

MIKO-EKOLOGI JAMUR PENGHASIL TOKSIN DALAM PRODUK KAKAO KERING ASAL KALIMANTAN TIMUR, SULAWESI DAN IRIAN JAYA

Mico-ecology of toxigenic fungi in Sun Dried Cocoa from East Kalimantan, Sulawesi and Irian Jaya

Anton Rahmadi¹, Graham H. Fleet²

¹Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman, contact: arahmadi@ unmul.ac.id

²Dept. Food Science and Technology, Faculty of Chemical Engineering, University of New South Wales, Australia

ABSTRAK

Kontaminasi mikotoksin dalam produk kakao kering merupakan sebuah permasalahan yang belum banyak dikaji. Penelitian ini bertujuan untuk memetakan ekologi jamur yang berkaitan dengan keberadaan metabolit beracun di produk kakao Indonesia. Sampel diperoleh dari lima lokasi di Kalimantan Timur, Sulawesi, dan Irian serta diteliti di Universitas New South Wales, Australia. Polong dari kakao didisinfeksi dengan 1% klorin sebelum diinokulasikan pada media agar Dichloran 18 % Gliserol (DG-18, OXOID). Enumerasi total jamur dilakukan dengan pengenceran secara serial pada media yang sama. Untuk memurnikan tiap-tiap kultur yang diperoleh digunakan media agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC, OXOID). Secara bersamaan, koloni *Aspergillus spp.* penghasil aflatoxin dikonfirmasi menggunakan media *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar* (AFPA, OXOID). Konfirmasi identifikasi melingkupi pengamatan morfologi di bawah mikroskop fase kontras. Dari kakao kering yang diperoleh, sampel yang berasal dari Penajam menghasilkan kontaminasi tertinggi dengan $1,2 \times 10^7$ CFU/g, sementara sampel dari Malinau mencatatkan $2,6 \times 10^4$ CFU/g, yang merupakan tingkat kontaminasi terendah. Sebaran genus jamur yang diperoleh terdiri dari *Aspergillus*, *Penicillium*, *Issatchenkia*, beberapa kapang dan pseudo-kamir. Semua sampel menunjukkan kontaminasi beberapa jenis aflatoxin dan mengandung spora aktif dari *Aspergillus flavus*. Secara khusus, *A. parasiticus* berhasil diisolasi dari sampel Penajam. Penelitian ini masih dilanjutkan untuk menentukan tingkat kontaminasi dari masing-masing mikotoksin pada setiap sampel. Penelitian ini memiliki signifikansi bagi Indonesia yang merupakan penghasil coklat nomor tiga terbesar di dunia.

ABSTRACT

*Micotoxins contamination in sun dried cocoa has become a concern but not studied thoroughly. This research is aimed to understand the ecology of fungal contamination in relation with the occurrence of toxigenic metabolites in Indonesian fermented cocoa. The samples were obtained from five municipalities in East Kalimantan, Sulawesi, and Irian and brought to the University of New South Wales, Australia. The beans were surface disinfected with 1% chlorine prior to direct plating onto Dichloran 18 % Glycerol Agar (DG-18, OXOID). Total fungal count was obtained from serial dilutions on DG-18. Streaking onto Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, OXOID) purified a specific mould colony. Simultaneously, *Aspergillus sec. Flavi* colonies were confirmed using *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar* (AFPA, OXOID). The confirmatory test included morphological examination under phase contrast microscope. From the cocoa, Penajam sample showed the highest contamination, $1,2 \times 10^7$ CFU/g, while Malinau sample produced the least, $2,6 \times 10^4$ CFU/g. The ranges of genera identified were *Aspergilli*, *Penicillium*, *Issatchenkia*, yeasts and yeast-like fungi. All samples showed aflatoxins contamination and contained culturable spores of *Aspergillus flavus*. In particular, Penajam sample indicated the growth of *A. parasiticus*. The on-going research is to determine the level of micotoxins in each of the samples. Indonesia is the third largest exporter of raw cocoa, so that the result will have a strong significance for the country.*

I. Pendahuluan

Produksi kakao kering secara global mengalami peningkatan tahunan 6-10% sejak kurun 2001/2002 hingga 2005/2006 (ICCO, 2007). Saat ini, pasar kakao dunia berada pada kisaran 3,6 juta metrik ton dengan kontribusi Indonesia sebesar 13% dari total produksi (ICCO, 2007; UNCTAD, 2007a). Persentase tersebut menempatkan Indonesia sebagai produsen terbesar ketiga di dunia. Dalam perdagangan kakao, kualitas biji coklat ditentukan salah satunya dengan kandungan jamur, dimana 3% adalah batas maksimal yang diperkenankan untuk grade I, dan maksimal 4% untuk grade II (Minifie, 1980). Standar perdagangan ini tidak berubah selama 25 tahun (Minifie, 1999; UNCTAD, 2007b). Lebih lanjut, CODEX Alimentarius (2001a,b, c) merilis tiga revisi atas standar perdagangan coklat, tetapi tidak menyentuh aspek kontaminasi jamur penghasil toksin ataupun metabolitnya.

Dalam berbagai penelitian (Galvez *et al*, 2006; Jespersen *et al*, 2005; Schwan dan Wheals, 2004; Ardhana dan Fleet, 2003; Schwan *et al*, 1997) proses yang kompleks terjadi selama fermentasi biji coklat, sehingga dimungkinkan tumbuhnya mikroorganisme yang tidak diinginkan seperti jamur penghasil toksin (Minifie, 1999). Kakao merupakan biji buah dari pohon coklat, *Theobroma cacao*, yang tumbuh baik di daerah tropis seperti Indonesia, Amerika Latin dan Afrika (Ardhana dan Fleet, 2003; Schwan dan Wheals, 2004; Nielsen *et al*, 2006). Polong dan pulp yang menutupinya dikeluarkan dari buah dan dijemur di atas plastik terpal, boks, ataupun papan. Pada saat penjemuran, proses fermentasi terjadi secara spontan, melibatkan mikroorganisme dalam spektrum yang luas dan saling suksesif. Ardhana dan Fleet (2003) membagi proses fermentasi ini ke dalam dua kelompok besar, tahap awal (0-48 jam) dan tahap lanjut (0-120 jam). Pada tahap awal, beberapa jamur ditemukan tumbuh yaitu *Aspergillus versicolor*, *A. Wentii*, *Penicillium citrinum*, *P. purpogenum*, dan *P. ochroclhoron*. Kamir-kamir ini bertahan pada konsentrasi antara 10^2 - 10^3 CFU/g yang kemudian menurun hingga tidak terdeteksi (< 100 cfu/g) setelah 36 jam. Pada tahap lanjut, tidak dilaporkan adanya pertumbuhan jamur hingga proses fermentasi selesai. Selama proses pengeringan, aktifitas mikroorganisme masih terus berlangsung hingga membentuk karakter aroma, tekstur, dan warna yang spesifik (Ardhana dan Fleet, 2003; Nielsen *et al*, 2006).

Seperti yang dikemukakan Minifie (1980), jamur tumbuh di produk biji kakao dan menurut Pitt dan Hocking (1997) hampir semua fungi memproduksi toksin, yang disebut mikotoksin. ICMSF (2005) melaporkan kemungkinan adanya aflatoksin dan okratoksin di produk kakao, coklat, kacang-kacangan, dan sereal. Studi lanjut yang mengkonfirmasi pernyataan ini dilakukan di Italia (Tafari *et al*, 2004) sekaligus merupakan satu-satunya publikasi keberadaan okratoksin di produk kakao, sementara Batista *et al* (2003) melaporkan hal yang sama untuk produk kopi.

Proses kontaminasi jamur dari produk kering kakao dimungkinkan karena pengeringan tidak sempurna, dalam hal ini Minifie (1980) memberikan titik kritis pada level 8% kadar air dan rekomendasi 6-7%. ICMSF (2005) menyebutkan empat kategori jamur yang mengkontaminasi produk pangan, *field fungi*, *storage fungi*, *contaminant fungi*, dan *invasive fungi*. Jamur yang ditemukan pada saat proses pemanenan disebut *field fungi*, sementara pada proses penyimpanan, *storage fungi*. *Invasive fungi* adalah apabila jamur mampu menyerang biji dan disebut *contaminant fungi* jika mengkontaminasi pada saat proses pengolahan. Makalah ini merupakan bagian dari penelitian untuk mempelajari proses kontaminasi jamur dan mikotoksinnya, sehingga diharapkan dapat menghasilkan kakao dengan kualitas yang lebih baik.

II. Bahan dan Metode

Sampel Kakao

Biji kakao kering diperoleh dengan bantuan Dinas Perkebunan Propinsi Kalimantan Timur untuk tiga wilayah, Samarinda, Penajam (bagian selatan Kaltim), dan Malinau (bagian utara Kaltim), sedangkan untuk wilayah Sulawesi dan Irian Jaya menggunakan stok tahun 2004 yang tersedia di University of New South Wales. Sampel dipaket dalam kantung plastik dan disimpan pada suhu dan kelembaban ruangan, dijauhkan dari cahaya matahari langsung sebelum dianalisa.

Media

Media yang digunakan adalah Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, Oxoid), *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar (AFPA, Oxoid) dan Dichloran 18% Glycerol Agar (DG-18, Oxoid). Semua media ditambahkan suplemen Chloramphenicol 100 mg/L. Dua metode sampling digunakan untuk memperoleh spektrum fungi yang lebih luas.

Inokulasi langsung

Batista *et al* (2003) merekomendasikan 30 biji kakao, 15 diantaranya mendapat perlakuan disinfeksi permukaan dengan perendaman pada 1% asam hidroklorida selama 2 menit, untuk kemudian diletakkan secara aseptik di atas medium agar DG-18.

Inokulasi dengan pengenceran

Sebanyak 10 g biji kakao ditimbang secara aseptis dan direndam selama 30 menit pada 0.1% peptone water (Oxoid) di dalam stomacher. Setelah direndam, sampel dihancurkan menggunakan stomacher 400 sesuai Pitt dan Hocking (1997) selama 3 menit. Proses pengenceran berseri (1:9) menggunakan peptone water dilakukan sampai 10^{-5} untuk sampel Samarinda, Penajam, dan 10^{-3} untuk sampel-sampel yang lain. Setelah proses homogenisasi menggunakan vortex, 0.1 mL sampel dari 3 pengenceran terakhir di inokulasikan di atas medium DG-18 dengan teknik spread plating sesuai rekomendasi Pitt dan Hocking (1997).

Inkubasi

Koloni jamur (kapang dan kamir) yang tumbuh dihitung setelah inkubasi dalam kondisi aerobik pada suhu 25 °C selama 1-4 hari. Koloni-koloni yang berbeda diamati bentuk morfologinya dan diamati di bawah mikroskop. Tiga representasi sampel yang sejenis diisolasi dan dipurifikasi pada medium DRBC menurut metode Ardhana dan Fleet (2003).

Identifikasi

Proses identifikasi dilakukan di laboratorium Mikrobiologi, Departemen Ilmu Pangan, University of New South Wales, Sydney. Pengamatan melingkupi observasi morfologi aseksual dan seksual di bawah mikroskop fase kontras untuk mengkarakterisasi jamur-jamur. Proses konfirmasi koloni tipikal dari *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* dilakukan menggunakan medium AFPA (Pitt dan Hocking, 1997).

III. Hasil dan Pembahasan

Tabel 1 Hasil perhitungan total jamur

Sampel	Total fungal (CFU/g)
Penajam	$1,2 \times 10^7$
Samarinda	$4,0 \times 10^5$
Malinau	$2,6 \times 10^4$
Sulawesi	$3,1 \times 10^5$
Irian	$1,0 \times 10^5$

Dari hasil perhitungan total jamur, sampel Penajam menduduki peringkat terbanyak dan sampel yang berasal dari Malinau sebagai yang tersedikit. Sampel-sampel yang lainnya berada pada kisaran 10^5 CFU/g.

Tabel 2 Sebaran spesies dan genera mikroorganisme

Sampel	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	Yeasts	Bacteria
Samarinda	1		1	2	1	3	4	
Penajam	1	1		2	2	1	2	
Malinau	1			2	2	1	3	
Sulawesi	1			2				3
Irian Jaya	1			1	1	1		3

Dalam semua sampel, ditemukan kontaminan *Aspergillus flavus* dan secara khusus pada sampel Penajam, juga ditemukan *A. parasiticus*. Dilihat dari persebaran genera *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Fusarium* didapatkan informasi sampel Penajam, Malinau dan Samarinda sebagai tiga wilayah dengan diversifikasi jamur terbanyak.

Hasil observasi lainnya menunjukkan sebaran kapang (*yeasts*) terdiri dari genus *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, dan *Issatchenkia* pada sampel-sampel yang berasal dari Kalimantan Timur. Akan tetapi pada sampel yang berasal dari Sulawesi dan Irian Jaya, dengan waktu penyimpanan yang lebih lama, tidak terdeteksi (< 100 CFU/g) tumbuhnya kapang-kapang tersebut. Keadaan berbanding terbalik dengan ditemukannya bakteri pada kedua sampel terakhir dengan tiga spesies utama bakteri yang terdeteksi semuanya berasal dari grup Bakteri Asam Laktat (data tidak disertakan).

Biji kakao yang berada dalam buah dan belum dibuka disebutkan relatif steril dari cemaran mikrobiologis (Schwan dan Wheals, 2004). Dalam proses pengeluaran biji, kontaminasi terjadi dengan bantuan tangan pekerja, pisau, tempat yang tidak dicuci, maupun polong-polong kering yang tertinggal di wadah fermentasi. Dalam proses fermentasi, Schwan et al (1997), Jespersen et al (2005), dan Galvez (2006) menekankan pentingnya populasi jamur yang akan membantu mendegradasi pulp dengan bantuan enzim pektinolitik. Ardhana dan Fleet (2003) memiliki kesimpulan tambahan, bahwa khusus proses fermentasi di Indonesia, fungi berfilamen diduga memiliki kontribusi yang juga signifikan dalam proses fermentasi kakao.

Enumerasi total fungal dilakukan untuk menghitung jumlah koloni kapang dan kamir yang tumbuh pada polong kakao. Jespersen et al (2005) menyebutkan, dalam fermentasi setelah 24-72 jam ditemukan jamur pada skala eksponensial 7 CFU/g dengan komposisi utama adalah kapang. Ekologi jamur pada proses fermentasi tersebut berasal dari populasi yang

tumbuh di permukaan buah kakao (Jespersen *et al*, 2005). Hal yang sama juga diduga berlaku untuk fungi dari genera *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Fusarium*.

Panjangnya rangkaian perdagangan kakao, yang dimulai dari pemanenan, fermentasi, pengeringan, pengepakan, distribusi hingga sampai ke industri coklat (Minifie, 1999), memungkinkan adanya cemaran-cemaran tambahan yang terjadi disetiap satuan operasi produksi tersebut. Mabbett (2002) menjelaskan bahwa penyimpangan fisik pada proses penyimpanan biji kakao merupakan faktor krusial karena biji kakao bersifat higroskopis, sehingga kadar air permukaannya cepat berubah sesuai dengan kelembaban udara di sekelilingnya. Namun, ICMSF (2005) menyebutkan bahwa selain jamur yang tumbuh pada saat penyimpanan, dapat pula ditemukan invasi jamur ke dalam biji kakao.

Dalam genera *Aspergillus*, tiga spesies yang merupakan perhatian utama bagi kesehatan masyarakat adalah *A. flavus*, *A. parasiticus*, dan *A. ochraceus* (Cotty, 1997; Moss, 2002). Ketiganya menghasilkan mikotoksin yang dapat menyebabkan kanker serta mampu bertahan pada berbagai kondisi pengolahan termasuk penggunaan panas (Hocking *et al*, 1997; Pitt dan Hocking, 1997).

ICMSF (2005) menyebutkan bahwa *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus* memiliki kemampuan invasif, atau menyerang biji secara sistemik, bukan hanya dari kontaminasi pengolahan pasca panen. Faktor ini memberikan ide terhadap keberadaan *A. flavus* pada setiap sampel yang diteliti. Apabila sel hidup ditemukan, maka probabilitas adanya aflatoksin dalam semua sampel diduga sangat tinggi. Sekalipun Batista *et al* (2003) dan ICMSF (2005) menyebutkan bahwa tidak semua *A. flavus* mampu menghasilkan mikotoksin, tetapi semua varietas maupun subspecies dari *A. parasiticus* dipastikan memproduksi aflatoksin. Konfirmasi terhadap level kandungan aflatoksin saat ini masih diteliti untuk dilaporkan pada publikasi yang lain.

Sedikit berbeda dengan hasil yang ditemukan Tafuri *et al* (2004), keberadaan *A. ochraceus* penghasil okratoksin tidak ditemukan dalam semua sampel. Namun dalam sekuens lain penelitian ini, dari sampel Queensland (data tidak disertakan) berhasil diisolasi spesies tersebut. Tidak terdeteksinya sel hidup (spora maupun hifa) bukan berarti mikotoksin ini absen dalam produk kakao kering yang diteliti. Konfirmasi terhadap kandungan okratoksin masih harus dilakukan menggunakan metode kimiawi seperti HPLC (Batista *et al*, 2003).

Dari genera *Penicillium*, sekalipun membutuhkan konfirmasi lebih lanjut, diduga spesies yang tumbuh adalah *P. citrinum*. Blackburn (2006) menyebutkan keberadaan spesies ini pada hampir semua jenis bahan pangan yang diisolasi. Berdasarkan pengamatan morfologi di bawah mikroskop, semua ciri yang sesuai pada *P. citrinum* ditemukan pada isolat yang berasal dari sampel Samarinda, Penajam dan Irian Jaya. Seperti halnya genera *Aspergillus*, *Penicillium* juga merupakan jamur yang memproduksi toksin. Keberadaan *Penicillium* dalam produk seperti kopi dan kakao pada umumnya dideteksi dari kandungan toksin, sekalipun kontaminasi oleh genera ini tidak tampak (Hocking *et al*, 1997). Mekanisme kontaminasi genera ini diduga dikarenakan kandungan kadar air yang masih cukup tinggi (>8%) dan lambatnya waktu pengeringan produk selama dijemur di bawah sinar matahari.

Fusarium ditemukan secara terpisah atau sering kali bertumpuk dengan kapang-kapang yang berhasil diisolasi. Berkaitan dengan genera *Fusarium*, proses identifikasi dilakukan sampai pada tahap genera. Kesulitan identifikasi *Fusarium* dikonfirmasi dengan Nelson *et al* (1994) yang menyatakan tingginya kemampuan genera ini untuk merubah morfologi *sporodochial* dan *pinnotal*, variasi yang bergantung pada media tumbuhnya. Signifikansi keberadaan spesies *Fusarium* di dalam produk kakao kering berimplikasi terhadap

kemungkinan adanya mikotoksin yang berbahaya bagi manusia dan ternak seperti yang dijelaskan oleh Marasas *et al* (1984) dan Sugiura *et al* (1999).

Keberadaan kapang *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, dan *Issatchenkia* dikonfirmasi dalam banyak literatur (Galvez, 2006; Ardhana dan Fleet, 2003; Schwan dan Wheals, 2004). Genus yang pertama disebutkan berperan dalam proses konversi sukrosa, glukosa, dan fruktosa pada pulp menjadi etanol, serta menyediakan alkohol untuk dimanfaatkan oleh bakteri asam asetat. Genus lain yang signifikan, dan hanya ditemukan dalam tahap fermentasi adalah *Kluyveromyces* dan *Kloeckera*. Menurut Ardhana dan Fleet (2003), pada 24-48 jam pertama ditemukan *Kloeckera apiculata*, *K. javanica*, dan *K. apis* hingga konsentrasi 10^8 CFU/g kemudian turun dengan tajam hingga tidak terdeteksi setelah 48 jam. *Saccharomyces cerevisiae* ditemukan hingga akhir proses fermentasi pada konsentrasi 10^2 CFU/g (Ardhana dan Fleet, 2003). Keberadaan *S. Cerevisiae* diduga terus berlanjut hingga penyimpanan sampai dengan pengamatan sampel dalam kurun waktu 2 bulan sejak fermentasi usai. *Issatchenkia*, teleomorph dari *Candida krusei*, menghasilkan komponen aroma dalam jumlah kecil namun menentukan cita rasa akhir dari polong kakao (Schwan dan Wheals, 2004). Baik *Hanseniaspora* maupun *Issatchenkia* diduga juga merupakan kultur yang bertahan pasca fermentasi. Selaras dengan hal ini, Ardhana dan Fleet (2003) melaporkan bahwa *Candida tropicalis* mampu bertahan hingga akhir fermentasi, 120 jam, pada konsentrasi 10^3 CFU/g. Berbeda dengan kamir yang ditemukan, kapang dari *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* dan *Issatchenkia* secara umum tidak menghasilkan toksin dan lebih merupakan mikroflora yang berperan dalam proses fermentasi biji kakao (Jespersen *et al*, 2005; Schwan dan Wheals, 2004). Pseudo kamir dalam jumlah kecil juga ditemukan dalam sampel Samarinda, Penajam dan Malinau, namun tidak dilakukan penelitian yang lebih mendalam.

Sekuens penelitian yang masih berlanjut adalah untuk menentukan kadar kontaminasi mikotoksin pada masing-masing sampel dan akan dipublikasikan di kesempatan terpisah.

IV. Kesimpulan

Ekologi kakao kering didominasi oleh genera *Aspergillus* dan *Penicillium*, disamping pada beberapa sampel juga ditemukan *Fusarium*. *A. flavus* ditemukan di semua sampel, dan secara khusus pada sampel Penajam juga ditemukan *A. parasiticus*. Sel hidup kedua spesies ini merupakan indikasi kuat adanya mikotoksin pada produk kakao kering asal Indonesia. Diversifikasi jamur diperkaya dengan diisolasinya kapang *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, serta pseudo kamir pada sampel-sampel berusia 2 bulan. Secara umum, perhitungan total fungi pada semua sampel lebih dari 5 skala eksponensial, yang menunjukkan bahwa aktifitas mikrobiologis pada produk kakao kering masih berlangsung dengan intensitas yang cukup tinggi.

V. Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada pemerintah Republik Indonesia, c.q. Direktorat Pendidikan Tinggi dan Dinas Perkebunan Prop. Kaltim, Pemerintah Australia, dan Food Science Dept. UNSW.

VI. Daftar Pustaka

- Ardhana, M.M., Fleet, G.H. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, p. 87-99.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Schwan, R.F., Wheals, A.E. 2003. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 85, p. 293-300.
- Blackburn, C. W. 2006. *Food Spoilage Microorganisms*. CRC Press, Woodhead.
- CODEX. 2001a. Standard for Cocoa Butter. Codex Alimentarius. [online at] http://www.codexalimentarius.net/download/standards/66/CXS_086e.pdf [date access] 1 Oktober 2007.
- CODEX. 2001b. Standard for Cocoa powders (cocoas) and dry mixtures of cocoa and sugars. Codex Alimentarius. [online at] http://www.codexalimentarius.net/download/standards/68/CXS_105e.pdf [date access] 1 Oktober 2007.
- CODEX. 2001c. Standard for Cocoa (Cacao) Mass (Cocoa/Chocolate Loquor) and Cocoa Cake. Codex Alimentarius. [online at] http://www.codexalimentarius.net/download/standards/69/CXS_141e.pdf [date access] 1 Oktober 2007.
- Cotty, P.J. 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section Flavi from cotton producing areas in the United States. *Mycol. Res.*, 101(6), p. 698-704.
- Galvez, S.L., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M., Guiraud, J.P. 2006. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology* (article in press).
- Hocking, A.D., Arnold, G., Jenson, I., Newton, K., Sutherland, P. 1997. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. 5th ed. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group, Sydney, NSW.
- ICCO. 2007. Annual Report. International Cocoa Organization. [online at] http://www.icco.org/pdf/An_report/anrep0506english.pdf [date access] 6 Oktober 2007.
- ICMSF 2005. *Microbial Ecology of Food Commodities*. 2nd ed. *Microorganisms in Food*. 6th ed.. Chapman & Hall.
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Henholt, S., Jakobsen, M. 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, 5, p. 441-453.
- Mabbett, T. 2002. Logistics: Storing up problems?. *Coffee & Cocoa International*. [online at] http://www.vicam.com/pdf/tp_cci_sept2002.pdf [date access] 7 Oktober 2007.
- Marasas, W.F.O, Nelson, P.E., Toussoun, T.A. 1984. *Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press, University Park.

- Minifie, B.W. 1980. *Chocolate, Cocoa, and Confectionary: Science and Technology*. 2nd ed. AVI, Connecticut, USA.
- Minifie, B.W. 1999. *Chocolate, Cocoa, and Confectionary: Science and Technology*. 3rd ed. AVI, Connecticut, USA.
- Moss, M.O. 2002. Mycotoxin Review - 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist*, 16(3), p. 116-119.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., Anaissie, E.J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), p. 497-504.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., Holzapfel, W.H. 2006. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, (article in press).
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Blackie Academic & International.
- Schwan, R.F., Wheals, A.F. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 44, p. 205-221.
- Schwan, R.F., Cooper, R.M., Wheals, A.E. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbiol Technology*, 21, p. 234-244.
- Sugiura, Y., Barr, J.R., Barr, D.B., Brock, J.W., Elie, C.M., Ueno, Y., Patterson, D.G., Potter, M.E., Reiss, E. 1999. Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. *Mycol. Res.*, 103(11), p. 1462-1468.
- Tafari, A., Ferracane, R., Ritieni, A. 2004. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chemistry*, 88(4), p. 487-494.
- UNCTAD. 2007a. Production, Cocoa Market. United Nations Conference on Trade and Development. [online at] <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/cocoa/market.htm> [date access] 6 Oktober 2007.
- UNCTAD. 2007b. Cocoa Quality. United Nations Conference on Trade and Development. [online at] <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/cocoa/quality.htm> [date access] 4 Oktober 2007.