

## I lieviti del cacao e gli aromi del cioccolato

### INTRODUZIONE

Il cioccolato e tutti i prodotti derivati, dalle praline alla torta Sacher, non esisterebbero con gli aromi, i gusti e i profumi che conosciamo, senza l'intervento dei microrganismi, che svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo delle sue caratteristiche sensoriali (Rohan, 1964; Schwan e Wheals, 2004; Afoakwa et al., 2008). Infatti, sia lo sviluppo microbico che la presenza delle diverse comunità di microrganismi durante la fermentazione conferiscono ai semi del cacao caratteristiche particolari che contraddistinguono il prodotto finale e la sua qualità. Inoltre, i microrganismi agenti delle diverse fermentazioni possono influenzare alcune delle proprietà salutistiche del cacao, che rappresenta una delle fonti naturali più ricche in composti polifenolici (principalmente epicatechina, catechina e procianidine) e antiossidanti (Ellam e Williamson, 2013).

Il cacao, *Theobroma cacao* L., è una pianta tropicale indigena delle regioni equatoriali americane. I suoi semi furono introdotti in Europa da Colombo dopo il suo quarto viaggio, nel 1502, e utilizzati per produrre la bevanda chiamata *xocoatl* presso la corte di Spagna. *T. cacao* è un albero sempreverde, alto da 6 a 12 metri. Produce fiori direttamente sul tronco o sui rami, a mazzetti o singoli, di colore da bianco a rosa, rosso, giallo. Dall'ovario del fiore si sviluppa il frutto, chiamato cabossa, che matura in 4-6 mesi, assumendo forma ellittica, una lunghezza di circa 15-25 cm e un diametro di circa 10 cm. Ciascun

\* Centro Interdipartimentale di Ricerca "Nutraceutica e Alimentazione per la Salute" – Nutrafood, Università di Pisa; Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

frutto produce 30-40 semi, disposti lungo l'asse longitudinale, completamente ricoperti da una polpa mucillagginosa bianca e di sapore dolce-acido (chiamata anche placenta), che contiene 82-87% di acqua, 10-15% di zuccheri, 2-3% di pentosi, 1-3% di acido citrico, 1-1.5% di pectina, oltre a proteine, aminoacidi e vitamine (Roelofsen, 1958). Tale polpa rappresenta un ostacolo alla diretta utilizzazione dei semi di cacao, perciò è necessario intervenire per liberarli dalle mucillaggini. Come fare? Prima attraverso un'azione meccanica, il taglio del frutto alle due estremità per estrarre polpa e semi avvolti nelle loro mucillaggini. Successivamente attraverso la fermentazione dei semi, che è essenziale per la rimozione della polpa che circonda i semi e per lo sviluppo dei precursori degli aromi del cioccolato (Thompson et al., 2013). Durante il processo di fermentazione degli zuccheri e dei polisaccaridi della polpa, che può durare da 1-3 a 5-7 giorni, i microrganismi – lieviti, batteri lattici e batteri acetici – provocano un aumento della temperatura (fino a 52°C) che uccide l'embrione (evitando così la germinazione dei semi) e producono metaboliti che rappresentano i precursori degli aromi del cioccolato. Gli aromi si sviluppano poi completamente durante le fasi successive del processo di produzione del cioccolato (Afoakwa et al., 2008; Schwan e Wheals, 2004).

In questo lavoro saranno presi in considerazione i diversi gruppi di microrganismi che intervengono durante le varie fasi delle fermentazioni che liberano il seme dalle mucillaggini e danno luogo allo sviluppo degli aromi e dei precursori degli aromi del cioccolato.

#### FERMENTAZIONI AD OPERA DI LIEVITI E BATTERI

Le fermentazioni del cacao avvengono ancor oggi attraverso un processo non controllato, tradizionale, in cui intervengono diverse specie indigene di lieviti, batteri lattici e acetici. Tali fermentazioni sono condotte in cumuli di semi contenuti tra due strati di foglie di banano, oppure in cassoni di legno appositamente costruiti nei vari paesi di produzione del cacao. Nelle pile di fermentazione avvengono complesse reazioni biochimiche, e i diversi microrganismi si sviluppano in successione (Schwan e Wheals, 2004).

Durante le prime 24 ore del processo fermentativo i bassi valori del pH della polpa e l'abbondanza di zuccheri portano alla rapida crescita dei lieviti, che divengono dominanti (fig. 1). I principali zuccheri fermentescibili nella polpa fresca sono rappresentati da fruttosio (circa 70 mg/g) e glucosio (circa 50 mg/g), che sono rapidamente trasformati in etanolo. La concentrazione di etanolo può variare molto, da 5-20 mg/g (Camu et al., 2008; Galvez et

al., 2007; Lefeber et al., 2011; Ho et al., 2014) a valori molto più alti, 30-60 mg/g (Ardhana e Fleet, 2003; Schwan, 1998), in dipendenza delle quantità di zuccheri presenti nella biomassa vegetale iniziale e le specie di lievito che si sviluppano durante la fermentazione. Per esempio, specie che possiedono un alto potere fermentativo come *Saccharomyces cerevisiae* producono quantità più elevate di etanolo rispetto a lieviti con potere fermentativo più basso (Ardhana e Fleet, 2003; Papalexandratou et al., 2011), come *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Kluyveromyces* (Galvez et al., 2007). L'aerazione della massa causa un aumento della temperatura (sopra 37°C) e la sostituzione dei lieviti con i batteri lattici (LAB) (fig. 1). I LAB trasformano gli zuccheri principalmente in acido lattico e metabolizzano il fruttosio a mannitolo, il cui sapore dolce e fresco può contribuire a formare le caratteristiche organolettiche del cioccolato (De Vuyst et al., 2010; Lefeber et al., 2011; Ho et al., 2014). Successivamente i batteri acetici (AAB) diventano predominanti nella massa in fermentazione, ossidando l'etanolo prodotto dai lieviti in acido acetico, che raggiunge concentrazioni di 1-2%, capaci di inibire la germinazione dei semi (Quesnel, 1965) (fig. 1). Al terzo giorno la temperatura raggiunge i 45-50°C. Infine, i batteri sporigeni e le muffe possono comparire sulla parte più fredda della massa in fermentazione (Schwan e Wheals, 2004) (fig. 1).

Il contributo essenziale dei lieviti nella fermentazione del cacao e nello sviluppo degli aromi del cioccolato è stato rivelato da numerosi studi sperimentali (Ho et al., 2014; 2018). Al contrario alcune divergenze esistono riguardo al ruolo dei LAB, in quanto alcune ricerche hanno dimostrato che sono importanti per la fermentazione degli zuccheri della polpa in acido lattico e per l'utilizzazione dell'acido citrico, presente nella polpa non fermentata in quantità variabili da 5 a 40 mg/g, e la sua trasformazione in acido lattico, acido acetico e diversi composti volatili (Ardhana e Fleet, 2003; Camu et al., 2008; Lefeber et al., 2011). Altri studi invece hanno messo in evidenza che i LAB non sono essenziali per ottenere semi di cacao di alta qualità capaci di conferire al cioccolato i suoi tipici aromi (De Vuyst et al., 2010; Ho et al., 2015). Anche il ruolo dei batteri acetici (AAB) nella produzione di semi e cioccolato di qualità è ancora da chiarire completamente. Infatti, essi da una parte ossidano l'etanolo ad acido acetico, che può aumentare l'acidità dei semi e del cioccolato (Holm et al., 1993; Jinap, 1994), dall'altra producono aldeidi, chetoni e altri metaboliti (Raspor e Goranovic, 2008) che potrebbero favorire la formazione di composti aromatici nel cioccolato. In ogni caso, è stato dimostrato che nella parte interna dei semi del cacao, che ha un pH intorno a 7 prima della fermentazione, il pH si abbassa fino a 5-5,5 favorendo così l'azione delle proteasi, essenziali per la degradazione delle proteine del

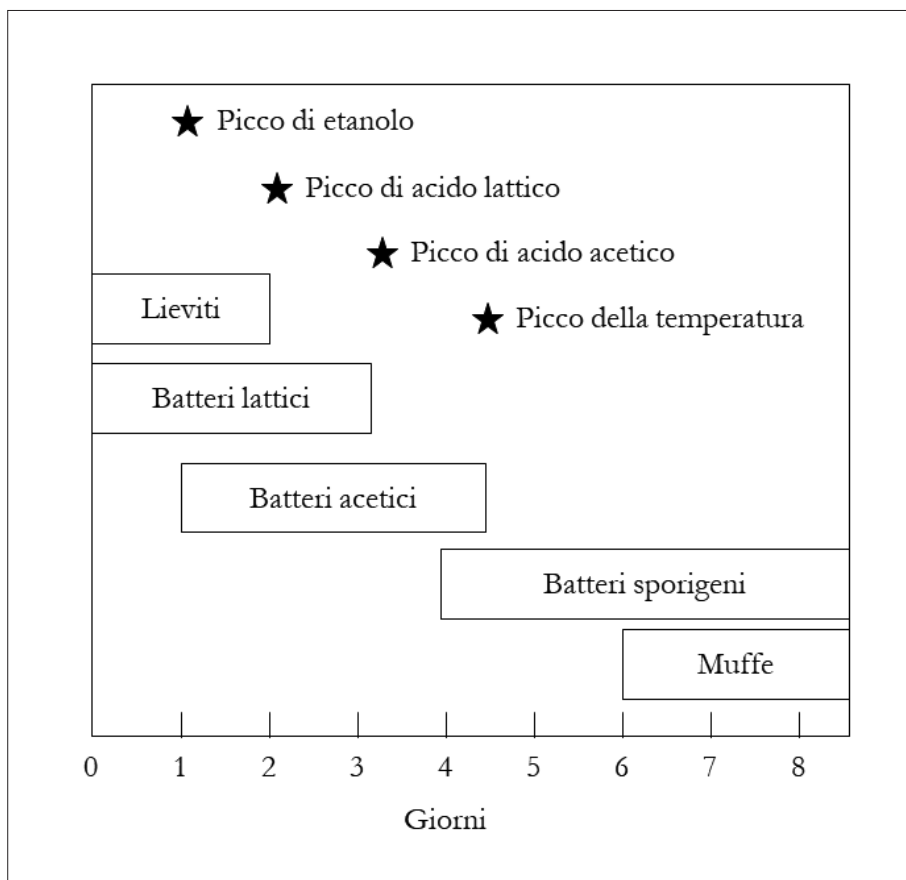


Fig. 1 Descrizione schematica della successione delle diverse comunità microbiche durante la fermentazione dei semi di cacao (da Schwan et al., 2013)

seme e la produzione dei precursori di specifici aromi del cioccolato (Biehl et al., 1985; Hansen et al., 1998).

Durante il primo stadio della fermentazione si avverte un forte odore di alcool, dovuto alla predominanza dei lieviti, favorita dalla presenza di acido citrico, zuccheri, pH acido e basse concentrazioni di ossigeno. La densità delle cellule di lievito è di circa  $10^7 - 10^8$  Unità Formanti Colonie (UFC)/g durante le prime 24 ore, rimane costante nelle successive 36 ore, e diminuisce velocemente fino a una popolazione finale di 10 cellule vitali per grammo di polpa (Schwan e Wheals, 2004). Tra le specie più frequentemente isolate troviamo *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* e

	LIEVITI	BATTERI LATTICI	BATTERI ACETICI
BRASILE	<i>Candida bombi</i> , <i>Candida pelliculosa</i> , <i>Candida rugopelliculosa</i> , <i>Candida rugosa</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> , <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspora pretoriensis</i>	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. dextrinicus</i>	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>liquefaciens</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>A. peroxydans</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>
GHANA	<i>Candida</i> spp., <i>Hansenula</i> spp., <i>Kloeckera</i> spp., <i>Pichia</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Saccharomycopsis</i> spp., <i>Schizosaccharomyces</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp.	<i>Lb. collinoides</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. mali</i> , <i>Lb. plantarum</i>	<i>Acetobacter ascendens</i> , <i>A. rancens</i> , <i>A. xylinum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>
MALESIA	<i>Candida</i> spp., <i>Debaryomyces</i> spp., <i>Hanseniaspora</i> spp., <i>Hansenula</i> spp., <i>Kloeckera</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp.	<i>Lb. collinoides</i> , <i>Lb. plantarum</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>A. rancens</i> , <i>A. xylinum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>
BELIZE	<i>Brettanomyces clausenii</i> , <i>Candida</i> spp., <i>C. boidinii</i> , <i>C. cacaui</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. reukaufii</i> , <i>Kloeckera apis</i> , <i>Pichia membranaefaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces chevalieri</i> , <i>Saccharomycopsis</i> spp., <i>Schizosaccharomyces malidevorans</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> spp.	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchmeri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. casei pseudoplan-tarum</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. gasserii</i> , <i>Lb. kandleri</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Ln. oenos</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i>	<i>Acetobacter</i> spp., <i>Gluconobacter oxydans</i>

Tab. 1 Lieviti, batteri lattici e batteri acetici isolati dal cacao durante la fermentazione, in quattro paesi diversi (da Schwan e Wheals, 2004)

alcune specie di *Candida* (Ardhana e Fleet, 2003; Daniel et al., 2009; Galvez et al., 2007; Jespersen et al., 2005; Nielsen et al., 2007; Ho et al., 2014). Per quanto riguarda i batteri lattici, il loro numero varia da  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g dalle prime 24 ore alle 48 ore di fermentazione, con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactococcus lactis* come le specie più rappresentate, anche se sono state riportate specie appartenenti ai generi *Pediococcus* e *Leuconostoc* (Kostinek et al., 2008; Nielsen et al., 2007; Ho et al., 2014). Tra i batteri acetici, il cui numero oscilla tra  $10^5$  e  $10^9$  UFC/g, la specie più spesso rinvenuta è *Acetobacter pasteurianus*, anche se altre specie sono state descritte, come *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter lovaniensis* e

*Acetobacter syzygii* (Ardhana e Fleet, 2003; Camu et al., 2007; Lefeber et al., 2011; Nielsen et al., 2007; Ho et al., 2014). I generi e le specie di lieviti e batteri, sia lattici che acetici, presenti nelle varie fasi della fermentazione del cacao possono variare nei diversi paesi produttori, dove avviene la fermentazione tradizionale spontanea, come illustrato in tabella 1.

Una domanda importante riguarda la provenienza dei microrganismi che si sviluppano sulla polpa e sui semi del cacao e danno luogo alle fermentazioni. In realtà i semi all'interno del frutto sono ritenuti microbiologicamente sterili, così come la polpa. Appena il frutto è tagliato con il coltello la polpa si contamina con i microrganismi che poi daranno luogo alla fermentazione: questi provengono dal coltello stesso, dagli insetti presenti, dalle mani dei lavoratori, dai contenitori usati per trasportare la polpa e i semi, e soprattutto dai residui disseccati delle mucillaggini rimasti attaccati alle pareti dei cassoni di fermentazione oppure dalle foglie di banano usate per coprire le biomasse in fermentazione (Schwan e Wheals, 2004).

#### FUNGHI FILAMENTOSI E PRODUZIONE DI MICOTOSSINE

Dopo la fermentazione, i semi di cacao sono essiccati e, quando la loro umidità è abbastanza bassa (6-7%), sono sottoposti alle successive diverse operazioni di tostatura, macinazione e lavorazione, oppure sono direttamente imballati e commercializzati. Durante le ultime fasi della fermentazione, possono svilupparsi diverse specie di funghi filamentosi (muffe), responsabili di sapori e aromi sgradevoli, di deterioramento del prodotto e della produzione di micotossine (Schwan e Wheals, 2004) (tab. 2). Quando presenti, tali microrganismi permangono anche durante le fasi di essiccazione e conservazione del seme fermentato, rappresentando un fattore di rischio per la salute umana, poiché alcuni generi, in particolare *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* possono produrre metaboliti secondari tossici, alcuni dei quali hanno effetti mutageni, teratogeni e carcinogeni sugli esseri umani e gli animali (IARC, 1993). Alcuni autori hanno indagato la presenza di micotossine in tutti gli stadi di lavorazione dei semi di cacao e hanno trovato una maggiore incidenza di ocratossina A durante la fase di essiccazione (<0,01-5,54 µg/kg) e di conservazione (<0,01-4,64 µg/kg), che era prodotta principalmente da isolati di *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* (Copetti et al., 2010). Uno studio successivo ha analizzato 494 campioni per la presenza di funghi filamentosi durante le diverse fasi di lavorazione del cacao e produzione del cioccolato, mostrando che essi erano più rappresentati durante le fasi di es-

FASE DEL PROCESSO (NUMERO DI CAMPIONI)	FERMENTAZIONE (51)	ESSICCAZIONE AL SOLE (85)	CONSERVAZIONE (65)
FUNGHI FILAMENTOSI	FO (%)	FO (%)	FO (%)
<i>Absidia corymbifera</i>	15.69	73.17	69.23
<i>Aspergillus candidus</i>	1.96	20	18.46
<i>A. carbonarius</i>	1.96	5.88	9.23
<i>A. clavatus</i>	0	1.18	0
<i>A. flavus</i>	3.92	37.64	32.31
<i>A. fumigatus</i>	3.92	11.76	1.54
<i>A. niger</i> group	3.92	16.47	26.15
<i>A. ochraceus</i> group	0	5.88	3.08
<i>A. parasiticus</i>	1.96	24.39	13.85
<i>A. penicilliioides</i>	0	0	15.39
<i>Aspergillus</i> sp. nov.	3.92	48.24	41.54
<i>A. sydowii</i>	3.92	2.35	18.46
<i>A. ustus</i>	ND	0	1.54
<i>A. versicolor</i>	1.96	0	6.15
Ascomycetes	0	1.18	0
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	1.54
Dematiaceous hyphomycetes	0	4.7	6.15
<i>Emmericella nidulans</i>	0	0	3.08
<i>Eurotium amstelodami</i>	5.88	8.23	35.38
<i>E. chevalieri</i>	0	12.94	21.54
<i>E. rubrum</i>	0	9.41	29.23
<i>Eupenicillium</i> sp.	0	0	1.54
<i>Fusarium solani</i>	0	1.18	0
<i>Geotrichum candidum</i>	19.61	10.59	6.15
<i>Monascus ruber</i>	25.49	4.7	10.77
<i>Mucor</i> sp.	5.88	1.18	3.08
<i>Neosartorya fischeri</i>	0	1.18	1.54
<i>Paecilomyces variotii</i>	3.92	4.7	10.77
<i>Penicillium citrinum</i>	0	8.23	7.69
<i>P. fellutanum</i>	0	0	1.54
<i>P. paneum</i>	23.53	58.82	16.92
<i>Rhizopus</i> sp.	1.96	9.41	10.77
<i>Symcephalastrum</i> sp.	1.96	0	15.38
<i>Wallemia sebi</i>	0	0	1.54
Yeasts	41.18	48.23	9.23

Tab. 2 Presenza (%) di funghi filamentosi durante la fermentazione di semi di cacao, la successiva essiccazione al sole e conservazione. FO=Frequenza di ritrovamento % (numero di campioni che contenevano una specie fungina/totale di campioni valutati, %); ND=Non rilevato (da Copetti et al., 2011)

sicazione e conservazione presso le fattorie. I 1132 funghi potenzialmente tossinogeni appartenevano alle specie o gruppi di specie *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, gruppo *Aspergillus niger* group, *A. carbonarius* e gruppo *A. ochraceus* (Copetti et al., 2011). È importante sottolineare che la conoscenza dell'ecologia dei funghi contaminanti durante le varie fasi di lavorazione dei semi di cacao e del cioccolato rappresenta un fattore chiave per poter ridurre la contaminazione fungina e la produzione di micotossine.

## CONCLUSIONI

Tutte le operazioni successive alla fermentazione, come l'essiccazione, la conservazione, e i processi tecnologici a cui sono sottoposti i semi e la polvere di cacao, influenzano le caratteristiche organolettiche dei vari tipi di cioccolato, a cui contribuiscono oltre 500 composti, volatili e non volatili. Alcuni di tali composti sono presenti nel seme del cacao, altri sono prodotti dopo la morte dell'embrione, altri ancora generati dalla reazione di Maillard e dalle reazioni che avvengono durante la tostatura. È ormai provato tuttavia che i microrganismi e le fermentazioni a cui danno luogo giocano un ruolo primario nello sviluppo del sapore e degli aromi del cioccolato.

Negli anni a venire i ricercatori dovranno soprattutto monitorare, durante le varie fasi della fermentazione, l'evoluzione dei composti chiave che contribuiscono allo sviluppo degli aromi del cioccolato, dopo l'inoculo della polpa e dei semi con ceppi microbici ben definiti, individualmente o in combinazione. Sarà essenziale studiare i vari ceppi di lieviti, batteri lattici e acetici, isolati da ambienti diversi durante la fermentazione dei semi del cacao, al fine di selezionare i migliori ceppi e i migliori consorzi microbici, che mostrino sia caratteristiche biotecnologiche ottimali che elevata capacità di produrre sostanze aromatiche, da poter utilizzare come starters nella fermentazione del cacao.

## RIASSUNTO

Gli aromi, il colore e il gusto del cioccolato dipendono in larga misura non solo dalla varietà genetica della pianta *Theobroma cacao*, ma anche dalla fermentazione microbica del frutto e dei semi che avviene dopo il raccolto. Infatti, durante la fermentazione sono prodotti composti volatili e non volatili, precursori degli aromi del cioccolato. Il frutto contiene circa



30-40 semi di cacao avvolti da una polpa mucillaginosa acida e ricca di zuccheri, che inizia a fermentare spontaneamente ad opera di microrganismi autoctoni. I lieviti fermentano gli zuccheri trasformandoli in alcool etilico, e contribuiscono alla degradazione della polpa attraverso la secrezione di enzimi pectinolitici. I batteri lattici metabolizzano l'acido citrico, aumentando il pH e il contenuto in ossigeno, che favorisce la crescita dei batteri acetici, capaci di trasformare l'etanolo in acido acetico. Il processo porta a un aumento della temperatura fino anche a 50°C, che inibisce la germinazione. Contemporaneamente avviene la degradazione delle pareti delle cellule dei semi, e il rilascio di enzimi preziosi che portano alla formazione dei precursori degli aromi del cioccolato. Recenti ricerche hanno mostrato come sia importante selezionare ceppi di lieviti e batteri che possiedano sia caratteristiche biotecnologiche ottimali che elevate capacità di produrre sostanze aromatiche, da poter utilizzare come starters nella fermentazione del cacao.

#### ABSTRACT

The aroma, taste and colour of chocolate largely depend not only on the genetic variety of the plant *Theobroma cacao*, but also on the microbial fermentation of the fruits and seeds, occurring after harvest. Indeed, during fermentation both volatile and non-volatile compounds are produced, the precursors of chocolate flavour. The fruit contains 30-40 cacao seeds surrounded by a mucilaginous acidic pulp rich in sugars, which, spontaneously contaminated by environmental microorganisms, is rapidly fermented. Yeasts ferment sugars into ethanol, contributing to pulp degradation by secreting pectinolytic enzymes. Lactic acid bacteria metabolize sugars and citric acid, increasing pH and oxygen content, which promote the growth of acetic acid bacteria, able to metabolize ethanol into acetic acid. The fermentation process increases the temperature up to 50°C, inhibiting seed germination. At the same time seeds cell walls are degraded, releasing enzymes which lead to the formation of the precursors of chocolate flavour. Recent studies revealed the importance of the selection of yeast and bacterial strains showing the best biotechnological characteristics and the highest ability to produce aromatic compounds, to be used as starters of cacao fermentation.

#### BIBLIOGRAFIA

- AFOAKWA E.O., PATERSON A., FOWLER M., RYAN A. (2008): *Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review*, «Critical Reviews in Food Science and Nutrition», 48, pp. 840-857.
- ARDHANA M.M., FLEET G.H. (2003): *The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia*, «Int. J. Food Microbiol.», 86, pp. 87-99.
- BIEHL B., BRUNNER E., PASSERN D., QUESNEL V.C., ADOMAKO D. (1985): *Acidification, proteolysis and flavor potential in fermenting cocoa beans*, «J. Sci. Food Agric.», 36, pp. 583-598.
- CAMU N., DE WINTER T., ADDO S.K., TAKRAMA J.S., BERNAERT H., DE VUYST L. (2008): *Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate*, «J. Sci. Food Agric.», 88, pp. 2288-2297.
- CAMU N., DE WINTER T., VERBRUGGHE K., CLEENWERCK I., VANDAMME P., TAKRAMA

- J.S., VANCANNEYT M., DE VUYST L. (2007): *Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana*, «Appl. Environ. Microbiol.», 73, pp. 1809-1824.
- COPETTI M.V., PEREIRA J.L., IAMANAKA B.T., PITT J.I., TANIWAKI M.H. (2010): *Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing*, «Int. J. Food Microbiol.», 143, pp. 67-70.
- COPETTI M.V., PEREIRA J.L., IAMANAKA B.T., FUNGARO M.H., TANIWAKI M.H. (2011): *Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa*, «Int. J. Food Microbiol.», 148, pp. 141-144.
- COPETTI M.V., IAMANAKA B.T., FRISVAD J.C., PEREIRA J.L., TANIWAKI M.H. (2010): *Mycobiota of cocoa: From farm to chocolate*, «Food Microbiol.», 28, pp. 1499-1504.
- DANIEL H.M., VRANCKEN G., TAKRAMA J.F., CAMU N., DE VOS P., DE VUYST L. (2009): *Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations*, «FEMS Yeast Res.», 9, pp. 774-783.
- DE VUYST L., LEFEBER T., PAPALEXANDRATOU Z., CAMU N. (2010): *The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation*, in *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, a cura di F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo, Wiley- Blackwell, USA, pp. 301-325.
- ELLAM S., WILLIAMSON G. (2013): *Cocoa and human health*, «Annual Review of Nutrition», 33, pp. 105-128.
- GALVEZ S.L., LOISEAU G., PAREDES J.L., BAREL M., GUIRAUD J.P. (2007): *Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic*, «Int. J. Food Microbiol.», 114, pp. 124-130.
- HANSEN C.E., DEL OLMO M., BURRI C. (1998): *Enzyme activities in cocoa beans during fermentation*, «J. Sci. Food Agric.», 77, pp. 273-281.
- HO V.T.T., FLEET G., ZHAO J. (2014): *Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms*, «Int. J. Food Microbiol.», 279, pp. 43-56.
- HO V.T.T., ZHAO J., FLEET G. (2014): *Yeasts are essential for cocoa bean fermentation*, «Int. J. Food Microbiol.», 174, pp. 72-87.
- HO V.T.T., ZHAO J., FLEET G. (2015): *The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation*, «Int. J. Food Microbiol.», 205, pp. 54-67.
- HOLM C.S., ASTON J.W., DOUGLAS K. (1993): *The effects of the organic-acids in cocoa on the flavour of chocolate*, «J. Sci. Food Agric.», 61, pp. 65-71.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993): *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, in Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*, IARC Press, Lyon, 56, pp. 1-599.
- JESPERSEN L., NIELSEN D.S., HONHOLT S., JAKOBSEN M. (2005): *Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans*, «FEMS Yeast Res.», 5, pp. 441-453.
- JINAP S. (1994): *Organic acids in cocoa beans - A review*, «ASEAN Food J.», 9, pp. 3-12.
- KOSTINEK M., BAN-KOFFI L., OTTAH-ATIKPO M., TENIOLA D., SCHILLINGER U., HOLZAPFEL W.H., FRANZ C. (2008): *Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria*, «Curr. Microbiol.», 56, pp. 306-314.
- LEFEBER T., GOBERT W., VRANCKEN G., CAMU N., DE VUYST L. (2011): *Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels*, «Food Microbiol.», 28, pp. 457-464.
- NIELSEN D.S., TENIOLA O.D., BAN-KOFFI L., OWUSU M., ANDERSSON T.S., HOLZAP-

- FEL W.H. (2007): *The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analyzed using culture-dependent and culture-independent methods*, «Int. J. Food Microbiol.», 114, pp. 168-186.
- PAPALEXANDRATOU Z., FALONY G., ROMANENS E., JIMENEZ J.C., AMORES F., DANIEL H.M., DE VUYST L. (2011): *Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations*, «Appl. Environ. Microbiol.», 77, pp. 7698-7714.
- QUESNEL V.C. (1965): *Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation*, «J. Sci. Food Agric.», 16, pp. 441-447.
- RASPOR P., GORANOVIC D. (2008): *Biotechnological applications of acetic acid bacteria*, «Crit. Rev. Biotechnol.», 28, pp. 101-124.
- ROELOFSEN P.A. (1958): *Fermentation, drying, and storage of cocoa beans*, «Adv. Food Res.», 8, pp. 225-296.
- ROHAN T.A. (1964): *The precursors of chocolate aroma: a comparative study of fermented and unfermented beans*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 29, pp. 456-459.
- SCHWAN R.F., WHEALS A.E. (2004): *The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality*, «Critical Reviews in Food Science and Nutrition», 44, pp. 1-17.
- THOMPSON S.S., MILLER K.B., LOPEZ A., CAMU N. (2013): *Cocoa and coffee*, in *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4<sup>th</sup>, a cura di M.P. Doyle, R.L. Buchanan, ASM Press, Washington, DC, pp. 881-889.