

# 嘉南藥理大學110年度 研究計畫成果報告

計畫名稱：特色農產品之保健功效暨產品開發  
子計畫2:可可豆烘烤程度對巧克力黃烷醇、風味成份及保健功效的影響  
■重點(整合型)研究計畫

與業界廠商合作之研究計畫

執行期間：110年01月01日至12月31日

總計畫主持人:吳明娟  
本（子）計畫主持人:林盈君

中華民國111年02月21日



## 子計畫:可可豆烘烤程度對巧克力黃烷醇、風味成份及保健功效的影響

**摘要:** 可可豆含有豐富的黃烷醇對人身體心臟血管健康具有極大的助益。本研究原料可可豆經7天木箱自然發酵，採用熱風乾燥直到可可豆水分含量降至約6%。為了探討台灣可可豆在不同烘烤溫度和時間作用下，黃烷醇含量的變化情形，烘烤溫度分別是110，130和150 °C，烘烤時間分別是15，25和35min。以正相HPLC方法分析檢測黃烷醇單體到10聚體的含量，結果顯示巧克力中黃烷醇及其具體(DP1-DP10)含量隨著烘烤溫度與時間的增加而減少。從最高 $45.87 \pm 1.82 \text{ mg/g}$ (低溫110°C和15min)緩降至 $18.51 \pm 0.64 \text{ mg/g}$ (高溫150°C和35min)。在保健功效方面，DPPH 自由基的清除能力以烘烤溫度110°C加熱時間15分鐘其值達 $19.89 \pm 1.14 \text{ mg TE/g}$ 緩降至 $11.17 \pm 0.52 \text{ TE/g}$ (150°C加熱時間35分鐘)。ABTS自由基的清除能力以烘烤溫度110°C加熱時間15分鐘其值達 $22.95 \pm 1.35 \text{ mg TE/g}$ 緩降至 $11.35 \pm 1.95 \text{ TE/g}$ (150°C加熱時間35分鐘)。這結果證明了在高溫長時間的烘烤條件會降低巧克力萃取物清除自由基的能力。因此，低度加工烘烤(低溫110°C短時間15min)的可可豆，其巧克力製品保留較多的總黃烷醇及較高的抗氧化活性，具備清除自由基的能力，可以成為促進健康具備保健功效的潛力食品，預防心血管疾病及併發症。

### 1.研究動機與文獻回顧

人類享用巧克力已有4000年的歷史，其主要原料是可可樹的種子(可可豆)，原產於南美洲的亞馬遜河流域，栽培範圍介於赤道附近南北緯20度之間。可可豆含有豐富的油脂，多酚，黃烷醇等多種成分。Buijsse et al.(2010)發現可可粉中的多酚具有降血壓的潛力；Heiss et al.(2010)指出可可粉中的多酚具有改善血管內皮之功能；Khawaja et al.(2011)指出可可粉中的多酚具有防止血小板凝聚之功能與降低發炎反應(Monagas et al., 2009)，而可可豆中的多酚以黃烷醇的含量最多，這也意謂著黃烷醇具備上述對人類心臟血管的健康有極大的助益。(Tomás-Barberán et al., 2011)。近年來，台灣種植可可的面積逐年增加，特別是在南台灣屏東縣種植可可樹面積約有350公頃，主要分布在內埔、萬巒等地，由於平均樹齡偏小，產量不豐，農民產出的可可多數自己發酵、烘烤、精磨後，生產巧克力相關產品，但規模甚小，缺乏專業技術的支持，導致產品品質參差不齊。事實上，可可從種植到完成巧克力產品，每個流程都需要掌握關鍵技術。從果樹栽植到收成果實，可可豆歷經發酵、曬乾、烘焙、壓碎去殼、精磨、調溫加工，經過耗時近月的複雜工序，最後才能成為巧克力。過程不僅繁瑣，費工費時，未經過專業訓練很難達成一定的水平。其中烘焙階段則是影響巧克力成品外觀與色澤與風味的關鍵步驟，同時烘烤的溫度與時間亦會對可可多酚產生影響(Ioannone et al., 2015)。最近國外研究指出烘烤的溫度時間空氣流速與濕度都會對可可豆的品質產生影響(Żyżelewicz et al., 2016 ; Sacchetti et al., 2016)；同時亦會對多酚和黃烷醇及其聚合體的含量產生影響(Kothe et al., 2013)。因此本研究主要目的是探討乾燥後的可可豆，在不同的烘烤條件下：溫度分別從110到150°C，烘烤時間從15到35分鐘。對可可豆之製品巧克

力中黃烷醇含量的變化情形，在保健功效方面，探討不同加工處理之可可巧克力萃取物對DPPH自由基的清除能力及對ABTS自由基的清除能力。本計畫的執行成果將可以有效提昇台灣的可可產業的產值，提昇農民的收益與可可的附加價值，改善國內巧克力製品之品質與保健功效訴求。

## 2.材料與方法

### 2.1 可可果莢

台灣屏東內埔萬巒一帶生產的可可果莢，早上由特定農民的莊園內採收後，下午送交台南嘉南藥理大學實驗室備用。隔天早上將成熟的果莢利用不鏽鋼的鋼刀切開，同時取出可可的種子，過程中要小心不要傷到種子。緊接著準備進行發酵實驗或直接乾燥。

### 2.2 可可種子的發酵

發酵操作採用傳統木箱，將木箱分隔成上、中、下三個隔間，每個隔間大小為 50cm x 50cm x 50cm。剛開始將新鮮的可可種子存放在最上層的隔間，表面覆蓋一層香蕉葉(天然菌株來源)再加蓋麻布袋(整個發酵過程)來防止熱的流失，確保能提升發酵溫度達約 48 °C。在經過 48 小時後，將最上層的可可種子移到中層的隔間並充分攪拌再保持 48 小時。接下來將發酵後的可可豆移至最下層的隔間，同時每天翻覆一次到兩次直到完成整個發酵過程 168 小時。發酵後的可可豆利用熱風乾燥 50 °C 持續 48 小時降低其水份含量至約 6%，冷卻後儲存於冰箱冷藏備用。

### 2.3 可可豆的烘烤

乾燥後的可可豆必須進一步的烘烤以利可可豆風味的形成，同時亦會伴隨非酵素褐變反應，還有可可豆中黃烷醇亦會同時產生變化。本研究將利用數位烘豆機來烘烤可可豆，3種溫度烘烤的時間分別是15min，25min及35min。每次將隨機抽取1000公克的可可豆在旋轉式的數位烘豆機內進行烘烤，共得到9種不同烘烤程度的可可豆。取出樣本後置於室溫，冷卻後儲存於冰箱冷藏。

### 2.4 巧克力的製造

烘烤完成之可可豆，首先經由脫殼機去殼，接下來利用粗磨機將可可碎粒研磨至糊狀，將可可糊狀物移至精磨機繼續精磨24小時，添加可可總量30%的砂糖後，繼續精磨24小時後。將可可膏進行調溫首先升溫至48°C，然後降溫至27°C，再升溫至32°C並保持這溫度備用。將調溫完成的巧克力膏充填至聚丙烯製成的模具(40 mm x 40 mm x 4 mm)共40個。儲存於密封的鋁箔袋內存放在溫度18°C溼度55%的點心櫃熟成7天後進行各項測試分析。

## 2.5 黃烷醇之含量測定

### (1)萃取液之製備

參考 Robbins 氏等人 (2012)的方法並加以修飾。取 0.5-1.0 克去脂巧克力置於 50mL 離心瓶中，以 20 mL 之丙酮/水/醋酸(AWAA, 700:295:5, v/v/v)於 50 超音波振盪萃取 50 min，離心分離上清液與沉澱物，沉澱物再以 20 mL AWAA 於 50 超音波振盪萃取第二次 30 min 後離心去除沉澱物，將兩次萃取液合併、過濾、並定容至 50 mL，即為 50 倍(v/v)之粗萃液。粗萃液因含有其他雜質，故須以固相萃取加以淨化濃縮，使用 Strata SCX 之 cartridge 進行淨化。固相萃取前，Strata SCX cartridge 要以 5 mL 純水預處理，然後將粗萃液 2 mL 以低於 1 mL/min 之流速載入其中，全數進入 cartridge 後再以蒸餾水洗去較極性的雜質，最後再用 2 mL 之甲醇洗出淨化後的萃取液。

### (2)HPLC分析

淨化後之萃取液經0.45μm濾膜過濾後，以HPLC進行分析。參考文獻之方法，以正相 HPLC 分析，使用管柱與條件如下(Adamson et al.,1999)：

Column : Phenomenex SphereClone 5μm,normal-phase silica(Φ4.6\*250mm),Phenomenex Inc.,Torrance,CA,USA

Detection wavelength:280nm

Mobile phase:

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/Acetic acid(82:14:2:2 , v/v)

MeOH/H<sub>2</sub>O/Acetic acid(96:2:2 , v/v)

Flow rate:1 mL/min

Mobile phase gradient：如表1所示。

表 1. 黃烷醇組成分析之移動相流洗梯度

Time(min)	A%	B%
0	100	0
30	82.4	17.6
45	69.3	30.7
50	12.2	87.8

## 2.6 DPPH自由基清除力測試

取適量樣品加入50%丙酮，於50°C超音波震盪8min，經離心收集上清液。配製 1mM DPPH · (α,α-diphenyl-β-pricrylhydrazyl)，為一安定的自由基，DPPH 甲醇溶液呈現紫蘿蘭色(Violet)，測試樣品的供氫能力強；於540 nm下有最大吸收，吸光值越低，則表示樣品中清除自由基能力越強。以Trolox作為標準品作為檢量線。

## 2.7 TEAC總抗氧化能力測定

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) 總抗氧化能力測定是由ABTS (2,2'-Azino -bis- [ 3-ethylbenthiazoline sulfonic acid ] ) 與Peroxidase (Metmyoglobin) 及過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 催化下氧化成藍綠色穩定的ABTS·+陽離子自由基，其水溶液在734 nm有最

大的吸收峰，吸光值愈低表示樣品抗氧化效果愈好。以維他命E (Trolox) 製作其標準曲線。

### 3.結果與討論

#### 3.1 不同烘烤條件對巧克力中黃烷醇單體到10聚體的含量影響

為了探討台灣可可豆在不同烘烤溫度和時間作用下，所製成巧克力內黃烷醇含量的變化情形，烘烤溫度分別是110，130和150 °C，烘烤時間分別是15，25和35min。表2顯示巧克力中黃烷醇及其具體(DP1-DP10)含量隨著烘烤溫度與時間的增加而減少。從最高 $45.87\pm1.82\text{mg/g}$ (低溫 $110^\circ\text{C}$ 和 $15\text{min}$ )緩降至 $18.51\pm0.64\text{mg/g}$ (高溫 $150^\circ\text{C}$ 和 $35\text{min}$ )。我們可以藉由控制烘烤溫度與時間來預測巧克力中黃烷醇的含量，成為生產具保健功效巧克力的重要參考依據。

表2. 不同烘烤溫度處理之可可豆對巧克力製品中黃烷醇含量之影響

Roasting conditions		Flavanol and Procyandin, mg (-)-epicatechin equivalents/g										
Temperature (°C)	Time (min)	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DP9	DP10	Total
110	15	21.06 ±0.73 <sup>bc</sup>	6.86 ±0.35 <sup>b</sup>	5.45 ±0.17 <sup>a</sup>	6.05 ±0.13 <sup>ab</sup>	2.46 ±0.24 <sup>a</sup>	1.96 ±0.12 <sup>a</sup>	1.21 ±0.08 <sup>a</sup>	0.88 ±0.05 <sup>a</sup>	0.15 ±0.04 <sup>a</sup>	0.05 ±0.00 <sup>a</sup>	45.87 ±1.82 <sup>a</sup>
	25	19.64 ±0.69 <sup>bc</sup>	7.11 ±0.35 <sup>b</sup>	5.26 ±0.15 <sup>b</sup>	6.04 ±0.12 <sup>b</sup>	2.32 ±0.12 <sup>c</sup>	1.66 ±0.08 <sup>c</sup>	0.98 ±0.07 <sup>b</sup>	0.74 ±0.04 <sup>b</sup>	0.11 ±0.04 <sup>b</sup>	0.04 ±0.01 <sup>b</sup>	43.89 ±1.65 <sup>b</sup>
	35	19.64 ±0.74 <sup>b</sup>	6.37 ±0.34 <sup>b</sup>	4.58 ±0.13 <sup>b</sup>	5.38 ±0.04 <sup>d</sup>	2.09 ±0.10 <sup>cd</sup>	1.09 ±0.06 <sup>d</sup>	0.82 ±0.06 <sup>c</sup>	0.77 ±0.03 <sup>c</sup>	0.08 ±0.03 <sup>c</sup>	0.04 ±0.01 <sup>b</sup>	40.86 ±1.53 <sup>b</sup>
130	15	19.43 ±0.74 <sup>b</sup>	6.32 ±0.38 <sup>ab</sup>	4.19 ±0.15 <sup>b</sup>	5.45 ±0.10 <sup>c</sup>	1.87 ±0.08 <sup>d</sup>	0.75 ±0.04 <sup>e</sup>	0.63 ±0.04 <sup>d</sup>	0.66 ±0.01 <sup>d</sup>	0.06 ±0.01 <sup>d</sup>	0.03 ±0.00 <sup>c</sup>	39.37 ±1.57 <sup>b</sup>
	25	16.31 ±0.66 <sup>bc</sup>	5.19 ±0.35 <sup>b</sup>	2.80 ±0.12 <sup>c</sup>	4.28 ±0.12 <sup>b</sup>	1.20 ±0.11 <sup>c</sup>	0.53 ±0.11 <sup>b</sup>	0.51 ±0.04 <sup>d</sup>	0.31 ±0.02 <sup>d</sup>	0.03 ±0.00 <sup>c</sup>	0.01 ±0.00 <sup>b</sup>	31.16 ±1.57 <sup>b</sup>
	35	17.39 ±0.52 <sup>d</sup>	5.10 ±0.24 <sup>cd</sup>	2.77 ±0.08 <sup>d</sup>	3.45 ±0.04 <sup>d</sup>	0.81 ±0.03 <sup>e</sup>	0.38 ±0.01 <sup>f</sup>	0.34 ±0.01 <sup>e</sup>	0.18 ±0.02 <sup>e</sup>	0.01 ±0.00 <sup>f</sup>	0.00 ±0.00 <sup>de</sup>	30.32 ±0.91 <sup>cd</sup>
150	15	15.84 ±0.63 <sup>c</sup>	4.81 ±0.28 <sup>c</sup>	3.51 ±0.08 <sup>d</sup>	3.29 ±0.04 <sup>d</sup>	3.32 ±0.11 <sup>e</sup>	0.47 ±0.03 <sup>f</sup>	0.40 ±0.02 <sup>e</sup>	0.23 ±0.02 <sup>e</sup>	0.05 ±0.00 <sup>f</sup>	0.00 ±0.00 <sup>e</sup>	31.89 ±1.15 <sup>c</sup>
	25	15.44 ±0.52 <sup>d</sup>	4.07 ±0.20 <sup>d</sup>	2.29 ±0.06 <sup>e</sup>	2.44 ±0.02 <sup>e</sup>	3.22 ±0.01 <sup>e</sup>	0.32 ±0.02 <sup>f</sup>	0.02 ±0.00 <sup>e</sup>	0.00 ±0.00 <sup>e</sup>	0.00 ±0.00 <sup>f</sup>	0.00 ±0.00 <sup>e</sup>	27.80 ±0.71 <sup>de</sup>
	35	12.71 ±0.43 <sup>d</sup>	3.58 ±0.14 <sup>e</sup>	1.25 ±0.04 <sup>e</sup>	0.75 ±0.02 <sup>e</sup>	0.17 ±0.01 <sup>e</sup>	0.05 ±0.00 <sup>f</sup>	0.02 ±0.00 <sup>e</sup>	0.00 ±0.00 <sup>e</sup>	0.00 ±0.00 <sup>f</sup>	0.00 ±0.00 <sup>e</sup>	18.51 ±0.64 <sup>e</sup>

Values are expressed as the means ± SD. Different letters indicate significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 3.2 不同烘烤溫度處理對巧克力保健功效清除自由基能力之影響

巧克力萃取物清除自由基能力是利用DPPH 和 ABTS 這兩種評估方法。不同烘烤溫度/時間組合處理的可可豆，其製品巧克力萃取物清除自由基之能力如表3所示。結果顯現兩種測試方法的抗氧化活性有類似的結果。儘管結果類似，但不同巧克力製品的萃取物其組成不同。在DPPH的評估方法中容易與疏水性的化合物作用，而在ABTS的測試方法中會同時與疏水性及親水性的化合物作用(Carmen L.D.T.S. et al., 2021)。DPPH 自由基的清除能力以烘烤溫度 $110^\circ\text{C}$

加熱時間15分鐘其值達 $19.89\pm1.14$  mg TE/g緩降至 $11.17\pm0.52$ TE/g (150°C 加熱時間35分鐘)。ABTS自由基的清除能力以烘烤溫度110°C 加熱時間15分鐘其值達 $22.95\pm1.35$  mg TE/g緩降至 $11.35\pm1.95$  TE/g (150°C 加熱時間35分鐘)。這結果證明了在高溫長時間的烘烤條件會降低巧克力萃取物清除自由基的能力。

從表2和表3的數據結果顯示可可豆在低溫短時間的烘烤情況下，其相對應的巧克力可以保留較多的黃烷醇，同時具備較高的抗氧化活性。這結果同時建立巧克力黃烷醇的含量與巧克力抗氧化能力直接呈現正相關。而黃烷醇的含量直接受到烘烤程度的影響。巧克力總黃烷醇中以表兒茶素含量最多達46%。這類的物質具備芳香環與氫氧官能基，這些結構允許黃烷醇與金屬離子螯合，形成不具活性的複合物，同時也會與自由基結合形成穩定物質(Noelia *et al.*, 2021)。自由基在引起細胞氧化損傷、發炎、老化、心血管疾病上扮演關鍵的角色。這些發現證明了利用低度烘烤可可豆，可以保留巧克力較多的總黃烷醇及較高的抗氧化活性，可以成為促進健康具備保健功效的食品。

**表3. 不同烘烤溫度處理對巧克力保健功效清除自由基能力之影響**

Roasting conditions		ABTS scavenging activity	DPPH scavenging activity
Temperature, °C	Time, min	(mg TE/g )	(mg TE/g)
110	15	$22.95\pm1.35$	$19.89\pm1.14$
	25	$16.95\pm0.35$	$14.68\pm1.12$
	35	$16.60\pm1.00$	$13.12\pm0.65$
130	15	$22.30\pm2.25$	$17.86\pm0.18$
	25	$14.20\pm1.20$	$13.58\pm0.41$
	35	$12.15\pm1.95$	$12.04\pm0.72$
150	15	$13.95\pm1.65$	$15.98\pm1.12$
	25	$12.20\pm1.20$	$12.58\pm0.25$
	35	$11.35\pm1.95$	$11.17\pm0.52$

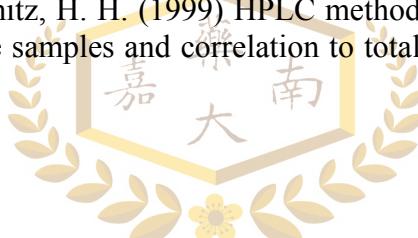
The data were indicated with mean±SD.

#### 4. 結論

自由基在引起細胞氧化損傷、發炎、老化、心血管疾病上扮演關鍵的角色，低度加工烘烤(低溫110°C 短時間15min)的可可豆，其巧克力製品保留較多的總黃烷醇及較高的抗氧化活性，具備清除自由基的能力，可以成為促進健康具備保健功效的潛力食品，預防心血管疾病及併發症。

#### 5、參考文獻：

Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L, Cao, G., Jacobs, P. H., Kremers, B. G., Hammerstone, J. F., Rucker, R., Ritter, K. A. & Schmitz, H. H. (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J Agric. Food Chem. 47: 4184-4188.



Buijsse, B., Weikert, C., Drogan, D., and Bergmann, M. (2010). Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. European Heart Journal, 31, 1616-1623.

Carmen L.D.T.S., Francisco R.F., Francisco J.C.M., Josue' J., Sau'l R.C., Francisco J.W.C., Jesu's B.F., Daniela D.C., Carlos G.B.U., Jose' A.T.H. 2021. Recovery of phytochemical from three safflower (*Carthamus tinctorius* L.) by-products: antioxidant properties, protective effect of human erythrocytes and profile by UPLC-DAD-MS. *J Food Process Preserv.* 45(9):e15765. <http://doi.org/10.1111/jfpp.15765>

Heiss, C., Keen, C. L., and M. (2010). Flavanols and cardiovascular disease prevention. European Heart Journal, 31, 2583-2592.

Heiss, C., Keen, C. L., and M. (2010). Flavanols and cardiovascular disease prevention. European Heart Journal, 31, 2583-2592.

Ioannone, F., Mattia, C.D. D., Gregorio, M. D., Sergi, M., Serafini, M., and Sacchetti, G. (2015). Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chemistry*, 174, 256-262.

Khawaja, O., Gaziano, J. M. and Djoussé, L. (2011). Chocolate and coronary heart disease: A systematic review. *Current Atherosclerosis Reports*, 13, 447-452.

Kothe,L., Zimmermann, B.F., and Galensa, R.(2013).Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chemistry*, 141, 3656-3663.

Monagas, M., Khan, N., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., and Llorach, R. (2009). Effect of coca powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 1144-1150.

Noelia D.M., Mónica C. S., Gonzalo S.M., Dolores R.P., and Pilar M. 2021. Cytotoxicity study of bakery product melanoidins on intestinal and endothelial cell lines. *Food Chem.* 343:128405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128405>

Robbins R.J., Leonczak J., and Li J. (2012). Determination of flavanol and procyanidin (by degree of polymerization 1–10) content of chocolate, cocoa liquors, powder(s), and cocoa flavanol extracts by normal phase high-performance liquid chromatography: collaborative study. *J AOAC Int* 95, 1153–1160.

Sacchetti, G., Ioannone, F., Gregorio, D. M., Mattia, D. C., Serafini, M., and Mastrocola, D. (2016). Non enzymatic browning during cocoa roasting as affected by processing time and temperature. *Journal of Food Engineering*, 169, 44-52.

Tomás-Barberán, F., Borges, G., and Crozier, A. (2011). Phytochemicals in cocoa and flavan-3-ol bioavailability. In A. Crozier, H. Ashihara, and F. Tomás-Barbérán (Eds.) *Teas, cocoa and coffee: Plant secondary metabolites and health* (pp. 193-217). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Żyżelewicz, D., Krysiak, W., Oracz, J., Sosnowska, D., Budryn, G. and Nebesny, E. (2016). The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. Food Research International, 89, 918-929.

