

#

嘉南藥理大學112年度# 研究計畫成果報告

計畫名稱：可可豆發酵過程中微生物的菌相分析

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：112年05月04日至12月31日

總計畫主持人：陳品晟#

本(子)計畫主持人：林盈君

中華民國113年01月31日

摘要

本研究以台灣產的可可豆為原料，採用木箱天然發酵，探討發酵過程中微生物的菌相隨發酵時間的變化情形，藉此瞭解微生物在發酵過程中的消長變化情形，並進行分子層次的鑑定，利用 PCR 擴增核糖體基因 (ribosomal DNA) 或其內轉錄間隔區 (ITS)，進行序列分析，利用 GeneBank database 進行序列比對，來確認分離之菌種。研究結果顯示發酵開始時(0 hour) 即在可可豆中檢測到絲狀真菌，並在24小時內生長達到最高峰，此後即逐步死滅，發酵後第72小時已幾乎無法檢測到絲狀真菌。對酵母菌來說，在發酵的最初階段，可可豆中即可檢測到酵母菌的存在，並在整個發酵過程中維持穩定的數量。*Candida nivariensis* 是整個發酵過程中主要的優勢菌種，而未知的 *Candida* 屬菌株(*Candida* sp.)也對可可豆最初的發酵做出了貢獻。*Saccharomyces cerevisiae* 則在發酵第48小時出現，並在96小時生長至最大數量。對乳酸菌而言，發酵一開始即可檢測到乳酸菌，菌數在第48小時達到最高，之後開始逐漸減少。*Fructobacillus tropaeoli* 是最主要的菌種。發酵的第72小時，可可豆中即可檢測到醋酸菌的存在，並在第120小時數量達到最高量，主要菌株包括未知的醋桿菌屬菌株(*Acetobacter* sp.)及未知的駒形桿菌屬菌株(*Komagataeibacter* sp.)，其中未知的醋桿菌屬(*Acetobacter* sp.)為主要優勢菌種。總結來說，整個微生物的菌相，包括初期的酵母菌和乳酸菌，接著中期的醋酸菌，這三種微生物主宰了整個可可豆的發酵過程。

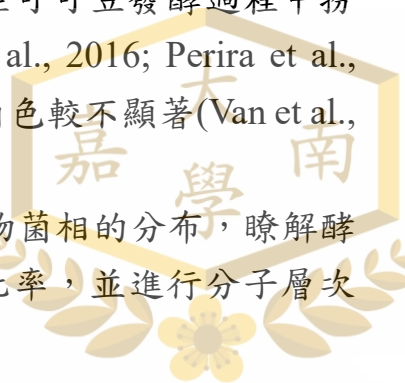
(一)前言

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。國內首先研究可可豆發酵的學者，首推台灣大學蘇南維教授(陳，2011)，使用屏東邱姓農民生產的可可豆進行小量的發酵試驗，發酵後的台灣可可豆及國外進口的可可豆分別進行特定化學成分的定量，並探討可可脂的結晶性質。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。

巧克力的製程中，發酵的成功與否扮演著重要的角色，將直接影響巧克力風味與品質及多酚的含量，Brito et al.(2017)探討發酵過程中多酚含量的變化情形。發酵也是可可加工過程中最難控制的步驟，一般而言，傳統上可可的發酵是採用自然落菌法，經由野生的酵母菌、乳酸菌、醋酸菌之作用達到可可豆風味形成及風味前驅物質的生成。最近國外有些學者經由篩選不同地理區域的野生菌株並加以詳細分析鑑定(Bortolini et al., 2016)，其結果顯示可可果實發酵參與的菌主要有酵母菌、乳酸菌、醋酸菌等菌株。Koné et al(2016)使用特定的酵母菌進行可可豆的發酵，改善了象牙海岸生產的可可豆之風味，而得到不同風味巧克力。其他相關研究也證實了酵母菌在可可豆發酵過程中扮演非常重要角色(Ho et al., 2014; Maura et al., 2016; Perira et al., 2017)。而乳酸菌在可可豆發酵過程中的角色較不顯著(Van et al., 2015)。

本研究將探討天然發酵可可豆中微生物菌相的分布，瞭解酵母菌、乳酸菌及醋酸菌或其他微生物的比率，並進行分子層次



的鑑定，利用 PCR 擴增核糖體基因 (ribosomal DNA) 或其內轉錄間隔區(ITS)，進行序列分析(Lopandic et al., 2006)，利用 GeneBank database 進行序列比對，確認分離之菌種。

(二)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。

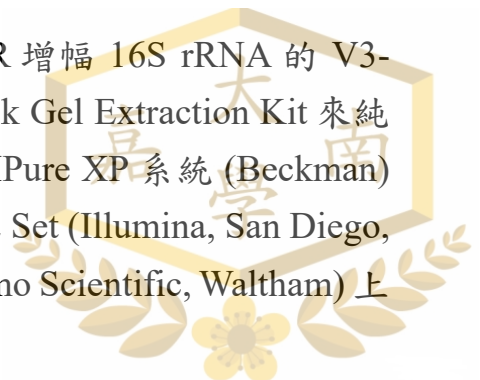
2.2 可可種子的發酵

可可種子的發酵採用傳統木箱發酵，剛開始將新鮮的可可種子約25公斤存放在木箱，表面覆蓋一層香蕉葉再加蓋麻布袋(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，將可可豆移出木箱並充分攪拌再保持48小時。接下來將發酵後的可可豆移出充分攪拌，同時每天翻覆一次到兩次直到完成整個發酵過程168小時。在發酵過程中將可可豆混和均勻並每隔24hr 取25g 可可豆測微生物菌相的分布。

2.3 微生物體分析

次世代定序(Next Generation Sequencing; NGS) 是總體基因體學的工具，透過次世代定序可以研究微生物的組成與相對數量的多寡。本實驗將樣品以 Qiagen PowerSoil DNA extraction kit 抽取 DNA，來進行細菌的族群分析。

16S 擴增子次世代定序: 利用341F/805R 引子對 (341F: CCTACGGGNGGCWGCAG;805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC)來 PCR 增幅 16S rRNA 的 V3-V4高變異區段(細菌)接著利用 QIAquick Gel Extraction Kit 來純化 PCR 片段。第一階段擴增子通過 AMPure XP 系統 (Beckman) 純化，然後使用 Nextera XT Index Kit v2 Set (Illumina, San Diego, CA, USA)，並在 Qubit 2.0 螢光計 (Thermo Scientific, Waltham) 上



評估 library 的質量。然後再以 illumina 的 Miseq 機型，定序讀長為 300 paired-end；並分別從正向與反向進行雙端測序 (Schloss et al., 2009)。

生物資訊分析流程遵循 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) 的指引來進行 (Callahan et al., 2016)，並使用 DADA2 過濾 noisy 序列，校正序列上的錯誤，移除 chimeric 序列，移除 singletons 合併降噪後的配對讀序 (paired-end reads) 去掉重複序列。接著使用事先訓練好的分類器 Scikit-learn 來進行分類指派 (Taxonomic Assignment)。分類器是用 Naive Bayes 方法以 99% 相似度訓練 SILVA 132 資料庫 (Quast et al., 2013)。

(三) 結果與討論

微生物體次世代定序 (Next Generation Sequencing; NGS) 是總體基因體學的工具，透過次世代定序可以研究微生物的組成與相對數量的多寡。本實驗將樣品以 Qiagen PowerSoil DNA extraction kit 抽取 DNA，來進行真菌與細菌的族群分析，其結果分別說明如下。

3.1 絲狀真菌

發酵開始時 (0 hour) 即在可可豆中檢測到絲狀真菌，並在 24 小時內生長達到最高峰，此後即逐步死滅成為幾乎不可檢測的菌群 (圖 1)。Penicillium steckii 和 Mucor irregularis 為最初的優勢菌群，但兩者均在發酵第 48 小時後即迅速死滅 (圖 2)。Trichoderma lixii 及 Choanephora cucurbitarum 則是在 24 小時內生長達到最高峰 (圖 3)。在發酵過程中亦可檢測到其他絲狀真菌存在，主要為麴黴屬 (Aspergillus sp.)、毛雙孢屬 (Lasiodiplodia sp.) 及黑粉菌科 (Ustilaginaceae)。整體來說，發酵後第 72 小時已幾乎無法檢測到絲狀真菌。

3.2 酵母

在發酵的最初階段，可可豆中即可檢測到酵母菌的存在，並在整個發酵過程中維持穩定的數量。Candida nivariensis 是



整個發酵過程中主要的優勢菌種，而未知的 *Candida* 屬菌株 (*Candida* sp.) 也對可可豆最初的發酵做出了貢獻。

Saccharomyces cerevisiae 則在發酵第48小時出現，並在96小時生長至最大數量(圖4)。在可可豆最初的發酵即可檢測到 *Pichia kluyveri*，一株未知的 *Hanseniaspora* 屬菌株 (*Hanseniaspora* sp.) 在24小時內被檢測出來，並持續到發酵終止皆可檢出(圖5)。其他種類的酵母菌群，包括 *Diaporthe* sp.、*Issatchenkia orientalis*、*Candida kungkrabaensis* 和 *Candida albicans*，在發酵的各階段皆有被檢測出來，但只佔整個酵母菌群的不到0.03%(數據未顯示)。

3.3 乳酸菌

發酵一開始即可檢測到乳酸菌，菌數在第48小時達到最高，之後開始逐漸減少(圖6)。*Fructobacillus tropaeoli* 是最主要的菌種，而未知的乳桿菌屬菌株(*Lactobacillus* sp.) 則在發酵後期(96小時)開始出現。其他乳酸菌群皆極微量存在(數據未顯示)。

3.4 醋酸菌

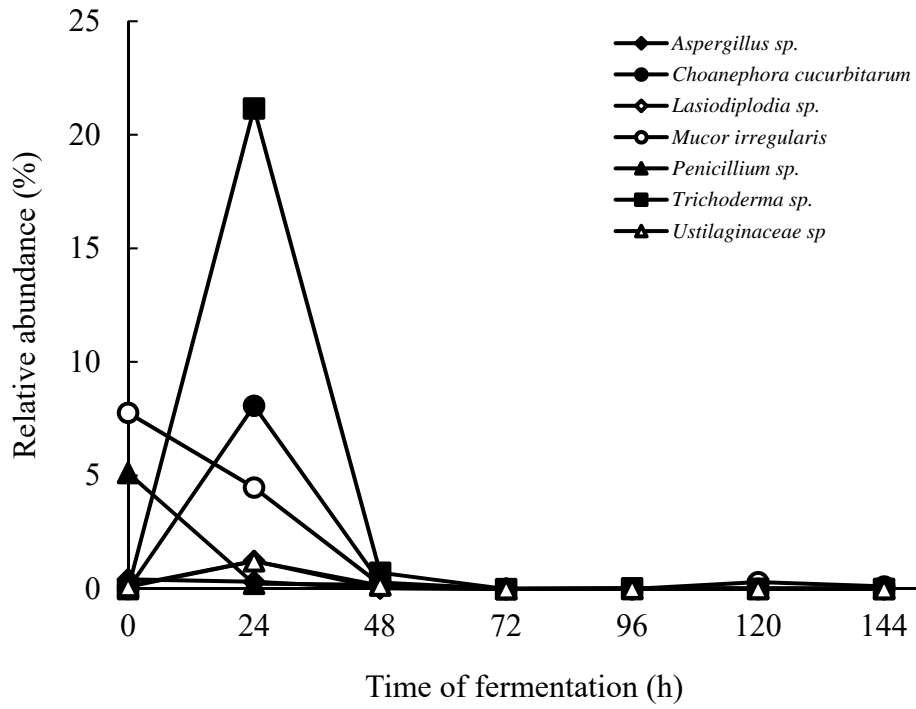
發酵的第72小時，可可豆中即可檢測到醋酸菌的存在，並在第120小時數量達到最高(圖6)。主要菌株包括未知的醋桿菌屬菌株(*Acetobacter* sp.) 及未知的駒形桿菌屬菌株 (*Komagataeibacter* sp.)，其中未知的醋桿菌屬(*Acetobacter* sp.) 為主要優勢菌種。此外，在發酵第72小時亦檢測到極微量的 *Komagataeibacter saccharivorans* 菌株存在(數據未顯示)，發酵後期亦檢測出醋桿菌科(*Acetobacteraceae*) 菌株。

3.5 其他菌群

在發酵一開始即可檢測到 *Enterobacter* sp. 及 *Pantoea* sp.，並在發酵開始後即逐步死滅(圖7)。在發酵過程中亦可檢測到其他細菌存在，主要為腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*) 及歐文菌科(*Erwiniaceae*)，但皆極微量(數據未顯示)。



#



#####

Figure 1. Growth of filamentous fungi during coca bean fermentation.

#

#

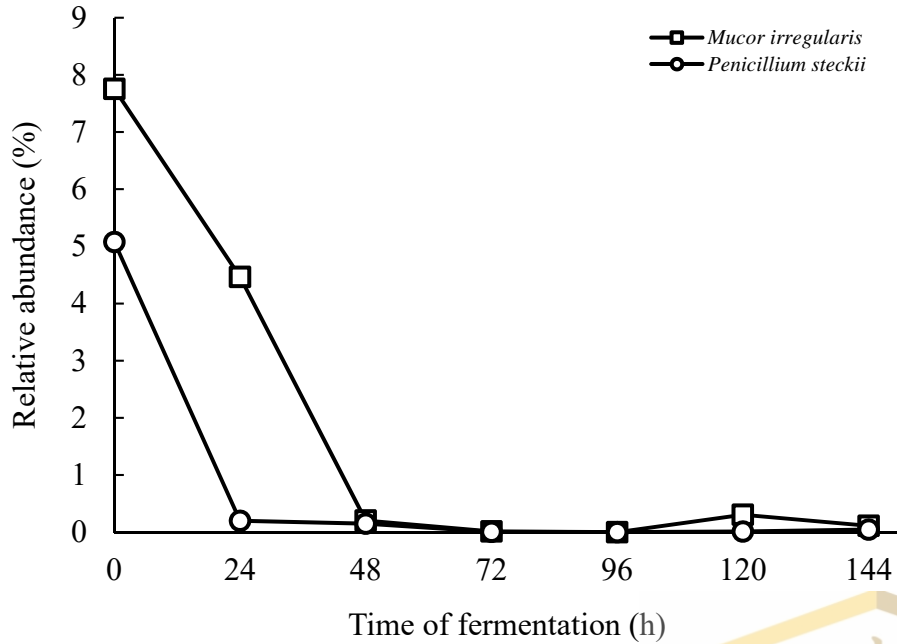
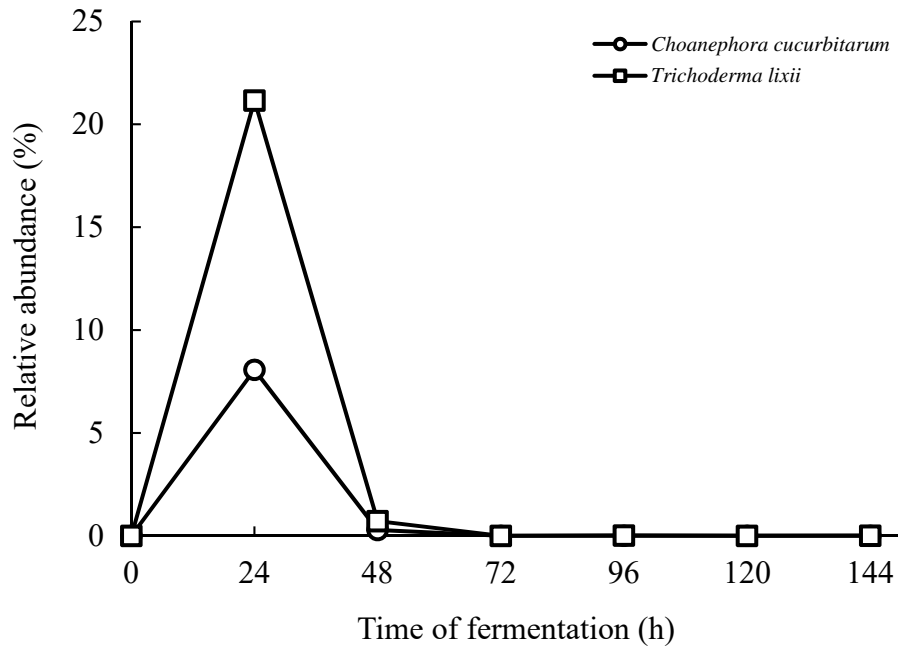


Figure 2. Growth of *Mucor irregularis* and *Penicillium steckii* during coca bean fermentation.

#



#



#

Figure 3. Growth of *Choanephora cucurbitarum* and *Trichoderma lixii* during coca bean fermentation.

#

#

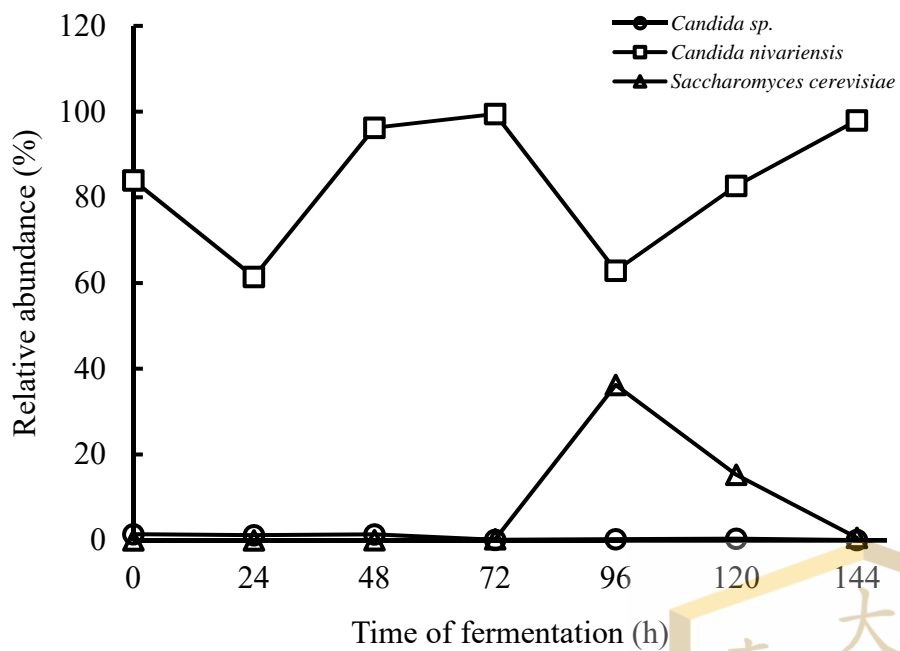


Figure 4. Growth of *Candida sp.*, *Candida nivariensis* and *Saccharomyces cerevisiae* during coca bean fermentation.



#

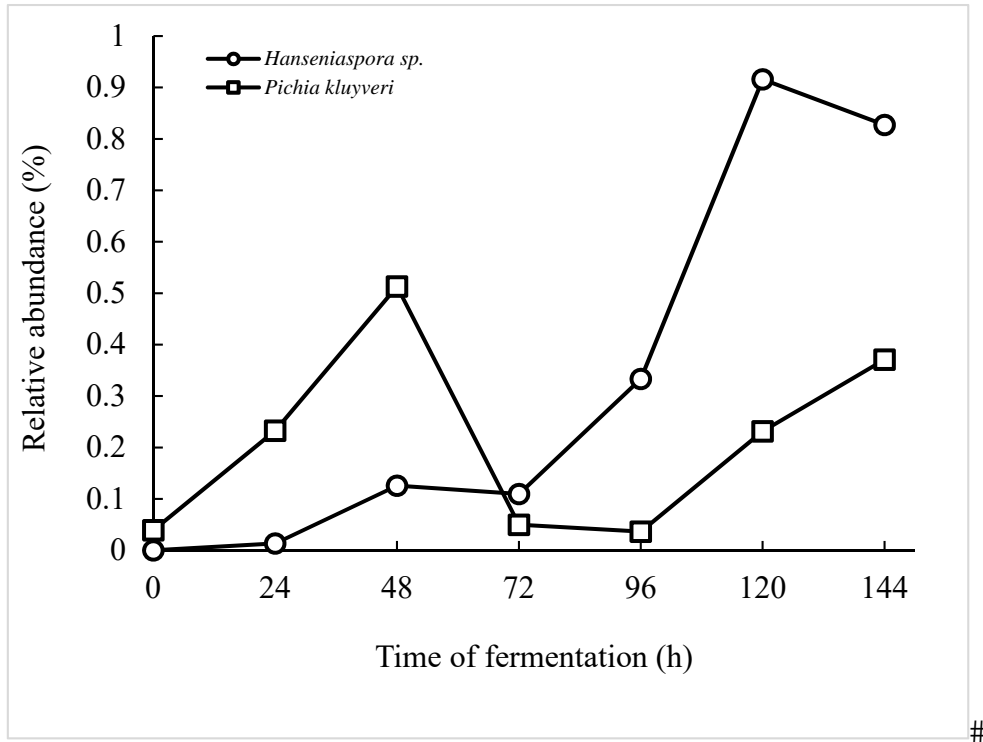


Figure 5. Growth of *Hanseniaspora sp.* and *Pichia kluyveri* during coca bean fermentation.

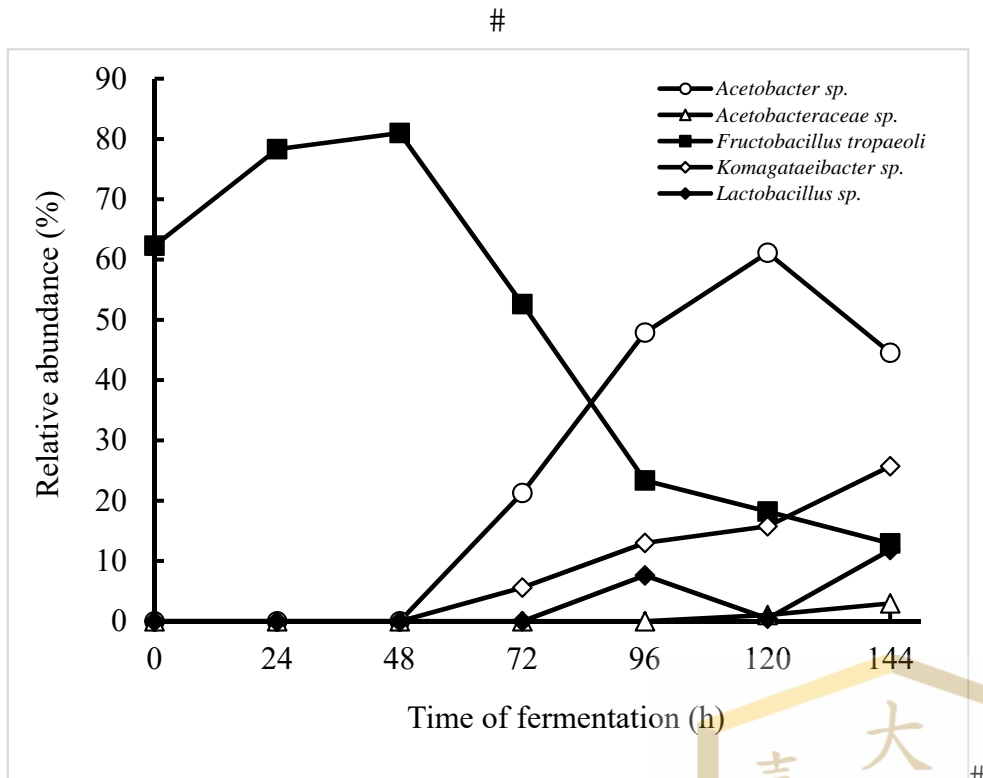
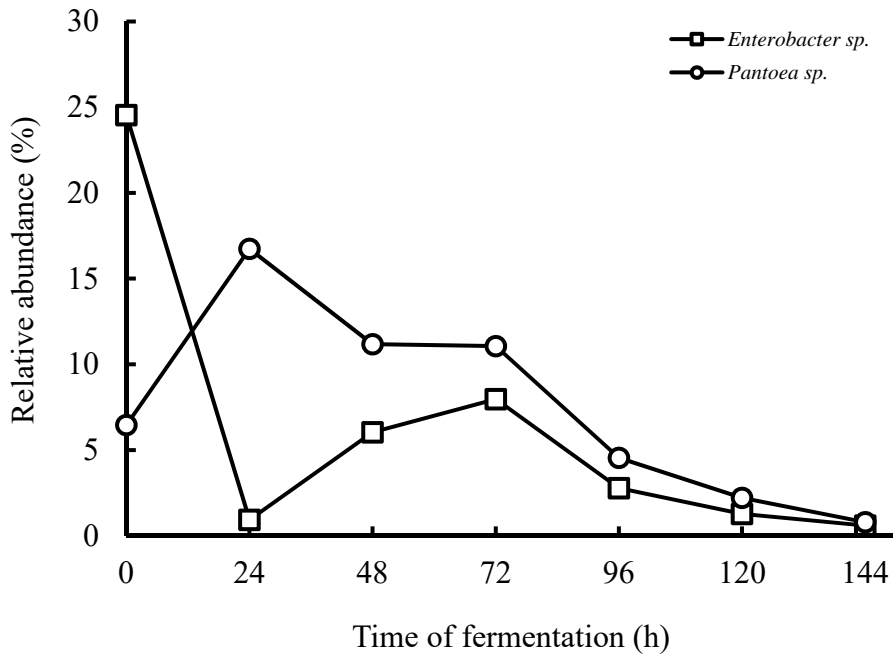


Figure 6. Growth of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria during coca bean fermentation.

#



#



#

Figure 7. Growth of *Enterobacter sp.* and *Pantoea sp.* during cocoa bean fermentation.

#

(四)結論

本研究結果顯示發酵開始有絲狀真菌，並在24小時內生長達到最高峰，此後即逐步死滅，發酵後第72小時已幾乎無法檢測到絲狀真菌。對酵母菌來說，在發酵的最初階段，可可豆中即可檢測到酵母菌的存在，*Saccharomyces cerevisiae* 則在發酵第48小時出現，並在96小時生長至最大數量。對乳酸菌而言，發酵一開始即可檢測到乳酸菌，菌數在第48小時達到最高，之後開始逐漸減少。*Fructobacillus tropaeoli* 是最主要的菌種。發酵的第72小時，可可豆中即可檢測到醋酸菌的存在，並在第120小時數量達到最高量，主要菌株為未知的醋桿菌屬菌株 (*Acetobacter sp.*)。總結來說，可可豆發酵過程的菌相包括初期的酵母菌和乳酸菌，接著中期的醋酸菌，這三種微生物組成了整個微生物的菌相。



(五)參考文獻

陳似蘭，2011。"巧克力原料之研究-從可可莢果到可可粉及可可脂"國立台灣大學碩士論文。

Bortolini, C., Patrone, V., Puglisi, E. and Morelli, L. (2016). Detailed analyses of the bacterial populations in processed cocoa beans of different geographic origin, subject to varied fermentation conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 98-106.

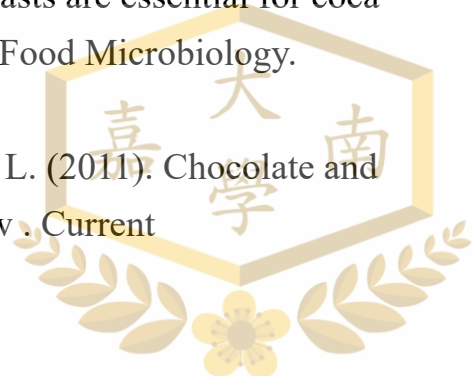
Brito, B. d. N. d. C., Chisté, C. R., Pena, R. d. S., Gloria, M. B. A. and Lopes, S. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484-490.

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.

Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J.; Holmes, S. P., DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, 13 (7), 581-3.
Heiss, C., Keen, C. L., and M. (2010). Flavanols and cardiovascular disease prevention. *European Heart Journal*, 31, 2583-2592.

HO, V.T.T., Zhao, J. and Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*.

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



#

Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Koffi-Ban, L., Berthiot, L., Tachon, A. F., Brou, K., Boulanger, R., and Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 89, 910-917.

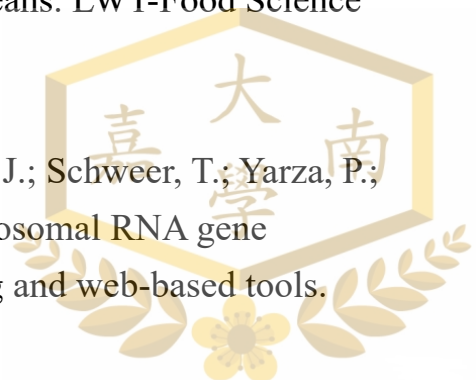
Lopandic, K., Zelger, S., Ba' nszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23, 341–350.

Maura, Y.F., Balzarini, T., Borges, P.C., Evrard, P., Vuyst, L.D. and Daniel. H-M. (2016). The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 34-43.

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.

Perira, G.V.M., Alvarez, J.P., Neto, Dã. Pedro. de. C., Soccol, .T., Tanobe, V.O.A., Rogez, Hervé., Góes-Neto, Aristó and Soccol, C.R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *LWT-Food Science and Technology*, 10, 05-73.

Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glockner, F. O., The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.



#

Nucleic Acids Res. **2013**, *41* (Database issue), D590-6.

Schloss, P. D.; Westcott, S. L.; Ryabin, T.; Hall, J. R.; Hartmann, M.; Hollister, E. B.; Lesniewski, R. A.; Oakley, B. B.; Parks, D. H.; Robinson, C. J.; Sahl, J. W.; Stres, B.; Thallinger, G. G.; Van Horn, D. J.; Weber, C. F., Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (23), 7537-41.

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-Barberán (Eds.) *Teas, cocoa and coffee: Plant secondary metabolites and health* (pp. 193-217). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

Van, T. T. H., Zhao, J. and Fleet, G.(2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 54-67.

#

