

ANALISIS NUTRISI PADA MODIFIKASI FERMENTASI BIJI KAKAO DENGAN PENAMBAHAN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, *ACETOBACTER ACETI*, ENZIM BROMELAIN, DAN SISTEIN

*Nutritional Analysis In Fermentation Modification Cocoa Beans With The Addition Of Exogenous *Saccharomyces Cerevisiae*, *Lactobacillus Plantarum*, *Acetobacter Aceti*, Bromelain Enzyme And Cysteine*

DWIRYANI ARIZONA
IMAN PERMANA MAKSUM
R. UKUN M. S. SOEDJANAATMADJA

Universitas Padjadjaran
email korespondensi: ryaozon@yahoo.com

Abstrak

Kakao merupakan salah satu hasil pertanian Indonesia yang cukup potensial dalam menyumbang devisa negara. Indonesia berada di posisi ketiga dunia sebagai produsen setelah Pantai Gading dan Ghana. Namun, karena didominasi oleh biji tanpa fermentasi, maka kakao Indonesia terkena diskon sebesar 10-15% di pasar internasional. Biji kakao tanpa fermentasi akan bermutu rendah karena tidak mempunyai calon cita rasa coklat. Oleh karena itu, untuk mendapatkan biji dengan kualitas tinggi dan memiliki cita rasa khas coklat, dibutuhkan metode fermentasi yang baik dan benar. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh variasi fermentasi dengan optimasi suhu dan penambahan *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*, enzim bromelain, sistein secara eksogen terhadap komponen nutrisi dan polifenol penyusun biji kakao setelah empat dan lima hari fermentasi. Biji kakao hasil fermentasi dianalisis komponen nutrisinya meliputi kadar karbohidrat, protein, lemak, serta kandungan total polifenolnya menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Berdasarkan profil kandungan nutrisinya, fermentasi dengan penambahan *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*, enzim bromelain, dan sistein mampu mempercepat proses fermentasi dari lima hari menjadi empat hari dengan hasil meningkatnya kandungan nutrisi dan dapat dipertahankannya kandungan polifenol biji kakao.

Katakunci: fermentasi, nutrisi, polifenol, *Theobroma cacao* L

Abstract

*Cocoa is one of Indonesia's agricultural potential in contributing to foreign exchange. At world level, Indonesian cocoa came in third after Ivory Coast and Ghana. Until recently, production of Indonesian cocoa is dominated by unfermented beans. This leads to application discounts to Indonesia's cocoa up to 10-15% in international markets. Unfermented cocoa beans will have a low quality bean because it has no chocolate flavor potential. Therefore, to obtain seeds with high quality and have high chocolate flavor, it needs a good and right fermentation method. The purpose of this study is investigating the effect of variations in the fermentation with temperature optimization and addition of *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*, bromelain enzyme, cysteine by incubation fermentation method toward nutritional components, free amino acids, and polyphenol of cacao beans. The purpose of this study is investigating the effect of variations in the fermentation with temperature optimization and addition of *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*, bromelain enzyme, cysteine by incubation fermentation method toward nutritional components and polyphenol of cacao beans. We analyzed the nutritional components i.e levels of carbohydrates, protein, fat, and the content of total polyphenol compound using Folin-Ciocalteu reagent in cocoa beans after fermentation four and five days. Based on the nutrition profile, fermentation with the addition of *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*, bromelain enzyme, and cysteine can accelerate the fermentation process from five days to four days and increase nutrient content and concentration cocoa polyphenols content in beans after fermentation.*

Keywords: fermentation, nutrition, poliphenol, *Theobroma cacao* L

Pendahuluan

Fermentasi adalah salah satu tahapan yang harus dilewati dalam pengolahan biji kakao. Tahapan ini sangat penting, karena akan menentukan kualitas aroma kakao. Menurut Biehl & Passern (1982) dalam Abbe & Amin (2008), proses fermentasi biji kakao terdiri atas dua tahapan, yakni fermentasi eksternal dan fermentasi internal. Fermentasi eksternal merupakan proses fermentasi secara mikrobiologis yang meliputi proses perombakan gula pada pulp oleh mikroorganisme, sedangkan fermentasi internal merupakan proses fermentasi secara enzimatik di dalam biji yang meliputi perubahan biokimia di dalam kotiledon biji.

Mikroorganisme berperan penting dalam proses fermentasi eksternal kakao. Ardhana & Fleet (2003) dan Schwan & Wheals (2004) telah melakukan penelitian untuk mengetahui keragaman mikroorganisme yang terlibat dalam fermentasi kakao di Indonesia. Berdasarkan pengamatan diketahui bahwa mikro-

organisme dominan yang hadir dalam fermentasi kakao di Indonesia antara lain, ragi pada jam ke-24 sampai 36 yang dapat mencapai populasi maksimal sebanyak 107-108 cfu/g. Ragi yang paling dominan pertumbuhannya adalah jenis *S. cerevisiae* dan *Candida tropicalis*. Selain ragi, mikroorganisme lain yang dominan hadir dalam fermentasi kakao adalah jenis bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat. Jumlah populasi maksimal bakteri asam laktat adalah 108-109 cfu/g pada jam ke-36 dengan spesies dominan ialah *Lactobacillus cellobiosus* dan *L. plantarum*. Mikroorganisme selanjutnya ialah bakteri asam asetat yang dapat mencapai populasi maksimal sebanyak 10 - 10 cfu/g. Ragi yang paling dominan pertumbuhannya adalah jenis *S. cerevisiae* dan *Candida tropicalis*. Selain ragi, mikroorganisme lain yang dominan hadir dalam fermentasi kakao adalah jenis bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat. Jumlah populasi maksimal bakteri asam laktat adalah

$10^8 - 10^9$ cfu/g pada jam ke-36 dengan spesies dominan ialah *Lactobacillus cellobiosus* dan *L. plantarum*. Mikroorganisme selanjutnya ialah bakteri asam asetat yang dapat mencapai populasi maksimal sebanyak $10^5 - 10^6$ cfu/g dengan spesies dominan *Acetobacter pasteurianus* dan *A. aceti*.

Mikroorganisme ini akan tumbuh membentuk suatu urutan yang menyebabkan terjadinya proses fermentasi. Etanol dan asam organik (asam laktat dan asam asetat) yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut akan berdifusi ke dalam biji dan menyebabkan kematian biji. Perubahan ini menginduksi reaksi biokimia (reaksi enzimatik) di dalam biji dan menghasilkan prekursor kimia dari cita rasa coklat, aroma dan warna (Ardhana & Fleet, 2003).

Salah satu enzim yang berperan penting dalam reaksi enzimatik di biji adalah enzim protease. Enzim protease berperan dalam memecah protein menjadi asam-asam amino bebas sebagai prekursor cita rasa biji kakao (Thompson et al., 2001). Penambahan enzim eksogen pada penelitian ini bertujuan untuk membantu proses pemecahan protein menjadi asam-asam amino bebas. Enzim protease ini akan memecah protein menjadi asam amino dan peptida yang merupakan salah satu prekursor cita rasa kakao.

Berbagai usaha modifikasi fermentasi telah dilakukan untuk dapat meningkatkan kualitas kakao. Penelitian pendahuluan yang dilakukan di Jurusan Kimia FMIPA Unpad oleh Aulani (2010) menunjukkan bahwa fermentasi kakao dengan penambahan isolat *S. cerevisiae*, *A. aceti*, dan ditambahkan enzim protease campuran bromelain dan papain dapat meningkatkan kandungan nutrisi dan asam amino bebas biji kakao hasil fermentasi. Namun, sebagai konsekuensi dari fermentasi ialah menurunnya kandungan polifenol kakao akibat reaksi enzimatik polifenol oksidase. Walaupun konsentrasi polifenol yang lebih tinggi akan mengurangi cita rasa coklat (Misnawi et al., 2004), berbagai usaha telah dilakukan untuk mempertahankan jumlahnya karena senyawa polifenol bermanfaat untuk kesehatan (Schroeter et al., 2006). Beberapa inhibitor kimia telah diuji kemampuannya dalam menghambat reaksi enzimatik polifenol oksidase, antara lain seperti asam askorbat (Sapers & Miller, 1995) dan sistein (Richard et al., 1992). Senyawa-senyawa ini dapat berinteraksi langsung dengan enzim polifenol oksidase, kompleks enzim-substrat polifenol, atau produk dari reaksi yang dihasilkan.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penulis tertarik untuk meneliti kombinasi modifikasi fermentasi kakao dengan menggunakan mikroorganisme eksogen, enzim protease, dan inhibitor polifenol oksidase dalam mencari bagaimana metode fermentasi kakao yang tepat, guna menghasilkan biji kakao yang berkualitas baik. Biji yang dihasilkan dari proses tersebut diharapkan memiliki karakteristik yang baik yaitu memiliki nilai nutrisi dan kandungan polifenol yang tinggi.

Metode

Bahan yang digunakan adalah buah trinitario klon UAH dari perkebunan di Ciamis, *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*, enzim bromelain dan sistein. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah antron, asam klorida 0,1 N, asam oksalat 0,1 N, asam sulfat, asam trikloro asetat 30%, aseton, buffer fosfat pH 7,5, indikator fenofthalien, indikator Toshiro, kalium sulfat, kasein 1%, larutan glukosa standar, natrium hidroksida 0,1 N, natrium hidroksida 30%, n-heksana, tembaga sulfat, natrium klorida fisiologis 95%. Semua bahan kimia yang digunakan memiliki kualitas proanalisis.

Variasi Perlakuan

Variasi perlakuan yang diterapkan adalah sebagai berikut : A: nonfermentasi; B: fermentasi alami; C: fermentasi dengan enzim bromelain hari ke-3; D: fermentasi dengan sistein hari ke-3; E: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, *A. aceti* hari ke-2; F: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, *A. aceti* hari ke-2, enzim bromelain hari ke-3; G: fermentasi dengan fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, *A. aceti* hari ke-2, enzim bromelain dan sistein hari ke-3.

Analisis Nutrisi

Analisis nutrisi dilakukan untuk biji hasil fermentasi hari keempat dan kelima. Analisis yang dilakukan meliputi analisis kandungan karbohidrat dengan metode Antron (Hedge & Hofreiter, 1962), kandungan protein dengan metode Kjeldahl (AOAC, 1975), dan kandungan lemak dengan metode Soxhlet (AOAC, 1975).

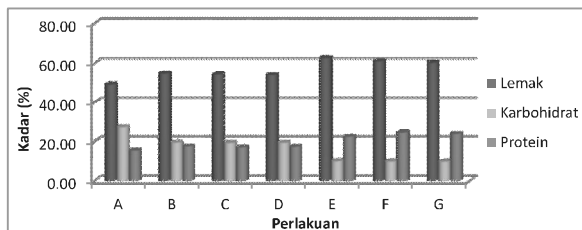
Analisis Kandungan Polifenol

Persiapan ekstrak kasar senyawa fenolik dilakukan dengan prosedur pada Elwers et al (2009). Total polifenol ditentukan dengan prosedur Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Ekstrak kasar senyawa fenolik dilarutkan dengan 2,5 mL asam asetat. Sebanyak 1 mL larutan ini dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 2 mL larutan natrium karbonat, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas. Setelah itu, sampel diinkubasi selama 10 menit dalam penangas air pada suhu 70°C. Setelah didinginkan pada suhu kamar, absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 730 nm. Total polifenol yang ditentukan ekuivalen dengan asam galat.

Hasil dan Pembahasan

Kadar Nutrisi Biji Kakao Hari Keempat Fermentasi

Hasil analisis nutrisi hari keempat pada Gambar 3.1 menunjukkan bahwa fermentasi dengan penambahan tiga mikroorganisme dan enzim mampu meningkatkan kadar nutrisi, terutama kadar lemak biji kakao.



Gambar 3.1. Kurva hubungan antara karbohidrat, lemak dan protein biji kakao yang difermentasi selama 4 hari dengan berbagai variasi perlakuan. A: nonfermentasi; B: fermentasi alami; C: fermentasi dengan enzim bromelain hari ke-3; D: fermentasi dengan sistein hari ke-3; E: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2; F: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2, enzim bromelain hari ke-3; G: fermentasi dengan fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2, enzim bromelain dan sistein hari ke-3.

Kadar protein pada biji kakao oleh adanya kegiatan enzim protease akan dipecah menjadi asam-asam amino, dengan demikian melalui fermentasi, maka kandungan protein akan berkurang, tetapi sebaliknya jumlah nitrogen terlarut akan meningkat. Kadar asam amino bebas pada biji kakao yang sudah difermentasi pun akan meningkat akibat aktivitas enzim protease ini.

Penambahan *S. cerevisiae* akan meningkatkan kadar lemak karena *S. cerevisiae* akan mengoptimalkan kerja ragi yang akan meningkatkan jumlah glukosa yang dihasilkan. Semakin banyak glukosa yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula glukosa yang akan mengalami glikolisis sehingga didapat piruvat yang semakin banyak. Selanjutnya piruvat yang ada akan diubah menjadi asetil KoA.

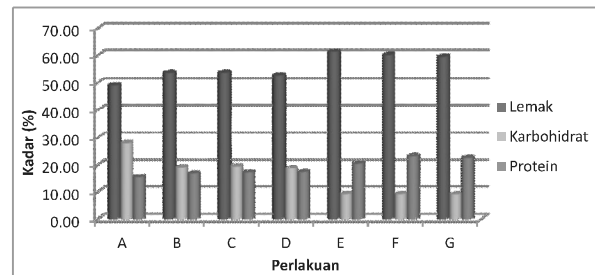
L. plantarum akan memaksimalkan perubahan piruvat menjadi asetil KoA, karena *L. plantarum* memiliki gen yang dapat mengkode lebih banyak protein yang terlibat dalam interkonversi atau degradasi gula dibandingkan dengan spesies *Lactobacillus* lain, sehingga mampu menjalani mekanisme konversi piruvat yang lebih luas. *L. plantarum* mampu mensintesis enzim piruvat dehidrogenase kompleks dan enzim-enzim lain yang dibutuhkan untuk konversi piruvat menjadi asetat, asetaldehid, dan asetil koenzim-A (Boekhorst et al., 2004), sehingga semakin banyak asetil KoA yang dihasilkan, maka akan meningkatkan kadar lemak kakao karena asetil KoA merupakan prekursor lemak pada jalur metabolisme pembentukan lemak.

Peran bakteri asam asetat pada fermentasi biji kakao lebih utama bertanggung jawab terhadap pembentukan prekursor aroma coklat (Schwan & Wheals, 2004). Bakteri asam asetat akan segera menghilang populasinya dari pulp ketika suhu fermentasi meningkat diatas 50°C (Schwan, 1998). Sebagian asam asetat yang terbentuk akan menguap dan sebagiannya lagi berpenetrasi ke dalam biji (kurang lebih sebanyak 2% asam asetat) yang akan membunuh embrio biji (Lopez & Dimick, 1991).

Kadar Nutrisi Biji Kakao Hari Kelima Fermentasi

Gambar 3.2 menunjukkan kadar nutrisi biji kakao pada hari kelima fermentasi. Kadar nutrisi pada hari kelima

tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kadar nutrisi pada hari keempat, sehingga bisa disimpulkan bahwa fermentasi dengan modifikasi pada penelitian ini dapat mempersingkat waktu fermentasi menjadi empat hari.



Gambar 3.2. Kurva hubungan antara karbohidrat, lemak dan protein biji kakao yang difermentasi selama 5 hari dengan berbagai variasi perlakuan. A: nonfermentasi; B: fermentasi alami; C: fermentasi dengan enzim bromelain hari ke-3; D: fermentasi dengan sistein hari ke-3; E: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2; F: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2, enzim bromelain hari ke-3; G: fermentasi dengan fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2, enzim bromelain dan sistein hari ke-3.

Kenaikan kadar lemak pada biji kakao yang mengalami proses fermentasi dipengaruhi karena adanya penurunan kadar karbohidrat. Hubungan antara karbohidrat, lemak, dan protein dengan jelas dapat dilihat pada Gambar 3.1 dan 3.2, dimana jika karbohidrat mengalami penurunan yang signifikan, maka kadar lemak dan protein akan meningkat. Hal ini disebabkan karena metabolisme karbohidrat cenderung membentuk asetil KoA sebagai prekursor lemak atau membentuk asam-asam amino sebagai prekursor protein.

Peningkatan nilai nutrisi pada biji kakao secara otomatis akan meningkatkan kualitas dari biji kakao. Semakin tinggi lemak kakao semakin mahal pula harga jual kakao, karena lemak merupakan komponen yang penting pada biji kakao. Selain itu peningkatan kandungan asam-asam amino bebas akibat aktivitas enzim proteolitik juga akan memperbaiki cita rasa kakao karena asam amino bebas, terutama asam amino hidrofobik merupakan prekursor cita rasa coklat.

Kandungan Total Polifenol Biji Kakao

Sebagai akibat dari aktivitas polifenol oksidase selama fermentasi adalah menurunnya kandungan polifenol biji kakao. Menurut Baba et al. (2007a), polifenol kakao mampu dapat mengurangi resiko penyakit kardiovaskular dengan cara mencegah oksidasi LDL. Marthur et al. (2002) dan Baba et al. (2007b) telah melakukan penelitian yang menunjukkan bahwa suplemen polifenol kakao mampu mengurangi oksidasi LDL. Penurunan kandungan polifenol biji kakao merupakan akibat dari aktivitas enzim polifenol oksidase dalam biji kakao selama fermentasi yang mulai aktif bekerja ketika biji kakao terpapar oksigen. Aktivitas enzim ini akan mendegradasi polifenol menjadi pigmen berwarna coklat (Gacche et al., 2006).

Untuk menghambat aktivitas polifenol oksidase dalam mendegradasi polifenol biji kakao, maka dilakukan penambahan inhibitor polifenol oksidase sejak hari pertama fermentasi yakni ketika buah kakao berinteraksi dengan udara, segera setelah kulit buah dipecah. Kandungan polifenol biji kakao terfermentasi ditunjukkan pada Tabel 3.1

Hari ke-	Kadar Total Polifenol/ %						
	A	B	C	D	E	F	G
4	8,05	4,89	4,87	6,51	4,28	4,26	5,26
5	8,05	4,97	4,10	5,61	4,29	4,16	5,02

Tabel 3.1. Perbedaan kandungan polifenol pada biji kakao yang difermentasi selama 4 dan 5 hari dengan berbagai variasi perlakuan. A: nonfermentasi; B: fermentasi alami; C: fermentasi dengan enzim bromelain hari ke-3; D: fermentasi dengan sistein hari ke-3; E: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2; F: fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2, enzim bromelain hari ke-3; G: fermentasi dengan fermentasi dengan *S. cerevisiae* hari ke-0, *L. plantarum* hari ke-1, A. aceti hari ke-2, enzim bromelain dan sistein hari ke-3.

Beberapa inhibitor kimia telah diuji kemampuannya dalam menghambat enzim polifenol oksidase, seperti asam askorbat (Sapers & Miller, 1995), sistein (Richard et al., 1992), asam kojik (Kahn et al., 1995) dan asam glutamat (Dogan et al., 2007). Berdasarkan interaksinya, inhibitor polifenol oksidase dibagi menjadi dua kategori yakni inhibitor yang berinteraksi dengan sisi tembaga atau sisi tertentu pada enzim dan inhibitor yang mengganggu sisi aktif enzim. Sistein sebagai inhibitor polifenol oksidase pun berinteraksi dengan dua cara tersebut. Secara umum, rantai samping tiol dari sistein akan berikatan ke suatu tempat yang sangat spesifik pada polifenol oksidase atau kompleks polifenol oksidase-substrat sehingga menyebabkan enzim menjadi tidak aktif (Gacche et al., 2006)

Penambahan sistein pada perlakuan D dan G memiliki kandungan polifenol yang paling baik karena mendekati kadar polifenol perlakuan A. Penambahan inhibitor sistein berfungsi untuk menghambat kerja enzim polifenol yang akan mengoksidasi polifenol menjadi melanin yang berwarna coklat yang biasanya disebut reaksi pencokelatan. Sedangkan dengan adanya penambahan mikroorganisme eksogen, ternyata menurunkan kandungan polifenol, seperti yang terlihat pada perlakuan E dan F. Hal ini dimungkinkan karena adanya tambahan enzim – enzim tambahan yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang juga dapat menurunkan kandungan polifenol dalam biji kakao.

Berdasarkan penelitian ini dapat diperoleh kesimpulan bahwa modifikasi fermentasi biji kakao dengan menggunakan campuran *S. cerevisiae*, *L. plantarum*, A. aceti, dan enzim bromelin terbukti meningkatkan kandungan nutrisi dan mempercepat waktu fermentasi menjadi empat hari, dan penambahan inhibitor sistein dapat mempertahankan kadar polifenol secara efektif.

Daftar Pustaka

- Abbe, M. M. J & Amin, I. 2008. *Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health*. Molecules Review. 13:2190-2219.
- AOAC. 1975. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. AOAC, Inc., Washington, Washington.
- Ardhana, M. M. & Fleet, G. H. 2003. *The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia*. International J. Food Microbiology. 86:87-99.
- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, N., Kanegae, M. & Kondo, K. 2007a. *Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder*. J. Nutr. 137:1436–1441.
- Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., Fukuda, K., Muto, Y. & Kondo, K. 2007b. *Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans*. Am. J. Clin. Nutr. 85:709-717.
- Boekhorst, J., Siezen, J. R., Zwahlen, M. C., Vilanova, D., Pridmore, R. D., Mercenier, A., Kleerebezem, M., Willem, M. V., Bru'ssow, H. & Desiere, F. 2004. *The complete genomes of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus johnsonii reveal extensive differences in chromosome organization and gene content*. Microbiology. 150:3601–3611.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Alkan, M. & Arslan, O. 2007. *Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by glutamic acid*. Eur Food Res Technol. 225:67–73.
- Elwers, S., Alexis, Z., Rohsius, C. & Lieberei, R. 2009. *Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (Theobroma cacao L.)*. Eur Food Res Technol. 229:937–948.
- Gacche, R. N., Shete, A. M., Dhole, N. A. & Ghole, V. S. 2006. *Reversible inhibition of polyphenol oxidase from apple using L-cysteine*. Indian Journal of Chemical Technology. 13:459-463.
- Hedge, J. E. & Hofreiter, B. T. 1962. In: *Carbohydrate Chemistry*, 17 (Eds. Whistler R.L. and Be Miller, J.N.). Academic Press. New York.
- Kahn, V., Lindner, P. & Zakin, V. 1995. *Effect of kojic acid on the oxidation of o-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase*. J Food Biochem. 18:253–271.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S. M. & Jialal, I. 2002. *Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans*. J. Nutr. 132:3663-3667.
- Misnawi, S. J., Jamilah, B. & Nazamid, S. 2004. *Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting*. Food Qual Pref. 15:403–409.
- Richard, F. F. C., Goupy, P. M. & Nicolas, J. J. 1992. *Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies*. J Agric Food Chem. 40:2108–2113.
- Sapers, G. M. & Miller, R. L. 1995. *Heated ascorbic/citric acid solution as browning inhibitor for pre-peeled potatoes*. J Food Sci. 60:762–766.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L. & Hollenberg N. K. 2006. *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. Proc Natl Acad Sci USA. 103:1024–1029.
- Schwan, R. F. & Wheals, A. F. 2004. *The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality*. Critical Review in Food Science and Nutrition. 44:205-221.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am J Enol Vitic. 16:144–158.
- Thompson, S. S., Miller, K. B. & Lopez, A. S. 2001. *Cocoa and coffee*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington DC. pp: 721-736.