levaduras L3 y L4 alcanzaron su máximo crecimiento a las 48 horas con una concentración celular de 3.60×10^7 UFC/g para L3 y de 1.30×10^8 UFC/g para la levadura L4. Luego se observó continuidad en presencia de la levadura L3 en el cultivo. Sin embargo, la levadura L4 pasó por una fase de adaptación durante las primeras 24 horas y luego de 48 horas de cultivo su concentración celular disminuyó.

Tabla 1: Crecimiento microbiano en UFC/ g durante los cultivos puros (CP) de *Saccharomyces cerevisiae* (L1), *Candida humilis* (L2), *Pichia kluyveri* (L3) y *Hanseniaspora opuntiae* (L4)

Crecimiento microbiano en los CP (UFC/g)				
tiempo (h)	L1	L2	L3	L4
0	1.03×10^6	1.55×10^6	4.60×10^5	7.00×10^5
24	9.00×10^7	4.22×10^8	1.32×10^7	6.00×10^6
48	1.01×10^8	5.00×10^4	3.60×10^7	1.30×10^8
72	1.08×10^8	1.00×10^5	3.60×10^7	5.00×10^7

Fuente: (Zamudio-Palacios, 2021)

En el cultivo mixto (Tabla 2) el comportamiento cinético de las levaduras L1 y L2 fue similar al observado en sus CP y alcanzaron su máximo crecimiento celular a las 24 horas con una concentración celular de 8.43×10^7 UFC/g y 8.14×10^7 UFC/g, respectivamente. Mientras que la levadura L4 alcanzó su máximo crecimiento a las 48 h del cultivo. Sin embargo, la presencia de la levadura L3 ya no se observó después de 24 horas de cultivo (Zamudio-Palacios, 2021).

Tabla 2: Crecimiento microbiano en UFC/g durante el cultivo mixto (CM) de *Saccharomyces cerevisiae* (L1), *Candida humilis* (L2), *Pichia kluyveri* (L3), *Hanseniaspora opuntiae* (L4) y cuenta total de levaduras (LT).

Crecimiento microbiano en el CM (UFC/g)					
tiempo (h)	L1	L2	L3	L4	LT
0	3.70×10^5	1.10×10^5	2.70×10^5	2.00×10^3	7.53×10^5
24	8.43×10^7	8.14×10^7	2.10×10^6	1.00×10^6	1.69×10^8
48	8.20×10^7	6.30×10^7	0.00	1.20×10^6	1.46×10^8
72	6.20×10^7	1.40×10^7	0.00	2.00×10^4	7.66×10^7

Fuente: (Zamudio-Palacios, 2021)

Estos resultados indicaron que la cepa L1 fue predominante y estuvo presente durante 72 horas en las fermentaciones CP y CM. L2 en su CP disminuyó su concentración celular después de las primeras 24 h, pero permaneció en la fase estacionaria en CM. Esto puede indicar que la presencia del consorcio promueve el crecimiento y persistencia de *C. humilis* durante el proceso de fermentación. Este predominio de *S. cerevisiae* se atribuye a su mayor capacidad enzimática y capacidad para resistir condiciones estresantes, como altos niveles de etanol y ácidos orgánicos, altas temperaturas y bajos niveles de pH (Batista et al., 2016).

Los resultados de Zamudio-Palacios, (2021) indicaron que *Saccharomyces cerevisiae* fue la cepa predominante durante las fermentaciones tanto en CP como en CM. Además, fue la cepa con mayor consumo de azúcares disponibles en la pulpa de cacao en los CP. La fermentación de cacao criollo por el consorcio conformado por *Saccharomyces*

cerevisiae, *Candida humilis*, *Pichia kluyveri* y *Hanseniospora Opuntiae* aisladas de la fermentación espontánea, tuvo impacto en la generación de 26 compuestos volátiles precursores de aroma. Estos compuestos se clasificaron en 6 grupos: ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos, cetonas y pirazinas. Del total de compuestos detectados, se encontraron 18 compuestos deseables para un cacao fino. Durante la fermentación en CM se encontró además ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético. Dado que la presencia de *P. kluyveri* solo se detectó hasta las 24 h de fermentación se propuso en una siguiente etapa, incrementar la concentración de inóculo con el propósito de obtener mayor potencial aromático (Zamudio-Palacios, 2021).

CONCLUSIONES

Son varios los microorganismos que pueden ser aplicados en el uso de cultivo para iniciadores en la fermentación de cacao. Los microorganismos como los mencionados *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter tropicales*, tienen un alto potencial para ser utilizadas como cultivos iniciadores de fermentación por su influencia en la estandarización y aceleración de este proceso, y en la mejora sensorial de chocolates producidos por lo que se sugiere la selección de estos microorganismos para ser incluidos en los cultivos iniciadores de fermentación del cacao. Se propone además la diversificación de los procesos de fermentación para la producción, procesamiento y comercialización del cacao.

BIBLIOGRAFÍAS

- Batista, NN, Ramos, CL, Dias, DR, Pinheiro, ACM y Schwan, RF (2016, Febrero). The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate. *J Food Sci Technol*, 53(2). 10.1007/s13197-015-2132-5
- Castro-Alayo, EM, Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, FP. (2019, Enero 29). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Dicks, H. D. (2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. UNSW, Sydney. <https://doi.org/10.26190/unsworks/14910>

- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, ZJ, González-Ríos, O., Cocolin, L., & Suárez-Quiroz, ML (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301(ISSN 0168-1605), Pages 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002>.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., & Guillamón, JM. (2007, Diciembre 01). Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Research*, 7(Issue 8), Pages 1340–1349. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00304.x>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174(ISSN 0168-1605), Pages 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(ISSN 0168-1605), Pages 54-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>.
- Koné, MK, Guéhi, ST, Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, AF, ... & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, Part 2(ISSN 0963-9969), Pages 910-917. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>.
- Kongor, J. E., Van de Walle, D., Afoakwa, EO, Boeckx, P. y Dewettinck, K.(2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile. *Food Research International*, 82(ISSN 0963-9969), Pages 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>.
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, JL., Barel, M., Guiraud, JP (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 114, Issue 1, Pages 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>.
- Lima, L. J., Almeida, M. H., Nout, M. J., & Zwietering, MH. (2011). *Theobroma cacao* L., “The food of the Gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(8), 731-761. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Nigam, P. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology* (2da ed.). Academic Press.
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The microbiology of cocoa fermentation. *Woodhead Publishing*, 8, 423-446. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>

- Sukha, DA, Bharath, SM, Ali, NA y Umaharan, P. (2013). AN ASSESSMENT OF THE QUALITY ATTRIBUTES OF THE IMPERIAL COLLEGE SELECTIONS (ICS) CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*) CLONES. ISHS Acta Horticulturae, 1047(1047). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1047.29>
- Tavares, AG, Batista, NN, Ramos, CL, De Silva, ARDA, Efraim, P., Pinheiro, ACM, & Schwan, RF (2016, Marzo). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (*Theobroma cacao L.*) inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Research International, 81(ISSN 0963-9969), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.036>
- Teneda Llerena, W. F. (2016). Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao L.*). Universidad Internacional de Andalucía. <https://core.ac.uk/download/pdf/223061502.pdf>
- Zamudio-Palacios. (2021). Estudio de un consorcio de levaduras durante la fermentación de cacao y su efecto en la generación de compuestos aromáticos. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 6, 62-74. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume6/6/2/9.pdf>