Utjecaj temperatura termičkog procesa obrade i skladištenja na neke parametre sigurnosti i kvalitete kakaove mase

Leko, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:883711

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Leko

UTJECAJ TEMPERATURA TERMIČKOG PROCESA OBRADE I SKLADIŠTENJA NA NEKE PARAMETRE SIGURNOSTI I KVALITETE KAKAOVE MASE

SPECIJALISTIČKI RAD

Osijek, rujan, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SPECIJALISTIČKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju ugljikohidrata
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Poslijediplomski specijalistički studij Sigurnost i kvaliteta hrane
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Higijena i sanitacija
Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015/16. održanoj 28. 6. 2016.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Đurđica Ačkar*

Utjecaj temperatura termičkog procesa obrade i skladištenja na neke parametre sigurnosti i kvalitete kakaove mase

Ivana Leko, 9/S-05

Sažetak:
Cilj ovoga bio rada je ispitati utjecaj termičkih procesa u izradi kakaove mase (prženja kakaovog zrna i termičke obrade kakaove mase) i skladištenja na neke parametre sigurnosti i kvalitete kakaove mase.
U tu svrhu provedeno je prženje kakaovog zrna (pri 130 °C tijekom 25 min) i termička obrada kakaove mase pri četiri različite temperature (115 °C, 120 °C, 125 °C i 140 °C tijekom 20 min) te su tako pripremljene kakaove mase skladištene na 40 °C tijekom tri tjedna.
U sirovom kakaovom zrnu, kakaovom lomu i kakaovim masama određen je udio polifenola i flavan-3-ola, peroksidni broj, broj aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni i kvasaca te su ovi parametri prćeni tijekom 3 tjedna skladištenja. Rezultati istraživanja pokazali su da peroksidni broj raste termičkom obradom i skladištenjem, ali ne utječe na sigurnost proizvoda. Udio polifenola smanjio se skladištenjem, ali flavan-3-oli bili su stabilni tijekom termičke obrade i skladištenja. Mikrobiološka kvaliteta svih masa bila je zadovoljavajuća, a najstabilnija je bila masa tretirana na 140 °C.

Ključne riječi: Kakaova masa, termička obrada, polifenoli, flavan-3-oli, mikrobiološka stabilnost

Rad sadrži: 55 stranica
13 slika
6 tablica
0 priloga
38 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu specijalističkog rada:

1.	prof. dr. sc. *Drago Šubarić*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Đurđica Ačkar*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Jurislav Babić*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Borislav Miličević*	zamjena člana

Datum obrane: 20. rujan 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

POSTGRADUATE SPECIALIST THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Carbohydrate Technology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Postgraduate specialist study Food Safety and quality

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Hygiene and sanitation
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on June 28th 2016
Mentor: *Đurđica Ačkar*, PhD, associate prof.

Influence of cocoa mass thermal treatment temperatures and storage on some parameters of safety and quality

Ivana Leko, 9/S-05

Summary:
The aim of this research was to investigate influence of thermal processes in production of cocoa mass (cocoa bean roasting and cocoa mass thermal treatment) and storage on some parameters of cocoa mass safety and quality.
Cocoa bean was roasted at 130 °C for 25 min. Cocoa mass was treated at 115, 120, 125 and 140 °C for 20 min and stored at 40 °C for 3 weeks. In cocoa bean, cocoa nibs and cocoa mass polyphenol, flavan-3-ol content, peroxide value and microbial count was determined and monitored during storage of cocoa mass. The results showed that thermal treatment and storage increase peroxide value, but not significantly. Polyphenol content decreased, but flavan-3-ols remained stable during treatment and storage. Microbial quality was satisfying, and the most stable mass was the one treated at 140 °C.

Key words: Cocoa mass, thermal treatment, polyphenols, flavan-3-ols, microbiological stability

Thesis contains:
55 pages
13 figures
6 tables
0 supplements
38 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Drago Šubarić*, PhD, prof. — chair person
2. *Đurđica Ačkar*, PhD, associate prof. — supervisor
3. *Jurislav Babić*, PhD, associate prof. — member
4. *Borislav Miličević*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: September 20, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Kakaovac 4

2.1.1. Kakao stablo 4

2.1.2. Kakao plod 6

2.1.3. Fermentacija i sušenje kakaovog zrna 7

2.1.4. Razvoj prekursora arome i boje tijekom fermentacije i sušenja 8

2.2. Sastav kakaovog zrna 10

2.2.1. Makronutrijenti kakaovog zrna 11

2.2.2. Mikronutijenti kakaovog zrna 12

2.2.3. Utjecaj mikronutrijenata kakaovog zrna na zdravlje ljudi 15

2.3. Kvaliteta kakaovog zrna 16

2.4. Parametri Mikrobiološke kakvoćE kakaovog zrna u različitim fazama obrade kakaovog zrna 17

2.4.1. Mikroorganizmi 17

2.4.2. Mikrobiološka kakvoća kakaovog zrna u različitim fazama brade 19

2.5. Tehhološki postupci prerade kakaovog zrna do kakaove mase 22

2.5.1. Čišćenje 23

2.5.2. Prženje i drobljenje kakaovog zrna 23

2.5.3. Proizvodnja kakaove mase (mljevenje) 24

2.5.4. Prerada kakaove mase 24

3. EKSPERIMENTALNI DIO 27

3.1. Zadatak 28

3.2. Materijal i metode 28

3.2.1. Određivanje kvalitete kakaovog zrna (ulazna kontrola) 28

3.2.2. Određivanje sadržaja vlage sušenjem na 105°C 29
3.2.3. Određivanje ukupnog sadržaja masti po Soxhlet-u 30
3.2.4. Određivanje peroksidnog broja 31
3.2.5. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom i flavan-3-ola (Vanilin HCl test) (Belščak i sur., 2009) 32
3.2.6. Određivanje boje 33
3.2.7. Mikrobiološka analiza 34
4. REZULTATI 38
5. RASPRAVA 45
6. ZAKLJUČCI 49
7. LITERATURA 51

Popis oznaka, kratica i simbola

LDL – Lipooprotein niske gustoće (Low density lipoprotein)

FCC – Federation of cocoa commerce

CFU – Mikrobna populacija (Colony forming unit)

PDAT – Pasterizacija, Deacidifikacija, Alkalizacija, Prženje (Pastorizzare, Deacidificare, Alcalinizzare, Torrefare)

PCA – Plate count agar

VRBG – Violet red bile glucose agar

YGC – Cloramphenicol glucose yeast extract agar

SKM – Sirova kakaova masa

PKM – Termički obrađena kakaova masa

NN – Narodne novine

1.UVOD

Europska povijest kakaovih i čokoladnih proizvoda započinje slučajnim otkrićem Kristofora Kolumba u 16. stoljeću koji donosi prve sjemenke kakaovog zrna u Španjolsku s njegovog posljednjeg putovanja. Zbog svog karakterističnog okusa i mirisa, te blagotvornog djelovanja na ljudski organizam dolazi do ekspanzije kakaovih i čokoladnih proizvoda u Europi.

Početak prerade kakaovog ploda je fermentacija pomoću mikrobne populacije prirodno prisutne na plodu i nakon toga sušenje. Sušeno kakaovo zrno se dalje prerađuje prženjem, drobljenjem i mljevenjem kako bi se dobila tekuća kakaova masa. To je osnovna sirovina za proizvodnju kakaovih i čokoladnih proizvoda svojstvenog okusa i mirisa. Kakaova masa može se termički tretirati prije daljnje prerade.

S obzirom na preradu vrlo bitan parametar sigurnosti kakaovih i čokoladnih proizvoda je mikrobiologija proizvoda, kao i očuvanje sadržaja spojeva kao što su polifenoli zbog svojih antioksidativnih svojstava, karakteristične boje i okusa kakaove mase.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi utjecaj termičke obrade i skladištenja na parametre kvalitete i sigurnosti kakaove mase. Kakaova masa tretirana je na različitim temperaturama skladištena tri tjedna. Istraživani parametri kvalitete i sigurnosti su mikrobiologija kakaove mase, sadržaj polifenola i flavan-3-ola, boja i peroksidnog broja.

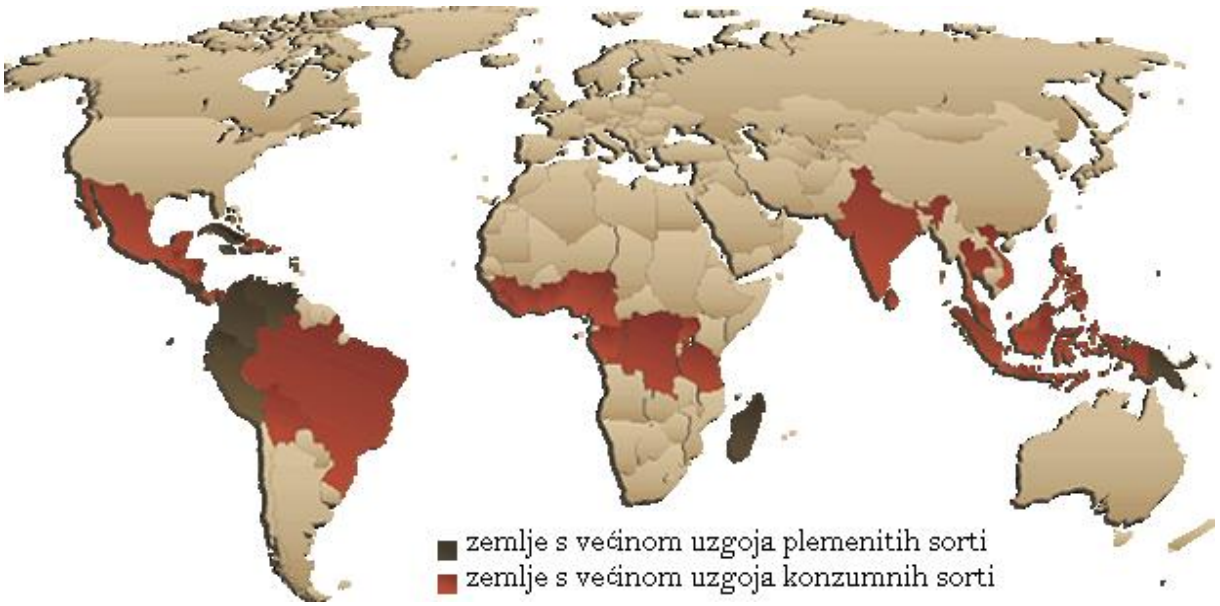
2.TEORIJSKI DIO

2.1. KAKAOVAC

2.1.1. Kakao stablo

Kakaovac je vrsta tropskog stabla. Prema biološkoj sistematizaciji potiče iz porodice *Sterculiaceae* i roda *Theobroma*. Botanički naziv kakaovca je *Theobroma cacao, L*., a porijeklom je iz Južne i Središnje Amerike. Uzgaja se u klimi tropskog pojasa sa srednjom godišnjom temperaturom 25°C. Područje uzgoja je između 20° sjeverne i 20° južne širine (**Slika 1**), a najznačajnije tri regije uzgoja su:

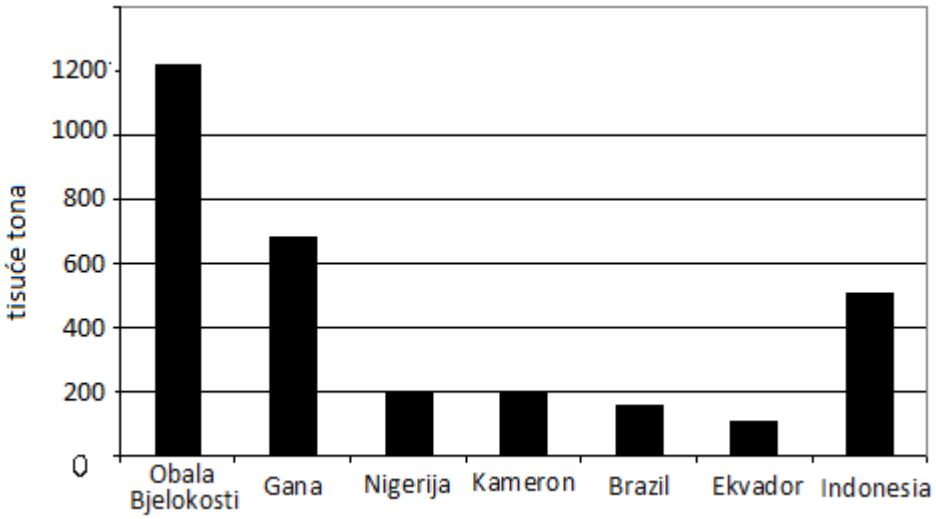
- Zapadna Afrika,
- Jugoistočna Azija i
- Južna Amerika (deZaan, 2013).



Slika 1 Regije svijeta u kojima se uzgaja kakao (TNAU Agritech Portal)

Kakao stablo naraste od 5 do 15 metara visine, debljine oko 20 cm. Najveću plodnost dostiže poslije 10 – 12 godina starosti, zadržava plodnost 20 – 30 godina. Cvjeta tokom cijele godine, a ima jedno do dva glavna doba cvjetanja. Broj cvjetova je jako veliki (6000 – 12000 tisuća i više), ali godišnje sazrije svega 20 – 50 kakao plodova. Period od cvjetanja do sazrijevanja kakao ploda traje 4 – 8 mjeseci i sazrijeva dva puta godišnje (Gavrilović, 2011).

Najveći proizvođači kakaovca kao što su Obala Bjelokosti, Gana, Nigerija, Kamerun, Brazil, Ekvador, Indonezija, Malezija komercijalno uzgajaju samo jednu vrstu, *Theobroma cacao,* sa dvije podvrste Criollo i Forastero. Na **Slici 2** su prikazane količine proizvodnje najvećih proizvođača (Hii i sur., 2009).



Slika 2 Najveći proizvođači kakao zrna (2008/09.) (Hii i sur. 2009)

Najzastupljenije podvrste kakaovca od kojih se dobiva 95 % ukupne proizvodnje kakao ploda su:

1. Criollo - najcjenjenija vrsta, finog blagog okusa i jedinstvene arome. Ova vrsta je neotporna i daje male prinose. Udio ove vrste u svjetskoj proizvodnji se kreće od 5 do 8 %.
2. Forastero - odlikuje se manje izraženim okusom, gorak i kiselkast, sa slabijim mirisom. Ovo je mlađa vrsta od Criollo vrste i otpornija je, te daje veće prinose. Ovo je najzastupljenija vrsta i u svjetskoj proizvodnji čini 70 %. Vrste koje potječu od Forastero se nazivaju i konzumne sorte.
3. Trinitario - hibrid Criollo i Forastero vrste. Vrlo je bogat kakaovim maslacem i ima jaku aromu. Stvaranju hibrida pristupilo se ne samo zbog sjedinjavanja dobrih roditeljskih osobina, već i zbog slabe otpornosti Criollo vrste. Trinitario

je osnova za finu čokoladu i zastupljena je u svjetskoj proizvodnji s 20 %. Vrste koje potječu od hibrida se nazivaju i plemenite sorte (Šimunac, 2002).

2.1.2. Kakao plod

Kakao plod se sastoji od kore, srži i sjemenki. Dužine je 15 -25 cm, debljine 7 – 10 cm i mase od 400 do 500 g. Ovisno o sorti, boja kore može biti žuta, ružičasta, crveno-smeđa, a površina izbrazdana ili glatka. Srž ili pulpa je bijele do ružičaste boje. Srž je bitna tvar tijekom fermentacije kada dolazi do razgradnje šećera iz pulpe pomoću kvasaca i bakterija. U srži ploda su vretenasto poredane kakao sjemenke, najčešće u 5 redova, a rjeđe u 8 redova i ima ih oko 20 do 50 (**Slika 3**).



Slika 3 Presjek ploda biljke *Theobroma cacao* (TNAU Agritech Portal)

Sjemenke kakao ploda su obavijene sjemenom ljuskom, a unutar ljuske se nalaze dva kotiledonska listića i klice uklopljene između njih. Kotiledon, nakon fermentacije i sušenja postaje osnovna sirovina u procesu proizvodnje kakaovih i čokoladnih proizvoda.

Prema Goldoniju (2004), u koltiledonu se nalaze tri vrste stanica: duguljaste stanice pokožice, pigmenti (fenoli, pigmenti, teobromin, kofein) i pričuvne stanice (koje sadrže mast, škrob, poteine, minerale). Nakon berbe kakao ploda, sjemenke se rasijecaju na dvije polovice i vade se rukom ili drvenom žlicom). Unutar 24 sata sjemenke se moraju podvrgnuti fermentaciji.

2.1.3. Fermentacija i sušenje kakaovog zrna

Proces fermentacije je neophodan i nezamjenjiv proces. Cilj fermentacije je hidroliza srži kakao ploda, nastanak octene kiseline, uništavanje biološke aktivnosti klice i omogućavanje uvjeta za biokemijske i kemijske promjene u kakaovom zrnu. Kao posljedica ovih promjena u koltiledonu nastaje karakteristična boja, prekursori arome i dio aromatičnih tvari. Fermentacija traje 5 do 14 dana ovisno o vrsti kakao ploda. Može se podijeliti u dvije faze s obzirom na uvjete u kojima se odvija: anaerobna sredina u kojoj dolazi do alkoholne fermentacije, hidrolize pektina i oksidacije alkohola u octenu kiselinu i aerobna sredina u kojoj se odvijaju kemijske i biokemijske reakcije te procesi oksidacije.

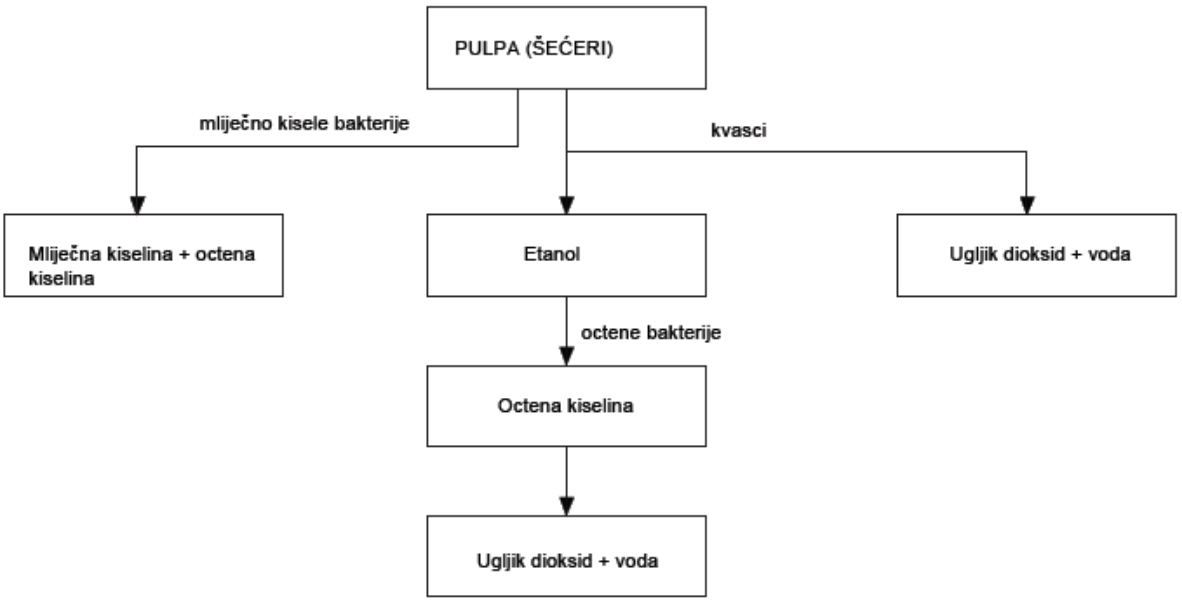
Prema Beckettu (1999), s mikrobiološkog aspekta fermentacija se odvija u tri stupnja (**Slika 4**):

I stupanj – Anaerobni kvasci - traje 24 – 36 sati. Anaerobni kvasci vrše alkoholnu fermentaciju (pretvaraju šećer u alkohol) u uvjetima smanjene količine kisika i pH ispod 4. U kiseloj sredini se odvija hidroliza pektina, raskidaju glikozidne veze i srž hidrolizira i prelazi u sok. Povećava se temperatura, octene bakterije prevode alkohol u octenu kiselinu. Dolazi do odumiranja zrna najčešće drugi dan uslijed djelovanja octene kiseline i alkohola. Sok prodire kroz kakaovu ljusku u kotiledone.

II stupanj – Mliječno-kisele bakterije – iako prisutne od početka, postaju dominantne između 48 – 96 sati. Mliječne kiseline potiskuju razvoj kvasaca. U ovim uvjetima može doći do razvoja stranog mirisa kakaovog zrna (uslijed maslačnih bakterija) i vrlo je bitno da se anaerobna sredina prekine na vrijeme uz intenzivno miješanje kakaovih zrna.

III stupanj – Bakterije octene kiseline – Iako prisutne cijelo vrijeme fermentacije, značajan porast je u aerobnim uvjetima. Dolazi do oksidacije alkohola u octenu kiselinu, te porasta temperature čak i do 50°C. Visoka vlaga i kisela sredina omogućuju jaku aktivnost enzima koji kataliziraju brojne kemijske procese. Uslijed oksidacije i razvijanja topline, protaninske tvari prelaze u taninske, formiraju se pigmenti i prekursori arome.

Načini fermentacije su različiti. Najstariji postupak fermentacije je bio u zemlji, u rupama gdje se sjemenke ostave i fermentiraju, ali nedostatak ovakvog postupka je otjecanje soka hidrolizirane pulpe (srži), te nedovoljna aeracija za procese oksidacije. Novija metoda fermentacije odvija se u pletenim košarama ili drvenim sanducima, gdje je omogućeno otjecanje soka te olakšano provjetravanje i miješanje.



Slika 4 Kemijske promjene pulpe tijekom fermentacije (Hii i sur., 2009)

Nakon fermentacije kakovo zrno sadrži količinu vode i do 60 % (Gavrilović, 2011) i mora se sušiti kako ne bi došlo do nepovoljnih promjena tijekom skladištenja. Najbolji način sušenja je na suncu, ali to često nije izvedivo zbog vremenskih prilika. Suvremenije metode sušenja su u raznim uređajima za sušenje uz stalnu kontrolu temperature. Sušenjem se zaustavlja djelovanje enzima, odvijaju procesi kondenzacije polihidroksifenola i polimerizacija razgradnih produkata proteina s polihidroksifenolima, te nastaju tvari okusa, boje i mirisa kakaovog zrna. Sušenjem se smanjuje količina vode na 5 – 7 %. Vrlo je bitno da tijekom skladištenja i transporta, vlaga zrna bude ispod kritične količine vlage od 8 % pri kojoj dolazi do razvoja plijesni (Bitsch, 2005).

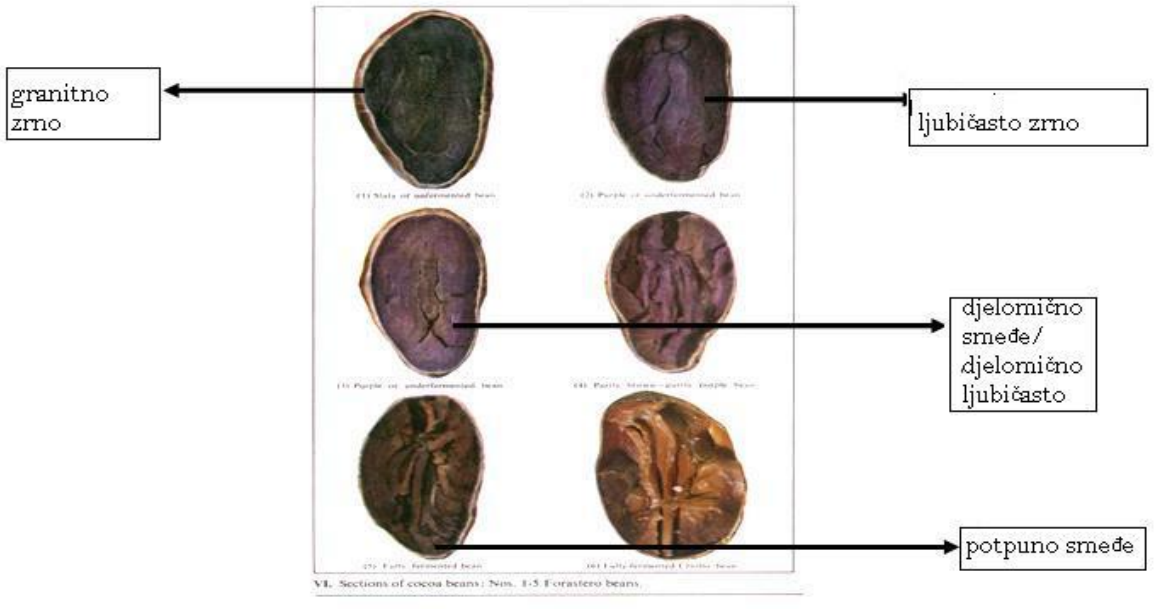
2.1.4. Razvoj prekursora arome i boje tijekom fermentacije i sušenja

Prema Beckettu (1999), razvoj prekursora arome nastaje u kotiledonu tijekom fermentacije i sušenja kakaovog zrna. Glavne dvije vrste stanica u kotiledonu su rezervne stanice koje sadrže mast i proteine te pigmentne stanice koje sadrže fenolne spojeve i ksantane (kofein i teobromin). Tijekom fermentacije kreće klijanje zrna i to uzrokuje vezivanje proteinskih

vakuola unutar rezervnih stanica. Kada dođe do odumiranja zrna, raspadaju se stanična stjenka i membrana, te dolazi do reakcija raznih spojeva i enzima. Ove reakcije proizvode prekursore arome kakaovog zrna. Stupanj reakcije je određen temperaturom i stupnjem kiselosti. Nekoliko grupa spojeva je odgovorno za nastanak aroma. Ksantani (teobromin i kofein) daju gorčinu. Tijekom fermentacije njihova količina se smanji za 30 %, najvjerojatnije radi difuzije iz kotiledona. Fenolni spojevi daju trpkost. Njihova količina također značajno opada tijekom fermentacije i sušenja.

Osnovni prekursori boje su flavanoidi, podgrupa fenola. Ljubičasta boja pulpe potiče od antocijanina koji su esteri antocijanidina i šećera. Oni brzo hidroliziraju u cijanide i šećere uz enzim glukozidazu. To uzrokuje efekt izbjeljivanja ljubičastog kotiledona kod Forastero vrste kakaovog zrna. Antocijanidini i proantocijanidini oksidiraju uz pomoć enzima, te u reakciji s amino-kiselinama i proteinima daju smeđe obojenje. Isto se događa i s ostalim flavanoidima (deZaan, 2013). S obzirom na to da u ovim procesima sudjeluje kisik, ovi procesi se odvijaju u aerobnoj fazi fermentacije te tijekom sušenja. Još jedna grupa važnih spojeva su prekursori Maillard-ovih reakcija. Nastaju iz rezervnih stanica od proteina i saharoze. Saharoza invertira u reducirajuće šećere. Enzim peptidaza hidrolizira proteine u oligopeptide i amino-kiseline. Ovi prekursori arome kakaa sudjeluju u Maillard-ovim reakcijama tijekom prženja kakaovog zrna te nastaju spojevi arome kakaa (Jumnongpon i sur. 2012.).

Na **Slici 5** prikazane su različite promjene boje kakaovca ovisno o utjecaju enzima.



Slika 5 Boja zrna kakaa ovisno o utjecaju enzima (TNAU Agritech Portal)

2.2. SASTAV KAKAOVOG ZRNA

Varijacije u sastavu kakaovog zrna ovise o sorti kakao ploda, zrelosti ploda prilikom branja, načinu vođenja procesa fermentacije, geografskom porijeklu zrna, klimatskim uvjetima i dr. U **Tablici 1** prikazan je prosječan sastav kakaovog zrna (Gavrilović, 2011). Tijekom prerade izdvaja se kakaova jezgra i uklanjaju kakaova ljuska i klica.

Tablica 1 Prosječan sastav kakaovog zrna (Gavrilović, 2011)

Sastojci (%)	Jezgra	Ljuska	Klica
Voda	5	1 – 2	5
Mast	50 – 55	1 – 2	2,5 – 3,5
Proteini	11,8 – 14	12 – 15	24,5
Teobromin	1,2 – 1,6	1 – 2	1,5
Kofein	0,2 – 0,3	0,2	0,2
Škrob	6	3	
Celuloza	9	27	4
Pentozani	1,5	7	
Pektini		8	
Šećeri	1,0		
Taninske tvari	6	1	
Organske kiseline	1,2 – 1,5		
Vitamini	+	+	
Mineralne tvari	2,6 – 4,0	5,5 – 12,4	5,7 – 6,9
Kiselinski stupanj	10	17 - 24	

Voda se u kakaovom zrnu nalazi u jezgi, ljusci i klici. Tijekom procesa prerade i sušenja kakaovog zrna sadržaj vlage se mijenja od 60 % do 5 %. Tijekom prerade kakaovog zrna izdvaja se ljuska i

klica. U tehnološkim procesima prerade kakaovog zrna sadržaj vode se i dalje mijenja. Tehnološkim postupkom prženja vlažnost kakaovog zrna smanjuje se do 1 - 2 %.

2.2.1. Makronutrijenti kakaovog zrna

Mast

Kakaovo zrno sadrži najviše masti. Prisutna je u jezgri, ljusci i klici. Tijekom fermentacije dolazi do gubitka sadržaja masti koja iscuri sa sokom i dio se zadrži na ljusci. Kemijski sastav masti u kakaovoj jezgri se ne mijenja tijekom fermentacije i sušenja. Mast kakaove ljuske je po svome kemijskom sastavu različita od masti kakaove jezgre. U kemijskom sastavu ove masti vidljivi su tragovi fermentacije (sadrži visok sadržaj neosapunjivih tvari koje potječu iz lipoida mikroorganizama zaostalih poslije fermentacije kakaovog zrna). Organoleptički ima slabija svojstva. Mast kakaove klice je smeđe boje, neprijatnog mirisa i okusa. Iskoristiva mast kakaovog zrna je mast koja se nalazi u jezgri. Mast u kakaovom zrnu se naziva kakaov maslac i to je vrlo stabilna masnoća i tijekom ispravne fermentacije, sušenja i pravilnog skladištenja ne dolazi do uočljivih promjena njezinih svojstava i sastava (Goldoni, 2004).

Proteini

Proteini u kakaovom zrnu su raspoređeni u jezgri, ljusci i klici. To su globulini, albumini, prolamini i glutelini. Tijekom fermentacije stvaraju se slobodne aminokiseline koje se inače ne nalaze u nefermentiranom kakaovom zrnu. Pravilna fermentacija ima utjecaj na hidrolizu proteina, a time i na okus kakaovog zrna. Nedovoljna fermentacija ima za posljedicu nedovoljno hidrolizirane proteine, a preduga fermentacija dovodi do povećanog udjela produkata razlaganja proteina i nepoželjnog okusa i mirisa kakaovog zrna. Važnost proteina je u tome što reagiraju sa fenolima, što daje karakterističnu boju kakaovom zrnu. Peptidi i amino kiseline su odgovorne za prekursore arome kakaovih proizvoda (Jalil i Ismail, 2008).

Ugljikohidrati

Ugljikohidrati u kakovom zrnu nalaze se u obliku škroba, celuloze, pentozana, pektina, viših saharida, disaharida i monosaharida.

Organske kiseline

Organske kiseline dijele sa na hlapljive i nehlapljive kiseline. Tijekom fermentacije mogu nastati osim octene kiseline i druge hlapljive kiseline koje nepovoljno utječu na kakao aromu. Stoga tehnološki procesi prerade kakaovog zrna uključuju postupke kojima dolazi do isparavanja hlapljivih kiselina. Nehlapljive kiseline su sastavni dio kakao arome, kao što su limunska, mliječna, vanilin, vinska i dr. Sadržaj kiselina u kakaovoj ljusci i kakaovoj klici nije dovoljno ispitan, te se u literaturi mogu naći oprečni rezultati (Gavrilović, 2011).

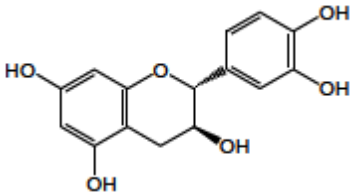
2.2.2. Mikronutijenti kakaovog zrna

Mikronutrijenti kakaovog zrna su polifenoli, teobromin i kofein, te minerali i vitamini.

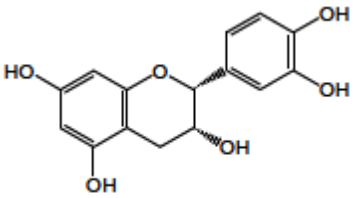
Polifenoli

Polifenoli skupa sa staničnom tekućinom difundiraju iz pigmentnih stanica i uslijed oksidacije kondenziraju u veće molekule koje nazivamo tanini.

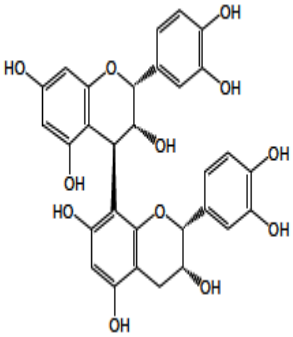
Sadržaj polifenola varira ovisno o vrsti kakaovca. Polifenoli se u svježem kakaovom zrnu nalaze u pigmentnim stanicama u kotiledonu. Tri grupe polifenola su karakteristične za kakaovo zrno: katehini ili flavan-3-oli (cca 37 %), antocijanini (cca 4 %) i proantocijanidi (cca 58 %). Ukupna količina polifenola u osušenoj bezmasnoj tvari svježeg kakaovog zrna je 15 – 20 % (što odgovara 6 % u osušenom kakaovom zrnu, koje sadrži 54 % masti i 6 % vode), ili oko 5 % u fermentiranom zrnu (ukoliko ga ima 10 % i više smatra se da fermentacija nije bila dobra). Tijekom fermentacije antocijanini brzo hidroliziraju (93 % gubitak nakon 4 dana fermentacije) i zbog toga se njihov sadržaj smatra dobrim indeksom fermentacije kakaovog zrna. Ove vrijednosti se odnose na Forastero vrstu, dok Criollo vrsta ima 2/3 ovih količina i u njima nisu nađeni antocijanini (Hii i sur., 2009). Najznačajniji polifenoli u kakaovcu su prikazani na **Slikama 6 i 7**.



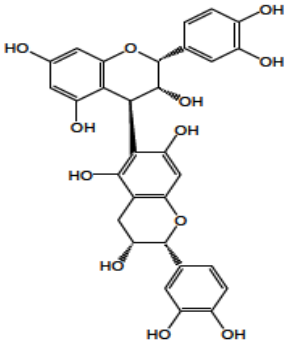
Katehin



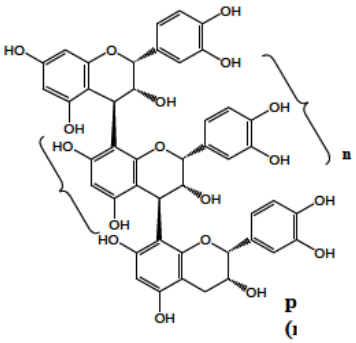
Epikatehin



Procijanid dimer B2

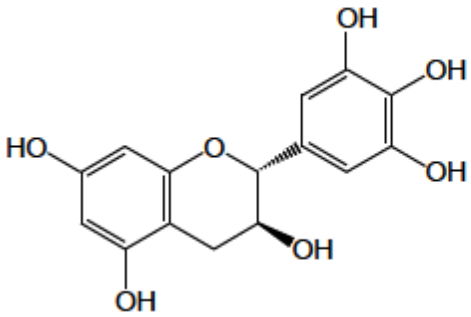


Procijanid dimer B5

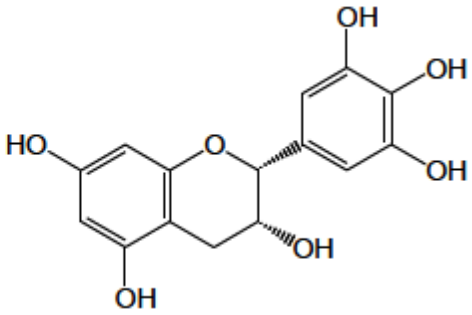


Procijanid oligomer

Slika 6 Najznačajniji polifenoli u kakaovom zrnu (Bitsch, 2005.)



Galokatehin



Epigalokatehin

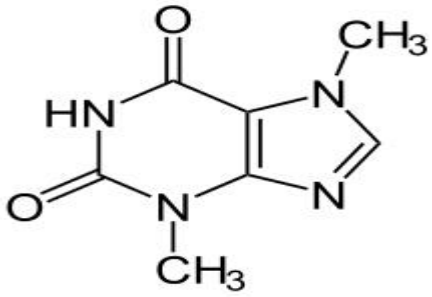
Slika 7 Dodatni katehini koji se nalaze u kakaovcu u manjoj količini (Bitsch, 2005)

Pri određivanju polifenola najčešće su primjenjivane kolorimetrijske metode za ukupni sadržaj polifenola u biljci ili hrani, uključujući Folin–Ciocalteu, Prussian-Blue i Vanilin–HCl test. Sve

metode izražavaju ukupni sadržaj polifenola (Folin–Ciocalteu, Prussian–Blue) i ukupnih flavan-3-ola (Vanlin-HCl), kao ekvivalent jednog od standardnih fenolnih spojeva, najčešće galne kiseline ili katehina (Wollgast i Anklam, 2000). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u volfram-oksid i molibden-oksid koji su plavo obojeni. Redoks potencijal ovisi o fenolnim spojevima, ali i o drugim kakaovim spojevima koji se mogu umiješati u reakciju, kao što su aromatični amini, ugljikohidrati te produkti Maillardove reakcije koji nastaju u procesima prerade kakaovog zrna. Zbog toga je potrebno pažljivo prikazati rezultate prije kao ukupna procjena fenola, nego ukupni sadržaj fenola. Suprotno tome, kod testa Vanilin-HCl, dolazi do reakcije spajanja vanilina u kiselom mediju sa epikatehinom i test je specifičan za flavan-3-ole i flavan-2,3-ole (Bitsch, 2004).

Metilesteri

Teobromin i kofein su metilesteri ksantina. Sadržaj teobromina i kofeina ovisi o sorti, načinu i trajanju fermentacije. Dio ovih spojeva odlazi sa sokom pulpe, a dio zaostaje na kakaovoj ljusci, na kojoj prije fermentacije nisu prisutni. Teobromin je vidljiv na površini kakaove ljuske u obliku bijelog mikrokristala. Na **Slici 8** prikazana je molekularna struktura teobromina.



Slika 8 Strukturna formula teobromina

Minerali

Minerali koji se nalaze u kakaovoj jezrgi su kalij, natrij, magnezij, fosfor, kalcij, željezo, bakar i dr. Kakaova masa u 100 g ima značajne količine magnezija (300 mg), fosfora (400 mg), kalija (1000 mg), željeza (18 mg), cink (4 mg) (deZaan, 2013).

Vitamini u kakaovoj jezgri su bez većeg značaja. Vitamin A prisutan je u neznačajnim količinama, vitamini B grupe i vitamin E su također bez većeg značaja (deZaan, 2013).

2.2.3. Utjecaj mikronutrijenata kakaovog zrna na zdravlje ljudi

Najznačajniji mikronutrijenti koji su najviše predmet istraživanja su polifenoli. Polifenoli se ubrajaju u fitotvari (sekundarni biljni metaboliti), a to su aktivni spojevi biljaka koji prvenstveno štite biljku od vanjskih utjecaja. Uneseni u organizam, imaju funkciju zaštite ljudskog zdravlja.

Brojne su studije oko antikancerogenog, protuupalnog, antimikrobnog, antialergijskog, imunostimulativnog i drugih svojstava polifenola. Polifenoli imaju ovakav utjecaj zbog antioksidativnih svojstava (Wollgast i Anklam, 2000).

Kakaovac je bogat izvor polifenola i zadnjih desetljeća provedena su brojna istraživanja o utjecaju polifenola iz kakaovca na zdravlja ljudi. Medicinska upotreba kakaovca se može pratiti još od Azteka, a dokumentirano je oko 150 upotreba kakaa za medicinske svrhe (Jalil, 2008). *In vitro* studije potvrđuju nekoliko bioloških svojstava procijanidina, uključujući i antioksidativni kapacitet, kao što je mogućnost izbacivanja slobodnih radikala, smanjivanje lipid peroksid radikala i inhibiranje oksidacije lipida (Ioannone i sur., 2004).

LDL oksidacija – najveći faktor za srčane bolesti i krvne žile je količina kolesterola niske gustoće (eng. *low – density lipoprotein*, LDL). Povećani sadržaj ovog kompleksa ima predispoziciju stvaranja naslaga (plaka) na koronarnim arterijama. Unošenje antioksidanasa iz hrane sprječava oksidaciju LDL-a. Studijama je dokazano da flavonoidi mogu spriječiti oksidaciju LDL *in vitro.* Po 35 g bezmasne tvari kakaovca je podijeljeno dvanaestorici muških volontera i pokazan je mali, ali značajan porast otpornosti LDL na oksidaciju dva sata nakon konzumacije (Knight, 1999).

Prema Takedi (1996), napravljena je serija ispitivanja na miševima, gdje su miševi hranjeni polifenolima iz kakaovca izloženi stresu. Miševi hranjeni polifenolima nisu pokazivali povećanje peroksida lipida u jetri i bubrezima, za razliku od miševa koji izloženi stresu nisu hranjeni polifenolima.

Neurološka je zaštita kakaovih polifenola u brojnim tipičnim i netipičnim zdravstvenim stanjima zbog starenja (Alzheimerova bolest, demencija, Parkinsonova bolest) kao i akutnim neurološkim stanjima kao što je srčani udar. Ovakva stanja mogu biti uzrokovana visokim

krvnim tlakom i izloženosti oksidativnom stresu. Antioksidacijska aktivnost flavanoida štiti od posljedica oksidativnog stresa i neuroloških smetnji koji mogu dovesti do neuroloških bolesti (Sokolov i sur., 2013).

2.3. KVALITETA KAKAOVOG ZRNA

Kvaliteta kakaovog zrna direktno ovisi o uvjetima fermentacije (dovoljna zrelost kakao ploda, vremenski uvjeti, vrijeme fermentacije, pravovremeno prekidanje fermentacije i dr.), skladištenju, transportu, te o vrsti kakaovca.

Prema Beckettu (1999), procjenu kvalitete kakaovog zrna možemo podijeliti u tri kategorije i to su tipični zahtjevi proizvođača kakaovih proizvoda i čokolade:

- Ekonomska – odnosi se na iskorištenje korisnih tvari. Kriteriji koji ulaze u ovu procjenu su ključni pri formiranju cijene. To su kriteriji kao što je sadržaj vlage (< 7 – 8 %), veličina zrna (100 zrna / 100g ili 110 / 100g), sadržaj ljuske (13 – 16 %), sadržaj masti (52 – 57 % u suhoj tvari), strane tvari (odsutne), proklijano, ravno ili infestirano zrno (< 3 %)

- Kvalitativna – odnosi se na željenu aromu, odsutnost neželjenih aroma i mirisa, fizičkih svojstava. Kriteriji koji se odnose na ovaj aspekt su: nefermentirana zrna i presjek ovakvog zrna je „slaninast“ (< 5 %), kakaova aroma, neželjene arome kao što je aroma dima (odsutne), točka topljenja kakaovog maslaca i slobodne masne kiseline u kakaovom maslacu (< 1,75 %).

  Prema FCC pravilima (eng. *Federation of cocoa commerce* LTD, FCC Quality rules) pravilno fermentiranim se smatra kakaovo zrno koje ima manje od 10 % „slaninastog“ ili oštećenog (pljesniva ili infestirana) zrna, a dobro fermentiranim ono koje ima manje od 5 % ovakvog zrna (FCC, 2012).
- Zdravstvena ispravnost – odnosi se na zdravstvenu sigurnost sirovine – granice ovih parametara su određene nacionalnom zakonskom regulativom zemlje u kojoj je tvornica smještena. Odnose se na pljesniva zrna kojih treba biti manje od 5 %, pesticide, teške metale.

2.4. PARAMETRI MIKROBIOLOŠKE KAKVOĆE KAKAOVOG ZRNA U RAZLIČITIM FAZAMA OBRADE KAKAOVOG ZRNA

2.4.1. Mikroorganizmi

Bakterije

Bakterije su prokarioti čija duljina varira od 0,3 µm do 20 µm, promjera 1 µm, a oblici u kojima se pojavljuju dijele se na četiri osnovna oblika:

- kuglaste bakterije - koki,
- štapićaste bakterije - bacili,
- zavojite bakterije - spirohete i spirili,
- prijelazni oblici – kokobacili (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).

Bakterije u prirodi žive u različitim uvjetima i njihovo razmnožavanje je uvjetovano dostupnošću hrane, vode i veličinom raspoloživog prostora, te fizikalnim uvjetima - temperature, aciditeta i osmotskog tlaka.

Prema učinku koji ima prisutnost ili odsutnost kisika na rast bakterija, možemo izvršiti podjelu na:

- obligatne ili striktne aerobe,
- fakultativne anaerobe,
- obligatne ili striktne anaerobe.

Kada se bakterijska stanica nađe u nepovoljnim uvjetima za rast i razvoj, ona može stvoriti čahuru koja ju čini otpornijom, štititi od dehidracije, a u prehrambenim proizvodima takova vrsta bakterija pridonosi onečišćenju. Neke vrste stvaraju spore koje su otporne na povišene temperature, kemijske agense, zračenja i druge vrste sterilizacije proizvoda i tako uvelike otežavaju proizvodnju zdravstveno ispravnog proizvoda, jer kada se nađu u povoljnim uvjetima takove vrste bakterija ponovno započnu proces rasta i razmnožavanja. U kakaovom zrnu tijekom obrade prate se parametri aerobnih mezofilnih, aerobnih sporogenih i patogenih bakterija (Duraković, 1996).

Gljive

Gljive su eukarioti, organizmi čije stanice imaju pravu jezgru s genetskim materijalom. Pripadaju carstvu *Fungi*, kojima pripadaju kvasci i plijesni, imaju staničnu stjenku sazidanu od polisaharida hitina. Gljive mogu biti jednostanične i višestanične. Neki višestanični oblici nalikuju biljkama, ali ne mogu obavljati fotosintezu. Jednostanični oblici su kvasci, jajolikog oblika i mnogo su veći od bakterija. U staničnom zidu kvasaca i plijesni za razliku od bakterija, nema teihoične i muraminske kiseline. Rast gljiva na umjetnim hranjivim podlogama dobro je izražen. Za svoj razvoj trebaju makroelemente u količini od oko 10^{-3} M i mikroelemente u vrlo maloj količini od približno 10^{-6} M. Sve gljive patogene za čovjeka rastu na hranjivim podlogama čije su vrijednosti pH između 5,4 - 5,6, ali većina gljiva podnosi i nižu koncentraciju (pH 2-8). Ovo svojstvo podnošljivosti različitih pH vrijednosti koristi se pri identifikaciji i izolaciji gljiva. Rast i razvoj im ovisi i o temperaturnim uvjetima okoline. Svaka vrsta ima svoju optimalnu temperaturu, ali i minimalne i maksimalne vrijednosti koje se moraju uzeti i obzir. Gljive se slično kao i bakterije mogu razvrstati u nekoliko skupina:

- psihrofilne
- mezofilne
- termofilne.

  Gljive koje su uzročnici bolesti u čovjeka najčešće pripadaju skupini mezofilnih gljiva.

Pigmenti nekih vrsta gljiva ovise o temperaturi rasta, hranjivoj podlozi i stupnju aeracije, i ti se parametri uzimaju u obzir prilikom identifikacije vrsta kvasaca.

U kvasaca se mogu razlikovati tri vrste pigmenata: karotenoidi, pulherimin i ribosilaminoimidazol (Duraković, 1996).

Plijesni

Plijesni su najtipičniji predstavnici višestaničnih gljiva. Stanice plijesni su produžene i čine cjevastu tvorevinu - hifu. Većina vrsta imaju hife dužine 5-50 µm a širina 2-5 µm. Stanice hife građene su kao i stanice kvasca a najznačajnija razlika je u sastavu staničnog zida, koji sadrži veću količinu hitina i celulozu. One tvore micelij. Reprodukciju vrše spolno i nespolno i

prehranjuju se apsorpcijom otopljene organske tvari iz svog okoliša, vode, tla, domaćina biljke ili životinje (Duraković, 1996).

Kvasci

Kvasci se potpuno razlikuju od ostalih gljiva, osnovni tip stanice je blastospora, razmnožavaju se nespolnim načinom, pupanjem. Kvasac je jednostanična gljiva, velika je 5-7 μm, ovalna ili izdužena, stanica je građena od višeslojnog staničnog zida, stanične membrane, jezgre, mitohondrija, ribosoma, glikogenskih zrnaca i vakuole. Neki rodovi kvasaca rastu u anaerobnim uvjetima. Vrlo rijetko stvaraju spore (Kalenić i Malenić-Missoni, 1995).

Enterobakterije

Porodicu *Enterobacteriaceae* čine gram-negativni štapići koji ne stvaraju spore a u odnosu na kisik, oni su fakultativni anaerobi. Pokretne vrste imaju peritrihe flagele. Razvrstane su u 22 roda i mogu uzrokovati bolest u čovjeka, a najvažniji predstavnici su salmonele i šigele. Žive u probavnom sustavu čovjeka i životinja, tlu, vodi, živom i trulom bilju gdje svojim biokemijskim aktivnostima pridonose ukupnoj ravnoteži okoliša. Enterobakterije dobro rastu na selektivnim i diferencijalnim podlogama, tvoreći velike kolonije, sjajne i glatke površine. Boja kolonija ovisi o podlogama na kojima se uzgajaju. Može biti siva na običnim hranjivim podlogama ili će boja ovisiti o indikatoru selektivne podloge, te o biokemijskoj aktivnosti pojedine vrste. Sve koriste glukozu, reduciraju nitrate i nitrite i nemaju oksidaze (Duraković, 1996).

2.4.2. Mikrobiološka kakvoća kakaovog zrna u različitim fazama brade

Fermentacija

Plijesni se pojavljuju već na kakaovom zrnu, a ovise o vlazi zrna i njegovoj temperaturi. Plijesni mogu rasti do kotiledona (jezgre) zrna i tako mogu narušiti kvalitetu zrna.

Rod *Aspergillus (A. fumigatus*, *A. glaucus, A. niger, A. flavus, A. tamarii*) se najčešće pojavljuje tijekom fermentacije gdje dovode od pojave stranog, netipičnog okusa. Plijesni roda *Penicillium i Mucor* također doprinose lošim i neprihvatljivim okusima. Neke plijesni i određene bakterije imaju sposobnost stvaranja lipaza, koje iz takove sirovine kasnije stvaraju problem u produktima

proizvodnje, kao što je kakaova masa. Rezistentne su na niski pH tijekom fermentacije, kada se proizvodi mliječna kiselina. Kvasci koji sudjeluju u fermentaciji kakaovog zrna dolaze iz okoline, npr. tla, drveća itd. Najčešće prisutne vrste su *Saccharomyces spp*. (posebno *S. cerevisiae*), *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata, Pichia fermentans, Hansenula anomala* i *Schizosaccharomyces pombe.* Kvasci se množe vrlo brzo tijekom fermentacije i mogu preživjeti sušenje i skladištenje. Prema istraživanju Hansen i Welty-a (1970), čak i više od 10^7 kvasaca u gramu se može pronaći u uskladištenom kakaovom zrnu (preuzeto iz: Beckett, 1999). Prisutnost bakterija roda *Bacillus* na početku fermentacije je u manjem broju i rezultat su manipulacije zrnom ili onečišćenja zraka. Početkom fermentacije smanjuje se pH sredine, prilično je nizak što onemogućava namnažanje, no već u ranoj fazi (kada pH počinje rasti i povećanjem temperature), *Bacillaceae* prevladava florom kakaovog zrna dosežući broj 10^8 bakterija po zrnu (Beckett, 1999). Najčešće prisutne bakterije roda *Bacillus* su *Bacillus cereus, B. megaterium, B. subtilis, B. coagulans, B. pumula i B. stearothermophilus.* Sadržaj šećera, raspoloživost kisika i porast temperature su najvažniji faktori za njihov rast i razvoj.

Mliječne bakterije su sposobne proizvesti značajnu količinu mliječne kiseline i odigrati važniju ulogu u fermentaciji heksoza, pentoza, organskih kiselina i fenolnih spojeva. Različite vrste mliječno-kiselih bakterija nastanjuju kakaovo zrno sukladno s njihovom optimalnom temperaturom rasta tijekom fermentacije. Određene vrste kao što su *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus fermentum* koriste različiti sustav proizvodnje octene kiseline. Osim mliječno-kiselih bakterija, neke octene bakterije žive među florom kakaovog zrna. *Acetobacter* i *Gluconobacter* oksidiraju etanol tijekom fermentacije da bi proizvele octenu kiselinu, ugljični dioksid i vodu. Produžena fermentacija može rezultirati kolonizacijom kakaovog zrna bakterijama koje se namnažaju kada pH ponovno počne rasti do vrijednosti približno pH 6 -7. Među tim vrstama pronalazimo *Pseudomonas, Enterobacter ili Escherihia*, koje proizvode truli miris. U postupku sušenja kakaovog zrna, vlaga se reducira na 5 – 7 %, a 8 % se smatra kritičnom granicom iznad koje dolazi do rizika kontaminacije plijesnima tijekom skladištenja. Pravilno osušeno zrno ima gljivičnu floru koja se sastoji od vrsta opisanih iznad, a razina nastanjenosti broji i do 10^5 CFU/g. Zrna opisana kao pljesniva obično sadrže 10^9 CFU/g s većim brojem zabranjenih vrsta, obično su *to Aspergillus, Penicillium* i *Paecilomyces.* Rezultati njihovog lipolitičkog djelovanja su povećanje sadržaja slobodnih masnih kiselina, smanjenje točke tališta masti te proizvodnja stranih mirisa.

Termička obrada kakaovog zrna

Termička obrada kakaovog zrna se radi na temperaturama 95 – 145 °C, zavisno o opreme, vrste kakaovog zrna, te traženog proizvoda. Većina mikroflore se nalazi na ljusci kakaovog zrna i izlaganje zrna visokoj temperaturi značajno reducira broj mikroorganizama.

Nakon prženja, da bi se zrno moglo dalje procesuirati, potrebno ga je ohladiti. Hlađenjem u kakaovom zrnu se događa očvršćivanje kakaove masti, te je jednim dijelom u ovoj fazi opasnost od kontaminacije mikroorganizmima moguća zbog manipulacije, a drugim dijelom od mikroorganizama koji stvaraju spore u nepovoljnim uvjetima.

Takove spore su se mogle razviti tijekom prethodne faze prženja, a sada u povoljnim uvjetima razviti u vegetativan oblik zadržavajući prijašnja patogena svojstva. Mikrobiološki problemi u industriji proizvodnje kakaovih proizvoda i čokolade su jedinstveni i povezani su s dvije glavne karakteristike proizvoda:

1. Proizvodi imaju nizak aktivitet vode (a_w) ekvivalentan ravnoteži relativne vlažnosti (Rh).

2. Proizvodi sadrže puno masti i visok postotak šećera.

Oba faktora mogu biti pogodna za razvoj mikroorganizama. Nizak aktivitet vode (oko 0,3), za rast bakterija i plijesni nije pogodan čak i za osmofilne kvasce i kserofilne plijesni, ali opstanak spora ovih vrsta bakterija u takovim uvjetima nije upitan. Nizak aktivitet vode može biti nepovoljan za uništavanje bilo kojih prisutnih bakterija, jer ne dozvoljava upotrebu postupaka vlaženja i zagrijavanja. Najveći mikrobiološki rizik predstavlja prisutnost *Salmonellae spp.* Ova vrsta bakterija se ne pojavljuje u fermentaciji niti dolazi u prirodnom okruženju, ona je mikroorganizam koji dolazi iz probavnog trakta ljudi ili životinja. Može preživjeti u postupku fermentacije kakaovog zrna, kontaminirati zrno tijekom uklanjanja pulpe, okretanja zrna tijekom aeracije (ponekad se obavlja nogama) ili tijekom sušenja zrna. Od kada je otkrivena prisutnost ove bakterije u kakaovcu, postaje najvažniji rizik za zdravlje povezan s čokoladnim proizvodima. Slijedeći činjenicu da je *Salmonellae* prisutna u ovim proizvodima, Udruženje proizvođača čokolade Sjedinjenih Američkih Država provelo je istraživanje opstanka bakterija koje je pokazalo sljedeće:

1. 30 *Salmonellae* u 100 g mliječne čokolade može biti uništeno zagrijavanjem na 71°C/ 20 h.

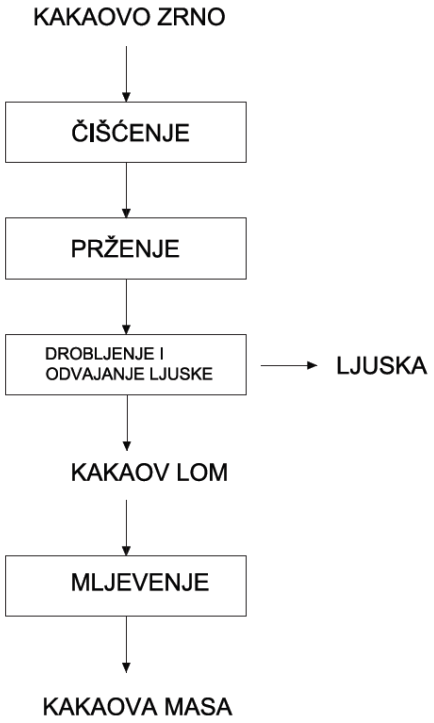
2. Vrijeme se može smanjiti na 8 h ako se doda 1 % vode i na 4 h ako se doda 2 % vode.

Također je dokazano da koncentracije manje od 10^4 *Salmonellae* mogu izazvati ozbiljne zdravstvene probleme (Beckett, 1999).

Poznata je i termička obrada kakaove mase koja iako se ne radi isključivo radi mikrobioloških kriterija dodatno reducira broj mikroorganizama u proizvodu (Gavrilović, 2011).

2.5. TEHHOLOŠKI POSTUPCI PRERADE KAKAOVOG ZRNA DO KAKAOVE MASE

Najvažnije tehnološke funkcije prerade kakaovog zrna su čišćenje zrna, prženje, drobljenje zrna i odvajanje kakaove ljuske i klice. Kakov lom se dalje usitnjava i prelazi u tekuću fazu, kakaovu masu. **Slika 9** prikazuje shemu tehnološkog procesa prerade kakaovog zrna do kakaove mase.



Slika 9 Shema proizvodnje kakaove mase (Knight, 1999)

Kakaova masa se može dodatno tretirati postupcima koji oplemenjuju kakaovu aromu i boju (Maillardova reakcija) i predstavljaju dodatnu sigurnost za proizvod (termička obrada i redukcija mikroorganizama).

2.5.1. Čišćenje

Prerada kakaovog zrna započinje postupkom čišćenja. Odstranjuju se metalni dijelovi, komadi ljuske, prašine, kamenje, pijesak i dr.

Postupak čišćenja se sastoji od više faza:

- uklanjanje grubih i finih nečistoća prosijavanjem,
- uklanjanje metalnih nečistoća pomoću magneta,
- uklanjanje kamena i drugih nečistoća veće specifične težine i
- skupljanje prašine kroz nekoliko koraka čišćenja (Beckett, 1999).

2.5.2. Prženje i drobljenje kakaovog zrna

Prženje je važna operacija prerade kakaovog zrna jer se njime razvija kakaova aroma, lakše uklanja ljuske, uništavaju se mikrobiološki kontaminanti. Tradicionalno se vrši prženje cijeloga zrna. Ujednačenost veličine zrna je vrlo bitna kada se vrši prženje cijeloga zrna, jer kod manjih zrna može doći do prepržavanja, a kod prevelikih do nedovoljnog prženja. Također, kod cijeloga zrna dolazi do manjeg isparavanja kakao arome jer je zrno zaštićeno ljuskom (Beckett, 1999.).

Temperature prženja su 100 – 150 °C uz određeno vrijeme zadržavanja. Uvjeti temperature i vrijeme zadržavanja ovise o kvaliteti kakaovog zrna i poluproizvoda. Prženjem kakaovog zrna mijenja se boja kakaove jezge koja postaje tamnija. Smanjuje se sadržaj vlage i značajno reducira broj mikroorganizama. Nastaje i niz fizikalno-kemijskih promjena kojima nastaje karakteristična kakao boja i aroma u ovisnosti o temperaturi prženja.

Variranje procesa prženja u ovisnosti o temperaturi i vremenu prženja može promijeniti sastav i sadržaj polifenola u kakaovom zrnu. Prema Kealyi i sur. (1998) ispitivan je sadržaj polifenola u kakaovom zrnu prženom na tri temperature: 127 °C, 159 °C i 181 °C i nakon toga u dva koraka mljeveno u kakaovu masu. Porastom temperature prženja sa 127°C na 181°C sadržaj ukupnih polifenola se smanjio sa 24618 μg/g na 12786 μg/g, a sadržaj procijanida sa 1953 μg/g na 425 μg/g. Uočeno je da je temperatura bitan faktor u održavanju sadržaja polifenola, posebno većih oligomera (Wollgast i Anklam, 2000).

Prženjem zrno postaje krto i suho s povećanim međuprostorom između jezgre i ljuske. Ljuska postaje krta, a klica tvrda. Pravilno odabrani temperatura i vrijeme prženja omogućuju lakše odvajanje ljuske i klice.

Drobljenje kakaovog zrna se vrši u svrhu odvajanja ljuske i klice od kakaovog loma. Prženo kakaovo zrno sadrži 10 – 15 % kakaove ljuske, ovisno o sorti i porijeklu kakaovca i oko 1 % klice. U kakaovom lomu zaostaje dio ljuske koji ne bi trebao biti veći od 1 – 1,5 %, zbog nepovoljnog utjecaja na kakaovu aromu i boju, te otežanog mljevenja kakaovog loma (Lee i Jackson, 2008). Kakaov lom ima higroskopna svojstva i čuva se u zatvorenim spremnicima.

2.5.3. Proizvodnja kakaove mase (mljevenje)

Kakaov lom ima očuvanu strukturu kotiledona i kakaov maslac se nalazi unutar nje u krutom stanju. U svrhu daljnje obrade kakaov lom se mora usitniti u kakaovu masu. U postupku usitnjavanja dolazi do razaranja stanične stjenke kotiledona i iz stanice se oslobađa kakaov maslac. Uslijed trenja dolazi do povišenja temperature iznad točke topljenja kakaovog maslaca i masa prelazi u tekuću fazu. Smanjuje se veličina čestica bezmasne suhe tvari i kakaova masa je sve više tekuća. Usitnjavanje se najčešće vrši u dvije faze, grubo i fino usitnjavanje. Veličina čestica nakon usitnjavanja ovisi o namjeni kakaove mase. Za proizvodnju kakaovog maslaca i kakaovog praha je poželjna manja veličina čestica, dok za izradu čokoladnih masa nije bitna veličina čestica jer se ona usitnjava u kasnijim fazama obrade kao što je valcanje (Goldoni, 2004).

2.5.4. Prerada kakaove mase

Nakon mljevenja, postupka proizvodnje kakaove mase u tekućem stanju, ista se može skladištiti na temperaturama 40 – 45 °C prije daljnje proizvodnje kakaovih i čokoladnih proizvoda ili se vršiti prerada kakaove mase. Prerada kakaove mase u tekućem stanju nije tradicionalni postupak proizvodnje, već unaprjeđenje postupka proizvodnje u smjeru oplemenjivanja arome i boje, reduciranja količine mikroorganizama, skraćivanja vremena kasnije prerade kakaove mase (skraćivanje vremena končiranja) i dr. Jedan od nekonvencionalnih postupaka u preradi kakaovih proizvoda je postupak Carle-Montanari (Carle Montanari je poznata talijanska tvrtka opreme za konditorsku industriju), odnosno obrada kakaove mase u PDAT reaktoru (Goldoni,

2004). Sam naziv dolazi od početnih slova tehnoloških operacija na talijanskom jeziku koje se mogu u njemu obavljati.

- P – *Pastorizzare* (pasterizacija)
- D – *Deacidificare* (deacidifikacija ili uklanjanje kiselina)
- A – *Alcalinizzare* (alkalizacija)
- T – *Torrefare* (prženje)

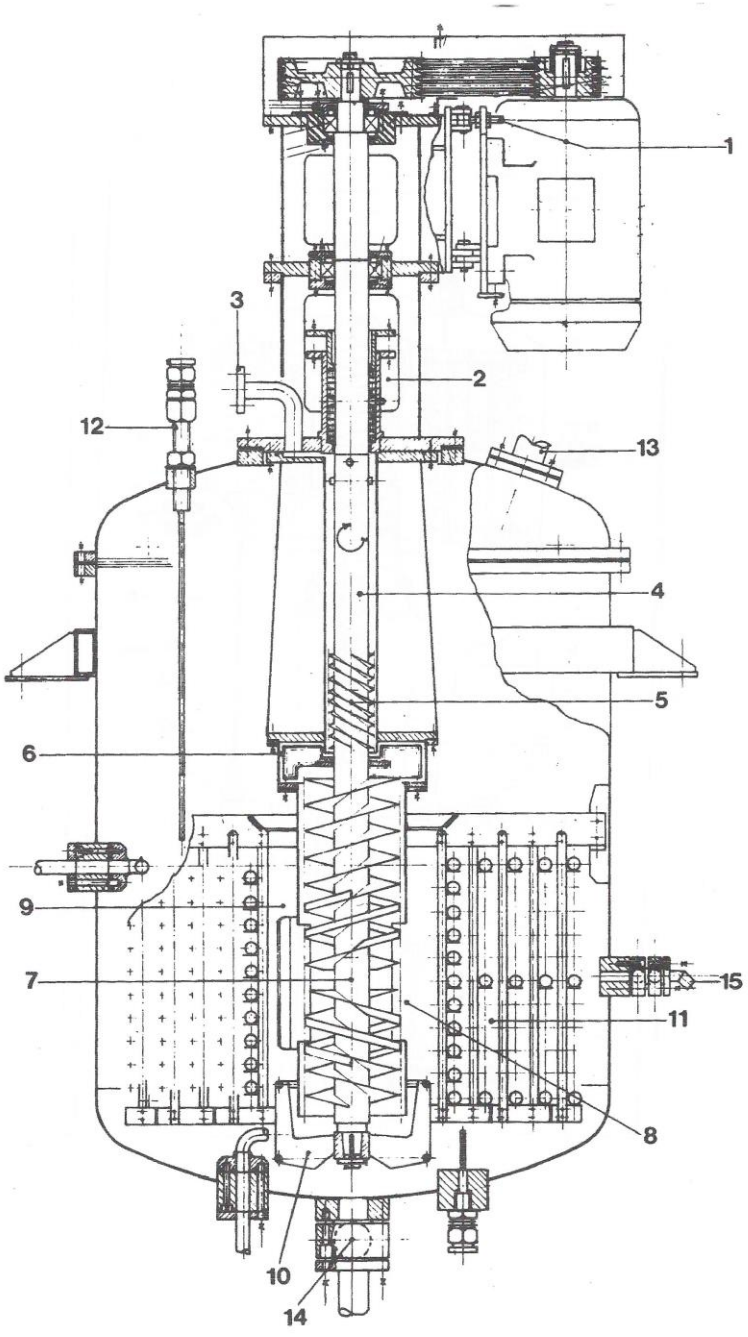
Pasterizacija se provodi zagrijavanjem kakaove mase u vlažnom mediju. Vlažni medij se postiže prirodno prisutnom vodom u kakaovoj masi zajedno s malim količinama dodane vode koji omogućava postizanje boljih rezultata kod nižih temperatura i kraćih vremena trajanja. Dodatak vode je 1,5 – 2,0 %.

Uklanjanje kiselina je prirodna posljedica pasterizacije. Također uključuje mokro zagrijavanje s prisutnom vodom koja se eliminira skupa s hlapivim kiselinama u uvjetima vakuuma i povišene temperature.

Alkalizacija je postupak u kojem se kakaova masa tretira s otopinom kalij klorida. Izvodi se u ciklusu pasterizacije, ali umjesto dodatka vode dodaju se alkalne otopine. U krajnjoj fazi alkalizacije vrši se sušenje upuhivanjem vrućeg zraka i primjenom vakuuma. Kontakt kakaove mase i zraka u ovoj fazi je potpun raspršivanjem mase u tankom filmu („kišobran efekt“), olakšavajući oksidaciju što potiče razvijanje arome i boje (Maillardova reakcija).

Prženje je postupak u kojem se kakaova masa raspršena miješalicom u formu tankog tekućeg filma zagrijava uz istovremeno ubacivanje vrućeg zraka. Ova faza izvodi se poslije operacije pasterizacije. Ubacivanje vrućeg zraka se izvodi uz istovremeno miješanje mase u uvjetima finog vakuuma. Zadnja faza obrade je tretiranje kakaove mase u uvjetima jačeg vakuuma za sušenje kakaove mase i postizanje arome.

Na **Slici 10** prikazan je reaktor PDAT.



Slika 10 Reaktor PDAT Carle & Montanari (Gavrilović, 2011; Beckett 1999)

1, 2 – motori specijalnog mješača, 3 – priključak za otopine i plin, 4 – uspravni mješač, 5,7 – pumpe, 6 – komora za disperziju, 8,9 – protjecanje kakaove mase, 10 – centrifugalni mješač, 11 – izmjenjivač topline, 12 – kontrola punjenja, 13 – ulaz kakaove mase, 14 – izlaz tretirane kakaove mase, 15 – uzimanje uzoraka.

Prednosti ovoga procesa su uklanjanje hlapivih kiselina, razvijanje boje i arome, redukcija mikroorganizama.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovoga rada bio je utvrditi utjecaj termičke obrade i skladištenja na neke parametre kvalitete i sigurnosti kakaove mase.

U tu svrhu potrebno je:

1. provesti prženje kakaovog zrna (pri 130 °C tijekom 25 min);
2. provesti termičku obradu kakaove mase pri četiri različite temperature (115 °C, 120 °C, 125 °C i 140 °C tijekom 20 min);
3. pripremljene kakaove mase skladištiti na 40 °C tijekom tri tjedna.
4. u sirovom kakaovom zrnu, kakaovom lomu i kakaovim masama odrediti udio polifenola i flavan-3-ola, peroksidni broj, broj aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni i kvasaca te ove parametre pratiti tijekom 3 tjedna skladištenja.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Određivanje kvalitete kakaovog zrna (ulazna kontrola)

1) Određivanje kvalitete kakaovca „cut“ testom – određuje se sadržaj slabo fermentiranih zrna

3 puta po sto komada kakaovih zrna staviti u metalnu giljotinu i prerezati ih na pola. Pregledati presjek zrna. Dobro fermentirana zrna su tamnije ili svjetlije smeđe boje. Presjek slabo fermentiranih zrna je ljubičaste boje i slaninastog presjeka. Broj takvih zrna u 100 komada izražava se kao %. Prilikom pregleda presjeka zrna određuje se i sadržaj pljesnivih i infestiranih zrna. Broj takvih zrna u 100 komada izražava se kao %.

2) Određivanje broja zrna u 300 g

Izvagati 300 g zrna i u odvaganoj količini odrediti broj zrna.

3) Određivanje količine jezgre, ljuske i klice

Odvagati 100 g kakaovog zrna, te sa svakoga zrna odvojiti jezgru, ljusku i klicu. Izvagati količinu ljuske, klice i jezgre i vrijednost izraziti u %.

3.2.2. Određivanje sadržaja vlage sušenjem na 105°C

Priprema kvarcnog pijeska: Kvarcni pijesak se žari u mufolnoj peći 3 sata na temperaturi od 550 – 600°C. Potom se hladi u eksikatoru. Prije odvage uzorke je potrebno homogenizirati.

U prethodno ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu sa oko 50g kvarcnog pijeska, staklenim štapićem i poklopcem, odvagati 3,5g uzorka s točnošću 0,001g.

Uzorak dobro izmiješati s kvarcnim pijeskom i staviti u sušionik zagrijan na 105 °C.

Dužina sušenja kakaovog zrna je 2 h, a dužina sušenja prženog kakaovog zrna, kakaovog loma i kakaove mase je 1 h. Nakon sušenja posudice staviti u eksikator, hladiti 30 minuta na sobnu temperaturu, te potom izvagati.

Pri ispitivanju svakog uzorka rade se istovremeno dva određivanja (paralele), a razlika između određivanja ne smije biti veća od ± 0,10% srednje vrijednosti.

IZRAČUN:

$$vlaga\% = \frac{a-b}{c} \times 100 \qquad (1)$$

Gdje je:

a – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posudice s uzorkom nakon sušenja i hlađenja (g)

c – masa uzorka za analizu (g)

Kao rezultat je uzeta aritmetička sredina dva određivanja.

3.2.3. Određivanje ukupnog sadržaja masti po Soxhlet-u

Ukoliko uzorak nije homogen kao npr. kakao zrno, najprije se mora dobro samljeti u mlinu za kavu. Na tariranom filter papiru odvagati uzorak i to ako se očekuje sadržaj masti preko 20 % odvaga je 3,0 g, a ako je ispod 20 % onda je odvaga 5,0 g. Potom se doda 100 ml 4 N HCl, tikvica se spoji s povratnim hladilom i kada prokuha ostavi kuhati 20 min. Zatim se hladilo i sadržaj isperu s oko 100 ml vruće destilirane vode.

Erlenmayer tikvica se skine i sadržaj se filtrira preko dvostruko nabranog filter papira, koji je prethodno navlažen vrućom destiliranom vodom. Tikvica se dobro ispere vrućom destiliranom vodom, kao i filter papir, iskustveno do oznake na posudi u koju se filtrira. Filter papir se s lijevkom za odjeljivanje stavlja u sušionik na 105°C. Uzorak je suh kada je vidljivo odvojen od filter papira.

Osušeni filter papir s uzorkom stavi se u papirnati ekstrakcioni tuljak 33 x 94 mm koji se dobro zatvori s vatom. Tako pripremljeni tuljak stavi se u ekstrakcioni dio aparature po Soxhletu i na odvaganu tikvicu po Soxhletu u koju smo stavili nekoliko kuglica za vrenje. Preko ekstraktora ulijevamo petroleter koji ne smije ispuniti više od 3/4 volumena tikvice. Tako pripremljeno hladilo i tikvica s uzorkom i petroleterom postavlja se na električno suho kuhalo i otvori voda za hlađenje Leibegovog hladila. Ekstrakcija traje oko 7 sati i pri tome petroleter treba procirkulirati oko 30 puta.

Po završetku ekstrakcije, prije rastavljanja aparature, pričeka se prije samog prelijevanja petroletera. Potom se aparatura rastavlja i petroleter se s ekstrakcionim tuljkom ulijeva u plastični lijevak gdje se odjeljuje petroleter od tuljka koji zaostaje u lijevku. Još jednom se ekstrakcioni dio sastavi sa Soxhlet tikvicom i ostavi još par minuta dok sav petroleter ne prijeđe iz Soxhlet tikvice u ekstrakcioni dio koji se još jednom odjeljuje. Ovisno koliko ima uzoraka toliko ima i Soxhlet tikvica koje se nakon ekstrakcije stavljaju u sušionik na 105 °C oko 1 h i 15 minuta. Tada se tikvice hlade u eksikatoru oko 30 minuta. Nakon hlađenja tikvice se važu.

IZRAČUN:

$$\%\, masti = \frac{a \times 100}{b} \qquad (2)$$

Gdje je:

a = težina ekstrahirane masti koja se dobije iz razlike tikvice s ekstrahiranom masti i prazne tikvice

b = odvaga uzorka (3 g ili 5 g)

$$mast\ (\%\ s.tv.) = \frac{\%\ masti}{100 - \%\ vlage} \quad (3)$$

3.2.4. Određivanje peroksidnog broja

U čašu od 100 ml odvagati 2,5 g uzorka. Dodati menzurom 15 ml 25 % kloridne kiseline, staviti satno stakalce i stakleni štapić. Postaviti čašu na grijaću plohu da se uzorak otopi i razori, boja postane tamnosmeđa. Ostaviti da se uzorak ohladi. Kvantitativno prenijeti uzorak u odmjerni cilindar za izmućkivanje. Zatim redom dodati otapala: 10 ml etanola 96 %, 25 ml dietil etera, 25 ml petroletera. Odmjerni cilindar zatvoriti i snažno promiješati 30 – tak puta i ostaviti dok se slojevi ne odvoje (2 h).

Iz gornjeg bistrog dijela stupca u odmjernom cilindru odmjernom pipetom prenesemo 25 ml bistrog dijela otopine u prethodno osušenu (45 min / 105°C) i izvaganu tikvicu sa par staklenih kuglica. Tikvicu stavimo na grijaču ploču da otpari otapalo. Nakon toga se tikvica suši u sušioniku na 105°C 45 minuta. Hladi se u eksikatoru 30 minuta i važe. Postupak ponavljamo do konstantne mase, ali vrijeme sušenja traje 15 minuta. Nakon završenog sušenja u tikvicu se doda 10 ml ledene octene kiseline i 1 ml zasićene otopine kalij jodida. Sadržaj u tikvici miješati točno 1 minutu. Dodati 20 ml destilirane vode (prethodno prokuhane i ohlađene). Sadržaj u tikvici izmiješati i titrirati s 0,01 M natrij-tiosulfatom do nestanka plave boje. Slijepu probu raditi po istom postupku, bez uzorka.

IZRAČUN:

$$PBr\ (mmol\ O_2/kg) = \frac{v - v_0}{m - m_0} \times 5 \quad (4)$$

Gdje je:

v- volumen 0,002 M natrij tiosulfata utrošenog za titraciju uzorka (ml)

v_0 – volumen 0,002 M natrij tiosulfata utrošenog za titraciju slijepe probe (ml)

m - odvaga uzorka nakon sušenja (g)

m_0 – odvaga prazne osušene tikvice (g)

3.2.5. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom i flavan-3-ola (Vanilin HCl test) (Belščak i sur., 2009)

Priprema uzorka za oba testa je zajednička. Odmašćivanje uzorka i ekstrakcija sa zakiseljenim acetonom.

ODMAŠĆIVANJE UZORKA:

Odvagati 5 g uzorka i ekstrahirati sa 25 ml n-heksan 15 minuta na magnetskoj mješalici. Izmiješani uzorak staviti u kivetu i centrifugirati uzorak 10 minuta na 3000 rpm. Supernatant baciti, a uzorak staviti u staklenu čašu s magnetom uz ispiranje kivete 25 ml n-heksana te ponoviti ekstrakciju još 2 puta. Uzorak raširiti u Petrijevu zdjelicu i sušiti preko noći.

Izvagati 2,0 g odmašćenog uzorka u staklenoj kiveti. Dodati 5 ml zakiseljenog acetona, promiješati na mješaču i ostaviti na tamnom mjestu 1 h. Nakon toga centrifugirati uzorak 10 min, na 3000 rpm. Supernatant profiltrirati u odmjerne tikvice od 10 ml. Na talog u kivetu ponovo dodati 25 ml zakiseljenog acetona, promiješati na miješaču i ponovo ostaviti 1 h na tamnom. Supernatant profiltrirati u istu odmjernu tikvicu od 10 ml i nadopuniti zakiseljenim acetonom do oznake.

Ovaj uzorak koristi za određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocaletu reagensom i flavan-3-ola Vanilin HCl testom.

ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA FOLIN-CIOCALETU REAGENSOM:

Uzeti 0,5 ml iz pripremljenog uzorka, dodati 2,5 ml otopine Folin-Ciocateu reagensa, 30 ml destilirane vode i 7,5 ml otopine natrijevog karbonata u odmjernu tikvicu od 50 ml. Izmiješati i nadopuniti tikvicu destiliranom vodom do oznake. Raditi u dvije paralele. Ostaviti da stoji 2 h na

tamnom mjestu. Mjeriti apsorbancu na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Iz baždarne krivulje za galnu kiselinu izračunati sadržaj polifenola.

ODREĐIVANJE FLAVAN-3-OLA VANILIN HCl TESTOM:

Uzeti 0,5 ml pripremljenog uzorka i dodati u plastičnu kivetu s čepom. Dodati 3 ml 4 % otopine vanilina u metanolu i ostaviti 5 min. Nakon toga dodati 1,5 ml koncentrirane kloridne kiseline. Kivetu zatvoriti čepom i ostaviti u hladnoj kupelji (s ledenicama) 15 minuta. Usporedno raditi i slijepu probu, gdje se umjesto 3 ml 4 % otopine vanilina doda 3 ml metanol. Izmjeriti apsorbancu u odnosu na slijepu probu.

Izračun:

$$flavan - 3 - ol = 290{,}8 \times \Delta E \quad (5)$$

3.2.6. Određivanje boje

Za određivanje boje škroba korišten je kromametar Konica Minolta CR-400, s nastavkom za krut uzorke. Prije mjerenja boje kromametar je kalibriran pomoću kalibracijske pločice. Za svaki uzorak provedeno je pet mjerenja.

U CIELab sustavu određuju se tri parametra boje:

L*, koji se kreće u rasponu 0 (crno) – 100 (bijelo)

a*, pokazuje odnos crveno (pozitivne vrijednosti) – zeleno (negativne vrijednosti)

b*, pokazuje odnos žuto (pozitivne vrijednosti) – plavo (negativne vrijednosti).

Ukupna razlika boje izračunava se iz podataka dobivenih mjerenjem u CIELab sustavu, prema jednakosti:

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (6)$$

Jednostavno ocjenjivanje odstupanja boja može se provesti na osnovi vrijednosti kolorimetrijske razlike, prema sljedećim kriterijima (Jukić, 2007):

ΔE = (0 – 0,5) razlika boja se ne vidi;

ΔE = (0,5 – 1,5) razlika boja se teško uočava ljudskim okom;

ΔE = (1,5 - 3) razliku boja uočavaju trenirani senzorski analitičari;

ΔE = (3 – 6) razliku boja uočavaju prosječne osobe;

ΔE = (6 – 12) očigledna odstupanja boja (boje pripadaju istoj skupini);

ΔE > 12 ekstremna razlika u boji (boje pripadaju različitim skupinama).

3.2.7. Mikrobiološka analiza

1) HORIZONTALNA METODA ZA ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA - AEROBNIH MEZOFILNIH BAKTERIJA HRN EN ISO 4833-1

Određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija u 1g ili ml prehrambene namirnice.

PODLOGA ZA UZGOJ**:** Plate count agar (PCA)

Pomoću sterilne pipete prenijeti 1 ml ispitnog uzorka (ako je tekućina) ili 1 ml inicijalnog razrjeđenja u slučaju ostalih proizvoda (razrjeđenje 10^{-1}) u sterilnu Petrijevu zdjelicu.

U slučaju potrebe ponoviti postupak koristeći daljnja razrjeđenja, te ako je moguće odabrati samo ona razrjeđenja koja će dati brojive kolonije (od 15 do 300 kolonija/ploča) Dodati 12-15 ml prethodno rastaljenog i na 44-47 ºC temperiranog agara (PCA) u vodenoj kupelji.

Petrijevu zdjelicu zatvoriti i kružnim pokretima promiješati inokulum s hranjivim medijem, potom ostaviti na hladnoj vodoravnoj površini, da se agar skrutne.

Ugrađivanje uzorka i ulijevanje hranjivog medija ne smije trajati duže od 45 minuta, zbog replikacije mikroorganizama, kako bi se dobio stvaran rezultat. Inkubirati pri 30 ºC/72h, u obrnutom položaju, tj. poklopcem prema dolje. Nakon inkubacije, izbrojati porasle kolonije na pločama. Koristeći mikroskop ispitati dvojbene kolonije/strane tvari. Širenje, prerast („spreading“) kolonija se treba smatrati kao jedna kolonija, u slučaju da je manje od ¼ zdjelice preraslo širenjem, brojati kolonije na netaknutom dijelu.

IZRAŽAVANJE REZULTATA:

Porasle kolonije brojati na pločama gdje je poraslo između 15 i 300 kolonija. Dobiveni broj kolonija množi se s faktorom razrjeđenja i iskazuje kao broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1g ili 1ml uzorka. Kolonije mikroorganizama koje porastu na čvrstoj hranjivoj podlozi predstavljaju stvaran broj živih stanica.

2) HORIZONTALNA METODA ZA DOKAZIVANJE PRISUTNOSTI I BROJENJE Enterobacteriacae HRN ISO 21528 - 2

PODLOGE ZA UZGOJ**:**

1) Violet red bile glucose agar (VRBG),
2) Plate count agar (PCA)

BIOKEMIJSKI POTVRDNI TESTOVI:

1) Reakcija oksidaze (Bactident Oxidaze - test trake)
2) Fermentacijski test (Purple glucose agar)

Pomoću sterilne pipete, prenijeti 1 ml ispitnog uzorka (ako je tekućina) ili 1 ml inicijalnog razrjeđenja u slučaju ostalih proizvoda (razrjeđenje 10^{-1}). U slučaju potrebe ponoviti postupak koristeći daljnja razrjeđenja, ako je moguće odabrati samo ona razrjeđenja koja će dati brojive kolonije. U svaku petrijevu zdjelicu dodati 10 ml rastaljenog i na 44-47 °C (± 2 °C) ohlađenog agara (VRBG) u vodenoj kupelji. Vrijeme između inokulacije i trenutka dodavanja hranjivog medija ne smije biti duže od 15 minuta, zbog replikacije mikroorganizama, kako bi se dobio stvaran rezultat. Petrijevu zdjelicu zatvoriti poklopcem i kružnim pokretima promiješati. Hranilište ostaviti na sobnoj temperaturi u vodoravnom položaju. Nakon potpunog skrutnjavanja medija, dodati 15 ml rastaljenog i na 44 - 47 °C ohlađenog agara (VRBG), kako bi se osigurali semi-anaerobni uvjeti. Hranilište ponovno ostaviti na sobnoj temperaturi u vodoravnom položaju. Inkubirati na 37 °C/24 h ± 2 h, u obrnutom položaju, tj. poklopcem prema dolje.

Enterobacteriaceae: ružičaste do crvene kolonije, sa ili bez zone precipitata ili neobojene kolonije, promjera 0,5 mm i više. Porasle kolonije brojati na pločama, gdje je poraslo < 150

karakterističnih kolonija. Izračunati broj kolonija uzimajući u obzir faktor razrjeđenja i rezultate potvrdnog postupka.

POSTUPAK BIOKEMIJSKIH POTVRDNIH TESTOVA:

Postupak precjepljivanja**:** 5 tipičnih crvenih kolonija precijepiti ezom na površinu podloge (PCA) i inkubirati 24h pri 37 °C. Dobivene pojedinačne kolonije ispitati na reakciju citokrom oksidaze i fermentacijskim testom.

Reakcija oksidaze: Poraslu koloniju prenijeti na reaktivnu zonu test trake. Pričekati 5 - 10 sekundi i usporediti sa skalom boja

Rezultati testa:

Ako reaktivna zona ostane žuto obojena (bakterija je oxidaza negativna)→ dokaz prisustva *Enterobacteria;*

Ako reaktivna zona postane plava/purpurna (bakterija je oxidaza pozitivna)→ dokaz odsustva *Enterobacteria*

Fermentacijski test:

Iste kolonije, koje daju negativan oksidaza test prenijeti ezom na Petrijevu zdjelicu - Purple glucose agar. Inkubirati 24 h ± 2 h pri 37 °C. Ukoliko podloga poprimi žutu boju test se smatra pozitivnim.

3) OPĆA UPUTA ZA BROJENJE KVASACA I PLIJESNI – Brojenje kolonija pri 25 ^{o} HRN ISO 7954

PODLOGA ZA UZGOJ**:** Chloramphenicol glucose yeast extract agar (YGC).

U sterilnu Petrijevu zdjelicu koristeći sterilnu pipetu prenijeti 1 ml uzorka (ako je tekućina) ili 1 ml inicijalnog razrjeđenja (ostali proizvodi). U drugu sterilnu Petrijevu zdjelicu, koristeći novu sterilnu pipetu, inokulirati 1 ml prvog decimalnog razrjeđenja (tekući proizvodi) ili 1 ml 10^{-2} razrjeđenja u slučaju ostalih proizvoda. U slučaju potrebe ponoviti postupak koristeći daljnja razrjeđenja, te ako je moguće odabrati samo ona razrjeđenja koja će dati brojive

kolonije, dodati 15 ml rastaljenog i na 45 ^{o}C temperiranog agara (YGC) u vodenoj kupelji. Ugrađivanje i ulijevanje hranilišta ne smije trajati duže od 15 minuta, zbog replikacije mikroorganizama, kako bi se dobio stvaran rezultat. Inkubirati 3 do 5 dana pri temperaturi od 25 °C ± 1 C (ne pomicati tijekom inkubacije, zbog sporulacije). Nakon inkubacije odabrati petrijeve zdjelice koje sadrže <150 kolonija i izbrojati kolonije. Kako bi se spriječilo širenje spora i dekontaminacija inkubatora i ostalih uzoraka, preporučuje se držanje petrijevih zdjelica u otvorenim plastičnim vrećicama.

IZRAŽAVANJE REZULTATA:

Porasle kolonije brojati na pločama gdje je poraslo < 150 kolonija. U slučaju brzo rastućih plijesni brojanje obavljati nakon 3, 4 i 5 dana. Dobiveni broj kolonija množi se faktorom razrjeđenja i iskazuje kao broj kvasaca i plijesni u 1 g ili ml uzorka.

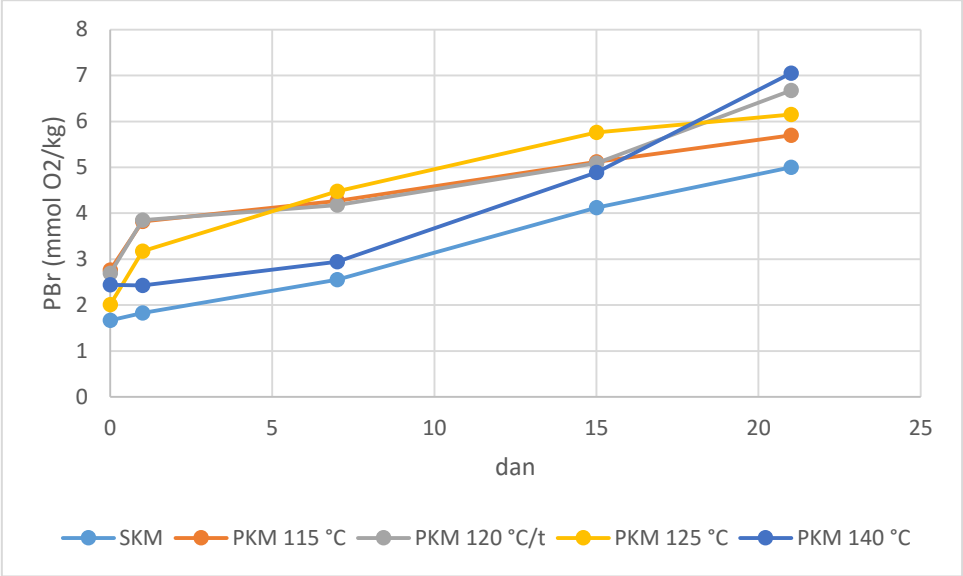
4. REZULTATI

Tablica 2 Neki parametri kvalitete sirovog kakaovog zrna korištenog za proizvodnju kakaove mase

Parametar kvalitete	Vrijednost	Referentna vrijednost
Jezgra (%)	85,42±0,46	75 – 89,5
Ljuska (%)	14,44±0,59	10 – 15
Klica (%)	0,79±0,07	0,5 – 1,7
Broj pljesnivih zrna	0	0 – 2
Broj trulih zrna	0	0 – 2
Broj slabo fermentiranih zrna	4±1	0 – 8
Broj zrna u 300 g	310±12	250 - 320

Tablica 3 Neki kemijski i mikrobiološki parametri kvalitete sirovog kakaovog zrna i kakaovog loma korištenih za proizvodnju kakaove mase

Parametar kvalitete	Kakao zrno	Kakao lom	Referentna vrijednost (kakao zrno)
Vlažnost (%)	6,13±0,28	1,88	4 – 6,5
Mast (% s. tv.)	58,86±1,41	56,64	52 - 62
pH	5,87	5,74	
Peroksidni broj (mmol O_2/kg)	1,38±0,01	2,09±0,02	
Polifenoli (mg/kg odmašćene tvari)	43,27±2,27	40,50±0,41	-
Flavan-3-oli (mg/kg odmašćene tvari)	5,64±0	5,66±0	-
Aerobne mez. bakterije / g	3 000 000	56 000	
Enterobacteriaceae /g	<10	<10	
Salmonella spp. / 25 g	n.n.	n.n.	
Kvasci i plijesni / g	7 000	<1000	

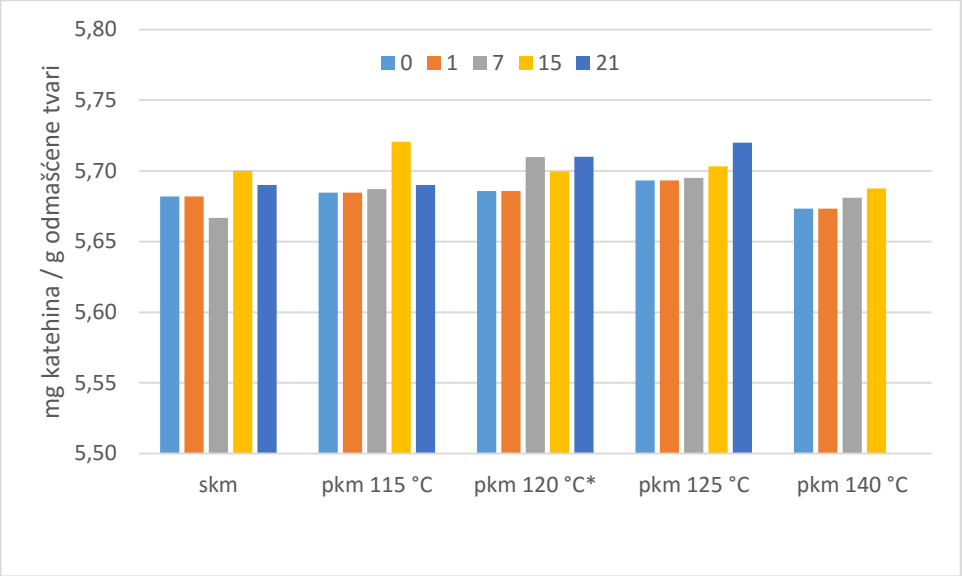


Slika 11 Stabilnost kakaovog maslaca izražena preko peroksidnog broja (PBr) u sirovoj (SKM) i termički obrađenim kakaovim masama (PKM) tijekom skladištenja pri 40 °C

Tablica 4 Udio polifenola (mg GAE/g odmašćene tvari) u sirovoj (SKM) i termički obrađenim kakaovim masama (PKM) tijekom 21 dan skladištenja pri 40 °C

DAN	0	1	7	14	21
SKM	40,82±0,06 $^{a, C}$	39,61±0,35 ^{a,B}	41,51±0,33 ^{d,D}	17,39±0,47 ^{a,A}	17,64±0,11 ^{c,A}
PKM 115 °C	40,90±1,28 ^{a,C}	39,63±0,32 ^{a,B}	40,23±0,04 ^{c,B,C}	17,39±0,25 ^{a,A}	17,56±0,11 ^{b,A}
PKM 120 °C*	41,55±2,55 ^{a,C}	39,93±0,13 ^{a,B,C}	39,53±0,12 ^{a,B}	17,45±0,13 ^{a,A}	17,56±0,09 ^{b,A}
PKM 125 °C	41,68±0,90 ^{a,C}	39,44±0,13 ^{a,B}	39,95±0,04 ^{b,B}	17,66±0,13 ^{a,A}	17,41±0,11 ^{b,A}
PKM 140 °C	39,78±0,29 ^{a,C}	39,85±1,21 ^{a,C}	39,80±0,18 ^{a,b,C}	17,68±0,10 ^{a,B}	16,69±0,13 ^{a,A}

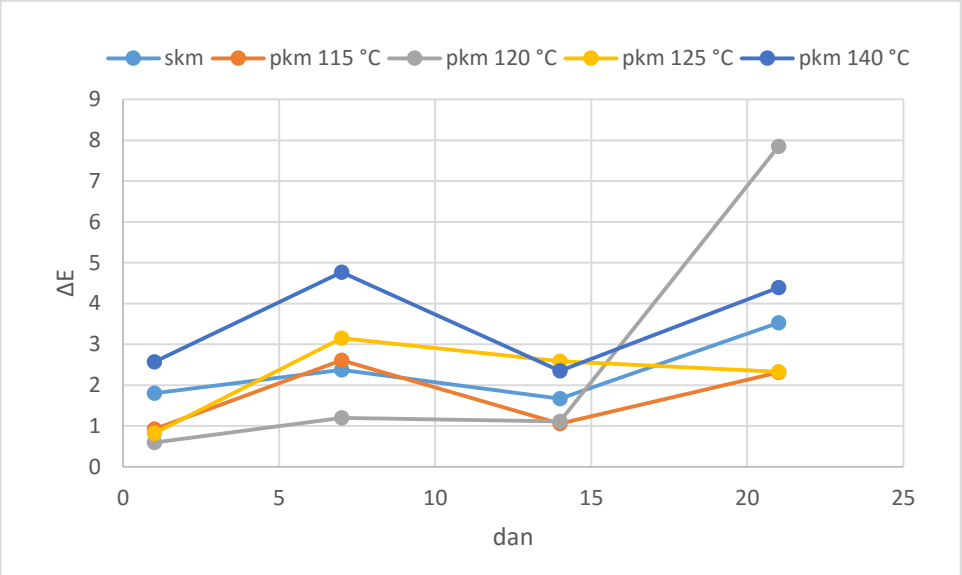
*vrijeme termičke obrade skraćeno; Između vrijednosti u istom stupcu s različitim malim slovima postoji statistički značajna razlika. Između vrijednosti u istom retku s različitim velikim slovima postoji statistički značajna razlika.



Slika 12 Udio flavan-3-ola (mg katehina/g odmašćene tvari) u sirovoj (SKM) i termički obrađenim kakaovim masama (PKM) tijekom 21 dan skladištenja pri 40 °C

Tablica 5 Boja površine sirove (SKM) i termički obrađene kakaove mase (PKM) mjerena u CIELab* sustavu tijekom skladištenja pri 40 °C

	L	a	b
Nulti dan			
SKM	28,35±0,20	9,16±0,13	3,71±0,18
PKM115 °C	28,80±0,18	8,83±0,09	3,06±0,18
PKM120 °C*	28,96±0,26	8,74±0,12	1,99±0,21
PKM125 °C	27,81±0,23	9,00±0,12	2,86±0,20
PKM140 °C	31,68±0,17	7,69±0,14	2,95±0,13
1. dan			
SKM	27,09±0,23	8,59±0,11	2,59±0,05
PKM115 °C	28,75±0,38	8,42±0,20	2,30±0,08
PKM120 °C*	28,79±0,24	8,90±0,23	1,75±0,16
PKM125 °C	27,40±0,14	8,65±0,08	3,35±0,07
PKM140 °C	29,16±0,11	7,98±0,20	2,60±0,08
7. dan			
SKM	26,74±0,18	8,12±0,19	5,07±0,28
PKM115 °C	30,74±0,42	7,91±0,08	1,61±0,09
PKM120 °C*	28,97±0,35	8,37±0,17	3,05±0,14
PKM125 °C	30,74±0,20	8,15±0,03	2,12±0,10
PKM140 °C	27,23±0,08	7,58±0,35	4,55±0,48
14. dan			
SKM	28,92±0,35	8,31±0,32	2,47±0,20
PKM115 °C	28,32±0,33	8,59±0,07	2,26±0,48
PKM120 °C*	28,35±0,23	8,44±0,41	2,67±0,14
PKM125 °C	29,89±0,91	8,67±1,26	2,06±0,59
PKM140 °C	29,53±0,46	7,48±0,49	2,29±0,31
21. dan			
SKM	25,95±0,10	6,84±0,08	2,57±0,08
PKM115 °C	29,44±0,41	6,82±0,11	3,84±0,26
PKM120 °C*	34,04±0,32	7,16±0,07	7,76±0,42
PKM125 °C	27,36±0,16	7,08±0,07	1,64±0,07
PKM140 °C	27,39±0,17	7,16±0,14	2,22±0,14



Slika 13 Promjena boje (ΔE) površine sirove (SKM) i termički obrađene kakaove mase (PKM) izračunata preko parametara CIELab* sustava tijekom skladištenja pri 40 °C

Tablica 6 Rezultati analize mikrobiološke ispravnosti sirove (SKM) i termički obrađene kakaove mase (PKM) tijekom skladištenja na 40 °C

UZORAK	MIKROBNA POPULACIJA (CFU)	DAN				
		0	1	7	14	21
SKM	Aerobne mez. bakterije / g	230 000	270 000	220 000	55 000	45 000
	Enterobacteriaceae /g	<10	<10	<10	<10	<10
	Salmonella spp. / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Kvasci i plijesni / g	<1000	<1000	<1000	<1000	<1000
PKM 115 °C	Aerobne mez. bakterije / g	38 000	56 000	49 000	50 000	40 000
	Enterobacteriaceae /g	<10	<10	<10	<10	<10
	Salmonella spp. / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Kvasci i plijesni / g	<100	<100	<100	<100	<100
PKM 120 °C	Aerobne mez. bakterije / g	51 000	70 000	55 000	61 000	52 500
	Enterobacteriaceae /g	<10	<10	<10	<10	<10
	Salmonella spp. / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Kvasci i plijesni / g	<100	<100	<100	<100	<100
PKM 125 °C	Aerobne mez. bakterije / g	8 000	8 900	11 300	4 500	3 000
	Enterobacteriaceae /g	<10	<10	<10	<10	<10
	Salmonella spp. / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Kvasci i plijesni / g	<100	<100	<100	<100	<100
PKM 140 °C	Aerobne mez. bakterije / g	<100	<100	<100	<100	<100
	Enterobacteriaceae /g	<10	<10	<10	<10	<10
	Salmonella spp. / 25 g	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	Kvasci i plijesni / g	<100	<100	<100	<100	<100

5.RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je utvrditi utjecaj termičke obrade kakaove mase i skladištenja na stabilnost kakaove mase i neke parametre kvalitete. Za potrebe istraživanja korišteno je kakaovo zrno iz Obale bjelokosti čiji su parametri kvalitete dani u **Tablicama 2** i **3**. Svi parametri bili su u okviru referentnih vrijednosti. Broj zrna u 300 g (310 ± 12) i udio ljuske (14,44 % ± 0,59) ukazuju na to da se radi o nešto sitnijim zrnima, ali to ne predstavlja problem za preradu. Ostali parametri: udio jezgre, klice, broj pljesnivih, trulih i slabo fermentiranih zrna također su u referentnim granicama.

Udio masti (kakaovog maslaca) u kakaovom zrnu iznosio je 58,86 ± 1,41 % (**Tablica 3**), što je nešto viša vrijednost u odnosu na udio masti u kakaovom zrnu iz Ekvadora i Gane (43,45 % i 41,93 %) koji su utvrdili Torres-Moreno i sur. (2014), ali je u skladu s prosječnom vrijednosti za kakaovo zrno (Dand, 2011; Jahurul i sur., 2013). Peroksidni broj u kakaovom zrnu iznosio je 1,38 ± 0,01 mmol O_2/kg, što je značajno ispod maksimalnih dozvoljenih vrijednosti propisanih Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 41/2012; 70/2013; 141/2013).

Udio polifenola (43,27 ± 2,27 mg GAE/kg odmašćene tvari) niži je od udjela utvrđenog za Forastero kakaovo zrno iz Obale bjelokosti u istraživanju Hii i sur. (2009), ali je u skladu s rezultatima koje su dobili Belščak i sur. (2009). Udio flavan-3-ola (5,64 ±0 mg/kg odmašćene tvari) u skladu je s literaturnim podacima (Belščak i sur., 2009; Wollgast i Anklam, 2000).

Rezultati mikrobiološke analize pokazali su da je mikrobiološka kvaliteta zrna u skladu sa smjernicama Federation of Cocoa Commerce (FCC) (http://www.cocoafederation.com/).

Da bi se dobila kakaova masa, očišćena i sortirana zrna se prže, odvajaju se ljuska i klica i dobiva se kakaov lom koji ide na meljavu. Uslijed prženja voda iz zrna isparava pa je kakaov lom imao značajno nižu vlažnost od kakao zrna (1,88 % u odnosu na 6,13 %). Uslijed djelovanja visoke temperature došlo je blagog porasta peroksidnog broja, ali on je ostao značajno niži u odnosu na maksimalno dozvoljene vrijednosti (Pravilnik, NN 41/2012; 70/2013; 141/2013). Udjeli polifenola i flavan-3-ola nisu se ovim procesom značajno smanjili, međutim, ovo treba uzeti kao uvjetni podatak jer na rezultat spektrofotometrijske analize mogu utjecati i obojeni spojevi koji nastaju tijekom prženja, a nisu polifenolne tvari, npr. smeđe obojeni Maillardovi produkti (Giacometti i sur, 2015), koji se stvaraju već pri 70 °C (De Brito i sur., 2002). Wollgast i Anklam (2000) u preglednom radu navode da se prženjem smanjuje udio polifenola u kakaovom zrnu, i to proporcionalno porastu temperature prženja. Prženjem se značajno smanjio i broj mikroorganizama, naročito aerobnih mezofilnih bakterija (**Tablica 3**).

Mljevenjem kakaovog loma dobiva se kakaova masa. Kako tijekom ovog procesa temperatura nije značajno visoka, nije došlo do značajnih promjena vrijednosti peroksidnog broja (**Slika 11**) te udjela polifenola i flavan-3-ola (**Tablica 4 i Slika 12**).

Termičkom obradom kakaove mase došlo je do blagog porasta peroksidnog broja, a skladištenjem on nastavlja rasti kod svih uzoraka (**Slika 11**), što je i za očekivati jer je nastajanje peroksida lančana reakcija katalizirana povišenom temperaturom, a kakaova masa čuvana je na 40 °C uz miješanje, kojim se povećava i kontakt kakaovog maslaca s kisikom iz zraka. Na kraju skladištenja, međutim, vrijednost peroksidnog broja ostala je u granicama određenim Pravilnikom o jestivim uljima i mastima (NN 41/2012; 70/2013; 141/2013).

Temperatura termičke obrade kakaove mase nije značajno djelovala na udio polifenola, a ni tijekom prvih sedam dana skladištenja udio polifenola u uzorcima ne mijenja se značajno (**Tablica 4**). Nakon 14 dana skladištenja udio polifenola se snižava sa oko 40 mg/g odmašćene tvari na oko 17 mg/g odmašćene tvari. To se može povezati s porastom peroksidnog broja između sedmog i petnaestog dana skladištenja – polifenoli djeluju kao antioksidativne tvari koje neutraliziraju slobodne radikale (Watson i sur, 2013), pa tako mogu djelovati i na usporavanje oksidacije masti u kakaovoj masi na početku skladištenja. S gubitkom polifenolnih tvari dolazi i do bržeg rasta peroksidnog broja u uzorcima (**Slika 11**) iako razlike među uzorcima nisu značajne, na kraju skladištenja najniži udio polifenola imala je kakaova masa obrađena na 140 °C, slijedi masa obrađena na 125 °C, mase obrađene na 120 °C i 115 °C, a najviši udio je imala sirova kakaova masa. Nepostojanje razlike između masa obrađenih na 115 °C i 120 °C može se objasniti kraćim vremenom obrade mase na 120 °C.

Udio flavan-3-ola nije se značajno mijenjao niti preradom kakaovog zrna u kakaovu masu, niti s temperaturom obrade kakaove mase i vremenom skladištenja (**Slika 12**). Ramli i sur. (2001) također su zabilježili slične vrijednosti udjela flavan-3-ola u kakaovom zrnu, lomu i masi. Stabilnost epikatehina tijekom prženja značajno ovisi o interakcijama s drugim spojevima prisutnima u kakaovom zrnu. Osim toga, tijekom prženja dolazi i do epimerizacije epikatehina u katehin (Giacometti i sur, 2015), pa se nepromijenjen udio tijekom obrade i skladištenja može objasniti navedenim reakcijama.

Tijekom obrade i skladištenja kakaove mase praćena je boja površine u sustavu CIEL*a*b*. Parametar L* pokazuje svjetlinu površine. Na kraju skladištenja sirove kakaove mase i kakaove mase obrađene na 140 °C L* vrijednost niža je nego na početku, što ukazuje da je površina tamnija (**Tablica 5**). Mogući uzrok su nastali obojeni produkti tijekom prženja, čiji se udio mogao

blago povećavati i tijekom skladištenja. Kod ostalih uzoraka svjetlina se nije značajno promijenila na kraju skladištenja. Vrijednosti parametra a* pokazuju značajan udio crvene, a parametra b* značajan udio žute komponente u ukupnoj boji svih uzoraka (**Tablica 5**).

Vrijednost ukupne promjene boje (**Slika 13**) kod kakaovih masa obrađenih na 115 °C i 125 °C je ispod 3, što ukazuje da promjenu boje mogu uočiti samo trenirani senzorski analitičari. Kod sirove kakao mase i mase tretirane na 140 °C, vrijednost ukupne promjene boje je iznad 3 pa promjenu boje mogu uočiti i prosječne osobe (Ačkar, 2010.). Uzorak tretiran na 120 °C imao je očigledno odstupanje boje na kraju skladištenja u odnosu na nulti dan (vrijednost iznad 6). Kod ovog uzorka značajno je porasla i L* vrijednost, odnosno svjetlina. Obje pojave mogu se objasniti sivljenjem poršine uslijed stvaranja nestabilnih polimorfnih oblika kakaovog maslaca tijekom toplinske obrade (Škrabal i sur., 2011).

Mikrobiološka analiza uzoraka pokazala je da se broj plijesni, kvasaca, enterobakterija i *Salmonella* nije mijenjao značajno tijekom skladištenja. Kod uzorka tretiranog na 140 °C nije se značajno mijenjao ni broj aerobnih mezofilnih bakterija. Na ovoj temperaturi je uništen značajan broj bakterija (broj < 100) i kakaova masa tretirana na ovoj temperaturi gotovo je sterilna. Na nižim temperaturama redukcija broja aerobnih mezofilnih bakterija nije tako značajna pa bakterije koje nisu uništene termičkom obradom nastavljaju ciklus razvoja tijekom skladištenja pri 40 °C. Kod sirove kakaove mase i kakaove mase tretirane na 125 °C do odumiranja bakterija dolazi nakon 14 dana skladištenja, a kod kakaovih masa tretiranih na 115 °C i 120 °C nakon 21 dan skladištenja. S obzirom na broj aerobnih mezofilnih bakterija, enterobakterija i *Salmonella* u kakaovim masama nakon obrade i nakon skladištenja, može se reći da uzorci udovoljavaju odredbama Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/2008, 156/2008, 89/2010, 153/2011) i Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011).

6.ZAKLJUČCI

Na osnovu pregleda literature, provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Peroksidni broj raste nakon termičke obrade kakaove mase, ali ne utječe na prihvatljivost proizvoda s obzirom na odredbe Pravilnika (NN 41/2012)
- Peroksidni broj raste tijekom 21 dan skladištenja kakaove mase kod svih ispitivanih uzoraka, ali uzorci su i nakon skladištenja u skladu s odredbama Pravilnika (NN 41/2012)
- Udio polifenola i flavan-3-ola u ispitivanim kakaovim masama u skladu je s literaturnim podacima za kakaove mase.
- Udio polifenola u kakaovoj masi smanjuje se nakon 14 dana skladištenja, bez obzira na temperaturu obrade kakaove mase.
- Flavan-3-oli stabilni su tijekom termičke obrade i skladištenja kakaove mase.
- Rezultati mjerenja boje pokazali su da je kod kakaove mase tretirane pri 120 °C došlo do značajnog posvjetljivanja površine, vjerojatno uslijed stvaranja nestabilnih polimorfnih oblika kakaovog maslaca.
- Mikrobiološka ispravnost kakaove mase nakon termičke obrade pri svim temperaturama u skladu je s odredbama Pravilnika (NN 74/2008) i Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011).
- Tijekom skladištenja, mikrobiološki je bila najstabilnija kakaova masa tretirana na 140 °C.

7. LITERATURA

Ačkar Đ: Izoliranje, modificiranje i karakteriziranje škroba pšenice. Doktorska disertacija. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

ADM Cocoa: *Cocoa & Chocolate Manual*. deZaan, Switzerland, 2013.

Beckett ST: Industrial Chocolate Manufacture and Use, Blackwell Science, 1999.

Belščak A, Komes D, Horžić D, Kovačević Ganić K i Karlović D: Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition, Food Research International, 42(5-6): 707-716, 2009

Bitsch, I: The content and effects of polyphenols in chocolate, Dissertation for obtaining the degree of doctor, Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Justus-University Giessen, Germany, 2005.

Dand, R: Quality assessment of cocoa beans for international trade. *U:* The International Cocoa Trade (R. Dand). Elsevier Science, 2011.

De Brito ES, Narain N, Pezoa Garcia NH, Valente A LP i Pini GF: Effect of glucose and glycine addition to cocoa mass before roasting on maillard precursor consumption and pyrazine formation, Journal of the Science of Food and agriculture, 82:534-537, 2002.

Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

FCC, Federation Cocoa Commerce LTD: FCC Quality rules, London, 2012. http://www.cocoafederation.com/

Gavrilović M: *Tehnologija konditorskih proizvoda.* Mlinpek zavod d.o.o, Novi Sad, 2011.

Giacommeti J, Jolić S. i Josić Đ: Cocoa processing and Impact on Compositin, Chapter 73, Processing and Impact on Active Components in Food, Preedy V (ed). Oxford, Academic Press Elsevier, 605-612.

Hii CL, Law CL, Suzannah S, Misnawi i Cloke M: Polyphenols in cocoa (Theoboma Cacao L.), Asian Journal of Food and Agro-Industry, 2(04), 702-722, 2009. (ISSN 1906-3040, dostupno na www.ajofai.info

HS, Hrvatski Sabor, Odluka o proglašenju zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu, Narodne novine 81/13, 2013.

HZN, Hrvatski zavod za norme: Mikrobiologija lanca hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge HRN EN ISO 4833-1:2013.

HZN, Hrvatski zavod za norme: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti Salmonella spp HRN EN ISO 6579:2002/AC:2006

HZN, Hrvatski zavod za norme: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae -- 1. dio: Određivanje prisutnosti i postupak određivanja najvjerojatnijeg broja s prednamnažanjem HRN ISO 21528-1:2008.

HZN, Hrvatski zavod za norme: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae -- 2. dio: Metoda određivanja broja kolonija HRN ISO 21528-2:2008.

Ioannone F, Di Mattia CD, De Gregorio M, Sergi M, Serafini M i Sacchetti G: Flavanols, proanthocyxanidins and antioxidant changes during cocoa (Theobroma Cacao L.), roasting as affected by temperature and time of processing, Food Chemistry 174 256 – 262, 2015.

ISO, International Standards Organisation: General guidance for enumeration of yeasts and Moulds Colony count technique at 25 degrees C. ISO 7954:1987.

Jahurul MHA, Zaidul ISM, Norulaini NAN, Sahena F, Jinap S, Azmir J, Sharif KM, Mohd Omar AK: Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. Journal of Food Engineering, 117(4): 467-476, 2013.

Jalil AMMJ i Ismail A: Polyphenols in Cocoa and Cocoa products: Is There a Link Between Antiokxidant Properties and Health, Molecules 13, 2190 – 2219, 2008.

Jomnongpon R, Chaiseri S, Hongsprabhas P, Healy JP, Meade SJ i Gerrard JA: Cocoa protein crosslinking using Maillard chemistry, Food Chemistry 134 375 – 380, 2012.

Kalenić S, Mlinarić-Missoni E: *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1995.

Knight, I.: Chocolate and Cocoa – Health and Nutrition, Blakwell Science, London, 1999.

Lees R i Jackson EB: Sugar Confectionery and Chocolate manufacture, St. Edmundsbury Press limited, Great Britain, 2008.

MP; Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu, Narodne novine 74/08, NN 156/08, NN 89/08, NN 153/11.

MP, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje), 2011.

MP, Ministarstvo poljoprivrede: Pravilnik o o jestivim uljima i mastima, Narodne novine 41/12, NN 70/13, NN 141/13.

Ramli N; HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Level In Cocoa and Chocolate products, malaysian Journal of Analitical Sciences, Vol 7, No 2 (2001) 377-386, 2001.

Sokolov AN, Pavlova MA, Klosterhalfen S i Enck P: Chocolate and the brain: Neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior, Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 37:2445-2453, 2013.

Šimunac D., Čokolada uvijek tako dobra, Grafem d.o.o, Zagreb, 2002.

Škrabal S, Šubarić D, Miličević B, Ačkar Đ, Babić J i Miličević R: Utjecaj mlijeka u prahu i čuvanja na stabilnost čokolada, 13th Ružička days „Today science-tomorrow industry" Proceedings, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2011.

Takeda H: Stress-alleviating effect of constitients of the cacao bean, International Symposium on Nutrition of Chocolate and Cocoa, Japan, 1996.

TNAU Agritech Portal URL: http://agritech.tnau.ac.in/horticulture/horti_plantation%20crops_cocoa.html (15.06.2016.)

Tehnologija hrane http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/alkaloidi (18.06.2016.)

Torres-Moreno M, Torrescasana E, Salas-Salvado J, Blanch C: Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. Food Chemistry, 166: 125-132, 2015.

Watson RR, Preedy VR, Zibadi S: *Chocolate in Health and Nutrition.* Humana Press, New York Heidelberg Dordrecht London, 2013.

Wollgast J i Anklam E: Rewiew on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, Food Research International 33 423-477, 2000.