Nota técnica

Fermentación de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae), sus primeras cuarenta y ocho horas: Oportunidades de estudio

S. Cestari-Abreu[1]*, F. Aguilera[1], J. De Almeida[1], H. Rodríguez[1], J. Hernández[1], M. Henríquez[1].

[1] Gerencia de Proyectos de Investigación, Desarrollo e innovación, Centro Nacional de Tecnología Química, Caracas, Venezuela.

Resumen

El propósito del trabajo fue brindar una descripción de los procesos que se producen una vez que ocurre la fermentación de las semillas de cacao. Se identificaron las variables que influyen durante esta etapa y los vacíos de información que conducen al desarrollo de nuevas investigaciones en este campo. La actividad de las levaduras es de especial interés durante las primeras 48 h, dado que la producción de etanol está asociada con los rasgos sensoriales que finalmente presentará el grano. Las variables que más afectan la fermentación alcohólica son la temperatura y el suministro de oxígeno; en este sentido, la recomendación es utilizar contenedores de forma cuadrada y hacer la primera remoción de los granos al finalizar el período de las 48 h. Adicionalmente, se debe considerar un tiempo de espera de las mazorcas para elevar la temperatura y acelerar su ascenso durante los primeros dos días.

Palabras clave: cacao, fermentación, levadura, etanol, tiempo de aguante.

Recibido: 27 de octubre del 2022
Aceptado: 16 de enero del 2023
Publicado: 11 de marzo del 2023
Conflicto de intereses: los autores declaran que no existen conflictos de intereses.
DOI: https://www.doi.org/10.5281/zenodo.7271877
***Autor para correspondencia:** S. Cestari-Abreu
e-mail: scestari.cntq@gmail.com

Technical note

Fermentation of *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) Seeds, their First Forty Eight Hours: Study of Opportunities

S. Cestari-Abreu[1]*, F. Aguilera[1], J. De Almeida[1], H. Rodríguez[1], J. Hernández[1], M. Henríquez[1].

[1] Gerencia de Proyectos de Investigación, Desarrollo e innovación, Centro Nacional de Tecnología Química, Caracas, Venezuela.

Abstract

The purpose of the work was to provide a description of the processes that occur once the fermentation of cocoa beans occurs. The variables that influence during this stage and the information gaps that lead to the development of new research in this field were identified. Yeast activity is of special interest during the first 48 h since ethanol production is associated with the sensory traits that the grain will finally present. The variables that most affect alcoholic fermentation are temperature and oxygen supply; In this sense, the recommendation is to use square-shaped containers and do the first removal of the grains at the end of the 48 h period. Additionally, a waiting time for the pod should be considered to raise the temperature and accelerate their rise during the first two days.

Keywords: cocoa, fermentation, yeast, ethanol, holding time.

CIENCIA EN REVOLUCIÓN

Received: October 27, 2022
Accepted: January 16, 2023
Published: August 11, 2023
Conflict of interest: the authors declare that there are no conflicts of interest.
DOI: https://www.doi.org/10.5281/zenodo.7271877
***Corresponding author:**
S. Cestari-Abreu
e-mail:
scestari.cntq@gmail.com

Ciencia en Revolución, Vol. 8, N° 23, (enero-abril, 2022)

1. Introducción

El grano de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) está definido por la semilla fermentada, seca y con cascarilla [1, 2]. La producción de granos de cacao es un negocio sustancial; el precio, durante junio de 2020, estuvo cerca de los dos mil dólares americanos por tonelada según reporta la Organización Internacional del Cacao (ICCO) [3], dando una idea de la magnitud que puede tener este producto al considerar que, por ejemplo, Costa de Marfil tuvo una producción de más de un millón de toneladas de granos de cacao en el año 2014 como reportan Hoare y col. [4].

La República Bolivariana de Venezuela ha mostrado especial interés en el aprovechamiento de este rubro; la declaración del cacao como género prioritario de la nación [5] y el nacimiento de la Corporación Socialista del Cacao Venezolano S.A. [6], así lo indican. Con el objetivo de ganar mayor protagonismo en el mercado, el refinamiento de la calidad del grano resulta relevante; además de cumplir con las exigencias mínimas de los países importadores, es una ventaja competitiva aumentar la calidad sensorial del grano de cacao. Entre los factores que más influyen en esta variable, resaltan la genética del cultivo elegido, así como, los modos en que son canalizados las actividades de fermentación y secado de los granos [7, 8, 9].

La fermentación es la descomposición microbiana de los carbohidratos contenidos en la pulpa que recubre la semilla de cacao. Los cambios en el pH, el aumento de la temperatura y la penetración de los productos de fermentación de la pulpa en los cotiledones finalmente matan al

embrión [10, 11, 12]. El camino correcto de la fermentación está sujeto a un número de variables; al identificarlas y ajustarlas correctamente, este proceso puede ser mejorado y, en consecuencia, aumentar el valor final del grano de cacao [7, 12, 13].

Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es ofrecer a los investigadores y productores agrícolas una descripción de los eventos que se originan debido a la fermentación; así como, identificar las variables de mayor impacto y aquellos aspectos que no han sido considerados en el proceso de fermentación.

2. Metodología

Se emplearon las plataformas de publicaciones científicas SciELO, ResearchGate y Dimensions, como se muestra en la Tabla 1, para identificar la literatura relacionada con la fermentación de los granos de cacao a nivel nacional, latinoamericano y mundial.

Tabla 1. Plataformas y ecuaciones de búsqueda empleadas

Plataforma	Ecuación de búsqueda
SciELO	(ab: ((fermentación OR fermentation))) AND (ab: ((cacao OR cocoa)))
ResearchGate	(fermentación OR fermentation) AND (cacao OR cocoa)
Dimensions	(fermentación OR fermentation) AND (cacao OR cocoa)

3. Discusión de resultados

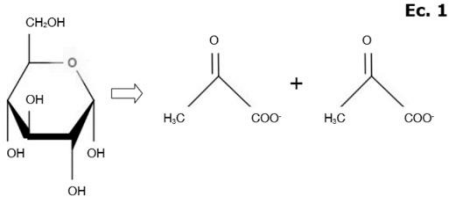
3.1 Fenómenos químicos involucrados

Cuando los cacaocultores abren las mazorcas de cacao, se inicia el proceso de fermentación, las semillas se exponen a una infinidad de microorganismos como consecuencia del contacto con las herramientas de trabajo, las manos o el aire circundante [13, 14]. La microbiota que da inicio a este proceso es característica de cada región geográfica, pero la evidencia científica mundial ha demostrado que las bacterias ácido lácticas y acéticas, junto a las levaduras son las responsables esenciales de la fermentación [10, 11, 12, 15].

El modelo más aceptado indica que las levaduras son las responsables de la producción de alcoholes a causa de la metabolización de azúcares en un entorno casi anaeróbico [12, 16]. Mientras que, las bacterias ácido lácticas metabolizan el ácido cítrico y la fructosa de la pulpa, formando así los ácidos acético y láctico, respectivamente [11, 12].

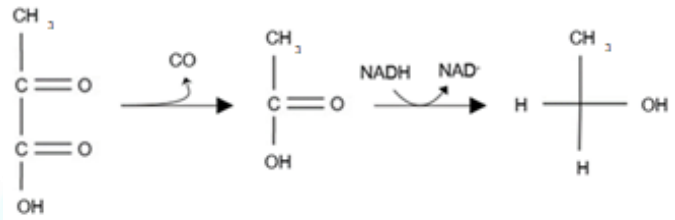
La fermentación inicia con la transformación del azúcar de la pulpa del grano en alcohol y dióxido de carbono (proceso de glucólisis), donde el pH y la temperatura aumentan. La glucosa se degrada en el citosol, dando lugar a dos moléculas de piruvato mediante la siguiente reacción general mostrada en la Ecuación 1 [13].

Ec. 1



Inmediatamente, bajo condiciones anaeróbicas el piruvato se transforma en alcohol etílico o etanol (fermentación alcohólica) como se observa en la Ecuación 2.

Ec. 2



Luego, gracias a la remoción de los granos, se oxigena el entorno y el etanol obtenido se convierte en ácido acético, mediante la oxidación del alcohol por bacterias ácido-acéticas como se observa en la Ecuación 3.

Ec. 3

Las reacciones metabólicas descritas conducen a un incremento de la temperatura y reducen los niveles de oxígeno del sistema [11, 14]. Por ello, si este oxidante es administrado de manera adecuada mediante la remoción de los granos, favoreciendo la proliferación de las bacterias ácido acéticas, estas convertirán el ácido láctico y/o etanol a ácido acético [12].

La evidencia sugiere que el ácido acético puede ser precursor de un amplio espectro de ésteres que darán al grano fermentado parte de sus rasgos sensoriales [17, 18]. De acuerdo con lo expuesto, este modelo sostiene que una buena fermentación estará dirigida a la generación de ácido acético; entonces, el identificar las variables que afectan los niveles de esta molécula favorecerá la calidad de la fermentación.

Por otra parte, a medida que la actividad microbiológica transcurre en la pulpa, se difunden al interior de la semilla moléculas solubles en ella, la temperatura aumenta y las sustancias que inhiben la germinación son degradadas [10, 11]; el contacto entre enzimas y sustratos en los cotiledones, y los productos de la fermentación finalmente matan el embrión [11]. Carboxipeptidasas, proteasas aspárticas y aminopeptidasas, son enzimas que están involucradas en la degradación de las proteínas de reserva de los cotiledones del grano y en la fermentación de las semillas de cacao [10, 19].

Las fermentaciones acompañadas de una fuerte acidificación de los cotiledones (pH < 5,0) dan como resultado un pobre potencial de sabor del cacao. Este hecho se debe a la dependencia del pH de las carboxipeptidasas, cuya actividad es óptima en un rango de pH entre 5,0 - 5,5 [10]. Además, estas peptidasas son las responsables principales de la hidrólisis de las proteínas globulinas tipo vicilinas de reserva, cuyos aminoácidos y oligopéptidos resultantes son los precursores que dotarán al cacao de su olor característico y, por lo tanto, en gran parte de la calidad sensorial [10, 19].

3.2 Aislamiento del sistema y suministro del oxígeno

El análisis de un fenómeno a través de un modelo es importante porque ayuda a comprender el funcionamiento de los sistemas y permite dar sugerencias para mejorar los procesos de producción. Aun cuando estos puedan contener muchos componentes y mostrar numerosas interacciones como puede ocurrir cuando se trata de conjuntos bastante complejos y de gran tamaño [20].

El modelo expuesto por López y Dimick, señala a las levaduras y a las bacterias ácido lácticas como las primeras participantes en este proceso [11, 12, 14]. Respecto a las primeras, algunos autores mencionan, que durante las primeras 48 h de una fermentación, las levaduras presentes en mayor número son *Pichia manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora opuntiae* [14, 21, 22]. Todas estas especies, pueden producir etanol por medio del metabolismo de azúcares bajo un entorno anaeróbico [23, 24, 25].

Los principales constituyentes de la pulpa se fermentan principalmente en etanol y ácido láctico. Como consecuencia, el microambiente del sustrato de fermentación cambia, lo que permite la actividad de las bacterias aeróbicas obligadas del ácido acético que pueden crecer a través de la oxidación del etanol producido por las levaduras en ácido acético [16]. Por ello, conviene promover la fermentación alcohólica; reacción que es exotérmica [16, 24], ya que, a medida que aumenta la temperatura, las levaduras alcanzarán su máxima capacidad de actividad. La acción de estos microbios disminuye al superar un valor de umbral de temperatura (45 – 50 °C), junto con el pH del entorno

(4,0 - 5,5), el cual resulta tras la producción de etanol y por el metabolismo de las bacterias ácido lácticas, así como por los niveles de oxígeno por debajo de los mínimos exigidos para la vida aeróbica [12, 16, 24].

En este sentido, se debe proporcionar las mejores condiciones para que la producción de etanol sea máxima, el sistema debe intercambiar calor lo menos posible con el entorno y no proveer oxígeno de modo artificial (mediante remociones de los granos) durante las primeras 48 h. Batista afirma que la fermentación anaeróbica tiene una duración de 48 h [14], Hamdouche y col. indican que, en Costa de Marfil, la primera remoción de los granos, ocurre tras finalizar este tiempo [22], lo cual es confirmado por otros autores como Guehi y col.; Tomlins y col., quienes efectuaron fermentaciones de semillas de cacao en Costa de Marfil y Ghana, respectivamente [26, 27].

Es importante señalar que, en África Occidental, en general, prevalece la explotación de la variedad de cacao forastero [28], en consecuencia, la primera remoción a las 48 h debe ocurrir en miembros de esta variedad.

En el caso de las especies de la variedad trinitario, Álvarez y col. determinaron que al limitar a dos el número de remociones, una a las 48 h y otra segunda a las 96 h (como ocurre, tradicionalmente en Costa de Marfil [22]), se obtienen granos con pH intermedios (5,20 - 5,49) según el rango fijado por Jinap y Dimick [8], sin que esto repercuta en el índice de fermentación. Por lo que, para esta variedad es recomendable hacer la primera remoción a 48 h, pues el pH encontrado no fue alto. Además, un nivel alto de pH en los cotiledones es un indicativo de una sobre fermentación de la masa [29].

Ciencia en Revolución, Vol. 8, N° 23, (enero-abril, 2022)

3.3 Dimensiones, materiales y geometría del contenedor

Las dimensiones, el tipo de material y la geometría del contenedor a utilizar, así como la masa de semillas a fermentar, son factores críticos del proceso. El propósito es disminuir la pérdida de calor de la masa de granos en fermentación.

Relativo a la geometría, algunos autores determinaron que un contenedor de forma cuadrada, en comparación a uno rectangular, permite alcanzar una temperatura más alta de la masa en fermentación [30, 31]. De hecho, estos trabajos, junto con el de Nogales y col. [32], señalan que un índice de fermentación mayor puede obtenerse con cajas de forma cuadrada, ya que, se alcanzan mayores temperaturas en la masa de granos fermentante al usar dicho cajón.

En relación con las dimensiones, lo tradicional es el uso de cajas de 100 cm^3 [11]; pero, Hernández y col. determinaron que los mejores resultados fueron obtenidos en la caja de 75 cm^3, con una masa de 300 kg de semilla, en comparación al de 100 cm^3, el cual alojó un peso de 1000 kg de semilla [33]. De los trabajos evaluados, este es el único que comparó el desempeño de cajas cuadradas en distintas dimensiones, lo cual, posiblemente, abre oportunidad para una mayor indagación al respecto.

Acerca del material del contenedor, diversos autores mencionan que el más usual o tradicional para este procedimiento son las cajas de madera [11, 13, 29]. López y Dimick indican que cualquier tipo de madera

resistente resulta útil [11], Álvarez y col., por ejemplo, nombran a la madera derivada del árbol apamate, *Tabebuia rosea* (Bertol) DC (Bignoniaceae) [29]. Aunque, los contenedores de plástico también han sido evaluados, Álvarez y col. observaron que no existe diferencia significativa en cuanto al índice de fermentación cuando se utiliza en cajas de madera o de plástico [29], pero Guehi y col. señalan que el uso de cajas de plástico arroja un índice de fermentación menor cuando es comparado con los obtenidos con cajas equivalentes de madera [26]. En consecuencia, se debe evaluar el material del contenedor para futuros estudios.

3.4 Tiempo de aguante

El tiempo que hay entre la cosecha y el desgrane de las mazorcas se define como tiempo de aguante [30]. El tiempo de fermentación de las variedades criollo y forastero varía de tres a cuatro días y de seis a siete días, respectivamente. Mientras, Graziani y col. mencionan que, en Cuyagua, estado Aragua (Venezuela), es costumbre un tiempo de aguante de cinco días por parte de los productores [31].

Por otro lado, Torres y col.; Portillo y col. evaluaron la fermentación al usar dos niveles de tiempo de aguante, es decir, cero y cinco días, hallando que un tiempo de aguante de cinco días produce temperaturas más altas en la masa de granos de cacao en fermentación, en comparación a los ensayos asociados a mazorcas que fueron desgranadas el mismo día (cero días) de la cosecha [9, 30].

Ciencia en Revolución, Vol. 8, N° 23, (enero-abril, 2022)

Un tiempo de aguante mayor a cero, acelera el aumento de la temperatura superior a los 45 °C durante las primeras 20 h [27, 30], lo cual, promueve una mayor actividad enzimática por parte de los microorganismos de interés y resulta de utilidad para reducir la proporción de granos germinados, factor considerado por la norma COVENIN 50:2018 [1], ya que, a mayor velocidad con la cual ocurra el incremento de la temperatura, más rápido se alcanzará la muerte de los embriones [9, 11]. Además, mejora el índice de fermentación, puesto que, al alcanzar temperaturas mayores se favorece el proceso de fermentación y por ende el número de almendras pardas [9, 30].

Además, se observó que a medida que se incrementa el tiempo entre la cosecha y el desgrane aumenta la posibilidad de una sobre fermentación, por lo cual es conveniente reducir el tiempo de fermentación cuando la proporción de mazorcas desgranadas tardíamente sea alta. De ahí que, definir un valor óptimo del tiempo de aguante es un terreno que brinda oportunidades para nuevos proyectos de investigación; pues, a pesar de sus ventajas potenciales, Torres y col. advierten que un tiempo de aguante indebido puede conducir a una fracción mayor de granos negros [9], es decir, sobre-fermentados [1, 9].

Un incremento exagerado y rápido de la temperatura, podría pensarse que conduciría a la muerte también rápida de las levaduras responsables de producir el etanol; sin embargo, algunas de estas levaduras pueden ser termoestables [12, 25]. La tolerancia de una levadura a la temperatura está sujeta a su carga genética [16], en consecuencia, podría utilizarse inóculos artificiales para mejorar los resultados asociados a estos microorganismos si se sospecha que altas

temperaturas inhiben la actividad de las levaduras nativas durante las primeras 48 h fermentación [34, 35].

El retardo del desgrane también influyó sobre las características químicas, obteniéndose un contenido más alto de taninos y acidez total en el cotiledón, así como pH bajos (5,46 - 5,49) [9, 31]. La elevación de la acidez en el cotiledón ha sido atribuida a la absorción de los ácidos producidos por la degradación microbiana de la pulpa, los cuales son difundidos hacia el cotiledón, provocando reacciones de hidrólisis y oxidación de pigmentos [29].

Merece especial mención que los resultados de Graziani y col.; Torres y col. sugieren que la acidez final de los cotiledones guarda una relación positiva con la temperatura del sistema [9, 31]. Hamdouche y col. señalaron que un tiempo de aguante mayor a cero se observan más bandas de ADN de comunidades de bacterias y levaduras. Lo que probablemente significa que la abundancia de especies microbianas aumenta con el tiempo de almacenamiento, ya que, estas comunidades podrían estar presentes en la superficie de las vainas y desarrollarse durante ese tiempo [22].

En resumen, estas evidencias apoyan al modelo de fermentación expuesto y respaldan que debe haber un tiempo de aguante mayor a cero, pues resulta favorecedor para la fermentación y por ende una mejor calidad en el sabor del grano.

Ciencia en Revolución, Vol. 8, N° 23, (enero-abril, 2022)

3.5 Acidez final de los cotiledones

Por último, el modelo estudiado sugiere que toda buena fermentación debe conducir a la producción de ácido acético, pero una acidez elevada en el grano fermentado es perjudicial para la calidad [9, 12]. Por ello, los autores recomiendan que, para un grano fermentado y seco, el pH ideal debe estar alrededor de 5,30, ya que, si los granos de cacao tienen un pH alto (5,5 - 5,8) después de la fermentación, se consideran que no presentan un nivel de fermentación adecuado, con un índice de fermentación bajo [8, 17].

Cuando finaliza la fermentación e inicia la labor del secado de los granos, un nuevo contexto bioquímico inicia; a medida que ocurre la deshidratación de la testa, el agua del interior del grano, por efecto osmótico, responde deslizándose hacia la cascarilla, arrastrando trazas de ácidos orgánicos junto a ella; estos, al ubicarse en la testa y al quedar expuestos al efecto de los vientos y de los rayos solares, volatilizan, reduciendo la acidez del grano [11, 32].

Un exceso de ácido acético en los granos no es deseable, pero también, según el modelo expuesto de fermentación, un aumento de la actividad de las bacterias ácido acéticas es favorable. En consecuencia, para contrarrestar el posible excedente de ácido acético en los granos, hay que regular el procedimiento de secado con el propósito de desprender del grano la mayor fracción posible de este ácido. Jinap y col. determinaron que las muestras de granos de cacao secados al sol y por soplado de aire no tuvieron diferencias significativas con respecto a la acidez, ácidos grasos volátiles, apariencia física y calidad del sabor.

Por lo tanto, el secado por soplado de aire debe practicarse cuando el secado al sol no es posible [8].

4. Conclusiones

La evidencia descrita en el modelo confirma que los eventos que yacen detrás de la fermentación de semillas de cacao reconoce a las levaduras, así como a las bacterias ácido lácticas y acéticas, como protagonistas principales de este proceso; además, sugiere que toda fermentación bien orientada conduce a una producción de ácido acético. Durante las primeras 48 h, las levaduras, en un entorno deficiente de oxígeno, y temperaturas alrededor de los 45 °C, producirán etanol, el cual es sustrato para la formación de ácido acético por parte de las bacterias ácido acéticas; por lo tanto, conviene estimular la producción de etanol para que la formación de ácido acético sea alta. Para que las levaduras puedan alcanzar máximos de actividad, es necesario que exista el menor intercambio de calor entre los granos fermentantes con el entorno, lo cual puede ser alcanzado haciendo la primera remoción de los granos a las 48 h, y por medio del empleo de contenedores de forma cuadrada. Adicionalmente, un tiempo de aguante superior a cero días ha demostrado ser una táctica apropiada para elevar tanto los máximos de temperatura como la rapidez de ascenso de este último factor durante las primeras 48 h.

5. Referencias

[1] INSAI. Granos de cacao. Norma COVENIN 50:2018 1ra Revisión, Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI), Ministerio del Poder Popular para la Agricultura Productiva y Tierras (MPPAPT), Ministerio del Poder Popular para la Alimentación (MINPPAL), Comisión Nacional de Normas Industriales (COVENIN), Fondo de Desarrollo para la Normalización, Calidad, Calidad y Metrología (FODENORCA) 2018.

[2] N. Dostert, J. Roque, A. Cano, M. La Torre, y M. Weigend. Hoja botánica: cacao. *Theobroma cacao* L. Giacomotti Comunicación Gráficas S.A.C., Lima, Perú, 2012.

[3] Organización Internacional del Cacao (ICCO). Cocoa Market Review. 2020. https://www.icco.org/statistics/.

[4] A. Hoare, R. King y S. Airey. Cocoa trade, climate change and deforestation. Resource Trade Earth. 2017. https://resourcetrade.earth/publications/cocoa-trade-climate-change-and-deforestation.

[5] Decreto N. 8157. Declaración de cacao de producción nacional como bien de primera necesidad. Gaceta Oficial de Venezuela N 39.665. Caracas, Venezuela, 2011.

[6] Decreto N. 7471. Creación de la Corporación Socialista del Cacao Venezolano s.a. Gaceta Oficial de Venezuela N 39.441. Caracas, Venezuela, 2010.

[7] M. Arvelo, D. González, S. Maroto, T. Delgado, y P. Montoya. Manual del cultivo de cacao Buenas prácticas para América Latina. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica, 2017.

[8] S. Jinap, J. Thien, and T. Yap. Effect of Drying on Acidity and Volatile Fatty Acids Content of Cocoa Beans. Journal of the Science of Food and Agriculture, 65(1), 67-75, 1994. DOI: https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650111

[9] O. Torres, L. Graziani, L. Ortiz, y A. Trujillo. Efecto del tiempo transcurrido entre la cosecha y el desgrane de la mazorca del cacao tipo forastero de Cuyagua sobre características del grano en fermentación. Agronomía Tropical, 54(4), 481-490, 2004.

[10] J. Voigt and R. Lieberei. Biochemistry of Cocoa Fermentation. In Cocoa and Coffee Fermentation, chapter 5. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014.

[11] A. López and P. Dimick. Cacao Fermentation. In Biotechnology: Enzimes, Biomass, Food and Feed, volumen 9, capítulo 14. Wiley - VCH, 1995.

[12] G. Ozturk and G. Young. Food Evolution: The Impact of Society and Science on The Fermentation of Cocoa Beans. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(3), 431-455, 2017. DOI: https://doi.org/10.1111/1541 4337.12264

[13] W. Teneda. Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.), variedad nacional y variedad CCN51. Universidad Internacional de Andalucía, España, 2016.

[14] L. Batista. Guía técnica, el cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc., República Dominicana, 2009.

[15] Z. Papalexandratou, G. Vrancken, K. De Bruyne, P. Vandamme, and L. De Vuyst. Spontaneous Organic Cocoa Bean Box Fermentations in Brazil are Characterized by Restricted Species Diversity of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria. Food Microbiology, 28(7), 1326–1338, 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003

[16] H. Schlegel y C. Zaborosch. Microbiología general. Ediciones Omega, Barcelona, España, 9a edición, 1997.

[17] J. Rodríguez, H. Escalona, I. Orozco, E. Lugo, and M. Jaramillo. Dynamics of Volatile and Non-volatile Compounds in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) During Fermentation and Drying Processes Using Principal Components Analysis. Food Research International, 44(1), 255–258, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028

[18] V. Barišić, M. Kopjar, A. Jozinović, I. Flanjak, D. Ačkar, B. Miličević, D. Šubarić, S. Jokić, and J. Babić. Review, The Chemistry Behind Chocolate Production. Molecules, 24(17), 3163, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules24173163

[19] L. Ortiz, H. Maldonado, P. Parra, y L. Graziani. Caracterización electroforética de las globulinas del grano fermentado de tres tipos de cacao. Interciencia, 31(6), 441–445, 2006.

[20] J. Wadsworth. Análisis de sistemas de producción animal, Tomo 2: Las Herramientas Básicas (Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 140/2). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 1997.

[21] Y. Fernández, T. Balzarini, P. Clapé, P. Evrard, L. De Vuyst, and H. Daniel. The Environmental and Intrinsic Yeast Diversity of Cuban Cocoa Bean Heap Fermentations. International Journal of Food Microbiology, 233, 34-43, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.012

[22] Y. Hamdouche, J. Meile, M. Lebrum, T. Guehi, R. Boulanger, C. Teyssier, and D. Montet. Impact of Turning, Pod Storage and Fermentation Time on Microbial Ecology and Volatile Composition of Cocoa Beans. Food Research International, 119, 477–491, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.001

[23] O. Mezenova, S. Keshtkar, K. Kulaev, S. Danshina, and E. Romiani. The Study of Ethanol Production by New Strain of Yeasts *Hanseniaspora opuntiae* mk460485, Investigation of its Ethanol Production in Presence of Different Carbon and Nitrogen Sources, and Optimal Condition. Journal of Critical Reviews, 7(4), 498–506, 2020. DOI: https://doi.org/10.31838/jcr.07.04.94

[24] G. Walker and G. Stewart. Review, *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. Beverages, 2(30), 1-12, 2016. DOI: https://doi.org/10.3390/beverages2040030

[25] N. Chamnipa, S. Thanonkeo, P. Klanrit, y P. Thanonkeo. The Potential of the Newly Isolated Thermotolerant Yeast Pichia kudriavzevii rz8-1 for High-Temperature Ethanol Production. Brazilian Journal of Microbiology, 49(2), 378-391, 2018.

[26] T. Guehi, A. Dadie, K. Koffi, S. Dabonne, L. Ban, K. Kedjebo, y G. Nemlin. Performance of Different Fermentation Methods and the Effect of their Duration on the Quality of Raw Cocoa Beans. International Journal of Food and Technology, 45(12), 2508–2514, 2010. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/j.1365 2621.2010.02424.x

[27] K. Tomlins, D. Baker, P. Daplyn, and D. Adomako. Effect of Fermentation and Drying Practices on the Chemical and Physical Profiles of Ghana Cocoa. Food Chemistry, 46(3), 257-263, 1993. DOI: https://doi.org/10.1016/0308 8146(93)90116-W

[28] M. Quintero y K. Díaz. El mercado mundial de cacao. Agroalimentaria, 18, 47-59, 2004.

[29] C. Álvarez, L. Tovar, H. García, F. Morillo, P. Sánchez, C. Girón y A. de Farías. Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) usando dos tipos de fermentadores. Científica UDO Agrícola, 10(1), 76-87. 2010.

[30] E. Portillo, L. Graziani, y E. Betancourt. Efecto de los tratamientos post-cosecha sobre la temperatura y el índice de fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo. Revista de la Facultad de Agronomía, 22(4), 217– 223, 2005.

[31] L. Graziani, L. Ortiz, y N. Álvarez. Fermentación del cacao en dos diseños de cajas de madera. Agronomía Tropical, 53(2), 175-188, 2003.

[32] J. Nogales, L. Graziani, y L. Ortiz. Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. Agronomía Tropical, 56(1), 5-20, 2006.

[33] C. Hernández, P. López, M. Ramírez, D. Ramírez, and J. Caballero. Evaluation of Different Fermentation Processes for Use by Small Cocoa Growers in Mexico. Food Science & Nutrition, 4(5), 690-695, 2015. DOI: https://doi.org/10.1002%2Ffsn3.333

[34] N. Nara, C. Lacerda, D. Ribeiro, A. Marques and R. Freitas. The Impact of Yeast Starter Cultures on the Microbial Communities and Volatile Compounds in Cocoa Fermentation and the Resulting Sensory Attributes of Chocolate. Journal of Food Science and Technology, 32(2), 1101-1110, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007%2Fs13197-015-2132-5

[35] R. Freitas. Cocoa Fermentation Conducted with a Defined Microbial Cocktail Inoculum. Applied and Environmental Microbiology, 64(4), 1477-1483, 1998.