

2017 International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Perú, 13-17 November 2017

**Aislamiento e identificación de microorganismos presentes durante el proceso de fermentación de *Theobroma cacao* L., variedad “Chuncho” del Cuzco**

L.G. Salazar, R. Rojas, J. Hurtado

Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias, Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú.

Resumen

Los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) son la materia prima principal para la producción de chocolate. La fermentación de los granos de cacao es un proceso post cosecha esencial para el desarrollo de precursores del sabor del chocolate la cual viene dada por su genotipo. El proceso de fermentación del grano involucra microorganismos como levaduras, bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, las cuales producen reacciones bioquímicas que impactan en el sabor y aroma del chocolate. El conocimiento y control de estos, ayudaría a la mejora del producto final. Perú posee una alta diversidad de genotipos del árbol de cacao. Entre ellas tenemos La variedad de cacao Chuncho la cual posee una superioridad en calidad organoléptica. En este trabajo se reporta el estudio microbiológico del proceso de la fermentación del cacao “Chuncho” del cultivar “Común Cáscara de Huevo”.

Se realizó una prueba de fermentación durante 4 días, en Quillabamba, Cusco. Se tomaron muestras de 20 gr de los granos en fermentación, cada 24 horas. Para el análisis microbiológico, se emplearon medios para conteo y aislamiento de levaduras (Sabouraud con cloranfenicol); bacterias ácido lácticas (agar MRS) y bacterias ácido acéticas (agar GYC). Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación.

Durante el análisis microbiológico se observó una sucesión de microorganismos. Las levaduras identificadas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Candida* sp. Entre las bacteria ácido lácticas se aisló e identificó a *Leuconostoc mesenteroides* ssp, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. En cuando a las bacterias ácido se determinó que pertenecían a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*.

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) tiene su centro de origen en el Perú. Sus granos constituyen la materia prima para la industria del chocolate. El cacao se clasifica desde el punto de vista botánico o genético en: criollo, trinitario y forastero. En Perú existen 5 grupos genéticos de acuerdo a la clasificación propuesta por Lachenaud, en 1997: Criollo, Forastero del Alto Amazonas o Amazonas, Forastero del Bajo Amazonas o Guyanas, Nacional y Trinitario (2). El Perú está clasificado según el Convenio Internacional del Cacao 2010 de la ICCO, como el segundo país productor y exportador de cacao fino (3).

El potencial para desarrollar sabores específicos depende principalmente del genotipo (4). Sin embargo, las intensidades pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo. Las semillas frescas de cacao no contienen los precursores necesarios para la formación del sabor del chocolate (4,5). Por lo tanto, se someten a un proceso posterior a la cosecha, que consiste en la fermentación y el secado (6).

Durante la fermentación, la pulpa de la fruta se degrada y los precursores del sabor a chocolate se desarrollan en las semillas de cacao. La intensidad de las notas amargas y astringentes disminuye y se reduce aún más durante el secado (4,7). Se pueden resaltar diferentes atributos del potencial del sabor del mismo cacao fresco a través de la fermentación (4,5).

El proceso de fermentación requiere una acción secuencial compleja de diferentes microorganismos: En primer lugar aparecen las levaduras, posteriormente las condiciones anaeróbicas y micro-aeróbicas facilitan el establecimiento de bacterias ácido lácticas y finalmente, bajo condiciones aerobias, aparecen las bacterias ácido acéticas (8).

### Cacao Chuncho

Perú posee una diversidad única con respecto a los genotipos del árbol de cacao (1). Entre ellas tenemos la variedad de cacao Chuncho del cultivar “Común Cáscara de Huevo”. El cacao Chuncho se encuentra ubicado geográficamente en los valles de La Convención de la Región Cusco (3). Pertenece al grupo genético Forastero del Alto Amazonas. Las principales características organolépticas de este cacao son de nota floral, frutal y nuez; con baja astringencia y amargor.

La importancia del estudio de esta variedad de cacao radica en su superioridad en calidad organoléptica. Un buen manejo de los procedimientos post cosecha asegura que las cualidades de sabor y aroma (determinadas por su genotipo) se expresen (9).

En las fermentaciones espontáneas tradicionales, los microorganismos necesarios para la fermentación entran aleatoriamente en la masa de fermentación (8). Esto hace que la fermentación y, por ende, el desarrollo del perfil del sabor sean escasamente controlables. La selección de la variedad del cacao y el manejo influye en la diversidad de especies de microorganismos aislados impactando la calidad de la fermentación del cacao. El conocimiento de los microorganismos presentes y el control de algunas especies de bacterias durante la fermentación podría permitir el control de una producción de alta calidad de chocolate y la generación de un pre cultivo para obtener aromas deseados en el chocolate (10,11).

En este trabajo se reporta el estudio microbiológico (caracterización e identificación de microorganismos) del proceso de la fermentación del cacao “Chuncho” del cultivar “Común Cáscara de Huevo”.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### RECOLECCIÓN DE FRUTOS DE LA VARIEDAD DE CACAO CHUNCHO, CULTIVAR “CÁSCARA DE HUEVO”

La recolección de frutos fue llevada a cabo en el distrito de Echarate, en la provincia de La Convención, en la ciudad de Quillabamba ubicada en el departamento de Cusco a 1400 m.s.n.m. La cosecha fue realizada utilizando un machete cortando el pedúnculo. El tiempo de cosecha fue de 3 horas.

### PROCESO DE FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación se realizó de acuerdo al estudio hecho por Rojas et al 2015 en el libro “Estudio del proceso poscosecha y caracterización morfológica-sensorial-molecular de 3 variedades de cacaos nativos de Cusco, Junín y Piura. Lima” (9).

### RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se recolectó alrededor de 30 gramos de masa de cacao en fermentación, desde el inicio del proceso (tiempo 0) y cada 24 horas hasta el cuarto día. La toma de muestra se realizó utilizando bolsas de polietileno con cierre hermético, tomando porciones en la superficie y en 5 puntos distintos distribuidos en la mitad de la caja de fermentación. Se midió la temperatura de la masa así como el pH.

### TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras se transportaron en refrigeración hasta el lugar de análisis microbiológico ubicado a 7 minutos. Una vez ahí, se pesaron asépticamente 20 gramos de muestra y se lavaron en 180 ml de agua peptonada al 0.1%, agitando las botellas por cinco minutos y dejando reposar por 30 minutos. Se tomaron 0.3 ml de la fase líquida y se le agregaron a viales que contenían 2.7 ml de agua peptonada al 0.1% para realizar diluciones seriadas. Posteriormente se sembraron alícuotas de 0.1ml por extensión en agares selectivos para los microorganismos que se iban a aislar. Una vez sembradas las muestras en las placas fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología Ambiental en la Universidad Peruana Cayetano Heredia para el aislamiento y caracterización.

### SIEMBRA EN MEDIOS DIFERENCIALES

Para el aislamiento de levaduras se utilizó el medio de cultivo agar Sabouraud de (HIMEDIA) (caseína enzimática hidrolizada 0.5%, peptona 0.5%, glucosa 4% y agar 1.5%). Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas se utilizó el medio de cultivo agar MRS (marca HIMEDIA) (peptona 1%, extracto de carne 1%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 2%, tween 80 0.1%, citrato de amonio 0.2%, acetato de sodio 0.5%, sulfato de magnesio 0.01%, sulfato de manganeso 0.005%, fosfato dipotásico 0.2% y agar 1.2%). Para las bacterias ácido acéticas se empleó el medio de cultivo GYC (2% glucosa, 1% extracto de levadura, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, y 1.5% agar) suplementado con 5% de etanol para las bacterias ácido acéticas.

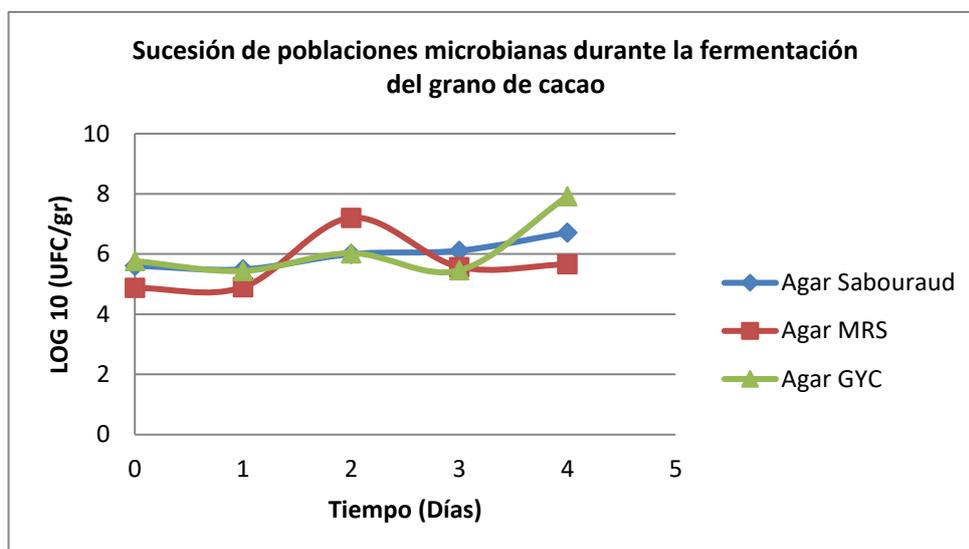
### AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Cada una de las muestras obtenidas al ingresar al laboratorio de Biotecnología Ambiental fue sembrada en medios de cultivos diferenciales e incubados a 28 ° C. Se obtuvieron cultivos axénicos para continuar con la caracterización morfológica y la caracterización bioquímica. Para levaduras se utilizó el método de identificación API 20C AUX (Biomérieux, Francia). Además se realizaron pruebas complementarias como son: crecimiento en agar maíz, crecimiento a 37 ° C y crecimiento en tiamina. Para las bacterias ácido lácticas se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa además de la tinción Gram, para luego realizar las pruebas de fermentación de azúcares mediante API 50 CHL Medium (Biomérieux, Francia). Para las bacterias ácido acéticas se realizó una serie de pruebas bioquímicas: prueba de la catalasa y oxidasa; oxidación de acetato; crecimiento a pH 3, 3.5, 4, y 6.8; crecimiento en 30% de glucosa; prueba de motilidad y crecimiento en 10% de etanol.

## RESULTADOS

### SUCESIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS

En el Gráfico 1 se muestra la variación en las poblaciones microbianas. Estas variaciones están representadas mediante el crecimiento en agar Sabouraud para levaduras, agar MRS para bacterias ácido lácticas y levaduras; y agar GYC para bacterias ácido acéticas y levaduras.



**Gráfico 1.** Variación en las poblaciones microbianas durante el proceso de fermentación de cacao

Durante el análisis microbiológico se observó una sucesión de microorganismos. A partir del segundo día se evidenció mayor número de microorganismos en el medio de cultivo MRS. Posteriormente hubo un incremento marcado de crecimiento en el medio Sabouraud. A partir del cuarto día se incrementó el crecimiento en el medio GYC, conservando este crecimiento hasta el final de la fermentación (Gráfico 2).

### IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Se seleccionaron 10 morfotipos para realizar la prueba de asimilación de azúcares con el cual se determinó que correspondían a 3 especies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera spp.* (anamorfo de *Hanseniaspora*) y *Candida sp.* Con la prueba de crecimiento en tiamina y ausencia de crecimiento a 37 °C se determinó que la especie perteneciente al género *Kloeckera sp.* fue *Kloeckera apiculata* (anamorfo de *Hanseniaspora uvarum*). Las características morfológicas se presentan en la tabla 1.

	Características Morfológicas	
	Macroscópicas	Microscópicas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	colonias con forma circular, con bordes enteros, convexa, opaca, color blanco con 1 cm de diámetro	células de globosas a elipsoidales grandes
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	colonia de forma circular, con borde ondulado, plana, opaca, color beige con 1.3 cm de diámetro	células con forma de limón
<i>Candida sp</i>	colonia con forma circular, con borde entero, convexa, opaca, color beige con 5 mm de diámetro	células globosas a elipsoidales pequeñas

**Tabla 1.** Características morfológicas de las levaduras aisladas.

### IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

A 10 de las colonias aisladas que fueron de tipo bacilos Gram positivos, catalasa negativas y oxidasa negativas se les realizó la prueba de fermentación de azúcares con la cual se pudo determinar la presencia de *Leuconostocmesenteroidesssp*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. Las características morfológicas se presentan en la tabla 2.

	<b>Características Morfológicas</b>	
	<b>Macroscópicas</b>	<b>Microscópicas</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp</i>	colonia con forma circular, 3 mm de diámetro, convexa, brillante, cremosa y color blanco	cocobacilos Gram positivos
<i>Lactobacillus plantarum</i>	colonia convexa, 6 mm diámetro, forma circular con borde irregular, opaca y cremosa	bacilos alargados Gram positivos
<i>Lactobacillus brevis</i>	colonia convexa con forma circular, 4 mm de diámetro, opaca y cremosa	bacilos Gram positivos

**Tabla 2.** Características morfológicas de las bacterias ácido lácticas aisladas.

### IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO ACÉTICAS

Se obtuvieron 12 colonias que presentaban halos de aclaramiento en el agar GYC y que eran bacilos Gram negativos. Las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a las bacterias ácido acéticas aisladas permitieron determinar a qué género pertenecen las bacterias aisladas y las posibles especies a las cuales podrían corresponder. La mayoría de aislados fueron catalasa positiva y oxidasa negativo. Dos de los aislados dieron resultados positivos para la oxidación de acetato. Ninguno creció en concentraciones altas de glucosa. Se evaluó el crecimiento de los aislados a diferentes pH, tres de los aislados crecieron en pH 3 y ocho crecieron en la prueba de crecimiento a una concentración de 10% de etanol. Las características morfológicas se presentan en la tabla 3.

	<b>Características Morfológicas</b>	
	<b>Macroscópicas</b>	<b>Microscópicas</b>
<i>Gluconobacter sp</i>	colonia con forma circular, 5 mm de diámetro, convexa, brillante, cremosa y color beige	bacilos Gram negativos
<i>Acetobacter spp</i>	colonia con forma circular, 2 mm de diámetro, convexa, brillante, cremosa y color beige oscuro	bacilos con forma de curva Gram negativos

**Tabla 3.** Características morfológicas de las bacterias ácido acéticas aisladas.

### DISCUSIÓN

Durante el análisis microbiológico se observó una sucesión de microorganismos. En general, durante el proceso de fermentación, el recuento total de microorganismos aumenta durante las primeras 24-36 horas y luego se estabiliza o se reduce gradualmente (13). En este estudio se encontró que las bacterias ácido lácticas cumplían con esta generalidad, mientras que las levaduras y las bacterias ácido acéticas al cuarto día aumentaron su población. Esto se puede deber a la frecuencia con la que se realizó el proceso de volteado, cada 24 horas, permitiendo mayor oxigenación de la masa, ayudando a la prevalencia de microorganismos aerobios.

Las poblaciones iniciales microbianas son variables, dependen de factores como el cultivar de cacao, la calidad de la mazorca y la calidad del grano, por lo que la dinámica de la comunidad microbiana varía entre lugares de fermentación y tipos de fermentación (10,13,14).

Se identificó durante el proceso de fermentación la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* y *Candida sp* (la cual aún se mantiene en estudios). Dos de estas especies aisladas se encuentran dentro del grupo de especies de levaduras más frecuentemente aisladas (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia fermentans*, *Pichia anomala* y *Kluyveromyces marxianus*) (15–17).

Tanto en las investigaciones dependientes de cultivos como en las independientes se ha demostrado el papel dominante de *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *P. membranifaciens* y *S. cerevisiae* en varios procesos de fermentación del grano de cacao (16,17). Sugiriéndonos así que al haber aislado estos microorganismos (*S. cerevisiae* y *H. uvarum*) podrían también tener un papel de dominancia en la fermentación llevada a cabo con cacao Chunchu.

La importancia de la presencia de levaduras radica en provocar la reducción de la viscosidad y el drenaje de la masa de la pulpa de cacao, debido a la secreción de enzimas pectinolíticas que descomponen las paredes celulares de la pulpa (8,18) esto permite la entrada de aire, lo que promueve el crecimiento de bacterias, en particular BAL y BAA.

Se identificó la presencia de *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. Este aislamiento se ve corroborado con estudios previos donde han encontrado que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* son las especies aisladas con más frecuencia (10,11,13,14,18–20).

La importancia de la presencia de *L. plantarum* en la fermentación radica en que junto con *Leuc. Pseudomesenteroide* y *L. fermentum* consumen el citrato en las primeras etapas de la fermentación del cacao bajo condiciones de pH bajo evitando así la competencia con las levaduras (citrato - negativas) que se encuentran degradando anaeróticamente azúcares a etanol (13).

Dos de los aislados de bacterias ácido acéticas dieron positivo para la prueba de oxidación de acetato, confirmando la presencia del género *Acetobacter* y/o *Gluconoacetobacter*; mientras que el resto de las 10 colonias fueron identificadas como *Gluconobacter*. La incapacidad de crecimiento de los 12 aislados en una concentración de 30% de glucosa confirma la pertenencia a los géneros de *Acetobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Gluconobacter*.

El crecimiento en 10% de etanol es una característica diferencial entre algunas especies del género *Acetobacter*, de los aislados que dieron positivo a la prueba de la oxidación de acetato ambos dieron positivo para la prueba de crecimiento en 10% de etanol (A17 y A90). *A. ghanensis*, *A. oeni*, *A. nitrogenifigensy* *A. pasteurianusson* son las especies que toleran tales condiciones (21). Por lo tanto es probable que los aislados pertenezcan a alguna de estas especies.

En general, los miembros del género *Acetobacter* se encuentran con más frecuencia que los de *Gluconobacter* (14,22) sin embargo en este estudio se ha encontrado lo contrario, de 12 aislamientos solo 2 pertenecieron al género de *Acetobacter*. El mayor aislamiento de *Gluconobacter* en este estudio, puede indicar una fermentación diferente de la masa de la pulpa con producción de otros ácidos orgánicos y otros productos finales de la fermentación, que podrían ser responsables del sabor diferente del grano fermentado del cacao Chunchu.

## CONCLUSIONES

Las levaduras identificadas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida sp*. Las bacterias ácido lácticas (y relacionadas) aisladas fueron: *Leuconostoc mesenteroides ssp*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*. En cuanto a las bacterias ácido acéticas se determinó que pertenecían a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconoacetobacter*.

Se continúa realizando pruebas bioquímicas para la determinación de las especies de *Candida* y otras levaduras más, involucradas en el proceso de fermentación.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo recibió el financiamiento del Programa Nacional para la Competitividad y Productividad-Innovate Perú, de acuerdo al contrato 159-PNICP-PIAP-2015.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, et al. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS One*. 2008;3(10).
2. (MINAG) M de A. Estudio del CACAO en el Perú y en el Mundo [Internet]. 2015. p. 90. Available from: [agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/.../estudio\\_cacao\\_para\\_iica.pdf](http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/.../estudio_cacao_para_iica.pdf)
3. Organoleptica C. Cacao “chuncho” (cusco). 2012;1–3.
4. Misnawi, Jinap S, Jamilah B, Nazamid S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *J Sci Food Agric*. 2005;85(6):917–24.
5. Aikpokpodion PE, Dongo LN. Effects of Fermentation Intensity on Polyphenols and Antioxidant Capacity. *Int J Sustain Crop Prod*. 2010;5(4):66–70.
6. Kadow D, Niemenak N, Rohn S, Lieberei R. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2015;62(1):357–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>
7. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M, Ryan A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008;48(9):840–57.
8. Schwan RF, Wheals AE. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(4):205–21.
9. Rosario R. Estudio del proceso poscosecha y caracterización morfológica-sensorial-molecular de 3 variedades de cacao nativos de Cusco, Junin y Piura. Lima; 2015. 82 p.
10. Papalexandratou Z, Camu N, Falony G, De Vuyst L. Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiol* [Internet]. 2011;28(5):964–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.010>
11. Papalexandratou Z, Vrancken G, de Bruyne K, Vandamme P, de Vuyst L. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiol* [Internet]. 2011;28(7):1326–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
12. Ouattara D, Ouattara H, Adom J, Goualié B, Koua G, Doué G, et al. Screening of Lactic Acid Bacteria Capable to Breakdown Citric Acid during Ivorian Cocoa Fermentation and Response of Bacterial Strains to Fermentative Conditions. *Br Biotechnol J* [Internet]. 2016;10(3):1–10. Available from: <http://sciencedomain.org/abstract/11816>
13. Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, et al. 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*. 2007;73(6):1809–24.

14. Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol.* 2007;114(2):168–86.
15. Jespersen L, Nielsen DS, Hønholt S, Jakobsen M. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* 2005;5(4–5):441–53.
16. Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa . *Food Microbiol.* 2013;35(2):73–85.
17. Papalexandratou Z, De Vuyst L. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Res.* 2011;11(7):564–74.
18. Ardhana MM, Fleet GH. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(1–2):87–99.
19. Lefeber T, Janssens M, Moens F, Gobert W, De Vuyst L. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(18):6694–8.
20. Papalexandratou Z, Falony G, Romanens E, Jimenez JC, Amores F, Daniel HM, et al. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(21):7698–714.
21. Bergey DH, Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 9 ed. Williams & Wilkins; 2000. 787 p.
22. Moens F, Lefeber T, De Vuyst L. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(6):1848–57.