

Mikrobiološka kvaliteta kakaove ljsuske

Sažetak

U ovom radu određena je mikrobiološka kvaliteta kakaove ljsuske koja se dobiva kao nusproizvod u proizvodnji čokolade, nakon prženja kakaovog zrna. Kakaova ljsuska je tretirana postupkom visokonaponskog električnog pražnjenja (VNEP) pri 40 i 80 Hz tijekom 15, 30 i 45 min u vodenoj suspenziji (pri koncentraciji kakaove ljsuske 1,5 i 3,0 %). Istraživanje je pokazalo da je kakaova ljsuska, iako je prije analize prošla termički tretman (prženje) jako opterećena mikroorganizmima, ali da se primjenom VNEP može reducirati broj enterobakterija. Naknadna obrada kakaove ljsuske sušenjem pri 40 °C, međutim, uzrokuje oporavak mikroorganizama.

Ključne riječi: kakaova ljsuska, visokonaponsko električno pražnjenje, aerobne mezofilne bakterije, kvasci i plijesni, enterobakterije

Uvod

Kakaova ljsuska je nusproizvod u proizvodnji čokolade. Odvaja se od kakaovog zrna najčešće nakon prženja jer se prženjem olabavi veza ljsuska – kotiledon te su manji gubici na endospermu koji se koristi u daljnjoj proizvodnji čokolade.

Uobičajeno se kakaova ljsuska koristi kao sredstvo za malčiranje, kao stočna hrana i u proizvodnji biogoriva (Panak Balentić i sur., 2018), no kako je iznimno bogata vlaknima i polifenolima, a sadrži i metilksantine i vitamin D (Nsor-Atindana i sur., 2012a i b; Martinez i sur., 2012), ima veliki potencijal i za primjenu u prehrambenoj industriji. Tako su do sad istraživane mogućnosti ekstrakcije polifenolnih tvari (Arlorio i sur., 2005), teobromina (Hartati, 2010), dijetalnih vlakana (Nsor-Atindana i sur., 2012b) i pektina (Mollea i sur., 2008; Vriesmann i sur., 2011), kakaova ljsuska korištena je kao adsorbens za pročišćavanje voda (de Luna i sur., 2017) i supstrat u proizvodnji bioplina (Ward-Doria i sur., 2016) i enzimskih preparata (Yusof i sur., 2016; Khanamadi i sur., 2016).

Kakaovom ljsuskom obogaćivani su keksi (Karlina i sur., 2012), ekstrudirani snack proizvodi (Jozinović i sur., 2016), vlaknima kakaove ljsuske obogaćeni su kruh (Collar i sur., 2009) i muffini (Martinez-Cervera i sur., 2011), polifenoli kakaove ljsuske korišteni su kao antioksidansi u ulju za prženje (Manzano i sur., 2017) i kuhanoj govedini (Ismail i Lee, 2006).

Međutim, veliko ograničenje u primjeni kakaove ljsuske mogla bi biti njena mikrobiološka kvaliteta jer je ljsuska svojevrsna zaštita zrna od utjecaja okolišnih faktora, uključujući i mikroorganizme. Stoga je cilj ovoga rada bio ispitati mikrobiološku kvalitetu kakaove ljsuske uzete nakon prženja i utjecaj naknadne obrade ljsuske na nju.

Materijali i metode

Kakaovo zrno prženo je na 135 °C tijekom 55 min. Nakon toga, odvojena je ljsuska koja je uzeta za daljnja istraživanja.

Kao nulti uzorak (netretirana kakaova ljsuska) uzeta je ljsuska nakon prženja. Nadalje, pripravljene su 1,5 % i 3 % suspenzije kakaove ljsuske u destiliranoj vodi koje su tretirane na sljedeći način:

¹ Kristina Doko, dipl. ing., Federalni agromediterranski zavod, Biskupa Čule 10, 88000 Mostar, Bosna i Hercegovina
² Veronika Barišić, mag. ing., izv. prof. dr. sc. Ivana Flanjak, doc. dr. sc. Antun Jozinović, prof. dr. sc. Jurislav Babić, izv. prof. dr. sc. Đurđica Ačkar, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Kuhačeva 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Autor za korespondenciju: dackar@ptfos.hr

-Miješanjem na magnetnoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 15 min, 30 min i 45 min
 -Tretiranjem visokonaponskim električnim pražnjenjem (VNEP) pri 40 Hz i 80 Hz tijekom 15 min, 30 min i 45 min.

Uređaj za VNEP konstruiran je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu, a izrađen je u suradnji s firmom Inganiare CPTS1. Tretiranje uzoraka u komori uređaja radi se „pin-to-plate“ (razmak između elektroda 2 cm), a miješanje uzoraka je pomoću magnetske miješalice.

Nakon tretmana ljuska je filtracijom odvojena od tekućeg dijela te osušena na 40 °C u laboratorijskom sušioniku (Memmert UFE 500) i samljevena u laboratorijskom mlinu (IKA Universal mill M20 S000) tako da prolazi kroz sito 2 mm.

Svi uzorci su odmah nakon tretmana zamrznuti (-18 °C) i tako čuvani do analize.

Udio suhe tvari određen je sušenjem na 105 °C do konstantne mase, a aktivitet vode pomoću uređaja za mjerenje aktiviteta vode (HygroLab 3, Rotronic). Mikrobiološka analiza provedena je prema standardnim metodama: EN ISO 4833-1:2013, EN ISO 6579:2005, EN ISO 6579/Cor2:2010, EN ISO 21528-2:2013 i EN ISO 21527:2009. Svaka metoda je rađena iz posebnih razrjeđenja, tj. za svaku metodu po uzorku je vršena posebna odvaga 25 g za *Salmonella* spp., a za ostale tri metode posebno po 10 g kakaove ljuske.

Rezultati i rasprava

Cilj ovoga rada bio je ispitati mikrobiološku kvalitetu kakaove ljuske koja se dobije kao nusproizvod nakon prženja kakaovog zrna prije i nakon tretmana visokonaponskim električnim pražnjenjem (VNEP) i sušenja pri 40 °C. Temperatura sušenja odabrana je u skladu s preporukama za termički tretman sirovina bogatih polifenolima, kako bi se smanjila toplinska degradacija ovih bioaktivnih komponenti.

U Tablici 1 prikazane su vrijednosti udjela suhe tvari i aktiviteta vode u analiziranim uzorcima. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je miješanjem u vodi, bez obzira na to je li primijenjen tretman VNEP ili ne, porastao aktivitet vode u uzorcima, ali je on i dalje značajno niži od 0,95.

Tablica 1. Udio suhe tvari i aktivitet vode (a_w) u prženoj kakaovoj ljusci prije i nakon tretmana suspenzije neusitnjene ljuske koncentracije 1,5 % i 3,0 % (miješanje – u vodi pri sobnoj temperaturi; 40 Hz i 80 Hz – tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem u vodi uz miješanje pri navedenoj frekvenciji)

Table 1. Dry matter content and water activity (a_w) in roasted cocoa husk before and after the treatment in water suspension 1,5% and 3,0% (shearing – in water at room temperature; 40 Hz and 80 Hz – treatment by high-voltage electric discharge in water with shearing at the appropriate frequency)

Tretman / Treatment	1,5 %		3,0 %	
	Suha tvar / Dry matter (%)	a_w	Suha tvar / Dry matter (%)	a_w
Netretirana ljuska / untreated cocoa husk	94,29	0,372	94,29	0,372
15 min, miješanje / shearing	87,78	0,552	85,93	0,559
30 min, miješanje / shearing	87,38	0,570	85,96	0,561
45 min, miješanje / shearing	86,45	0,579	84,97	0,572
15 min, 40 Hz	86,87	0,557	87,22	0,58
30 min, 40 Hz	88,63	0,532	86,76	0,591
45 min, 40 Hz	87,90	0,545	86,83	0,579
15 min, 80 Hz	86,92	0,577	87,19	0,597
30 min, 80 Hz	87,72	0,547	86,24	0,583
45 min, 80 Hz	87,43	0,567	86,15	0,78

U Tablicama 2 i 3 prikazani su rezultati mikrobiološke analize kakaove ljuske. Napravljena „dvostruka slijepa provjera“ – za usporedbu su, osim netretirane ljuske i ljuske tretirane VNEP pri dvije frekvencije, pripremljeni i uzorci koji su samo miješani u vodi tijekom odgovarajućeg vremena kako bi se razlučilo ima li na mikroorganizme utjecaja VNEP ili samo voda.

Tablica 2. Mikrobiološka kvaliteta pržene kakaove ljuske prije i nakon tretmana suspenzije neusitnjene ljuske koncentracije 1,5 % (miješanje – u vodi pri sobnoj temperaturi; 40 Hz i 80 Hz – tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem u vodi uz miješanje pri navedenoj frekvenciji)

Table 2. Microbial quality of roasted cocoa husk before and after the treatment in water suspension 1,5% (shearing – in water at room temperature; 40 Hz and 80 Hz – treatment by high-voltage electric discharge in water with shearing at the appropriate frequency)

Uzorak / Sample	Metode i kriteriji prihvatljivosti / Methods and criteria			
	<i>Salmonella</i> spp. (n.n.* u 25 g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (m=10 ⁴ cfu/g M=10 ² cfu/g)	Aerobne mezofilne bakterije / Aerobic mesophilic bacteria cfu (m=10 ⁴ cfu/g M=5x10 ⁶ cfu/g)	Kvasci i plijesni / Yeasts and molds (m=10 ² cfu/g M=10 ³ cfu/g)
Netretirana kakao ljuska / untreated cocoa husk	n.n. u 25 g	2,7x10 ³ cfu/g	1,4x10 ⁶ cfu/g	<10 cfu/g
1,5 %, 15 min, miješanje / shearing	n.n. u 25 g	1,6x10 ⁵ cfu/g	3,2x10 ⁶ cfu/g	1,8x10 ³ cfu/g
1,5 %, 30 min, miješanje / shearing	n.n. u 25 g	3,5x10 ⁶ cfu/g	2,4x10 ⁷ cfu/g	2,4x10 ⁴ cfu/g
1,5 %, 45 min, miješanje / shearing	n.n. u 25 g	1,2x10 ⁶ cfu/g	2,3x10 ⁷ cfu/g	2,6x10 ⁴ cfu/g
1,5 %, 15 min, 40 Hz	n.n. u 25 g	1,5x10 ⁶ cfu/g	1,6x10 ⁷ cfu/g	1,5x10 ⁴ cfu/g
1,5 %, 30 min, 40 Hz	n.n. u 25 g	1,5x10 ⁵ cfu/g	2,2x10 ⁶ cfu/g	3,6x10 ³ cfu/g
1,5 %, 45 min, 40 Hz	n.n. u 25 g	1,4x10 ⁴ cfu/g	2,8x10 ⁵ cfu/g	1,8x10 ³ cfu/g
1,5 %, 15 min, 80 Hz	n.n. u 25 g	5,1x10 ⁴ cfu/g	6,8x10 ⁶ cfu/g	1,8x10 ³ cfu/g
1,5 %, 30 min, 80 Hz	n.n. u 25 g	5,5x10 ⁴ cfu/g	1,7x10 ⁷ cfu/g	9,0x10 ³ cfu/g
1,5 %, 45 min, 80 Hz	n.n. u 25 g	7,6x10 ⁵ cfu/g	2,6x10 ⁷ cfu/g	1,9x10 ⁴ cfu/g

*odsutnost / not detected

Niti u jednom uzorku nije detektirana prisutnost *Salmonella* spp. Svi uzorci imali su veliki broj aerobnih mezofilnih bakterija (od $2,8 \times 10^5$ cfu/g u ljusci tretiranoj u 1,5 % suspenziji 45 min pri 40 Hz do $2,8 \times 10^7$ cfu/g u ljusci tretiranoj u 3 %-tnoj suspenziji tijekom 30 min na 80 Hz) i enterobakterija (od $1,9 \times 10^3$ cfu/g u ljusci tretiranoj u 3 %-tnoj suspenziji na 80 Hz tijekom 15 min do $3,5 \times 10^6$ cfu/g kod ljuske miješane u vodi u 1,5 %-tnoj suspenziji tijekom 30 min). Pri tome su svi uzorci tretirani u 1,5 %-tnoj suspenziji imali veći broj enterobakterija od netretirane kakaove ljuske, a u 3 %-tnoj suspenziji samo je kod jednog uzorka došlo do smanjenja njihovog broja. Nakon svih tretmana došlo je do porasta broja plijesni i kvasaca u odnosu na netretiranu ljusku, pri čemu je on nešto manji kod uzoraka na kojima je primijenjeno VNEP u 1,5 %-tnoj suspenziji, dok je u 3 %-tnoj suspenziji kod uzoraka tretiranih VNEP taj broj čak veći nego kod uzoraka koji su samo miješani u vodi.

Ranija istraživanja, međutim, pokazala su da se VNEP može koristiti u cilju smanjenja mikrobiološke kontaminacije. Tako su Ahmed i sur. (2017) objavili da su primjenom plazme u vodi inaktivirali *Escherichia coli*. Pri tome su utvrdili da i reaktivne čestice koje se generiraju i/ili do-

daju tijekom tretmana (O_2 , H_2O_2) imaju utjecaja na sterilizirajući efekt plazme, koji se zadržao i 72 h nakon tretmana. Ragni et al. (2016) ispitali su utjecaj materijala od kojeg su izrađene elektrode za plinsku plazmu koja se generira dielektričnim pražnjenjem na *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes*. Utvrdili su da napon, jakost struje i aktivna snaga te reaktivne čestice (u ovom slučaju nitrati i nitriti) nemaju značajnog utjecaja na dekontaminaciju vode, ali su srebro i mesing imali značajan utjecaj. Butscher i sur. (2016) utvrdili su i da priroda tretiranog materijala značajno utječe na uspješnost procesa, pri čemu je smanjenje broja endospora *Geobacillus stearothermophilus* na polipropilenskim glatkim površinama bilo značajno veće u odnosu na zrna pšenice, koja imaju neravnu površinu i duboku brazdicu.

Delsart i sur. (2105) primijenili su VNEP u inaktivaciji mikroorganizama u vinu te su postigli značajno smanjenje broja plijesni i bakterija, ali tretman nije bio uspješan kao pulsirajuće električno polje, a došlo je i do sniženja udjela polifenola.

Tablica 3. Mikrobiološka kvaliteta pržene kakaove ljuske prije i nakon tretmana suspenzije neusitnjene ljuske koncentracije 3,0 % (miješanje – u vodi pri sobnoj temperaturi; 40 Hz i 80 Hz – tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem u vodi uz miješanje pri navedenoj frekvenciji)

Table 3. Microbial quality of roasted cocoa husk before and after the treatment in water suspension 3% (shearing – in water at room temperature; 40 Hz and 80 Hz – treatment by high-voltage electric discharge in water with shearing at the appropriate frequency)

Metode i kriteriji prihvatljivosti /Methods and criteria				
Uzorak / Sample	<i>Salmonella</i> spp. (n.n.* u 25 g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (m=10 cfu/g M=10 ² cfu/g)	Aerobne mezofilne bakterije / Aerobic mesophilic bacteria (m=10 ⁴ cfu/g M=5x10 ⁴ cfu/g)	Kvasci i plijesni /Yeasts and molds (m=10 ² cfu/g M=10 ³ cfu/g)
Netretirana kakaov ljuska / untreated cocoa husk	n.n. u 25 g	2,7x10 ³ cfu/g	1,4x10 ⁶ cfu/g	<10 cfu/g
3 %, 15 min, miješanje / shearing	n.n. u 25 g	1,0x10 ⁴ cfu/g	7,4x10 ⁵ cfu/g	2,7x10 ² cfu/g
3 %, 30 min, miješanje / shearing	n.n. u 25 g	6,7x10 ⁵ cfu/g	3, 4x10 ⁶ cfu/g	9,1x10 ² cfu/g
3 %, 45 min, miješanje / shearing	n.n. u 25 g	1,8x10 ⁵ cfu/g	3,0x10 ⁶ cfu/g	9,1x10 ² cfu/g
3 %, 15 min, 40 Hz	n.n. u 25 g	7,9x10 ³ cfu/g	1,7x10 ⁶ cfu/g	1,3x10 ² cfu/g
3 %, 30 min, 40Hz	n.n. u 25 g	9,1x10 ³ cfu/g	6,0x10 ⁵ cfu/g	1,1x10 ⁴ cfu/g
3 %, 45 min, 40 Hz	n.n. u 25 g	2,9x10 ⁴ cfu/g	8,0x10 ⁵ cfu/g	9,1x10 ³ cfu/g
3 %, 15 min, 80 Hz	n.n. u 25 g	1,9x10 ³ cfu/g	1,0x10 ⁶ cfu/g	3,2x10 ⁴ cfu/g
3 %, 30 min, 80 Hz	n.n. u 25 g	1,3x10 ⁵ cfu/g	2,8x10 ⁷ cfu/g	9,5x10 ⁴ cfu/g
3 %, 45 min, 80 Hz	n.n. u 25 g	3,1x10 ⁴ cfu/g	1,2x10 ⁶ cfu/g	3,2x10 ⁴ cfu/g

*odsutnost / not detected

Do porasta broja mikroorganizama u ovom istraživanju, međutim, najvjerojatnije nije došlo uslijed tretmana VNEP, nego tijekom sušenja. Naime, temperatura sušenja bila je 40 °C, što nije značajno više od optimalne temperature za razvoj mikroorganizama te je tijekom sušenja mo-

glo doći do oporavka preživjelih stanica i njihovog razmnožavanja. Do sličnih rezultata došlo se u radu Mandure (2016), gdje je utvrđeno da je nakon 18 sati na 30 °C došlo do rekuperacije stanica *E. coli*, iako je tretman plazmom pri 60, 90 i 120 Hz uzrokovao oksidacijski stres i odumiranje bakterija.

Kako bi se provjerila ova hipoteza, odabran je uzorak ljuske tretiran u 3 %-tnoj suspenziji 15 min na 40 Hz. Tretman je ponovljen u istim uvjetima, ali je odmah po završetku tretmana dekantiran višak vode, a tretirana ljuska zamrznuta i liofilizirana u laboratorijskom liofilizatoru Alpha LSC Plus, Christ, Njemačka (početna temperatura proizvoda: -11 °C; vakuum postignut nakon 4 min; temperaturna rampa: -20 °C, 2 h/-15 °C, 2 h/-10 °C, 2,5 h/-5 °C, 2 h/0 °C, 3 h/final drying: 25 °C, 2 h). Liofiliziranoj ljusci također je određena mikrobiološka kvaliteta te je utvrđeno da sadrži < 10 cfu/g enterobakterija, $2,4 \times 10^6$ cfu/g aerobnih mezofilnih bakterija i 10^2 cfu/g kvasaca i plijesni što ukazuje na uspješnost VNEP u redukciji broja enterobakterija.

Zaključak

Iako je kakaova ljuska dobar izvor prehrambenih vlakana i polifenola te ima veliki potencijal za primjenu u proizvodnji prehrambenih proizvoda u okviru kružne ekonomije, pri tome je potrebno voditi računa i o njenoj sigurnosti za potrošača. S obzirom da se radi o dijelu zrna koji je u velikoj mjeri izložen okolišnim utjecajima, posebnu pozornost treba obratiti na njenu mikrobiološku kvalitetu i mogućnosti poboljšanja iste. Primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja moguće je reducirati broj enterobakterija na kakaovoj ljusci, ali je potrebno dodatno istražiti optimalne uvjete tretiranja i utjecaj naknadne manipulacije ljuskom na rekuperaciju mikroorganizama.

Zahvala

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2017-05-8709.

Zahvaljujemo se Javnoj ustanovi "Veterinarski Zavod Hercegovačko-neretvanske županije/kantona", Mostar, BiH na pomoći u provedbi analiza, posebno doc. dr. sc. Maji Arapović i Anki Čerkez.

Literatura

- Ahmed, M.W., Choi, S., Lyakhov, K., Shaislamov, U., Mongre, R.K., Jeong, D.K., Suresh, R., Lee, H.J. (2017) High-frequency underwater plasma discharge application in antibacterial activity. *Plasma Physics Reports*, 43(3), 381-392. <https://doi.org/10.1134/S1063780X17030011>
- Arlorio, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., Martelli, A. (2005) Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*, 38, 1009-1014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.012>
- Butscher, D., Zimmermann, D., Schuppler, M., von Rohr, P.R. (2016) Plasma inactivation of bacterial endospores on wheat grains and polymeric model substrates in a dielectric barrier discharge. *Food Control*, 60, 636-645. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.003>
- Collar, C., Rosell, C.M., Muguera, B., Moulay, L. (2009) Breadmaking performance and keeping behaviour of cocoa-soluble fiber-enriched wheat breads. *Food Science and Technology International*, 15, 0079-87. <https://doi.org/10.1177/1082013208102643>
- Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., Peuchot, M.M. (2015) Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 152-164 doi: 10.1111/jam.12981
- EN ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.
- EN ISO 6579:2005, EN ISO 6579/Cor2:2010 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- EN ISO 21528-2:2013 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method
- EN ISO 21527:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95
- Hartati, I. (2010) Hydrotropic extraction of theobromine from cocoa bean shell. *Momentum*, 6, 17-20.
- Ismail, A., Lee, C.L. (2006) Antioxidative effects of extracts of cocoa shell, roselle seeds and a combination of both extracts on the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. *Journal of Food Tehnology*, 4, 10-15. <http://medwelljour>

nals.com/abstract/?doi=jftech.2006.10.15

Jozinović, A., Babić, J., Ačkar, Đ., Miličević, B., Guberac, S., Šubarić, D. (2016) Influence of cocoa shell addition on properties of corn extrudates. *51st Croatian and 11th International Symposium on Agriculture Book of Abstracts*, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 121-122.

Karlina, D., Gedrovica, I., Reča, M., Kronberga, M. (2012) Production of biscuits with higher nutritional value. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, 66, 113-116. <https://doi.org/10.2478/v10046-012-0005-0>

Khanamadi, S., Faridah, Y., Ong Hwai, C., Azura, A., Harmen, S. (2016) Cocoa pod husk: a new source of CLEA-lipase for preparation of low-cost biodiesel: an optimized process. *Journal of Biotechnology*, 231,95-105. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.015>

de Luna, M.D.G., Murniati Budianta, W., Rivera, K.K.P., Arazo, R.O. (2017) Removal of sodium diclofenac from aqueous solution by adsorbents derived from cocoa pod husk. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 1465-1474. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.02.018>

Mandura, A. (2016) *Primjena hladne plazme u inaktivaciji mikroorganizma čiste kulture E. coli*. Završni rad. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Zagreb.

Manzano, P., Hernandez, J., Quijano-Aviles, M., Barragan, A., Choez-Guaranda, I., Viteri, R., Valle, O. (2017) Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste and its utility as antioxidant. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29, 45-50. DOI: 10.9755/ejfa.2016-04-388

Martinez-Cervera, S., Salvador, A., Muguera, B., Moulay, L., Fisman, S.M. (2011) Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 729-736. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.035>

Martinez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Perez-Alvarez, J., Viuda-Martos A. (2012) Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>

Mollea, C., Chiampo, F., Conti, R. (2008) Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*, 107, 1353-1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.006>

Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K.J., Bangoura, M.L., Lagnika, C. (2012a) Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11, 672-677. DOI: 10.3923/pjn.2012.672.677

Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K.J. (2012b) In vitro hypoglycemic and cholesterol effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food & Function*, 3, 1044-1050. DOI: 10.1039/c2fo30091e

Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, D., Pavlović, N. (2018) Cocoa shell: by-product with great potential for wide application. *Molecules*, 23(6), 1404. doi: 10.3390/molecules23061404.

Ragni, L., Berardinelli, A., Iaccheri, E., Gozzi, G., Cevoli, C., Vannini, L. (2016) Influence of the electrode material on the decontamination efficacy of dielectric barrier discharge gas plasma treatments towards *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 170-176. DOI: 10.1016/j.ifset.2016.07.029

Vriesmann, L.C., Teofilo, R., de Olivera Petkowicz F. (2011) Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1230-1236. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.009>

Ward-Doria, M., Arzuaga-Garrido, J., Ojeda, K.A., Sanchez, E. (2016) Production of biogas from acid and alkaline pretreated cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.). *International Journal of ChemTech Research*, 9, 252-260.

Yusof, F., Khanahmadi, S., Amid, A., Mahmud, S.S. (2016) Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate. *SpringerPlus*, 5, 57. DOI 10.1186/s40064-015-1621-3

Prispjelo/Received: 9.12.2018.

Prihvaćeno/Accepted: 1.3.2019.

Original scientific paper

Microbial Quality of Cocoa Husk

Abstract

In this paper, microbial quality of cocoa husk, a by-product of chocolate production after roasting cocoa bean, was evaluated. Cocoa husk was treated by high-voltage electrical discharge (HVED) at 40 and 80 Hz during 15, 30 and 45 min in water suspension (at concentration of 1,5 and 3,0%). The research showed that cocoa husk, although it has been subjected to thermal treatment during roasting, is heavily loaded with microorganisms, but the number of enterobacteria may be reduced by HVED. Subsequent drying at 40 °C, on the contrary, enables revival of microorganisms.

Keywords: cocoa shell, high-voltage electrical discharge, aerobic mesophilic bacteria, yeasts and moulds, enterobacteria