

Usporedba nir spektara i fizikalno kemijskih svojstava funkcionalnih kakao napitaka

Boras, Marija Terezija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:849389>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Marija Terezija Boras
0058215355**

**USPOREDBA NIR SPEKTARA I FIZIKALNO-KEMIJSKIH
SVOJSTAVA FUNKCIONALNIH KAKAO NAPITAKA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mjerenje i upravljanje procesima u prehrambenoj industriji

Mentor: izv. prof. dr. sc. Davor Valinger

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

USPOREDBA NIR SPEKTARA I FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA FUNKCIONALNIH KAKAO NAPITAKA

Marija Terezija Boras, 0058215355

Sažetak: Raznolikost upotrebe kakao prahova u prehrambenoj industriji upravo je razlog zbog čega je ta namirnica od davnih dana visoko cijenjena. U današnje vrijeme namirnice s visokim antioksidacijskim svojstvima su sve traženije tako da je u ovom radu provedena usporedba različitih mješavina kakao praha i meda koje su sušene pri različitim temperaturama (50, 60 i 70°C). Cilj je bio ispitati može li blisko infracrvena spektroskopija koja je uključivala tri različita uređaja (prijenosni, te dva laboratorijska različitog raspona), uz primjenu umjetnih neuronskih mreža, uspješno zamijeniti neki od uređaja koji su korišteni pri određivanju boje, nasipne gustoće, veličine čestica, aktiviteta vode te udjela suhe tvari. Rezultati su pokazali da prijenosni uređaj za blisko infracrvenu spektroskopiju u kombinaciji sa neuronskim mrežama, sa 98% preciznošću predviđa podatke (boje, nasipne gustoće, veličine čestica, aktiviteta vode te udjela suhe tvari) koji su izmjereni drugim uređajima. Time je potvrđen kvantitativni potencijal primjene prijenosnog NIR uređaja.

Ključne riječi: kakao, prahovi, blisko infracrvena spektroskopija, umjetne neuronske mreže

Rad sadrži: 33 stranica, 5 slika, 6 tablica, 29 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Davor Valinger

Komentor: /

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Maja Benković

Datum obrane: 14. rujan 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

COMPARISON OF NIR SPECTRA AND PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF FUNCTIONAL COCOA BEVERAGES

Marija Terezija Boras, 0058215355

Abstract: "The diversity of uses of cocoa powder in the food industry is precisely why this ingredient has been highly valued for centuries. Nowadays, foods with high antioxidant properties are in increasing demand, so this study compares different mixtures of cocoa powder and honey dried at different temperatures (50, 60, and 70°C). The aim was to investigate whether near-infrared spectroscopy, involving three different devices (portable and two laboratory devices with different ranges), along with the application of artificial neural networks, can successfully replace some of the devices used in determining color, bulk density, particle size, water activity, and dry matter content. The results showed that the portable near-infrared spectroscopy device, in combination with neural networks, predicts data (color, bulk density, particle size, water activity, and dry matter content) measured by other devices with 98% accuracy. This confirms the quantitative potential of using the portable NIR device."

Keywords: cocoa, powders, near-infrared spectroscopy, artificial neural networks

Thesis contains: 33 pages, 5 figures, 6 tables, 29 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Davor Valinger, PhD, Associate professor

Co-mentor: /

Technical support and assistance: Maja Benković, PhD, Associate professor

Thesis defended: September 14th, 2023

Sadržaj

SADRŽAJ	1
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PRAHOVI.....	2
2.2. KAKAO PRAH.....	2
2.2.1. PROIZVODNJA KAKAO PRAHA	3
2.3. NIR SPEKTROMETRIJA	5
2.3.1. KEMOMETRIJA I ANALIZA GLAVNIH KOMPONENATA	6
2.3.2. UMJETNE NEURONSKE MREŽE.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. SIROVINA.....	9
3.1.2. APARATURA, PRIBOR	9
3.1.2.1. Aparatura i software.....	9
3.1.2.2. Pribor.....	10
3.2. METODE	10
3.2.1. NASIPNA GUSTOĆA	10
3.2.2. VELIČINA ČESTICA	11
3.2.3. AKTIVITET VODE	12
3.2.4. SUŠENJE.....	13
3.2.5. ODREĐIVANJE BOJE	14
3.2.6. NIR SPEKTROSKOPIJA	14
3.2.7. OBRADA PODATAKA	15
3.2.7.1. Analiza glavnih komponenata i umjetne neuronske mreže.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. BOJA KAKAO PRAHA	17

4.2.	VELIČINA ČESTICA PRAHA	19
4.3.	NASIPNA GUSTOĆA	21
4.4.	ODREĐIVANJE UDJELA VLAGE I AKTIVITETA VODE U KAKAO PRAHU	23
4.5.	NIR I PCA.....	24
4.6.	UMJETNE NEURONSKE MREŽE	28
5.	ZAKLJUČCI.....	30
6.	POPIS LITERATURE	31

1. UVOD

Kakao prah je posljednjih godina postao namirnica koja se može naći u gotovo svakom kućanstvu. Razlog tome je u samoj raznolikosti pripreme koja može biti od toplih i hladnih napitaka, dodataka raznim kašama, muslijima do pripreme raznih slastica. Visokih nutritivnih vrijednosti, ukusan i lako dostupan, često je predmet raznih istraživanja i mjerenja fizikalnih i kemijskih karakteristika. U doba kad je vrijeme novac, svakodnevno se pronalaze novi načini za smanjenje količine posla tj. financijskog utroška pri čemu bi se zadržala ili čak poboljšala kvaliteta finalnog proizvoda.. Među novijim tehnikama blisko infracrvena tehnologija postala je sve popularnija zbog svoje brzine. Ne samo da je snimanje uzoraka vrlo brzo već uzorke nije potrebno pripremati za analizu tj. ne koriste se nikakve dodatne kemikalije čime se isto tako smanjuje utjecaj na okoliš. Koristeći tehnologiju blisko infracrvene spektroskopije (eng. *Near Infrared (NIR) Spectroscopy*) tzv. NIR uređaje u kombinaciji s PCA (eng. *Principal Component Analysis, PCA*) analizom i umjetnim neuronskim mrežama, postalo je moguće predvidjeti rezultate mjerenja s visokim postotkom točnosti te izbjeći obavljanje raznih uzastopnih mjerenja drugim metodama.

U ovom radu provedeno je istraživanje na kakao prahu kojem je dodan med pri tri različite temperature i različitim udjelima kakao praha i meda. Uzorcima su prvo mjereni parametri boje, nasipne gustoće, veličine čestica, aktiviteta vode te udjela suhe tvari, a zatim su svi uzorci snimljeni s tri različita NIR uređaja. Zatim je odrađena PCA analiza snimljenih uzoraka te je pomoću neuronskih mreža određeno moguće predviđanje rezultata za ta tri uređaja.

Cilj ovog rada bio je grafički prikazati te izračunati koji od korištena tri NIR uređaja može s najvećom točnosti povezati izmjerene podatke sa NIR spektrima te biti u mogućnosti potencijalno i zamijeniti određene uređaje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PRAHOVI

Prah je smjesa koja se sastoji od krutih čestica i zraka, pri čemu se smatra dvofaznim disperznim sustavom. Kada se analiziraju praškasti materijali, potrebno je uzeti u obzir pojedinačne osobine svake čestice, kao i osobine skupine čestica, te njihovu interakciju s fluidom (Barbosa-Canovas i sur., 2005).

Prahovi mogu biti prirodni ili umjetno stvoreni te se koriste u razne svrhe. Postoje prahovi koji se koriste u kozmetici, prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, industriji boja i premaza, kao i u mnogim drugim područjima. U prehrambenoj industriji, prahovi se koriste kao aditivi u raznim proizvodima radi poboljšanja teksture, stabilnosti ili okusa hrane.

Opseg primjene prahova je širok i ovisi o industriji i namjeni. Važno je napomenuti da ne postoje pravila koja definiraju što su prahovi, već je to općenit pojam za suhe čestice ili zrna koje se mogu koristiti u razne svrhe.

2.2. KAKAO PRAH

Biljka kakao, znanstveno poznata kao *Theobroma cacao*, pripada obitelji *Malvaceae*. Među 22 vrste u rodu *Theobroma*, samo je *Theobroma cacao* L. od velike ekonomske važnosti diljem svijeta. To je uglavnom zbog visoke potražnje za njenim zrnima, koja su glavna sirovina za razne proizvode od kakaa.

U Pravilniku o kakau i čokoladnim proizvodima iz 2005. godine definirano je da je kakao prah proizvod koji se dobiva od kakaovih zrna koja su očišćena, oljuštena i pržena. Taj kakao prah mora sadržavati najmanje 20% kakaovog maslaca, izračunato na suhu tvar, i najviše 9% vode (NN 73/2005). Proces dobivanja kakao praha uključuje prešanje kakao mase kako bi se odvojio kakao maslac od suhe tvari.

Zrna kakaa se široko koriste u proizvodnji čokolade. Nakon berbe, zrna prolaze kroz proces fermentacije, sušenja i obrade kako bi se dobila čokolada. Osim toga, kakao prah, dobiven iz zrna kakaa, široko se koristi u prehrambenoj industriji za pripremu kakao napitaka, peciva, sladoleda i slično. Kakao maslac, još jedan vrijedan proizvod dobiven iz kakaa, koji se koristi ne samo u konditorskoj industriji već ima primjene u kozmetici i farmaceutskom sektoru (Caligiani i sur., 2015; Kongor i sur., 2016).

Jedinstveni okus i aroma kakaa učinili su ga popularnom biljkom diljem svijeta, s velikom ekonomskom i kulturnom važnosti.

Trenutno se najviše uzgajaju tri vrste kakaa: Forastero, Criollo i Trinitario. Također, postoji četvrta sorta koja je razvijena u Ekvadoru i naziva se Nacional. Ove vrste se međusobno razlikuju po izgledu ploda, prinosu, karakterističnom okusu te otpornosti na različite bolesti (Afoakwa i sur., 2011).

Tijekom dugog niza godina, kakao i čokolada su se koristili isključivo radi užitka. Međutim, istraživanja provedena u posljednjih 20 godina pokazuju da kakao i čokolada mogu imati blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje zbog visokog udjela polifenola (Ackar i sur., 2013). Polifenoli koji se nalaze u zrnu kakaa pohranjeni su u pigmentnim stanicama, a boja može varirati od bijele do tamno ljubičaste, ovisno o količini antocijana. U kakau se posebno ističu tri glavne skupine polifenola: flavonoidi (oko 37%), antocijani (oko 4%) i proantocijanidi (oko 58%) (Wollgast i Anklam, 2000). Polifenoli iz kakaa iskazuju svojevrstna svojstva poput antikancerogenog, vazodilatatornog i protuupalnog djelovanja. Oni djeluju kao antioksidansi, a neka istraživanja su pokazala da postoji povoljna veza između konzumiranja kakaa i smanjenog rizika od smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. (Oleaga i sur., 2012; Corti i sur., 2009).

2.2.1. Proizvodnja kakao praha

Sirovi kakao ima gorak i trpak okus, što zahtijeva niz faza u procesu pretvaranja kakao zrna u proizvode koji se kasnije koriste za različite prehrambene proizvode. Osnovni principi obrade kakaa nisu se mijenjali u proteklih 150 godina. Tokom proizvodnje, dolazi do oksidacije polifenola, što smanjuje gorčinu i pojačava karakterističan okus kakaa (Nazaruddin i sur., 2006). Također, dolazi do promjene u sastavu, pa svježe zrno kakaa sadrži otprilike 32-39% vode, 30-32% masti, 10-15% proteina, 5-6% polifenola, 4-6% škroba, 2-3% celuloze i 2-3% saharoze.

Theobroma cacao L. obično počinje davati plodove nakon 3 godine, a postiže najviši prinos plodova nakon 8-9 godina. Berba kakaovih mahuna se provodi ručno koristeći noževe (Beg i sur., 2017). Ova berba se obavlja dvaput godišnje, u veljači/ožujku i travnju/srpnju. Nakon berbe, mahune se pažljivo pregledavaju, a odabrane su samo one koje su zdrave i potpuno zrele. Ključno je da se berba kakaovih mahuna izvodi u pravo vrijeme, kada su plodovi optimalno zreli. Nakon berbe, mahune se otvaraju i iz njih se izdvajaju kakao zrna koja se, nakon čišćenja, podvrgavaju procesu fermentacije (Gutierrez, 2017).

Fermentacija se obično provodi u drvenim kutijama ili košarama koje su prekrivene bananinim lišćem. Trajanje fermentacije varira ovisno o vrsti kakaa: za sortu Criollo traje 2-3 dana, dok za sorte Trinitario i Forastero traje duže, 5-8 dana. Fermentacija ima iznimno važnu ulogu jer tijekom nje dolazi do razgradnje pulpe, deaktivacije mikroorganizama i razvoja prekursora arome. Tijekom fermentacije, događa se nekoliko ključnih procesa: šećeri se smanjuju, proteini se enzimatski razgrađuju u slobodne aminokiseline i peptide, a fenolni spojevi oksidiraju i polimeriziraju. To dovodi do smanjenja gorčine. Tijekom fermentacije stvaraju se i hlapljivi spojevi poput alkohola, organskih kiselina, estera i aldehida, koji doprinose bogatstvu arome kakaa (Lopez i Dimick, 1995).

Nakon fermentacije dolazi faza sušenja. Sušenjem se dovršavaju oksidativni procesi koji su započeli tijekom fermentacije, što rezultira smanjenjem gorčine i kiselosti te razvojem smeđe boje. Smeđa boja nastaje reakcijom kondenzacije između kinona i proteina nakon enzimske oksidacije polifenola. Sušenje se provodi sve dok sadržaj vlage ne padne na 7-8%, što omogućava siguran transport i skladištenje. Obično se koristi prirodno sušenje na suncu, iako se u nepovoljnim klimatskim uvjetima može primijeniti i sušenje vrućim zrakom putem ventilacije.

Prije nego što se kakao zrna dalje obrade, potrebno ih je pregledati i očistiti od nečistoća. Ljuštenje kakao zrna može se izvršiti ili prije ili nakon procesa prženja.

Alkalizacija je proces tretiranja kakao zrna alkalnim otopinama kalijevog karbonata ili natrijevog hidroksida. Konačna boja i okus proizvoda u ovom procesu ovise o različitim parametrima, uključujući vrijeme obrade, temperaturu, vrstu i koncentraciju alkalnog sredstva, količinu vlage, zraka i tlaka. Alkalizacija je opcionalna i može se primijeniti u različitim fazama procesa (Lopez i Dimick, 1995). Tijekom alkalizacije, fenolni spojevi se oksidiraju, što dovodi do stvaranja smeđeg pigmenta (Giacometti i sur., 2014). Alkalizirani kakao prah obično ima bolju boju i manje gorčine u usporedbi s nealkaliziranim kakao prahom.

Pečenje je ključan korak koji znatno utječe na krajnju kvalitetu i okus proizvoda od kakaa. Ovaj proces se provodi pri temperaturama od 110 do 160 stupnjeva Celzija tijekom razdoblja od 5 do 120 minuta. Tijekom pečenja, sadržaj vlage u kakao zrnima smanjuje se na otprilike 2%, a nepoželjni hlapljivi spojevi koji pridonose kiselosti i gorčini isparavaju iz zrna.

Mljevenjem se stvaraju uvjeti za razbijanje staničnih stijenki kakao zrna, što omogućava oslobađanje kakao maslaca. Tijekom ovog procesa, trenje generira toplinu koja uzrokuje da masa postane tekuća. Nakon toga, dobivena kakao masa se čuva na temperaturi od 40°C do 45°C do daljnje obrade.

Kakao masa se podvrgava hidrauličkom prešanju s povećanjem pritiska od 40 do 50 MPa

tijekom određenog vremenskog razdoblja. Ovaj postupak omogućava izdvajanje kakao maslaca, koji se koristi za proizvodnju različitih čokoladnih proizvoda. Nakon što se maslac odvoji, preostala masa se usitnjava i pretvara u kakao prah.

2.3. NIR spektrometrija

Blisko infracrvena spektroskopija, poznata i kao NIRS (eng. *Near-infrared spectroscopy*), je tehnika koja se koristi za analizu molekula. Ona se fokusira na apsorpciju elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina od 750 do 2500 nanometara (nm). Ovaj raspon valnih duljina odgovara energijama fotona od 2.65×10^{-19} do 7.96×10^{-20} joula (J) (Pasquini, 2003).

Vibracijska spektroskopija u infracrvenom (IR) području proučava kako molekule apsorbiraju elektromagnetsko zračenje određenih valnih duljina, koje imaju dovoljno energije za promjenu između kvantiziranih vibracijskih energetske stanja. Ova tehnika analizira kako molekule "vibriraju" ili se pomiču na atomskoj razini, i koristi apsorpciju infracrvenog zračenja kao način za dobivanje informacija o njihovoj strukturi i kemijskim svojstvima (Metrohm, 2013). Molekula može apsorbirati infracrveno zračenje ako se tijekom vibracije dogodi promjena u dipolnom momentu. To znači da se električni naboj u molekuli pomiče ili mijenja tijekom vibracijskog kretanja. Atom vodika je najlakši atom i stoga je podložan najjačim vibracijama. Stoga su glavne regije (vrpce) u blisko infracrvenom spektru povezane s vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome, poput ugljika (C-H), dušika (N-H), kisika (O-H) i sumpora (S-H). To znači da se u bliskom infracrvenom spektru može vidjeti apsorpcija zračenja koja je karakteristična za te vrste veza (Blanco i Villarroya, 2002).

Blisko-infracrvena spektroskopija pruža brojne prednosti u praćenju kvalitete hrane u usporedbi s tradicionalnim analitičkim metodama. Ova tehnika je brza i ne oštećuje uzorak, što je čini pogodnom za upotrebu tijekom procesa proizvodnje hrane (npr. In-line analiza). Također, blisko-infracrvena spektroskopija se ističe po svojoj točnosti i pouzdanosti u pružanju rezultata (Pasquini, 2003).

Zahtjevi za pripremu uzoraka su minimalni i ne zahtijeva se upotreba kemijskih reagensa (Metrohm, 2013). To smanjuje troškove analize i količinu otpada koji nastaje. Uz to, NIR spektroskopija ima visok omjer signala i šuma, što znači da se može dobiti jasan i pouzdan spektar čak i pri niskim koncentracijama analita. Također, zbog slabije apsorpcije vode i stakla, NIR spektroskopija se može koristiti za snimanje spektara vodenih otopina u staklenim reaktorima, bez potrebe za dodatnom korekcijom pozadinskog signala.

S druge strane, vrpce blisko-infracrvenog (NIR) spektra pružaju manje informacija u usporedbi s drugim spektroskopskim tehnikama. Kako bi se dobile detaljnije informacije o analitu, potrebna je daljnja obrada podataka korištenjem multivarijatnih metoda analize. Blisko-infracrvena spektroskopija se često koristi kao sekundarna metoda analize, što znači da zahtijeva izradu kalibracijskih modela kako bi se povezali spektri s koncentracijama analita. Izrada ovih kalibracijskih modela može biti dugotrajan proces koji zahtijeva odgovarajući skup referentnih uzoraka i pažljivo odabrane matematičke algoritme (Jednačak i Novak, 2013).

2.3.1. Kemometrija i analiza glavnih komponenata

Kemometrija je kombinacija različitih matematičkih, statističkih i logičkih pristupa kojima se postiže efikasno upravljanje i interpretacija prikupljenih podataka (Haswell, 1992). Unutar kemometrije koriste se razne tehnike za analizu višedimenzionalnih podataka, poput regresije glavnih komponenti (PCR) i parcijalne linearne regresije metodom najmanjih kvadrata (PLS), kako bi se konstruirali modeli temeljeni na referentnim kemijskim informacijama koje su prikupljene pomoću drugih analitičkih metoda. No, u slučajevima gdje je prisutna izražena nelinearnost, gore navedene tehnike rezultiraju značajnim greškama.

Analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) ili je multivarijatna statistička metoda koja se koristi u obradi blisko-infracrvenih (NIR) spektara kako bi se smanjila dimenzionalnost podataka. Blisko-infracrveni spektri pružaju veliku količinu informacija o svakom uzorku, a glavna svrha PCA analize je identificirati i izdvojiti najvažnije informacije iz mjerenih spektara, čime se smanjuje količina podataka.

PCA analiza djeluje tako da transformira originalne spektre u novi skup varijabli, nazvane glavne komponente. Te glavne komponente su linearna kombinacija originalnih varijabli, ali su međusobno nekorelirane. Svaka glavna komponenta ima svojstvo da sadrži maksimalnu varijabilnost podataka. Time se postiže smanjenje dimenzionalnosti podataka, pri čemu se zadržava što više informacija iz spektara.

PCA analiza je korisna u istraživanju korelacija i varijabilnosti u skupu NIR spektara, te može pomoći u identifikaciji značajnih uzoraka ili karakteristika. Ova metoda omogućuje pojednostavljenje analize, interpretaciju rezultata i lakše donošenje odluka temeljem smanjenog skupa informacija (Abdi i Williams, 2010).

Podaci koji se dobiju za svaki uzorak mogu se prikazati u višedimenzionalnom prostoru, gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu (Jednačak i Novak, 2013), odnosno apsorbanciju blisko-infracrvenog zračenja pri određenoj valnoj duljini. Upotrebom PCA-a, generiraju

se nove varijable koje se nazivaju glavne komponente (PC), a dobivaju se kombiniranjem originalnih varijabli.

Glavne komponente imaju sljedeća svojstva: prva glavna komponenta (PC-1) predstavlja najveću varijabilnost u podacima (Abdi i Williams, 2010). Svaka sljedeća glavna komponenta je ortogonalna u odnosu na prethodnu (matematički su vektori) i predstavlja sljedeću najveću varijabilnost u podacima (Metrohm, 2013).

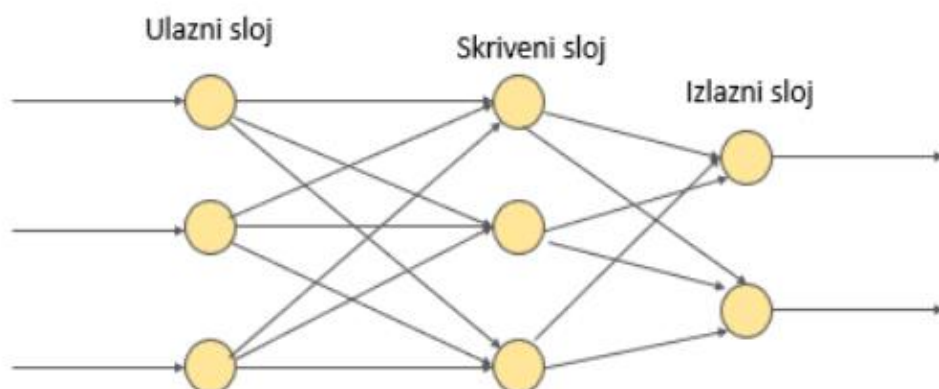
PCA analiza omogućuje transformaciju izvornih podataka u prostor manje dimenzionalnosti, gdje se veći dio varijabilnosti može objasniti glavnim komponentama. Time se postiže smanjenje kompleksnosti podataka i olakšava interpretacija rezultata analize blisko-infracrvenih spektara.

Djelomična regresija najmanjih kvadrata (PLS regresijski model) je tehnika modeliranja, primijenjena unutar područja kemometrije (kemija i statistika), koja koristi kombinaciju višestruke regresije i analizu glavnih komponenata (Bendelja i sur., 2018). Ova tehnika se koristi za predikciju niza zavisnih varijabli (označene kao X) na temelju nezavisnih varijabli, poznatih kao prediktori (Y) (Jurina i sur., 2018). Kvaliteta PLS regresije se ocjenjuje izračunavanjem koeficijenta determinacije (označenog kao R^2), što služi za procjenu usklađenosti modela tijekom kalibracije i provjere na novim podacima. Također, prosječna vrijednost korijena kvadratne pogreške (označena kao RMSE) se uzima u obzir kao mjera preciznosti modela.

2.3.2. Umjetne neuronske mreže

Umjetne neuronske mreže (ANN) predstavljaju fleksibilne i visoko paralelne sustave strojnog učenja koji se sastoje od slojeva procesnih jedinica, poznatih kao neuroni. Ove mreže se koriste za rješavanje problema prepoznavanja uzoraka putem izgradnje složenih nelinearnih modela (Han i sur., 2018). Ovi modeli se primjenjuju kako bi se predvidjeli obrasci koji nisu unaprijed poznati. Struktura i funkcija umjetnih neuronskih mreža nadahnute su organizacijom i funkcionalnošću ljudskog mozga (Zheng, 2011).

U umjetnim neuronskim mrežama, elementi obrade grupiraju se u slojeve. Prvi sloj predstavlja ulazne podatke (input), dok se posljednji sloj sastoji od izlaznih podataka (output). Između ovih slojeva mogu postojati dodatni slojevi, poznati kao skriveni slojevi. Svaki neuron u mreži povezan je s neuronima u susjednim slojevima. Ovi neuroni primaju ulazne signale, obrađuju ih i generiraju izlazne signale.



Slika 1. Umjetna neuronska mreža (Mehinović, 2020)

Kroz proces učenja, umjetne neuronske mreže prilagođavaju svoje težine i parametre kako bi se minimizirale pogreške u predviđanjima. Ovaj postupak omogućava mrežama da nauče i opisuju složene obrasce u podacima, čime postaju efikasni alati za različite zadatke, uključujući prepoznavanje uzoraka, klasifikaciju i predviđanje.

Neuronska mreža se može obučiti da izvršava specifične funkcije. Sve umjetne neuronske mreže podijeljene su u dvije glavne kategorije, ovisno o načinu učenja: i) učenje pod nadzorom i ii) učenje bez nadzora.

U učenju pod nadzorom, mreža je trenirana koristeći ulazne podatke i pripadajuće izlazne podatke. Tijekom treninga, težine veza u mreži prilagođavaju se kako bi se postiglo što bolje podudaranje između izlaza mreže i stvarnih izlaza. Ovaj iterativni proces nastavlja se sve dok mreža ne postigne željene rezultate.

U učenju bez nadzora, mreža se trenira samo s ulaznim podacima, bez poznatih izlaznih vrijednosti. Mreža mora samostalno izvući značajke i obrasce iz ulaznih podataka, često grupirajući ih u kategorije ili identificirajući karakteristike specifične za problem (Amato i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Mješavina kakao praha (Kraš d.d., Zagreb, Hrvatska) i zobi (Bio&bio, Zagreb, Hrvatska) na bazi meda (Bio&bio, Zagreb, Hrvatska) pri različitim omjerima koji su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Omjeri dodanih komponenti u smjesu

pokus	med / g	zob / g	kakao / g
1	50	50	6.25
2	60	40	7.5
3	40	60	5
4	40	60	7.5
5	60	40	6.25
6	50	50	5
7	60	40	5
8	40	60	6.25
9	50	50	7.5

3.1.2. Aparatura, pribor

3.1.2.1. Aparatura i software

- Analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- Analizator veličine čestica (Mastersizer 2000, Malvern Panalytical, UK)
- Eksikator (Normax, Portugal)
- Kolorimetar (CM-A177, Konica Minolta Sensing, inc., Japan)
- Laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- NIR spektrometar (Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO, Avantes, SAD)
- NIR spektrometar (NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μ m, Control development inc., SAD)
- NIR spektrometar (NIR-S-G1, InnoSpectra, Tajvan)
- Statistica v.10.0 (StatSoft, Tulsa, SAD)
- Uređaj za mjerenje aktiviteta vode (Hygropalm, HP23-AW-A, Rotronic, Švicarska)
- Vibracijski volumetar

3.1.2.2. Pribor

- aluminijske posudice
- metalna špatulica za vaganje
- plastična menzura volumena 250 mL
- plastične posudice za vaganje
- plastična žlica

3.2. METODE

3.2.1. Nasipna gustoća

Nasipna gustoća praha predstavlja omjer između mase praha koji je nasipan na slobodan način i volumena koji taj prah zauzima, uključujući i praznine među česticama koje su ispunjene zrakom. Ovaj omjer ovisi o gustoći samih čestica praha i njihovom rasporedu u prostoru. Nasipna gustoća može se izraziti u mjeri grama po mililitru (g/mL) ili kilograma po kubnom metru (kg/m^3). Kada se radi o grupi prahova, njihove zajedničke karakteristike (nazvane "bulk karakteristike") ovise o načinu pripreme, tretiranja i skladištenja uzoraka.

Vibracijska nasipna gustoća mjeri se kako bi se procijenio utjecaj vibracija na gustoću praha. Tijekom vibracija, zrak između čestica biva istisnut, što uzrokuje smanjenje volumena praha. Točni uređaji koji se koriste za ovu svrhu zovu se "vibracijski volumetri", a temelje se na principu rotirajućeg ekscentra koji podiže i spušta menzuru s uzorkom praha. Ovaj proces uzrokuje smanjenje volumena praha u menzuri zbog istiskivanja zraka između čestica i njihovog kompaktnijeg rasporeda.

Menzura volumena 250ml se stavlja na vagu te se vaga tarira kako bi se očitala samo masa praha koji se dodaje u menzuru. S obzirom da nisu svi uzorci jednake mase, važe se prvo uzorak s najmanjom masom, te se ostali uzorci važu na tu približnu masu (uzorci na temperaturi 50°C su vagani na masu približnu 60g, uzorci na 60°C su mase 80g, a uzorci na 70°C na približno 30g jer ih je bilo najmanje). Tijekom vaganja, prah se dodaje žlicom te se slobodno nasipa kako ne bi došlo do trešnje ili smanjenja volumena. Kad se izvaže uzorak, pažljivo se menzura prenosi s vage na vibracijski volumetar. Uređaj se pokreće te se protresanje zaustavlja tri puta, nakon 10, 100 i 1250 udaraca, tj. nakon približno 2 sekunde, 10 sekundi te 4 minute. Pri svakom zaustavljanju se očitava volumen i bilježi kako bi se naknadno mogli izračunati parametri nasipne gustoće, Hausnerovog omjera te indeksa kompresibilnosti.

Parametri se izračunavaju prema formulama:

$$I_c = \frac{V_o - V_f}{V_o} \times 100 \quad [1]$$

$$H_r = \frac{V_f}{V_o} \quad [2]$$

$$\rho_n = \frac{m}{V_o} \quad [3]$$

Pri čemu je V_o početni volumen prije protresanja, V_f je volumen praha nakon protresanja, I_c je indeks kompresibilnosti, H_r je Hausnerov omjer, a ρ_n je nasipna gustoća.

3.2.2. Veličina čestica

Veličina čestica predstavlja jedan od složenih problema unutar tehnologije prahova, oko kojeg se i dalje većina inženjera nije usuglasila. Razlog tomu leži u činjenici da veličina čestica predstavlja relativan koncept te i dalje nedostaje jasna i precizna definicija. Čak i unutar definicija prahova, gdje se veličina čestica spominje, postoje varijacije, a često se prahovi kategoriziraju kao fini ili grubi na temelju veličine čestica. Koriste se razne metode za određivanje veličine čestica, neke od njih su objašnjene u nastavku:

Sitena analiza (prolazak čestica kroz set sita s različitim veličinama otvora). Veličina čestica se određuje prema sitima kroz koja mogu proći), mikroskopija (vizualizacija i mjerenje veličine čestica direktno putem mikroskopskih slika), sedimentacija (temelji se na brzini kojom čestice padaju u tekućini ili drugoj sredini; Prema vremenu koje čestice trebaju da se istalože na dno, može se procijeniti njihova veličina), "stream scanning" metoda (hr. *skeniranje toka*) (prolazak čestica kroz detekcijski sustav koji mjeri njihovu svjetlosnu ili električnu interakciju, što omogućuje procjenu veličine čestica) te On-line metode (kontinuirano praćenje veličine čestica tijekom proizvodnog procesa, što je korisno za realno vrijeme).

Izbor odgovarajuće metode ovisi o specifičnim zahtjevima procesa i željenim rezultatima, uzimajući u obzir pouzdanost, praktičnost i relevantnost za primjenu čestica.

Mjerenje veličine čestica pomoću laserske difrakcije temelji se na usmjeravanju laserskog zračenja prema uzorku. Kada se svjetlosni snop susretne s česticama u uzorku, svjetlost se raspršuje pod različitim kutovima i s različitim intenzitetima. Ti kutovi i intenziteti izravno ovise o veličini ili promjeru tih čestica. Što su čestice manje, to će se svjetlost raspršiti pod većim kutovima, a taj rast kuta je logaritamski, kako se veličina čestica smanjuje. Također, intenzitet

raspršene svjetlosti varira ovisno o veličini čestica. Velike čestice će raspršiti svjetlost pod manjim kutem, ali s visokim intenzitetom, dok će manje čestice raspršiti svjetlost pod širim kutem, ali s manjim intenzitetom. Ovaj koncept omogućuje analizu raspodjele veličine čestica u uzorku koristeći lasersku difrakciju.

Mjerenjem intenziteta raspršene svjetlosti pod različitim kutovima, ova metoda omogućuje dobivanje raspodjele veličine čestica prema volumenu čestica. Iako se osnovna raspodjela temelji na volumenu, softverski je moguće pretvoriti tu raspodjelu u bilo koji drugi oblik raspodjele, sukladno potrebama analize. Ova cjelokupna tehnička struktura omogućuje precizno mjerenje veličine čestica i njihovu distribuciju u uzorku.

Uređaj za mjerenje veličine čestica, pod imenom Mastersizer 2000, mjeri te preko vlastitog softvera odmah navodi očitavanja različitih parametara potrebnih za određivanje veličine čestica. Postupak je jednostavan te je za mjerenje potrebno u ladicu koja se nalazi u uređaju staviti jednu žlicu uzorka i zatvoriti poklopac kako bi se pokrenulo mjerenje. Nakon što računalo završi s obradom podataka, potrebno ih je spremati u pdf obliku te preći na idući uzorak. Prije mjerenja je potrebno očistiti ladicu te sito kroz koje prolazi prah prije miješanja s zrakom pod tlakom. Po završetku mjerenja, svi podaci su preuzeti na računalo te posloženi u tablicu br. 3.

3.2.3. Aktivitet vode

Aktivitet vode je fizikalni parametar koji je uveo Scott u mikrobiologiju 1957. godine. On je pokazao da aktivitet vode učinkovito mjeri odnos između vlage prisutne u hrani i količine vode koja je dostupna mikroorganizmima za njihove metaboličke reakcije (Pitt i Hocking, 2009).

Važno je napomenuti da aktivitet vode u hrani nije isto što i sadržaj vlage. Na primjer, neki proizvodi mogu imati istu količinu vlage, ali različite vrijednosti aktiviteta vode. Sadržaj vlage definira se kao postotak vlage u odnosu na suhu tvar proizvoda. U uvjetima u kojima nema razmjene vlage između proizvoda i njegove okoline, kažemo da su postignuti statički ekvilibriji.

U tim statičkim ekvilibrijima, parcijalni tlak vodene pare na površini proizvoda jednak je parcijalnom tlaku vodene pare u neposrednoj blizini proizvoda. Razmjena vlage između proizvoda i okoline ovisi o razlici između ova dva parcijalna tlaka. Aktivitet vode se definira u uvjetima statičkog ekvilibrija i mjeri tlak pare koji je proizveden vlagom prisutnom u proizvodu. Ovaj parametar je ključan u kontroli kvalitete hrane i sprečavanju mikrobiološkog razmnožavanja jer mikroorganizmi zahtijevaju određeni nivo aktiviteta vode za svoj rast i razvoj (Károlyi, 2004).

Uređaj za mjerenje aktiviteta vode, pod nazivom HP23-AW-A, Rotronic, korišten je u određivanju aktiviteta vode uzoraka. Potrebno je u plastičnu čašicu staviti dvije žlice uzorka te tu čašicu bez poklopca ubaciti u postolje uređaja. Nakon toga, na postolje se stavlja uređaj te se pokreće mjerenje. Svako mjerenje traje četiri minute te se pri završetku uređaj oglašava te se mjerenje zaustavlja. Parametre temperature i aktiviteta vode s uređaja je potrebno pribilježiti za svaki uzorak posebno. S obzirom da je za svaki uzorak mjerenje obavljeno dva puta, rezultati su iskazani u tablici br. 4 u obliku aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

3.2.4. Sušenje

Sušenje je jedna od najstarijih metoda za smanjenje sadržaja vlage u materijalima i produženje njihovog roka trajanja, posebno kada su u pitanju sirovine biološkog podrijetla. U prehrambenoj industriji, sušenje se često koristi kako bi se namirnice stabilizirale i produžio njihov rok trajanja. S druge strane, u kemijskoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, sušenje se često primjenjuje nakon aglomeracije pomoću tekućih veziva, kako bi se uklonio suvišak vlage iz aglomeriranog materijala.

Tijekom procesa sušenja, voda prisutna u proizvodu uklanja se do stupnja gdje više nije dostupna za potencijalni rast mikroorganizama. Također, ovaj proces usporava ili sprječava kemijske ili enzimske reakcije koje mogu uzrokovati kvarenje proizvoda.

Postoje različite metode sušenja koje se primjenjuju u različitim industrijama. Neke od široko korištenih metoda uključuju sušenje na suncu (prirodno sušenje), sušenje u komorama, sušenje raspršivanjem (eng. *spray drying*), sušenje mikrovalovima, sušenje u vakuumu i proces ekstrakcije. Svaka od ovih metoda ima svoje specifične prednosti i primjene, ovisno o potrebama i karakteristikama proizvoda koji se obrađuju. Metode koje se specifično koriste za prahove su sušenje raspršivanjem, sušenje u fluidiziranom sloju, sušenje zamrzavanjem (liofilizacija), sušenje na bubnjevima i sušenje u pjenu.

Prije procesa sušenja potrebno je izvagati posudice i uzorke koji će ići na sušenje. Svaki uzorak se stavlja u dvije posudice kako bi se vagao dva puta. Aluminijska posudica se važe prazna zajedno s poklopcem te se masa zapisuje. U posudicu dok je još uvijek na vagi se plastičnom žličicom dodaje približno 2g uzorka te se posudica hvataljkom stavlja u sušionik. Svaka odvaga se zapisuje radi naknadne obrade podataka. Nakon što je svaki uzorak odvagano i poslan u prethodno zagrijani sušionik, započinje sušenje pri temperaturi od 105°C u trajanju od tri sata. Pri isteku vremena, posudice se oprezno prebacuju u eksikator gdje se hlade. Nakon što su se

posudice u potpunosti ohladile, idu na ponovno vaganje na analitičku vagu te se odvaga zapisuje u tablicu. Kako bi došli do iznosa promjene mase, potrebno je od početne mase (posudica+uzorak) oduzeti konačnu masu (posudica+uzorak).

3.2.5. Određivanje boje

Mjerenje boje na kolorimetru temelji se na parametrima trodimenzionalnog sustava boja izraženih u $L^*a^*b^*$ vrijednostima. Ovaj sustav, CIE Lab sustav, sastoji se od tri koordinate boja:

1. L^* (svjetlina): Ova koordinata predstavlja svjetlinu i ima raspon od 0 do 100, gdje 0 označava crnu, a 100 bijelu boju.
2. a^* (crveno-zeleni spektar): Koordinata a^* predstavlja crvenu boju na pozitivnoj strani i zelenu boju na negativnoj strani. Njezina skala proteže se od -127 do +127, gdje -127 označava čistu zelenu, a +127 čistu crvenu boju.
3. b^* (žuto-plavi spektar): Koordinata b^* predstavlja žutu boju na pozitivnoj strani i plavu boju na negativnoj strani. Skala joj također ide od -127 do +127, gdje -127 predstavlja čistu plavu, a +127 čistu žutu boju.

Osim ovih osnovnih koordinata, možete izračunati i druge parametre kao što su:

- h (ton boje): Predstavlja ton boje.
- c (intenzitet ili zasićenost boje): Označava koliko je boja zasićena.

Kolorimetar radi tako da mjeri stupanj reflektirane svjetlosti s površine koju mjeri. U plastični poklopac se stavi jedna žlica uzorka te se uređaj prislanja na prah kako bi se očitale L , a , b , c i h parametri. Za svaki uzorak je mjerenje provedeno tri puta. Između mjerenja različitih uzoraka potrebno je obrisati uređaj kako bi se uklonile čestice uzorka kojemu su prethodno mjereni parametri. Nakon mjerenja je sastavljena tablica br. 2 gdje su svi rezultati prikazani u obliku aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

3.2.6. NIR spektroskopija

Za snimanje uzoraka su korištena tri različita NIR uređaja: Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO (Avantes, SAD), NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm (Control development inc., SAD) te NIR spektrometar NIR-S-G1 (InnoSpectra, Tajvan).

Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO uređaj (pri izradi završnog rada referiran kao novi NIR) u rasponu valnih duljina 1000-2500nm omogućuje snimanje praškastih uzoraka tako što se sonda

uroni u uzorak. S obzirom da su uzorci u plastičnim kutijama, nije potrebno prebacivati u drugu posudu nego je dovoljno ručno protresti posudu kako bi se postigla homogenizacija uzorka te uroniti sondu. Kad se stabilizira očitavanje snimanja uzorka, potrebno je u programu spremite rezultate pod nazivom uzorka koji je sniman. Svaki uzorak je snimljen deset puta.

NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm (stari NIR) također funkcionira na način da se sonda uroni u prah te se snima uzorak u rasponu valnih duljina 904-1699 μm . Postupak mjerenja je jednak kao kod novog NIR uređaja, premda je softver koji ovaj uređaj koristi sporiji. Svaki uzorak je snimljen deset puta.

NIR-S-G1 uređaj, tj. prijenosni NIR, snima u rasponu valnih duljina 900- 1700 μm , ali je princip mjerenja drugačiji. Ovaj uređaj nema sondu koja se uranja u uzorak, već se direktno u uređaju nalazi detektor koji je zaštićen staklom. Da bi se snimio uzorak, potrebno je žlicu uzorka staviti u plitku plastičnu posudu na bijelu podlogu te uređaj prisloniti na uzorak. Kad se očitavanje stabilizira, potrebno je snimiti dobivenu krivulju te spremite rezultate pod imenom uzorka koji je sniman. Svaki uzorak je snimljen deset puta.

3.2.7. Obrada podataka

Svi parametri su mjereni u triplikatu te je računata srednja vrijednost i standardna devijacija.

3.2.7.1. Analiza glavnih komponenata i umjetne neuronske mreže

U svrhu obrade podataka iz NIR spektara primijenjena je kemometrijska metoda analize glavnih komponenti (PCA), a podaci dobiveni tim postupkom korišteni su za izradu umjetnih neuronskih mreža. Za obradu podataka korišten je softver Statistica 13.3 (Tibco Statistica, Palo Alto, SAD).

Analiza glavnih komponenti (PCA) primijenjena je kako bi se izdvojile ključne informacije iz opsežnih NIR spektara, koji pokrivaju valne duljine od 904 do 1699 nm i od 1000 do 2500 nm. PCA je pretvorila spektralne podatke u novi skup varijabli, nazvanih glavne komponente ili faktori. Obično se rezultati PCA analize prikazuju omjerom faktora, pri čemu prvi faktor objašnjava najveći dio varijabilnosti, dok ostali faktori objašnjavaju sve manji dio.

U ovom slučaju, prvih 10 faktora PCA analize, koji zajedno objašnjavaju 99,99% varijabilnosti u podacima, korišteni su kao ulaz za umjetne neuronske mreže. Izlazni podaci tih neuronskih mreža bili su izmjerene vrijednosti za nasipnu gustoću, boju, veličinu čestica, aktivitet vode i udio vlage u uzorku. S obzirom da su korištena tri različita NIR uređaja, razvijene su specifične

neuronske mreže za svaki od njih. Ovaj pristup omogućuje precizniju obradu i predviđanje svojstava uzoraka temeljem NIR spektralnih podataka prikupljenih pomoću različitih uređaja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj provedenog istraživanja bio je usporediti tri različita NIR uređaja te odrediti koji od njih može s najvećom preciznosti predvidjeti podatke izmjerene ostalim uređajima. Istraživanje se provodilo na mješavini praha koja je prikazana u tablici 1 pri tri različite temperature (50°C, 60°C i 70°C). Mjereni podaci su boja praha, nasipna gustoća, veličina čestica, aktivitet vode i udio vlage u uzorku koji su prikazani u tablicama (tablice 2, 3, 4 i 5), dok su rezultati mjerenja NIR uređajima dobiveni PCA analizom prikazani u tri grupe po devet grafova (slike 3, 4 i 5).

4.1. Boja kakao praha

Za određivanje boje kakao praha, koristeći kolorimetar određeni su parametri L, a, b, c i h za svaki uzorak. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 2. gdje se može iščitati kakva je boja kojeg uzorka.

Za L vrijednost je minimalna izmjerena vrijednost kod uzorka p2 na 50°C i iznosi $34,77 \pm 0,23$, a maksimalna izmjerena vrijednost je $55,11 \pm 0,01$ za uzorak p3 pri temperaturi od 50°C. Iz ovih podataka je vidljivo da su svi uzorci u rasponu od 34 do 55, što pokazuje da je boja bliža crnoj nego bijeloj (smeđi prah).

Za a vrijednost je izmjerena minimalna vrijednost za $10,10 \pm 0,02$ za uzorak p5 pri 50°C, a maksimalna vrijednost je pri p8 50°C i iznosi $18,91 \pm 0,03$. Prema ovim vrijednostima, veći je postotak crvene boje u uzorcima nego zelene.

B vrijednost pokazuje odnos plave i žute u uzorku te je iz minimalne i maksimalne vrijednosti ($9,39 \pm 0,14$ za uzorak p2 50°C i $16,57 \pm 0,06$ za p4 50°C) vidljivo da je više žute boje u uzorku nego plave.

H vrijednost označava ton boje. Minimalna vrijednost je zabilježena kod uzorka p2 50°C i iznosi $41,28 \pm 0,07$, a maksimalna iznosi $51,82 \pm 0,01$ za p3 50°C.

Zasićenost boje se opisuje parametrom c. Najzasićeniju boju ima uzorak p5 60°C i ima vrijednost $21,21 \pm 0,02$, a najmanje zasićena boja je kod uzorka p5 50°C i iznosi $13,85 \pm 0,03$.

Tablica 2. Prosječne vrijednosti za mjerene kolorimetrijske parametre ispitivanog praha

Pokus	50°C					60°C					70°C				
	L	a	b	c	h	L	a	b	c	h	L	a	b	c	h
1	40,27± 0,03	12,27± 0,03	12,50± 0,03	17,52± 0,05	45,55± 0,01	54,11± 0,28	12,09± 0,03	15,24± 0,04	19,45± 0,05	51,58± 0,01	45,44± 0,01	11,57± 0,02	12,41± 0,02	16,97± 0,03	47,03± 0,01
2	34,77± 0,23	10,70± 0,13	9,39±0, 14	14,24± 0,19	41,28± 0,07	45,72± 0,07	12,29± 0,01	13,52± 0,01	18,27± 0,01	47,73± 0,03	42,64± 0,13	12,4±0, 04	12,37± 0,06	17,51± 0,06	44,93± 0,05
3	55,11± 0,01	13,03± 0,01	16,56± 0,01	21,08± 0,01	51,82± 0,01	48,26± 0,29	12,38± 0,12	14,02± 0,19	18,71± 0,22	48,55± 0,12	48,49	11,48± 0,01	13,32± 0,03	17,59± 0,03	49,24± 0,04
4	51,49± 0,13	13,06± 0,02	16,57± 0,06	21,09± 0,06	51,75± 0,05	53,55± 0,21	12,75± 0,06	16,11± 0,05	20,54± 0,08	51,64± 0,04	46,03± 0,02	11,83± 0,01	12,8	17,43± 0,01	47,26± 0,02
5	37,54± 0,03	10,10± 0,02	9,46±0, 03	13,85± 0,03	43,13± 0,02	51,28± 0,04	13,40± 0,02	16,44± 0,02	21,21± 0,02	50,81± 0,01	43,59± 0,20	12,54± 0,03	12,73± 0,03	17,87± 0,04	45,42± 0,03
6	44,67± 0,05	13,07± 0,02	14,31± 0,01	19,38± 0,02	47,59± 0,01	46,46± 0,04	12,54± 0,01	13,74± 0,02	18,61± 0,01	47,63± 0,04	44±0,3 8	11,46± 0,09	11,87± 0,16	16,49± 0,18	45,99± 0,14
7	45,78± 0,02	13,29± 0,02	14,66± 0,01	19,79± 0,02	47,79± 0,08	39,36± 0,05	11,36± 0,02	10,59± 0,02	15,54± 0,02	43,00± 0,04	41,5±0, 03	10,81± 0,02	10,5±0, 01	15,07± 0,02	44,16± 0,03
8	49,17± 0,06	18,91± 0,03	15,77± 0,06	20,38± 0,06	50,69± 0,04	51,52± 0,16	12,68± 0,03	15,79± 0,05	20,25± 0,06	51,23± 0,04	49,61± 0,02	12,26± 0,01	14,5±0, 01	18,99± 0,01	49,78± 0,01
9	44,14± 0,11	12,47± 0,07	13,56± 0,09	18,42± 0,11	47,41± 0,02	50,65± 0,03	12,6±0, 02	15,43± 0,01	19,92± 0,01	50,78± 0,03	45,55± 0,03	11,96± 0,01	12,71± 0,04	17,45± 0,03	46,75± 0,06

4.2. Veličina čestica praha

Parametri za mjerenje veličine čestica su SWM (Surface Weighed Mean), VWM (Volume Weighed Mean), $d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$ te su za svaki uzorak određeni uz pomoć uređaja Mastersizer 2000.

Parametar SWM označava promjer čestice čija će površina, pomnožena s ukupnim brojem čestica, biti jednaka ukupnoj površini uzorka. VWM označava promjer čestice čiji će volumen biti jednak volumenu uzorka kad se pomnoži s ukupnim brojem čestica.

Parametri $d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$ označavaju distribucije gdje broj u zagradi označava koji postotak čestica u uzorku je manji od čestice prosječne veličine.

Prema ovim podacima moguće je vidjeti raspone veličine čestica u uzorcima, prema tome; SWM ima raspon od $47,48 \pm 1,54$ do $1019,32 \pm 280,20$; VWM ima raspon od $232,95 \pm 8,99$ do $1279,49 \pm 33,76$; $d(0,1)$ je u rasponu od $16,01 \pm 0,82$ do $922,79 \pm 61,51$; $d(0,5)$ ima raspon od $185,62 \pm 7,73$ do $1279,55 \pm 24,30$; $d(0,9)$ je u rasponu od $514,53 \pm 9,04$ do $1653,99 \pm 34,19$.

Kod uzorka 1 pri temperaturi 70°C dolazi do odstupanja za svaki parametar, a mogući uzroci za to su nasumičan odabir uzorka s većim česticama bez prethodne homogenizacije ili pojava aglomeracije praha pri skladištenju praha.

Tablica 3. Prosječne vrijednosti veličina čestica

P	50°C					60°C					70°C				
	SWM	VWM	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)	SWM	VWM	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)	SWM	VWM	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
1	259,66± 3,26	386,54± 13,86	139,39± 2,50	339,98± 9,79	707,34± 36,39	52,89±0 ,49	253,91± 10,10	19,27±0 ,33	201,76± 6,44	560,06± 21,18	1019,32± 280,20	1279,49 ±33,76	922,79± 61,51	1279,55 ±24,30	1653,99± 34,19
2	319,31± 9,10	450,55± 13,31	174,01 7±5,66	407,06± 13,29	795,96± 21,58	92,935± 3,90	310,40± 30,28	41,40±1 ,60	230,64± 11,48	678,45± 92,27	161,71±3 9,13	458,41± 133,23	76,19±1 9,91	346,80± 121,05	1021,62± 282,02
3	64,80±1 ,73	265,95± 8,44	26,43±1 ,10	219,56± 6,35	572,38± 22,11	147,28± 4,77	402,91± 28,79	71,85±2 ,21	327,41± 15,81	840,94± 76,76	132,16±1 5,23	454,56± 60,41	71,53±1 0,07	369,89± 44,87	958,29±1 42,12
4	89,66±3 ,49	315,47± 31,42	40,45±2 ,46	273,05± 33,84	656,80± 61,67	47,48±1 ,54	232,95± 8,99	16,01±0 ,82	185,62± 7,73	514,80± 16,96	178,58±5 ,00	441,14± 6,93	91,70±4 ,02	367,48± 8,64	898,72±6 ,39
5	313,49± 90,13	505,47± 92,26	169,48± 69,52	470,11± 95,97	889,76± 112,38	69,10±0 ,88	267,73± 9,95	29,35±0 ,44	202,23± 4,40	569,40± 23,06	141,18±1 2,00	379,95± 54,91	65,01±5 ,57	290,7±9 ±35,33	818,80±1 49,08
6	238,49± 4,04	390,46± 6,15	126,11± 2,57	336,38± 5,91	741,47± 10,43	799,98± 49,12	1027,15 ±16,83	562,25± 66,43	1000,99 ±11,96	1558,86 ±22,26	169,65±2 ,93	448,26± 13,93	82,33±1 ,63	363,56± 10,70	935,68±3 8,06
7	206,66± 5,36	434,27± 9,60	98,85±3 ,10	376,94± 9,77	858,17± 16,55	278,81± 25,40	481,13± 46,99	144,04± 13,83	409,00± 38,12	927,72± 95,74	181,35±1 0,16	399,56± 19,86	88,18±5 ,06	339,06± 20,80	801,87±3 5,88
8	107,68± 1,66	280,53± 8,22	54,39±0 ,79	236,09± 6,17	572,11± 20,92	69,56±1 ,20	244,41± 4,99	31±29± 0,95	204,47± 5,00	514,53± 9,04	95,86±4, 72	351,38± 34,47	49,38±3 ,07	274,81± 17,38	750,28±9 5,31
9	184,88± 47,11	346,54± 40,09	92,98±1 0,10	303,26± 37,10	665,44± 73,35	81,86±0 ,41	288,00± 2,79	37,90±0 ,26	238,06± 2,09	612,82± 9,11	123,37±1 4,51	399,95± 45,69	63,04±8 ,99	315,71± 48,05	857,35±9 1,14

SWM- Surface weighed mean (hr. površinska srednja vrijednost); VWM- Volume weighed mean (hr. volumna srednja vrijednost)

4.3. Nasipna gustoća

Tijekom mjerenja nasipne gustoće dolazi do smanjenja volumena praha u menzuri te je iz te razlike volumena moguće odrediti kako će određeni prah teći. Za svaki uzorak su izračunati parametri indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog omjera te su prikazani u tablici 4. Iz tablice 4 je prema parametrima vidljivo da je najveći indeks kompresibilnosti kod uzorka p5 70°C (veći udio meda u mješavini) te iznosi 23,81 što znači da je tečenje moguće, što potvrđuje Hausnerov omjer vrijednosti 1,3125. Nasuprot tome, najbolja svojstva tečenja ima uzorak p2 50°C s vrijednostima 11,46 za indeks kompresibilnosti i 1,1294 za Hausnerov omjer što je prema tablici prah koji dobro teče (prema tablici 1., također je veći udio meda u ispitivanoj mješavini uz 7,5g kakao praha).

Indeks kompresibilnosti (%)	Tečenje	Hausnerov omjer
1 - 10	Odlično	1,00 - 1,11
11 - 15	Dobro	1,12 - 1,18
16 - 20	Zadovoljavajuće	1,19 - 1,25
21 - 25	Moguće	1,26 - 1,34
26 - 31	Loše	1,35 - 1,45
32 - 37	Vrlo loše	1,46 - 1,59
> 38	Vrlo, vrlo loše	> 1,60

Slika 2. Svojstva tečenja praha i vrijednosti indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog omjera (Ph. Eur. 9.0, 2016)

Tablica 4. Nasipna gustoća

P	50°C						60°C						70°C					
	m	Vo	Vf	ρ_n	I_c	H_r	m	Vo	Vf	ρ_n	I_c	H_r	m	Vo	Vf	ρ_n	I_c	H_r
1	60,1742	96	84	0,6268	12,5	1,1429	80,003	127	99	0,6299	22,05	1,2828	30,048	43	36	0,6988	16,28	1,1944
2	60,0443	96	85	0,6255	11,46	1,1294	80,0013	129	105	0,6202	18,61	1,2286	25,0012	37	31	0,6757	16,22	1,1935
3	60,5811	101	80	0,5998	20,79	1,2625	80,4386	124	105	0,6487	15,32	1,1809	30,0095	42	35	0,7145	16,67	1,2
4	60,0694	96	76	0,6257	20,83	1,2632	80,006	127	97	0,6299	23,62	1,3093	30,0046	43	35	0,6978	18,61	1,2286
5	60,1139	94	76	0,6395	19,15	1,2368	80,0237	126	103	0,6351	18,25	1,2233	27,373	42	32	0,6517	23,81	1,3125
6	60,1236	99	86	0,6073	13,13	1,1512	80,0128	126	107	0,6350	15,08	1,1776	30,0132	43	35	0,6979	18,61	1,2286
7	60,0829	94	83	0,6392	11,70	1,1325	80,0352	122	106	0,6560	13,12	1,1509	30,0011	44	35	0,6818	20,45	1,2571
8	60,0357	104	84	0,5773	19,23	1,2381	80,0626	128	103	0,6255	19,53	1,2427	30,0126	42	35	0,7146	16,67	1,2
9	60,048	99	84	0,6065	15,15	1,1786	80,0399	124	101	0,6455	18,55	1,2277	30,1444	43	33	0,7010	23,26	1,303

Vo-volumen nasipne gustoće;

Vf-volumen gustoće nakon potresanja;

ρ_n -nasipna gustoća;

I_c -indeks kompresibilnosti;

H_r -Hausnerov omjer

4.4. Određivanje udjela vlage i aktiviteta vode u kakao prahu

Tijekom mjerenja udjela vlage u prahu, iz razlike u masi prije i nakon sušenja je dobiven udio suhe tvari u uzorku, a vlaga je izračunata iz $100\% - \% \text{suhe tvari}$. Što je veći udio vlage u prahu, to je manji rok trajanja proizvoda. Iz tablice 5. je moguće zaključiti koji uzorak ima najveću dugotrajnost.

Udio vlage u kakao prahu varira, najniža vrijednost je kod uzorka p1 60°C i iznosi 5,77% , a kod uzorka p6 50°C je najviši udio vlage, 11,638%. Prema tome, uzorak p6 50°C ima najveću tendenciju kvarenja, dok uzorak p1 60°C može najduže biti upotrebljiv ako je skladišten na pravilan način.

Jako slično udjelu vlage, iz aktiviteta vode se može predvidjeti koji uzorak ima najdulji rok trajanja. Što je niža vrijednost aktiviteta vode, to je veća mogućnost da će uzorak biti ispravan duže vrijeme. Vrijednost a_w potvrđuje pretpostavku da je uzorak p1 60°C najstabilniji s iznosom 0,2475, a uzorak p1 50°C ipak ima najvišu vrijednost aktiviteta vode prema iznosu od 0,51.

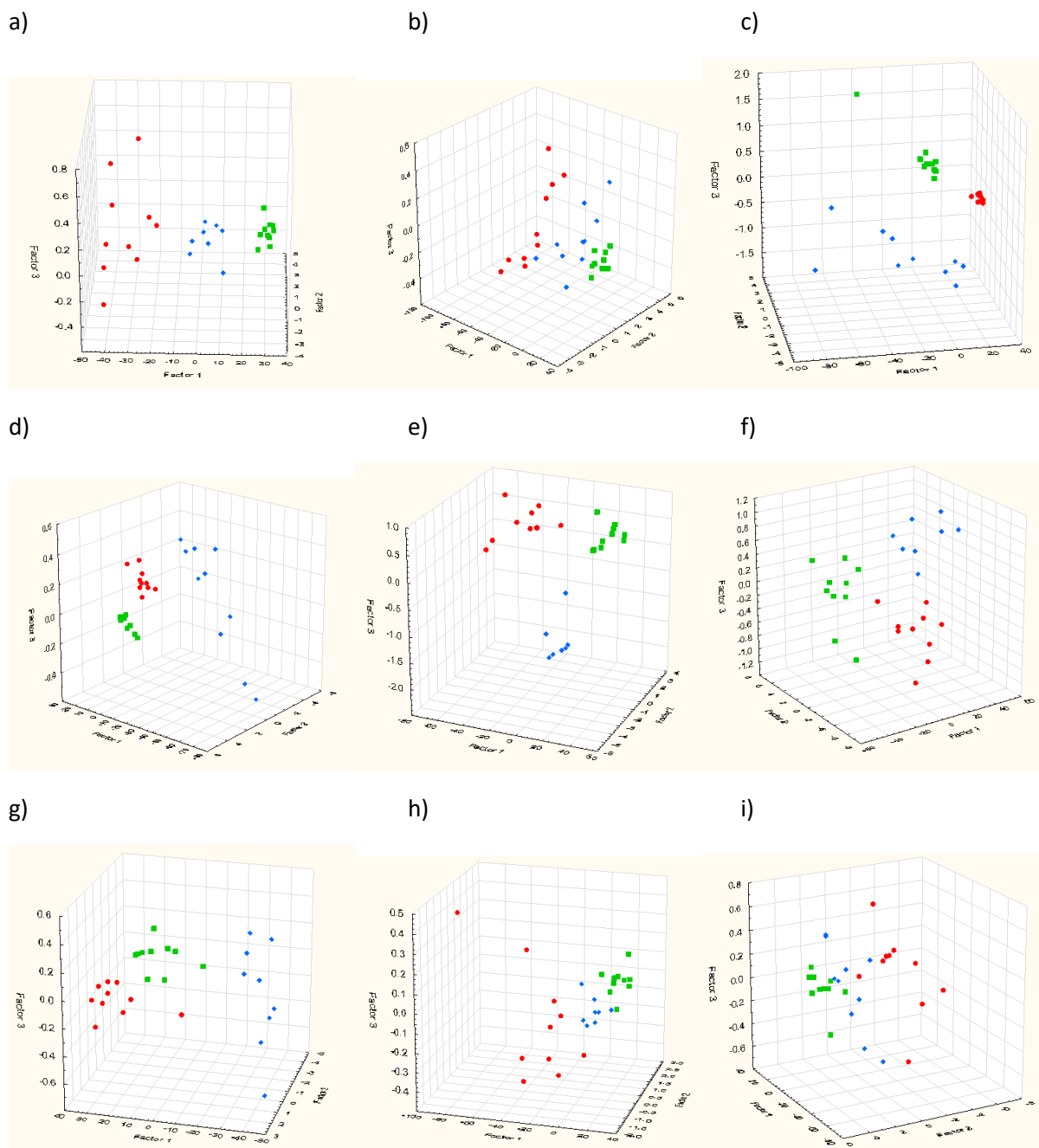
Tablica 5. Aktivitet vode i udio vlage

P	50°C		60°C		70°C	
	A_w	%suhe tvari	A_w	%suhe tvari	A_w	%suhe tvari
1	0,51	88,3641	0,2475	94,22935	0,404	92,17718
2	0,493	88,5052	0,32	93,20834	0,395	91,8079
3	0,352	92,3918	0,475	90,84524	0,406	92,37872
4	0,377	91,8009	0,271	94,17392	0,486	90,3443
5	0,3645	92,1777	0,2481	94,13751	0,41	92,26356
6	0,4875	88,3624	0,442	90,40309	0,3915	92,09876
7	0,413	90,6384	0,425	90,40074	0,364	92,65876
8	0,442	90,2685	0,311	93,62629	0,3615	92,97504
9	0,475	89,4101	0,3135	93,0737	0,3855	92,44475

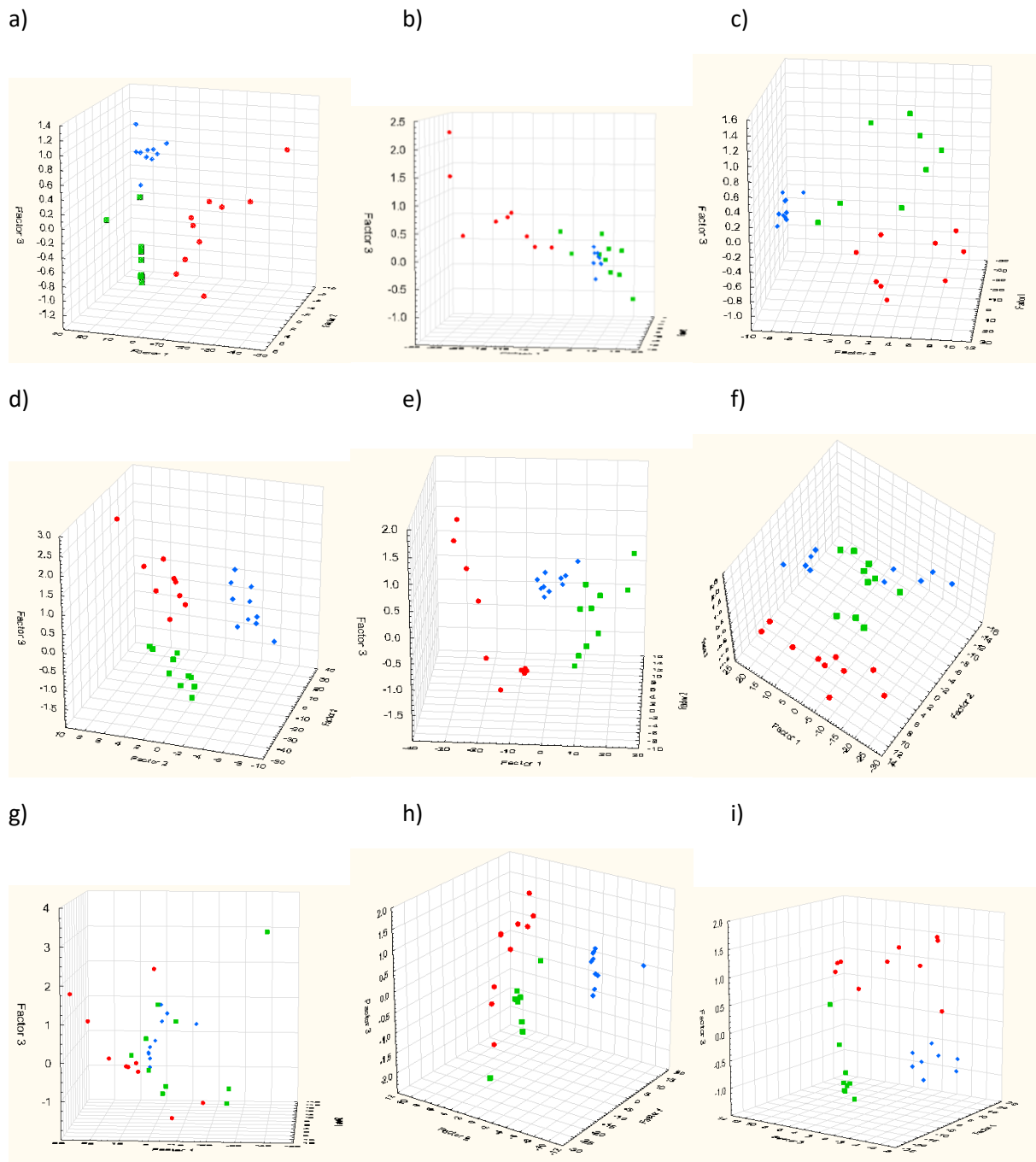
4.5. NIR i PCA

PCA analiza je često korištena kemometrijska metoda koja se koristi za identifikaciju uzoraka i izvlačenje najvažnijih informacija iz podataka, posebno spektralnih podataka (Abdi i Williams, 2010). Glavna svrha PCA analize je pojednostavljenje i reduciranje dimenzija podataka kako bi se bolje razumjele sličnosti i razlike među uzorcima. S obzirom da su za istraživanje korištena tri različita NIR uređaja, u programu Statistica v.13.3 su rezultati prikazani u obliku grafova (slike 3,4 i 5) u tri grupe. Kako je broj uzoraka i mjerenja poprilično velik, rezultati su grupirani prema NIR uređaju koji je korišten te prema broju uzorka; prema tome, graf 1 prikazuje rezultate mjerenja uređajem NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm za pokus 1 pri tri različite temperature. Podaci obojani u crveno prikazuju mjerenja na uzorku koji je prethodno pripremljen na temperaturi od 50°C, plavi podaci su za temperaturu od 60°C, a zeleni za 70°C. Tako su za svaki NIR uređaj podaci prikazani u devet grafova, što čini sveukupno 27 grafova. S obzirom da je u dvodimenzionalnom prikazu dolazilo do preklapanja podataka pri različitim temperaturama, za uređaje NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm i Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO je bilo potrebno rezultate prikazati u trodimenzionalnom obliku. Iz grafova je vidljivo da je uređaj NIR-S-G1 imao najbolja razlučivanja za iste uzorke pri različitim temperaturama te u grafovima dolazi do jasne razlike među različito obojanim podacima. Uređaji NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm i Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO znatno odudaraju od NIR-S-G1 te razlike među rezultatima nisu toliko očite odnosno podaci nisu toliko razdvojeni. Iz ovih podataka se može zaključiti da PCA analiza dobro može pokazati razlike u rezultatima uzoraka koji su pripremani na različitim temperaturama.

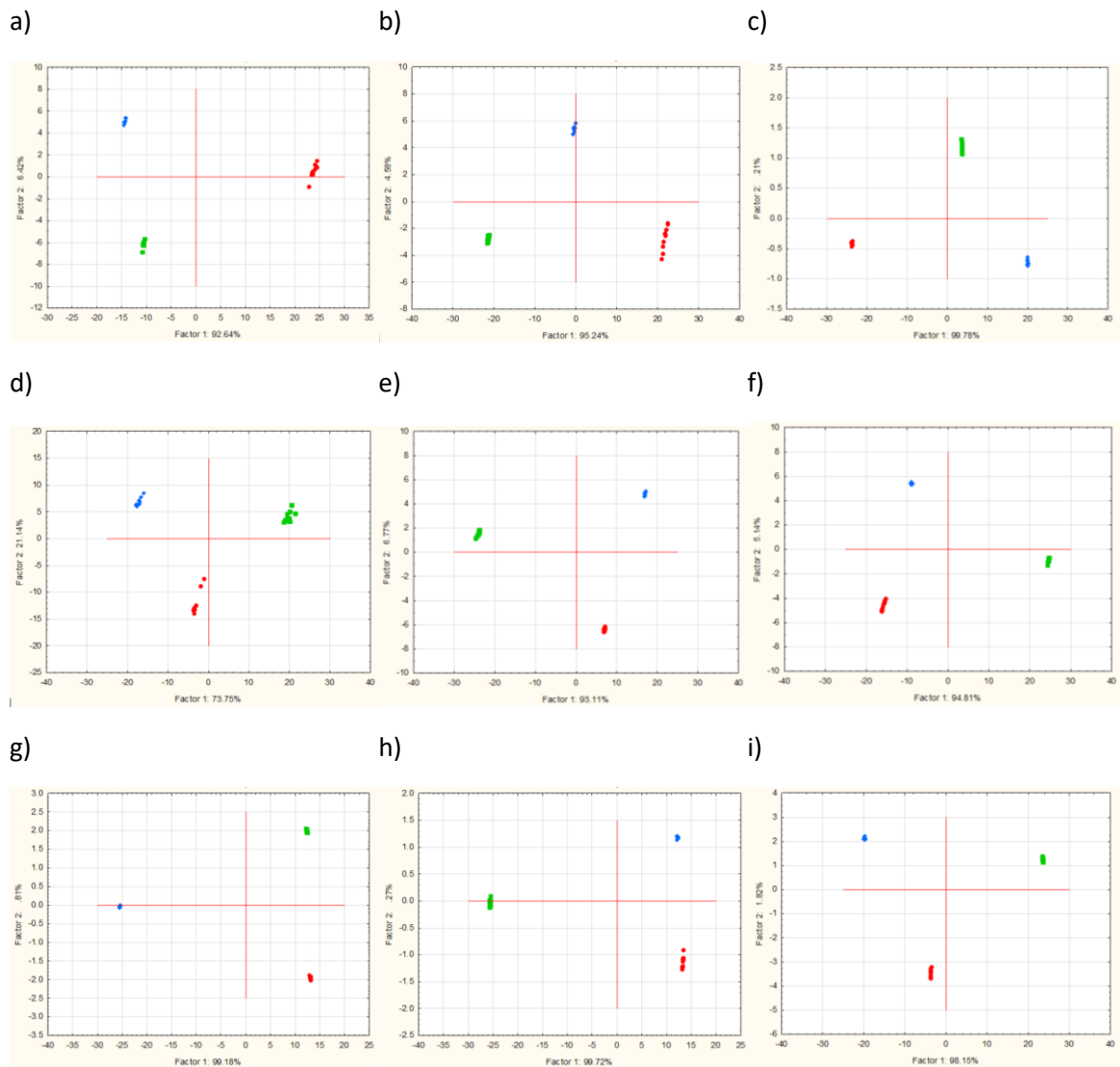
Blisko infracrvena spektroskopija je korištena s ciljem povezivanja NIR spektara snimljenih uzoraka s fizikalnim i kemijskim svojstvima kakao praha. Zbog opsežne i neupotrebljive prirode samih NIR spektara, u tu svrhu prvobitno je korištena analiza glavnih komponenata kako bi se veliki broj varijabli sveo na prihvatljiv broj koji bi služio kao ulaz za neuronske mreže.



Slika 3. Rezultati PCA analize za a) uzorak 1, b) uzorak 2, c) uzorak 3, d) uzorak 4, e) uzorak 5, f) uzorak 6, g) uzorak 7, h) uzorak 8, i) uzorak 9 pri 50(●), 60(●) i 70°C (●) za NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm



Slika 4. Rezultati PCA analize za a) uzorak 1, b) uzorak 2, c) uzorak 3, d) uzorak 4, e) uzorak 5, f) uzorak 6, g) uzorak 7, h) uzorak 8, i) uzorak 9 pri 50(●), 60(●) i 70°C (●) za Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO



Slika 5. Rezultati PCA analize za a) uzorak 1, b) uzorak 2, c) uzorak 3, d) uzorak 4, e) uzorak 5, f) uzorak 6, g) uzorak 7, h) uzorak 8, i) uzorak 9 pri 50(●), 60(●) I 70°C (●) za NIR-S-G1

4.6. Umjetne neuronske mreže

S obzirom da neuronske mreže funkcioniraju na principu ljudskog mozga, omogućuju povezivanje podataka koji naizgled nisu spojivi. Mreža je strukturirana na principu ulaz-neuroni u skrivenom sloju-izlaz. Za ulaz je korišteno deset glavnih komponenti koje sadrže 99,9% fizičkih i kemijskih svojstava objašnjenih u sebi. Sve varijable koje su mjerene tijekom istraživanja se koriste kao izlaz, a to je 15 varijabli: nasipna gustoća, indeks kompresibilnosti, Hausnerov omjer, SWM, VWM, $d(0,1)$, $d(0,5)$, $d(0,9)$, aktivitet vode, L, a, b, c, h te udio suhe tvari. Da bi mreža dobro funkcionirala potrebno je što manje neurona u skrivenom sloju da bi se povezali podaci ulaza s izlazom. Za ovo istraživanje razvijeno je tristo neuronskih mreža, za svaki NIR uređaj po sto i najbolje neuronske mreže za svaki uređaj prikazane su u tablici 5. U slučaju za uređaje NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm i Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO su se najbolje pokazale neuronske mreže koje imaju omjer podataka 70:15:15 (70% podataka je korišten za učenje, 15% za testiranje i 15% za validaciju), dok je za uređaj NIR-S-G1 korišten omjer podataka 50:30:20. Pokazatelj da omjer dobro odgovara određenoj mreži je odnos vrijednosti preciznosti učenja, testiranja i validacije te njihovih pogreški. Najveću vrijednost preciznosti treba imati učenje, pa testiranje, i najmanju validacija, a za pogreške je obrnuto, najveću pogrešku ima validacija, a najmanju učenje. Prema podacima u tablici 6 vidljivo je da strukture mreže odgovaraju za pojedini uređaj.

Tablica 6. Karakteristike umjetnih neuronskih mreža odabranih za tri NIR uređaja

NIR UREĐAJ	STRUKTURA MREŽE	UČENJE		TESTIRANJE		VALIDACIJA		SKRIVENA AKTIVACIJSKA FUNKCIJA	IZLAZNA AKTIVACIJSKA FUNKCIJA
		PRECIZNOST	POGREŠKA	PRECIZNOST	POGREŠKA	PRECIZNOST	POGREŠKA		
NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm	10-11-15	0,6975	0,2465	0,6097	0,2953	0,6053	0,2986	TANH	TANH
AvaSpec-NIR256-2.5-HSC-EVO	10-11-15	0,8444	0,1427	0,8108	0,1546	0,7742	0,1970	TANH	EKSP. F.
NIR-S-G1	10-12-15	0,9920	0,0088	0,9843	0,0138	0,9824	0,0182	LOGISTIČKA F.	LOGISTIČKA F.

Ponovno, NIR-S-G1 pokazuje najbolje rezultate. Iz podataka je vidljivo da ovaj uređaj ima jako visoke vrijednosti R^2 za učenje, testiranje i validaciju (0,9920, 0,9843 i 0,9824) te najmanje pogreške što upućuje na visoku preciznost uređaja. Iako su uređaji NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm i Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO u svom skrivenom sloju imali jedan neuron manje od NIR-S-G1, njihove mreže nisu toliko precizne. Mreža za Avaspec-NIR 256-2.5-HSC-EVO se pokazala boljom od mreže za NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm s R^2 vrijednostima 0,8444, 0,0,8108 i 0,7742 te s RMSE vrijednostima 0,1427, 0,1546 i 0,1970. Najlošije se pokazao NIR-128L-1.7-USB/6.25/50 μm , Kod kojega su rezultati za preciznost učenja bili 0,6975, za testiranje 0,6907 te za validaciju je 0,6053, a pogreške iznose 0,2465, 0,2953 i 0,2986. Prema tome, koristeći neuronske mreže, PCA analizu i NIR-S-G1 uređaj, moguće je predvidjeti vrijednosti fizikalnih i kemijskih svojstava kakao praha bez izvođenja svih mjerenja s jako visokom točnosti (99%).

5. ZAKLJUČCI

1. Parametri boje određeni su u sljedećem rasponu: L^* od $34,77 \pm 0,23$ do $55,11 \pm 0,01$; a^* od $10,10 \pm 0,02$ do $18,91 \pm 0,03$; b^* od $9,39 \pm 0,14$ do $16,57 \pm 0,06$; H^* od $41,28 \pm 0,07$ do $51,82 \pm 0,01$ i c^* od $13,85 \pm 0,03$ do $21,21 \pm 0,02$. što bi odgovaralo prahu „smeđe boje u kombinaciji sa crvenom i žutom“..

2. Veličina čestica je opisana parametrima u rasponu: SWM od $47,48 \pm 1,54$ do $1019,32 \pm 280,20$; VWM od $232,95 \pm 8,99$ do $1279,49 \pm 33,76$; $d(0,1)$ od $16,01 \pm 0,82$ do $922,79 \pm 61,51$; $d(0,5)$ od $185,62 \pm 7,73$ do $1279,55 \pm 24,30$; $d(0,9)$ od $514,53 \pm 9,04$ do $1653,99 \pm 34,19$ što bi značilo da među uzorcima postoji razlika ovisno o količini dodanih komponenta u smjesu.

3. Prema parametrima za opisivanje tečenja prahova, ispitivani prah može teći te pojedini uzorci (npr. uzorak p2 50°C koji ima veći udio meda u mješavini) pokazuju tendenciju dobrog tečenja, a ti parametri su u rasponu za indeks kompresibilnosti od 11,46 do 23,81 i Hausnerov omjer od 1,1294 do 1,312.

4. Prema vrijednostima aktiviteta vode i udjela vlage u ispitivanom prahu, najbolje rezultate je pokazao uzorak koji se sastoji od 50g meda, 50g zobi te 6,25g kakao praha pri temperaturi od 60°C, a najkraći rok trajanja se predviđa za uzorke sa 50g meda, 50g zobi i 6,25g kakao praha te s istim omjerom meda i zobi s 5g kakao praha pri temperaturi od 50°C.

5. Prema rezultatima PCA analize, uređaj NIR-S-G1 pokazao je najbolje performanse te pokazuje visoku preciznost i mogućnost ponavljanja istih uzastopnih rezultata tj. mogućnost najboljeg razlučivanja uzoraka pripremljenih pri različitim temperaturama.

6. NIR-S-G1 uređaj u kombinaciji s PCA analizom i umjetnim neuronskim mrežama vrlo brzo može procijeniti vrijednosti fizikalnih i kemijskih svojstava kakao praha te na taj način uštediti vrijeme i zamijeniti većinu uređaja potrebnih za izvođenje tih mjerenja.

6. POPIS LITERATURE

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2, 433-459.

Ackar, Đ., Valek Lendić, K., Valek, M., Šubarić, D., Miličević, B., Babić, J., Nedić, I. (2013) Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food? *J. Chem-ny.* 2013, 1-7

Afoakwa, O. E., Quao, J., Simpson Budu, A., Takrama, J., Saalia, F., K. (2011) Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Int. J. food Sci. Nutr.* 62, 755-764

Amato, F., López, A., Peña-Méndez, E. M., Vaňhara, P., Hampl, A., Havel, J. (2013) Artificial neural networks in medical diagnosis. *J. Appl. Biomed.* 11(2), 47–58.

Barbosa-Canovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H. (2005) *Food Powders, Physical Properties*, Ortega-Rivas E. (2005) *Handling and Processing of Food Powders and Particulates*. U: *Encapsulated and Powdered Foods* (Onwulata, C. I., i Konstance, R. P., ured.), CRC press Taylor and Francis Group, Boca Raton, str. 75-145 *Processing and Functionality*, 1. izd., Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Beg, M.S., Ahmas, S., Jan, K., Bashir, K. (2017) Status, supply chain and processing of cocoa -a review. *Trends. Food Sci. Tech.* 66, 108 – 116.

Bendelja, I., Valinger, D., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M. (2019) Influence of Particle Size on UV-VIS and NIR Spectra of Aqueous Extracts of Plants from *Lamiaceae* Family. *J. Hyg. Eng. Des.* str. 61-68.

Blanco, M., Villarroya, I. (2002) NIR Spectroscopy: a rapid response analytical tool. *Trends Analyt. Chem.* 21, 240-250.

Caligiani, A., Marseglia, A., Palla, G. (2015) Cocoa: Production, Chemistry and Use, U: Encyclopedia of food and health (Caballero, B., Finglas, P., Toldra, F., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam, 2016, str. 185-190.

Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., Luscher, T. F. (2009) Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation*. 119, 1433 – 1441

De Muijnck, L. (2005) Cocoa. U: Encapsulated and powdered foods, (Onwulata, C., ured.), CRC Press, Boca Raton, USA, str. 451-473.

European Pharmacopoeia 9.0, Methods of Analysis, Flowability, 01/2008:20916, (2016) 321-322.

Giacometti, J., Jolić, S.M., Josić, D. (2014) Cocoa Processing and Impact on Composition. U: Processing and Impact on Active Components in Food (Preedy, V., ured.), Elsevier Inc., Philadelphia, str. 605 – 612.

Gutierrez, T.J. (2017) State-of-the-Art Chocolate Manufacture: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. F*. 16, 1313 – 1344.

Han, R., Yang, Y., Li, X., Ouyang, D. (2018) Predicting oral disintegrating tablet formulations by neural network techniques. *Asian J. Pharm. Sci.* 13(4), 336-342.

Haswell, S.J. (1992) Practical guide to chemometrics, 10. izd., Marcel Dekker INC., New York, str. 1-3

Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* 62, 71-80

Jurina, T., Cvetković, A., Gajdoš Kljusurić, J., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Valinger, D. (2018) Modelling and optimization of physical characteristics based on UV-VIS/NIR spectra of aqueous extracts of lavender, mint and Melissa. *Book of Abstracts: 2nd TSD Conference*, 2(2), 51-59.

Karolyi, D. (2004) Aktivitet vode (aw) kao čimbenik održivosti mesa. *Meso* 6:9-13.

Kongor, J. E., Hinneh, M., Van de Wallw, D., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., Dewettinck, K. (2016) Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile - a review. *Food Res. Int.* 82, 44-52.

Lopez, A. S. i Dimick, P. S. (1995) *Cocoa fermentation*. U: *Biotechnology*, 2. Izd. (Rhem, H. J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P., ured.), VCH, Weinheim, Njemačka, str. 561 – 557.

Mehinović, L, (2020) *Konvolucijske neuronske mreže za klasifikaciju objekata (diplomski rad)*, Fakultet informatike u Puli, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Pula

Metrohm (2013) *NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes*, Metrohm Ltd., Herisau.

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., Said, M. (2006) Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Ind. Crop. prod.* 24, 87-94.

Oleaga, C., García, M., Solé, A., Ciudad, C. J., Izquierdo-Pulido, M., & Noé, V. (2012) CYP1A1 is over expressed upon incubation of breast cancer cells with a polyphenolic. *Euro. J. Nutri.* 51, 465- 476.

Pasquini, C. (2003) *Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications*. *J. Brazil. Chem. Soc.* 14, 198-219.

Pitt, JI, Hocking, AD, (2009) *Fungi and Food Spoilage*. Springer, London, New York

Pravilnik o kakau i čokoladnim proizvodima (2005) *Narodne novine* 73, Zagreb.

Wollgast, J. i Anklam, E. (2000) Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* 33, 423-447.

Zheng, H., Jiang, L., Lou, H., Hu, Y., Kong, X., & Lu, H. (2011) Application of Artificial Neural Network (ANN) and Partial Least-Squares Regression (PLSR) to Predict the Changes of

Anthocyanins, Ascorbic Acid, Total Phenols, Flavonoids, and Antioxidant Activity during Storage of Red Bayberry Juice Based on Fractal Analysis and Red, Green, and Blue (RGB) Intensity Values. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2), 592–600.

Izjava o izvornosti

Ja Marija Terezija Boras izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis