

DINÁMICA DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL CACAO NATIVO FINO DE AROMA Y EL CLON COMERCIAL CCN-51 DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA

CRUZ-ROJAS, L.L.¹; GUIOP-HUAMAN, H.²; OLIVA-CRUZ, S.M.¹; CAETANO, A.C.^{1,2}

¹Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas, Perú; ²Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas, Perú.

RESUMEN

El cacao es altamente comercializado y consumido en todo el mundo por ser la materia prima esencial del chocolate. En el presente trabajo se analizó la dinámica de los compuestos orgánicos volátiles (COV) del cacao nativo fino de aroma (CFA) y del clon comercial CCN-51 durante el proceso de fermentación espontánea que duró 156 horas. Los COV fueron analizados utilizando las técnicas de microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada al espectrofotómetro de masas (GC-MS). Se identificó y semicuantificó 42 compuestos volátiles entre ambas variedades al finalizar la fermentación.

Palabras claves: COV, SPME; GC-MS.

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao*) es un producto de alto interés agronómico, económico y comercial en el Perú y en el mundo. Desde el año 1961 hasta el 2016 se ha comercializado un promedio de 3,17 millones de toneladas anuales en todo el mundo y desde el año 2000 la exportación de cacao se está incrementando en el mercado internacional (Durango et al., 2019). En el año 2019 la producción de cacao fue de 5,51 millones de toneladas entre los 20 países de mayor producción de cacao, y el Perú quedó en el octavo puesto con una producción de 135 928 toneladas (FAO, 2019), resaltando en el mercado internacional el cacao fino de aroma por sus agradables características sensoriales.

Actualmente, los distintos tipos de cacao son estudiados desde su composición genética, fisicoquímica, origen geográfico (Acierno et al., 2016), perfil de compuestos volátiles (Hamdouche et al., 2019; Moreira et al., 2018; Qin et al., 2017) antes y después de la fermentación (Hamdouche et al., 2019; Rodriguez-Campos et al., 2011, 2012), secado (Rodriguez et al. 2011, 2012) tostado (Torres et al., 2021) y hasta el procesamiento e inclusión de ingredientes adicionales en la formulación del chocolate, y todo lo anteriormente mencionado influyen en el producto final. Además, estos aspectos pueden ser investigados y hacer correlaciones, por ejemplo, a través del perfil de compuestos volátiles de chocolates oscuros es posible determinar el origen botánico y geográfico del cacao, incluso después de las diferentes etapas de procesamiento y de los ingredientes adicionados (Acierno et al., 2016), asimismo estar relacionado a la calidad del producto final.

En el año 2020 se identificaron 146 ecotipos de cacao nativo fino de aroma en 3 departamentos del norte del Perú: Amazonas, Cajamarca y San Martín, tomándose la mayor cantidad de muestras en el departamento de Amazonas (Oliva & Maicelo, 2020), de los cuales, aún falta su caracterización. Debido a ello, se ha comenzado una serie de proyectos de investigación del cacao nativo fino de aroma, como el proyecto titulado “Análisis metagenómico y técnicas cromatográficas para la obtención de un cultivo iniciador que mejore la calidad del chocolate a partir del cacao nativo fino de aroma en la zona Nor Oriental del Perú”, y de este, deriva el presente estudio, al cual le corresponde evaluar los compuestos volátiles, teniendo como objetivo principal determinar la dinámica de los compuestos volátiles del cacao fino de aroma y del clon comercial de cacao CCN-51 durante el proceso de fermentación espontánea, estudiando las diferencias entre ambos perfiles como una forma de identificación de los compuestos que indiquen mejores características en el producto final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo 600 kg de cada variedad (provinieron de la provincia de Utcubamba, departamento de Amazonas) y se los transportó a la cooperativa Central de Productores Agropecuarios de Amazonas (CEPROA-A), ubicada en la provincia de Bagua Grande, capital de Utcubamba, en dónde se realizó la fermentación durante 156 h.

1. Muestreo

El muestreo se realizó cada 12 h, desde las 0 h hasta las 156 h de fermentación de ambas variedades. Fueron tomados 200 g de cada variedad y los cajones de fermentación fueron tapados con telas de yute. Las muestras fueron tomadas de una profundidad de 25 cm aproximadamente de la masa de fermentación y almacenadas en bolsas de plástico estériles etiquetadas. En seguida, las muestras fueron colocadas en un tanque de nitrógeno líquido para su conservación durante la colecta y traslado y en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UNTRM fueron conservadas a -20 °C.

Durante el proceso de fermentación ocurren cambios físicos y químicos, como la variación del pH y el incremento de la temperatura, cuyos datos fueron registrados en el momento de cada muestreo.

- a) Para la medición de pH de la pulpa, 20 g de granos de cacao con cáscara fueron mezclados con 20 g de agua destilada en bolsas de plástico y masajeados durante 30 s antes de medir el pH (Crafack et al., 2013) con un pHmetro portátil (Hanna, HI98100 Checker® Plus, Rumania). Para determinar el pH del cotiledón, fueron tomados 15 g de granos descascarillados y triturados con 135 g de agua destilada y masajeados por 30 s antes de medir el pH (Crafack et al., 2013; Guehi et al., 2010).
- b) La temperatura de la masa de fermentación de cada variedad fue medida en cada muestreo con un termómetro de mercurio. Se dejó al termómetro reposar dentro de la masa por 5 minutos y se realizó la lectura rápidamente.

2. Extracción de los compuestos volátiles por SPME y GC-MS.

Los compuestos volátiles de los granos de cacao fueron extraídos utilizando la técnica de la microextracción en fase sólida (SPME) y analizados por cromatografía de gases acoplada al detector de masas (GC-MS) como descrito por Moreira et al. (2018) con algunas modificaciones. Los granos de cacao, de cada muestra, fueron parcialmente chancados en un mortero de porcelana utilizando nitrógeno líquido, luego fueron completamente triturados en un molinillo automático, posteriormente fueron tamizados (tamiz de 850 μm). Se depositó 4 g de la muestra molida en un vial de 20 mL y se adicionó 5 μL de 4-metilpiridina (aproximadamente 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de 4-picolina diluida en metanol) (Rottiers et al., 2019), como estándar interno, en seguida, el vial fue cerrado herméticamente. Con el fin de extraer los compuestos volátiles de la muestra, se utilizó la fibra de SPME recubierta con una película de Divinilbenceno / Carboxeno / Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). El tiempo de equilibrio de la muestra fue de 15 min a 60 $^{\circ}\text{C}$, luego la fibra fue expuesta al espacio de cabeza (headspace) del vial por 30 minutos a la misma temperatura (Rodríguez-Campos et al., 2011, 2012).

Los compuestos fueron analizados en un cromatógrafo de gases Agilent 7890B equipado con detector de masas MSD 5977B y columna capilar DB – 5MS UI (60 m x 0,25 mm x 1.0 μm). La temperatura del horno fue programada a 50 $^{\circ}\text{C}/5$ min, con un gradiente de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 250 $^{\circ}\text{C}$. El tiempo de corrida fue de 55 min. El gas de arrastre que se utilizó fue helio, con un flujo de 1.1 mL/min. El inyector (operado en modo splitless) y el detector fueron mantenidos a 250 $^{\circ}\text{C}$. El tiempo de desorción de la fibra SPME fue de 5 min. De esta manera, cada muestra fue analizada 3 veces.

Se identificaron los compuestos volátiles mediante la comparación de los espectros de masa de los compuestos de la muestra y la base de datos de la biblioteca NIST 2017 (National Institute of Standards and Technology). La identidad de los compuestos fue confirmada por la inyección de la serie de estándares de n-alcános y la comparación de sus índices de retención.

3. Semicuantificación de los compuestos volátiles identificados

La semicuantificación de la concentración de los compuestos volátiles identificados fueron expresadas como microgramos de 4-metilpiridina (estándar interno) equivalentes por gramo de muestra y calculada como área del ion de interés dividido por el factor de respuesta del estándar interno.

4. Análisis de datos

En el análisis estadístico se utilizó una prueba paramétrica con el análisis de varianza (ANOVA). Antes se verificó el cumplimiento de las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas de los residuos para cada una de las variables. Todos los ensayos fueron analizados con el paquete estadístico del software R (R Development Core Team, 2021).

Para los compuestos volátiles fue realizado un análisis exploratorio descriptivo según las dos variedades de cacao estudiados.

RESULTADOS

1. Cambios físicos y químicos durante la fermentación

Hora de fermentación	CFA			CCN-51		
	Temperatura (°C)	pH pulpa	pH cotiledón	Temperatura (°C)	pH pulpa	pH cotiledón
0	29	3.86(0.10)	6.27(0.01)	28	3.43(0.00)	6.59(0.00)
12	32	3.76(0.01)	6.10(0.08)	28	3.63(0.06)	6.31(0.02)
24	35	3.85(0.05)	5.71(0.11)	29	3.73(0.26)	6.16(0.15)
36	34	4.07(0.00)	5.96(0.07)	33	4.13(0.23)	6.14(0.01)
48	40	4.25(0.08)	6.05(0.13)	35	4.13(0.06)	6.02(0.11)
60	41	4.08(0.11)	5.43(0.19)	38	4.05(0.04)	5.73(0.01)
72	44	4.00(0.05)	5.30(0.13)	39	4.22(0.02)	5.71(0.01)
84	53	4.11(0.07)	4.56(0.04)	45	4.17(0.12)	5.01(0.05)
96	50	4.30(0.01)	4.55(0.15)	44	4.08(0.04)	4.63(0.05)
108	51	4.16(0.02)	4.52(0.02)	45	4.32(0.01)	4.63(0.13)
120	53	4.23(0.07)	4.38(0.01)	47	4.16(0.01)	4.52(0.04)
132	53	4.13(0.10)	4.32(0.07)	48	4.16(0.04)	4.32(0.01)
144	50	4.23(0.08)	4.30(0.06)	48	4.17(0.01)	4.30(0.01)
156	52	4.22(0.01)	4.29(0.08)	50	4.28(0.04)	4.33(0.02)

Tabla 1. Temperatura, pH de la pulpa y pH del cotiledón de la masa de fermentación de los granos de cacao fino de aroma (CFA) y del CCN-51 durante las 156 h de fermentación. Los valores de pH son los promedios de 2 mediciones y la desviación estándar está entre paréntesis.

Se observa una diferencia de temperatura entre las variedades, la temperatura del cacao fino de aroma es mayor que la del clon comercial CCN-51 (Figura 1), sin embargo, al realizar una boxplot y análisis de varianza, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas.

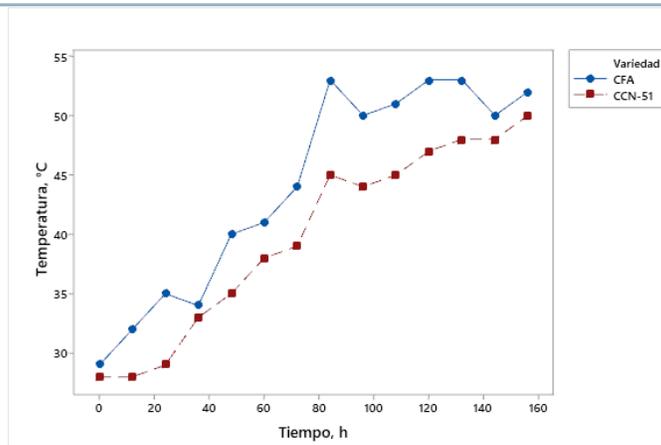


Figura 1. Perfil de temperatura de fermentación de ambas variedades: CFA y CCN-51.

El pH de la pulpa del cacao fino de aroma se mantuvo entre 3.86 y 4.22 (Tabla 1) y el pH de la pulpa del cacao CCN-51 se mantuvo entre 3.43 y 4.28 (Tabla 1). Al realizar un análisis de varianza del pH de la pulpa entre ambas variedades, el valor p fue igual a 0.612 ($p > 0.05$), lo cual indica que no existe diferencias significativas entre la variabilidad de pH entre las variedades. El pH del cotiledón de ambas variedades fue descendiendo con respecto a las horas de fermentación. La variación del pH de la variedad de cacao fino de aroma fue desde 6.27 hasta 4.29 (Tabla 1) y de la variedad CCN-51, desde 6.59 hasta 4.33 (Tabla 1). Al realizar el análisis de varianza, tampoco se encontró diferencias significativas entre ambas variedades.

2. Identificación de compuestos orgánicos volátiles

Tabla 2. Clasificación, descripción de la calidad de olor y concentración relativa de los 42 COV después de las 156 h de fermentación de los granos de CFA y del clon comercial CCN-51. El recuadro sombreado de verde indica el estándar interno.

Clasificación	Nombre de COV	Calidad de olor	Concentración relativa ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
			CCN-51	CFA
Aldehídos y cetonas	Benzaldehído	Dulce, amargo, almendrado, cereza	0.229	0.336
	Bencenoacetaldehído	Miel, floral	2.403	4.275
	2-Butanona	Afrutado	0.298	
	2-Heptanona	Afrutado, coco, queso, floral	0.292	0.593

Clasificación	Nombre de COV	Calidad de olor	Concentración relativa (µg/µl)	
	2-Nonanona	Afrutado, fresco, dulce	0.132	0.301
	Acetofenona	Mosto, floral, almendra, dulce	0.178	0.256
	Butirolactona			0.016
Alcoholes	(S)-(+)-1,2-Propanodiol			0.011
	2-Heptanol	Dulce, cítrico	0.552	1.053
	2-Nanolol	Cítrico, afrutado, limón, yerba	0.058	0.137
	Alcohol feniletílico	Miel, especia, rosa, lila, floral, caramelo	4.122	4.906
Ésteres y ácidos	1,1-Etanodiol, diacetato		0.077	0.056
	1,2-Etanodiol, monobenzoato		0.028	
	1-Butanol, 3-metil-, acetato	Manzana, plátano, pegamento, pera	1.974	1.281
	2-Butanol, 3-metil-, acetato		0.022	
	2-Heptanol, acetato		0.064	0.181
	Formato de metilo			13.305
	Ácido acético, éster 2-feniletílico	Miel, floral	1.088	1.115
	Ácido bencenoacético, éster etílico	Afrutado, dulce	0.254	0.229
	Ácido benzoico, éster 2-metilbutílico			0.020
	Ácido benzoico, éster etílico	Afrutado, floral, indeseable	0.056	0.063
	Ácido butanodioico, éster dietílico		0.031	0.034
	Ácido decanoico, éster etílico	Afrutado, indeseable	0.063	0.046
	Ácido hexanoico, éster etílico	Afrutado	0.103	0.065
	Ácido octanoico, éster etílico	Afrutado, floral	0.406	0.216
	Acetato de 3-oxobutan-2-Yl		0.065	0.064
Ácido bencenoacético		0.020	0.023	
Éteres	Dimetil éter		11.018	8.107
	Metil nonil éter		0.053	
Piridinas	4-metilpiridina		0.500	0.500
Terpenos y terpenoides	Beta.-Mirceno	Picante, balsamo	0.109	
	Beta.-Ocimeno			0.152

Clasificación	Nombre de COV	Calidad de olor	Concentración relativa (µg/µl)	
	Beta.-Pino			0.445
	Óxido de linalol	Nuez		0.063
Hidrocarburos	Estireno	Dulce, balsamo	0.275	0.190
	1,3,6-Octatrieno, 3,7-dimetil-, (Z)-			0.186
	1-Butino, 3-metil-		0.051	
	3-Careno		0.067	0.362
	2-Norpineno, 3,6,6-trimetil		0.085	
	Glicerina		0.031	0.016
	Trans-.beta.-ocimeno			0.455
	Propano, 1,3-dimetoxi-		0.410	
	Ácido nitroso, éster etílico	Dulce, afrutado		48.388

DISCUSIÓN

Las variaciones del incremento de las temperaturas con respecto al tiempo de ambas variedades no fueron estadísticamente significativas, sin embargo, la temperatura de la masa de fermentación del CFA siempre fue mayor que la del cacao CCN-51, esto se debe a componentes intrínsecos de las variedades, es decir, a de su genética (Torres et al., 2021), porque la pulpa del cacao fino de aroma posee características fisicoquímicas que favorece al mayor desarrollo de microorganismos involucrados en la fermentación en comparación con la variedad CCN-51, ya que la actividad microbiana es la responsable del incremento de la temperatura durante el proceso de fermentación. En la gráfica de temperaturas (Figura 1) se aprecia que la temperatura de fermentación va aumentando a lo largo del tiempo en ambas variedades: CFA y del CCN-51, la temperatura inicial estuvo entre 28 °C y 28.5 °C, mientras que las temperaturas finales fueron 50 °C y 52 °C, respectivamente. Lo que causa un aumento gradual de la temperatura es el metabolismo de los microorganismos, ya que, al consumir los azúcares de la pulpa, generan calor a través del proceso exotérmico de la fermentación y producen altas cantidades de etanol, ácido láctico y ácido acético (Ardhana & Fleet, 2003). El incremento del pH de la pulpa ocurrió porque la pulpa mucilaginosa, al momento de la cosecha, contiene ácido cítrico y es la causa de un pH bajo al comienzo de la fermentación. En las horas iniciales los microorganismos van metabolizando el ácido cítrico, la glucosa, fructosa y sales inorgánicas, produciendo grandes cantidades de etanol y posteriormente, éste disminuye y aumenta el ácido acético por metabolización oxidativa del etanol y para la etapa final de la fermentación el pH termina siendo mayor a la inicial (Ardhana & Fleet, 2003). La disminución del pH del cotiledón se debe al ácido láctico y ácido acético producido por la actividad de bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas. Dichas bacterias, al consumir los azúcares de la pulpa

del cacao, producen ácidos que, eventualmente, al transcurrir las horas de fermentación, ingresan al cotiledón y disminuyen el pH y, por ende, ocurre la muerte del cotiledón (De Brito et al., 2001; Schwan & Wheals, 2004). El proceso de acidificación es importante para comenzar una cadena de reacciones bioquímicas para la formación de sabores y aromas que caracterizan a los chocolates.

Los COV identificados desde la 0 h hasta las 156 h de fermentación fueron variando en concentración y presencia. Por ejemplo, la concentración de 2-heptanol en CCN-51 fue disminuyendo de inicio a fin, mientras que en el CFA aumentó la concentración a la mitad de la fermentación espontánea, siendo que este compuesto aporta con el aroma de frutas en el cacao (Tuentner et al., 2020; Rottiers et al., 2019). Otro compuesto, es el bencenoacetaldehído, el cual estuvo presente durante todo el proceso de fermentación, alcanzando su concentración relativa máxima a las 60 h en CFA y a las 72 h en CCN-51, sin embargo, la diferencia radica en que la concentración siempre fue mayor en el CFA. Afoakwa et al. (2009) encontraron que el bencenoacetaldehído (fenilacetaldehído) contribuye con notas acarameladas, dulces y de miel en el chocolate oscuro. Casi lo mismo ocurre con el compuesto alcohol fenilético, éste va aumentando de concentración a lo largo de la fermentación en ambas variedades, pero siempre hay mayor concentración en el CFA. Por otro lado, COV como el (S)-(+)-1,2-Propanediol; Beta-Ocimeno; 1,3,6-Octatrieno, 3,7-Dimetil, solo están presentes en CFA y otros COV como 1-hexanol; 3,6-heptanodiona, solo en CCN-51. Otros compuestos varían de manera similar entre ambas variedades, como el 3,6-heptanodiona. Al finalizar la fermentación espontánea del cacao nativo fino de aroma se identificó mayor concentración de 2-heptanol, bencenoacetaldehído, 2-nonanol, 2-nonanona, 1-butanol, 3-metil-acetato, alcohol fenilético, con respecto a la variedad CCN-51, los cuales indican mejor calidad de olor y sabor (Ducki et al., 2008), como algunos COV más (Tabla 2) que son precursores de sabores y aromas deseables que se irán formando en etapas posteriores a la fermentación.

CONCLUSIONES

1. No se encontraron diferencias significativas en las variaciones de temperatura, pH de la pulpa y pH del cotiledón entre las variedades CFA y CCN-51 durante el proceso de fermentación.
2. Se identificaron y semicuantificaron COV que dan una mejor calidad sensorial en el cacao nativo fino de aroma.

REFERENCIAS

ACIERNO, V., YENER, S., ALEWIJN, M., BIASIOLI, F., & VAN RUTH, S.. Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. **Food Research International**, 84, 86–95, 2016.

AFOAKWA, E. O., PATERSON, A., FOWLER, M., & RYAN, A. (2009). Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. **Food Chemistry**, 113(1), 208–215, 2009.

ARDHANA, M. M., & FLEET, G. H.. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. **International Journal of Food Microbiology**, 86(1–2), 87–99, 2003.

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.. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 167(1), 103–116, 2013.

DE BRITO, E. S., GARCÍA, N. H. P., GALLÃO, M. I., CORTELAZZO, A. L., FEVEREIRO, P. S., & BRAGA, M. R.. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81(2), 281–288, 2001.

DUCKI, S., MIRALLES-GARCIA, J., ZUMBE, A., TORNERO, A., & STOREY, D. M.. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. **Talanta**, 74(5), 1166–1174, 2008.

DURANGO W, CAICEDO M, VERA D, SOTOMAYOR I, SAINI E, C. E. **La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe**. 2019. v. 1. https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe_CACAO_linea_base.pdf

FAO. (2019). **FAOSTAT**. http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity

GUEHI, T. S., ZAHOUALI, I. B., BAN-KOFFI, L., FAE, M. A., & NEMLIN, J. G.. Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. **International Journal of Food Science and Technology**, 45(8), 1564–1571, 2010.

HAMDOUCHE, Y., MEILE, J. C., LEBRUN, M., GUEHI, T., BOULANGER, R., TEYSSIER, C., & MONTET, D.. Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. **Food Research International**, 119(March 2018), 477–491, 2019.

MOREIRA, I. M. DA V., VILELA, L. DE F., SANTOS, C., LIMA, N., & SCHWAN, R. F.. Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil. **Food Research International**, 109(April), 196–203, 2018.

OLIVA, M., & MAICELO, J. L.. Identificación y selección de ecotipos de cacao nativo fino de aroma de la zona Nor oriental del Perú. **Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable**, 4(2), 31, 2020.

QIN, X. W., LAI, J. X., TAN, L. H., HAO, C. Y., LI, F. P., HE, S. Z., & SONG, Y. H.. Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. **International Journal of Food Properties**, 20(10), 2261–2275, 2017.

RStudio Team (2021). **RStudio: Integrated Development for the R programming language**.

RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

RODRÍGUEZ-CAMPOS, J., ESCALONA, H. B., CONTRERAS, S. M., OROZCO, I., JARAMILLO, E., & LUGO, E.. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, *132*(1), 277–288, 2012.

RODRÍGUEZ-CAMPOS, J., ESCALONA, H. B., OROZCO, I., LUGO, E., & JARAMILLO, M. E.. 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), 250–258, 2011.

ROTTIERS, H., TZOMPA SOSA, D. A., DE WINNE, A., RUALES, J., DE CLIPPELEER, J., DE LEERSNYDER, I., DE WEVER, J., EVERAERT, H., MESSENS, K., & DEWETTINCK, K.. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. **European Food Research and Technology**, *245*(9), 1917–1937, 2019.

SCHWAN, R. F., & WHEALS, A. E.. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, *44*(4), 205–221, 2004.

TORRES, M., TARREGA, A., & BLANCH, C.. Effect of cocoa roasting time on volatile composition of dark chocolates from different origins determined by HS-SPME/GC-MS. **CYTA - Journal of Food**, *19*(1), 81–95, 2021.

TUENTER, E., DELBAERE, C., WINNE, A. DE, BIJTTEBIER, S., CUSTERS, D., FOUBERT, K., DURME, J. VAN, MESSENS, K., DEWETTINCK, K., & PIETERS, L.. Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate. **Food Research International**, *130*, 108943, 2020.