

科技部補助專題研究計畫成果報告

期末報告

不同發酵及乾燥方法對台灣產可可豆品質與黃烷醇多酚類成分 變化之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：MOST 107-2637-E-041-001-

執行期間：107年08月01日至108年07月31日

執行單位：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學食品科技系

計畫主持人：林盈君

共同主持人：鍾玉明、王淑珍

計畫參與人員：大專生-兼任助理：周恩光
大專生-兼任助理：林祐世
大專生-兼任助理：林昱甫
大專生-兼任助理：劉宗奇
大專生-兼任助理：吳玟霈
大專生-兼任助理：李興佳
大專生-兼任助理：傅虹瑄

中 華 民 國 108 年 10 月 30 日

中文摘要：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，一半採用旋轉式乾燥機熱風50℃乾燥，另一半採用天然日曬乾燥直到可可豆水分含量降至約6%。以正相HPLC方法分析檢測黃烷醇單體到10聚體的含量，結果顯示前者熱風50℃乾燥可可豆之黃烷醇含量，為 55.91 ± 2.82 mg/g，而日曬乾燥可可豆之黃烷醇含量，為 49.27 ± 2.49 mg/g。接下來，探討可可果實不經發酵而直接乾燥(包括殺菁，熱風乾燥與日曬乾燥)後可可豆之保健指標成分黃烷醇之變化情形，發現可可黃烷醇之含量，以殺菁後乾燥最高達 68.94 ± 2.37 mg/g，熱風乾燥次之為 51.11 ± 1.77 mg/g，日曬乾燥最低為 32.53 ± 1.10 mg/g。但當製成巧克力產品時，未經發酵直接乾燥的可可豆缺乏巧克力的風味，無法被消費者接受。本研究同時分析市售國外可可豆黃烷醇單體到10聚體的含量，其含量範圍在 34.06 ± 1.21 mg到 47.33 ± 1.70 mg/g之間。結果顯示台灣自然落菌發酵經熱風乾燥可可豆的黃烷醇含量顯著的高於國外可可豆($p < 0.05$)。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℃，烘烤時間分別是15，25和35min。結果顯示黃烷醇含量隨著烘烤溫度與時間的增加而減少。從最高 55.30 ± 1.95 mg/g(低溫110℃和15min)緩降至 19.12 ± 0.66 mg/g(高溫150℃和35min)。黃烷醇變化的動力學研究顯示烘烤過程中其含量的變化遵守一級反應，反應速率與溫度的關係遵循阿瑞尼爾士方程式(Arrhenius equation)。得到的參數 k_0 (頻率因子)其值為 19930 min^{-1} 與反應活化能 E_a 為11.2 kcal/mol。根據此方程式可以有效地預測在一般商業化巧克力烘烤製程下，可可豆中黃烷醇的含量。同時將上述9種不同烘烤溫度和時間作用下之可可豆製作成9種70%黑巧克力，並進行消費者型的品評分析，結果顯示130℃25min這組合接受度最高。對於開發具保健功效的巧克力產品提供有用的資訊。本研究亦探討不同發酵方式對台灣產可可豆的品質風味與特定保健指標成分的影響。發酵方式採用傳統的木箱固態發酵(菌株將分別採用自然落菌，強制添加酵母菌、強制添加乳酸菌及強制添加醋酸菌)，結果顯示針對強制添加不同菌種的發酵可可豆其黃烷醇的含量以強制添加乳酸菌之發酵可可豆最低為 43.17 ± 1.73 mg/g，以自然落菌之發酵可可豆最高為 44.38 ± 1.74 mg/g，並沒有顯著差異($p > 0.05$)，利用電子鼻進行氣味分析同時利用主成份分析發現不同菌種發酵的可可豆之風味有明顯不同。

中文關鍵詞：台灣可可豆，發酵，乾燥，正相HPLC，黃烷醇，烘烤，動力學

英文摘要：Cacao beans are rich in polyphenols and flavanols that have numerous positive health benefits especially related to cardiovascular. In this study, the cacao pods were purchased from local farmer at Ping-Tung county in Taiwan. The cacao seeds were fermented in a wooden box for 7 days. Half the fermented beans by oven dried at 50℃ and the other by sun dried for 7 days until the moisture content of cocoa beans reached 6-7%. The content of cocoa flavanol and procyanidin(FP) (Degree of Polymerization 1-10) were determined by normal phase HPLC. The results showed that

the levels of FP in oven dried beans and sun dried beans were 55.91 ± 2.82 mg/g and 49.27 ± 2.49 mg/g, respectively. The effects of different drying methods on the content of FP of Taiwan unfermented cocoa beans were conducted. The results indicated that the beans by blanching drying has the highest content of FP (68.94 ± 2.37 mg/g) and the beans by direct sun dried has the lowest level of FP (32.53 ± 1.10 mg/g). This study also compared the FP content of Taiwan bean with the different country origins. It showed that the FP content of Taiwan bean by oven dried is significantly higher than the other countries in the range of 34.06 ± 1.21 mg/g and 47.33 ± 1.70 mg/g at $p < 0.05$. This study also investigated the influence of the roasting conditions of cocoa beans at different roasting temperatures (110, 130 and 150°C) and roasting time (15, 25 and 35min) on the cocoa bean flavor and quality. The results showed the FP content decreased with the increase of roasting temperature and time, from the highest 55.30 ± 1.95 mg/g at 110°C and 15min slowly declined to the lowest 19.12 ± 0.66 mg/g at 150°C and 35min. The kinetic study showed that the FP change in cocoa bean is according to the first order reaction and the reaction rate constant complied with the Arrhenius equation. The value of frequency factor (k_0) is equal to 19930 min⁻¹ and the activation energy (E_a) is equal to 11.2 kcal/mol. The sensory evaluation for the above 9 chocolate products indicated the bean baking at 130°C and 25min with the highest acceptability by 44 panels. In addition, this study also investigated the effects of inoculated different microorganism strains (the strains includes natural occurring yeast, *Acetobactor aceti*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus plantarum*, respectively) on the cocoa bean flavor and quality. The results showed that the bean fermented by natural occurring microorganisms has the highest levels of FP (44.38 ± 1.74 mg/g) and the bean fermented by inoculated *Lactobacillus plantarum* has the lowest levels of FP (43.17 ± 1.73 mg/g), but they are not significantly different ($p > 0.05$). In addition, according to the flavor analysis by electronic nose and primary component analysis, It showed that there exists a big difference among these cocoa beans fermented by different strains.

英文關鍵詞：Taiwan cocoa bean, fermentation, drying, NP-HPLC, flavanols, roasting, kinetics

不同發酵及乾燥方法對台灣產可可豆品質與黃烷醇多酚類成分變化之影響

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，一半採用旋轉式乾燥機熱風 50 °C 乾燥，另一半採用天然日曬乾燥直到可可豆水分含量降至約 6%。以正相 HPLC 方法分析檢測黃烷醇單體到 10 聚體的含量，結果顯示前者熱風 50 °C 乾燥可可豆之黃烷醇含量，為 55.91 ± 2.82 mg/g，而日曬乾燥可可豆之黃烷醇含量，為 49.27 ± 2.49 mg/g。接下來，探討可可果實不經發酵而直接乾燥(包括殺菁，熱風乾燥與日曬乾燥)後可可豆之保健指標成分黃烷醇之變化情形，發現可可黃烷醇之含量，以殺菁後乾燥最高達 68.94 ± 2.37 mg/g，熱風乾燥次之為 51.11 ± 1.77 mg/g，日曬乾燥最低為 32.53 ± 1.10 mg/g。但當製成巧克力產品時，未經發酵直接乾燥的可可豆缺乏巧克力的風味，無法被消費者接受。本研究同時分析市售國外可可豆黃烷醇單體到 10 聚體的含量，其含量範圍在 34.06 ± 1.21 mg 到 47.33 ± 1.70 mg/g 之間。結果顯示台灣自然落菌發酵經熱風乾燥可可豆的黃烷醇含量顯著的高於國外可可豆($p < 0.05$)。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。結果顯示黃烷醇含量隨著烘烤溫度與時間的增加而減少。從最高 55.30 ± 1.95 mg/g(低溫 110°C 和 15min) 緩降至 19.12 ± 0.66 mg/g (高溫 150°C 和 35min)。黃烷醇變化的動力學研究顯示烘烤過程中其含量的變化遵守一級反應，反應速率與溫度的關係遵循阿瑞尼爾士方程式 (Arrhenius equation)。得到的參數 k_0 (頻率因子)其值為 19930 min^{-1} 與反應活化能 E_a 為 11.2 kcal/mol。根據此方程式可以有效地預測在一般商業化巧克力烘烤製程下，可可豆中黃烷醇的含量。同時將上述 9 種不同烘烤溫度和時間作用下之可可豆製作成 9 種 70% 黑巧克力，並進行消費者型的品評分析，結果顯示 130°C 25min 這組合接受度最高。對於開發具保健功效的巧克力產品提供有用的資訊。本研究亦探討不同發酵方式對台灣產可可豆的品質風味與特定保健指標成分的影響。發酵方式採用傳統的木箱固態發酵(菌株將分別採用自然落菌，強制添加酵母菌、強制添加乳酸菌及強制添加醋酸菌)，結果顯示針對強制添加不同菌種的發酵可可豆其黃烷醇的含量以強制添加乳酸菌之發酵可可豆最低為 43.17 ± 1.73 mg/g，以自然落菌之發酵可可豆最高為 44.38 ± 1.74 mg/g，並沒有顯著差異($p > 0.05$)，利用電子鼻進行氣味分析同時利用主成份分析發現不同菌種發酵的可可豆之風味有明顯不同。

關鍵字：台灣可可豆，發酵，乾燥，正相 HPLC，黃烷醇，烘烤，動力學

Abstract

Cacao beans are rich in polyphenols and flavanols that have numerous positive health benefits especially related to cardiovascular. In this study, the cacao pods were purchased from local farmer at Ping-Tung county in Taiwan. The cacao seeds were fermented in a wooden box for 7 days. Half the fermented beans by oven dried at 50°C and the other by sun dried for 7 days until the moisture content of cocoa beans reached 6-7%. The content of cocoa flavanol and procyanidin(FP) (Degree of Polymerization 1-10) were determined by normal phase HPLC. The results showed that the levels of FP in oven dried beans and sun dried beans were 55.91 ± 2.82 mg/g and 49.27 ± 2.49 mg/g, respectively. The effects of different drying methods on the content of FP of Taiwan unfermented cocoa beans were conducted. The results indicated that the beans by blanching drying has the highest content of FP(68.94 ± 2.37 mg/g) and the beans by direct sun dried has the lowest level of FP(32.53 ± 1.10 mg/g). This study also compared the FP content of Taiwan bean with the different country origins. It showed that the FP(content of Taiwan bean by oven dried is significantly higher than the other countries in the range of 34.06 ± 1.21 mg/g and 47.33 ± 1.70 mg/g at $p < 0.05$. This study also investigated the influence of the roasting conditions of cocoa beans at different roasting temperatures (110, 130 and 150°C) and roasting time (15, 25 and 35min) on the cocoa bean flavor and quality. The results showed the FP content decreased with the increase of roasting temperature and time, from the highest 55.30 ± 1.95 mg/g at 110°C and 15min slowly declined to the lowest 19.12 ± 0.66 mg/g at 150°C and 35min. The kinetic study showed that the FP change in cocoa bean is according to the first order reaction and the reaction rate constant complied with the Arrhenius equation. The value of frequency factor (k_0) is equal to 19930 min^{-1} and the activation energy (E_a) is equal to 11.2 kcal/mol. The sensory evaluation for the above 9 chocolate products indicated the bean baking at 130°C and 25min with the highest acceptability by 44 panels. In addition, this study also investigated the effects of inoculated different microorganism strains (the strains includes natural occurring yeast, *Acetobactor aceti*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus plantarum*, respectively) on the cocoa bean flavor and quality. The results showed that the bean fermented by natural occurring microorganisms has the highest levels of FP (44.38 ± 1.74 mg/g) and the bean fermented by inoculated *Lactobacillus plantarum* has the lowest levels of FP(43.17 ± 1.73 mg/g), but they are not significantly different ($p > 0.05$). In addition, according to the flavor analysis by electronic nose and primary component analysis, It showed that there exists a big difference among these cocoa beans fermented by different strains.

Keywords: Taiwan cocoa bean, fermentation, drying, NP-HPLC, flavanols, roasting, kinetics

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; Pereira 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)。目前國內屏東科技大學謝寶全教授(徐，2016)，從屏東陳姓農民可可發酵過程中進行酵母菌、乳酸菌、醋酸菌等菌株的篩選。並探討篩選出的酵母菌、乳酸菌、醋酸菌等菌株對台灣產可可豆發酵後，巧克力品質的影響，然該篇論文目前尚未公開，無法得知其實際研究成果。屏東的可可果農因產量少，多以一般傳統自然落菌方式居多，且利用家用機具進行烘焙或自然曬乾，缺乏發酵的專業技術與適當的控制乾燥設備，品質風味相對也較不穩定，且缺乏專業分析設備更無法檢測可可豆或巧克力中特定保健成分如多酚、黃烷醇的含量。因此本研究主要目的包括：

1. 探討不同乾燥方法對台灣產可可豆的品質風味與特定保健指標成分黃烷醇的影響。
2. 探討乾燥後的可可豆，在不同的烘烤條件溫度分別是 110，130 和 150℃，烘烤的時間分別為 15，25 與 35 分，對可可豆之風味品質與多酚等特定保健成分之變化情形，特別是黃烷醇含量變化的反應動力學。
3. 探討添加不同菌種發酵對台灣產可可豆的品質風味與特定保健指標成分黃烷醇的影響。

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。接著進行發酵實驗或直接乾燥。

2.2 可可種子的發酵實驗

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℃。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。接下來將利用篩選出具備良好風味且品評試驗結果較佳的酵母菌、乳酸菌及醋酸菌進行強制接種。同一大小的木箱將執行強制接種純化後單一酵母菌；再另一同大小的木箱將執行強制接種乳酸菌及另一同大小的木箱將執行強制接種醋酸菌。發酵後的可可豆一半採用旋轉式乾燥機熱風 50℃ 乾燥，另一半採用天然日曬乾燥直到可可豆水分含量降至約 6%，冷卻後儲存於冰箱冷藏備用。

2.3 可可豆不經發酵直接乾燥

成熟可可種子 10 公斤未經發酵直接乾燥(包括殺菁後熱風 50℃ 乾燥，直接熱風 50℃ 乾燥，直接日曬乾燥)將其水份含量降至約 6%，冷卻後儲存於冰箱冷藏備用。

2.4 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，還有可可豆的多酚黃烷醇亦會同時產生變化。通常烘烤的溫度介於 100℃ 到 150℃ 之間，每次時間約 10-120 分鐘。本研究將利用數位烘豆機來烘烤不同發酵方式所生產的可可豆，將選用 3 種溫度分別是 110℃，130℃ 及 150℃。烘烤的時間分別為 15，25 與 35 分。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，取出樣本後置於室溫，冷卻後儲存於冰箱冷藏以利進一步分析。

2.5 天然發酵可可豆中酵母菌、乳酸菌及醋酸菌之分離與鑑定

2.5.1 培養基

1. 乳酸菌培養基: MRS 及 MRSA 培養基(Hi-medium, India)

2. 醋酸菌培養基: Mannitol Agar (MA): Yeast extract 5 g、Peptone 3 g、Mannitol 25 g、Agar 15 g、Distilled water 1 litter) ; Mannitol Broth (MB: Yeast extract 5 g、Peptone 3 g、Mannitol 25 g、Distilled water 1 litter)

3. 酵母菌培養基: YMB, YMA (含 1.5% agar)

yeast extract (酵母抽出物) 1%，砂糖 20%，Soy peptone (蛋白胨) 1%

2.5.2 藥品

1. DNA 純化套組: Tissue and Cell Genomic DNA Purification Kit 購自 GeneMark

(Georgia, USA)

2. PCR 套組: ExScl High Fidelity DNA Polymerase、dNTP 皆購自 Bertec (Taipei, Taiwan)

3. 100 bp DNA Ladder 購自 Bertec (Taipei, Taiwan)

4. 5 × Tris-borate-EDTA (TBE) buffer:

將 tris base 54 g (Amresco)、boric acid 27.5 g (Ajax Chemicals)、0.5 M EDTA (pH8.0) 20 ml (Fluka), 加入 Distilled water 至 1 liter。

5. 1.8% Agarose gel:

將 agarose 1.8 g (Serva) 加入 1 × TBE buffer 至 100 ml。

6. 6× Loading buffer:

30% (W/V) Glycerol、0.25% (W/V) bromophenol blue、0.25% (W/V) xylene cyanol 加 Distilled water 至 100 ml。

7. SYBR 螢光染劑

8. PCR 引子

菌種	引子 名稱	5'→3'	Primer 長度	長度 (bp)
醋酸菌 16SrDNA	16Sd	GCTGGCGGCATGCTTAACACAT	22	1458
	16Sr	GGAGGTGATCCAGCCGCAGGT	21	
Yeast 26S rRNA	ITS3P	GCATCGATGAAGAACGCAGC	20	1000
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	19	
乳酸菌 16SrDNA	27F	AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG	20	1450
	1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	19	

PCR 引子: 16Sd/16Sr (Ruiz et al., 2000); ITS3P/NL4 (Lopandic et al., 2006); 27F/1492R (Tanner et al., 2000)

2.5.3 乳酸菌分離

取 10g 發酵可可豆至 MRS 中增殖培養。進行系列稀釋, 選用 2~3 個適合的稀釋度, 塗抹於 MRSA 含 0.2%CaCO₃ 培養基, 每個稀釋度作 2 個重複。將培養皿倒置於 35~37℃ 恒溫箱內培養 24~48 h, 觀察長出的細小菌落, 將長出具有透明圈之單一菌落, 進行畫線培養, 卻認為單一菌落。分別挑選單一菌落細胞接種到 MRS 液體培養基, 37~40℃ 恒溫箱內培養 24~48h。取 1 ml 菌液與 1 ml 甘油進行菌株保存, 並保存在 -80℃ 冷凍櫃中。

2.5.4 醋酸菌分離

取 10g 發酵可可豆 至 Mannitol Broth (MB) 中增殖培養, 再將增殖後之菌液取 100 µl 至塗抹在 Mannitol agar (MA) plate 上進行篩選。將分離出來的單一菌落, 培養在 Mannitol Broth (MB) 中進行增殖, 待增殖後, 取 1 ml 菌液與 1 ml 甘油進行菌株保存, 並保存在 -80℃ 冷凍櫃中。

2.5.5 酵母菌分離

先將發酵可可樣品與 peptone water 混勻，用無菌移液管吸取樣品 10 mL 加入盛有 90 mL 無菌水的三角瓶中，充分振搖，務必使樣品均勻分散，即為 10^{-1} 的樣品稀釋液，然後根據對樣品含菌量的估計，將樣品稀釋至適當的稀釋度。選用 2~3 個適合的稀釋度，塗抹於 PDA 含抗生素培養基，每個稀釋度作 2 個重複。將培養皿倒置於 25~30°C 恒溫箱內培養 3-5 天，觀察長出的菌落，將長出具有透明圈之單一菌落，進行畫線培養，卻認為單一菌落。分別挑選單一菌落細胞接種到 PDB 液體培養基，恒溫箱內培養。取 1 mL 菌液與 1 mL 甘油進行菌株保存，並保存在 -80°C 冷凍櫃中。

2.5.6 DNA 抽取

使用 Tissue and Cell Genomic DNA Purification Kit，首先取 200 μ l 菌液離心 (8000 rpm) 5 分鐘，加入 4 μ l 的 lysozyme (最終濃度 2 mg / ml) 在 37°C 保溫 30 分鐘，加入 200 μ l 的 Extraction Solution 及 20 μ l 的 proteinase K (最終濃度 1 mg / ml)，上下搖晃混合均勻，於 56°C 作用直到完整的細胞溶解 (在培養期間偶而震盪混合) 之後，加入 200 μ l 的 Binding Solution 進行反應，上下搖晃混合後，於 70°C 作用 10 min，再加入 200 μ l 的 Ethanol，上下搖晃，徹底的混合，將溶液充填入含有 collection tube 的 spin column，12000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄 flow-through，用 300 μ l 的 Binding Buffer 洗滌，12000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄 flow-through，使用 700 μ l 的 Wash Solution 洗滌兩次，12000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄 flow-through，使用最高速離心 3 分鐘去移除 ethanol，將 column 放置於新的離心管中，再將 spin column 於 60°C 5-10 分鐘使 ethanol 揮發，最後加入預熱 60-70°C 150 μ l 的 Elution Solution，靜置 1-2 分鐘，再離心 1 分鐘來洗提 DNA，將所製備之 DNA 置於 -20°C 冷凍櫃中備用。

2.5.7 PCR 增幅反應：

將所萃取的疑似 AAB 分離株及標準菌株之 DNA 進行 16S Rdna 及 alcohol dehydrogenase (ADH) 的 DNA 增幅反應。取 DNA 5 μ l 當模板，加入 2.5 mM dNTP 2.5 μ l、10 $\times$ PCR buffer 5 μ l、primer 1、primer 2 (30 pmole / μ l) 1.6 μ l 及 5 U 的 ExSel High Fidelity DNA Polymerase 0.04 μ l，補充無菌水至總量為 50 μ l，進行 PCR 反應。反應條件開始以 94°C 5 分鐘以及 94°C 40 sec 分鐘、黏合溫度依引子不同而不同進行 50 sec 分鐘、72°C 40 sec 分鐘進行 35 個循環，最後以 72°C 維持 10 分鐘，再進入 4°C 無限延長。PCR 引子組分別為 16Sd / 16Sr (醋酸菌)、27F / 1492R (乳酸菌) 及 ITS3P / NL4 (酵母菌) 進行增幅反應。將 PCR 產物以 1.8% agarose gel 於 1 $\times$ TBE buffer 中進行電泳分離，置於 UV Box 下觀察。

2.5.8 PCR 產物進行 DNA 定序：

將上述所得之 PCR 產物，送成功大學基因體中心進行定序工作。將序列結果，與 NCBI 之核酸序列資料庫中已發表的核酸序列進行比對。

2.6 巧克力的製造與品評

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℃，然後降溫至 27℃，再升溫至 32℃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)。儲存於密封的鋁箔袋內存放在溫度 18℃溼度 55%的點心櫃熟成 7 天後才進行品評測試。44 位未經訓練的品評員將針對巧克力的顏色、風味及整體接受度進行喜愛度評分。

2.7 可可粉機能性成分總原花青素之萃取

本研究將利用不同溶劑，包括甲醇、乙醇、異丙醇、乙酸乙酯、丙酮和正己烷來萃取市售可可粉總原花青素，以期區分並濃縮可可粉機能性成分總原花青素。

2.8 總原花青素(Proanthocyanidins, PACs)含量測定

(1)總原花青素之萃取：

取 0.2 g 經前處理之可可粉(CP)加入 20 mL 90% 甲醇置於 50 mL 離心管中，室溫下超音波振盪萃取 1 小時，離心後將上清液定容至 25 mL，即為可可粉之原花青素萃取液。

(2)標準曲線製作：

配置濃度分別為 0.01、0.025、0.05、0.1、0.15、0.20 mg/mL 的 Procyanidin B₁ 甲醇溶液。

分別取 1 mL 各濃度的 Procyanidin B₁ 甲醇溶液及可可粉之原花青素萃取液，置于具螺旋蓋試管中，然後分別加入 6 mL 正丁醇/鹽酸溶液(95/5, v/v) 和 0.5 mL 2% 硫酸鐵銨溶液，充分混勻後置沸水浴回流加熱 40 min 後，立即置于冰水中冷卻。於 546 nm 波長下用 10 mm 比色皿于分光光度計測定吸光度 A。以 ddH₂O 為空白對照，做一濃度樣品加標回收，每濃度處理 3 次重複。

根據各 Procyanidin B₁ 溶液的濃度和與之對應的吸光值 A，製作標準曲線。

(3)樣品檢測

將 1 mL 的 Procyanidin B₁ 工作液更換為待測液體，檢測。

2.10 黃烷醇及原花青素 Flavanol and proanthocyanidin (Degree of Polymerization 1-10)之測定

(1) 檢液之製備

參考 Counet 與 Collin (2003) 的方法並加以修飾。取 0.2-0.5 g 去脂可可粉，以 50 mL 之丙酮/水/醋酸(70:28:2, v/v) 萃取劑於室溫下超音波振盪萃取 1 小時，離心分離上清液與沉澱物，沉澱物再以 50 mL 之萃取溶劑在室溫下超音波振盪進行第二次萃取，離心去除沉澱物，將兩次萃取液合併、過濾、並定容至 100 mL，即為黃烷醇及原花青素粗萃液。

(2) 正相 HPLC 分析

取適量之黃烷醇及原花青素粗萃液經 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(Rebecca J. Robbins, et al., 2012.)：

- Column : Develosil Diol 100 Å 5 μm, 250 × 4.6 mm (Phenomenex , Torrance, CA; Cat. No. DI11546250W) or equivalent.
- Detection wavelength: UV280nm
- Mobile phase:

(A) CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/Acetic acid(82:14:2:2, v/v)

(B) MeOH/H₂O/Acetic acid(96:2:2, v/v)

- Flow rate:1 mL/min
- Mobile phase gradient：如表 1

表 1. 黃烷醇及原花青素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
52	50	50
55	100	0
60	100	0

2.10 統計分析

本研究將使用免費統計軟體“R”進行單因子變異數分析(One-way ANOVA)和 t 檢定來探討樣本平均值是否有顯著差異，針對各品質特性、多酚黃烷醇及品評試驗其顯著水準(α)皆為 0.05。

三、結果與討論

(一)本研究從天然發酵可可豆中分離出酵母菌及乳酸菌，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。結果如表 2 所示。

表 2、可可豆發酵分離菌株之 26S rDNA, 16S rDNA 核酸區域相似度百分比

Isolates	Identified strains	Genebank acc. no.	Sequence similarity (%)
Y01	<i>Cacdia tropicalis</i>	EU543687	100
Y02	<i>Saccharomyces Spp.</i>	DQ900942	100
L01	<i>Lactobacillus plantarum</i>	EF088327	99

(二)本研究以不同溶劑，包括甲醇、乙醇、異丙醇、乙酸乙酯、丙酮和正己烷來萃取市售可可粉總原花青素，實驗結果如表 3 所示。其中以 70%丙酮效果最佳，且收率達 34%以上。

表3. 不同溶劑對市售可可粉中總原花青素萃取效果

Extraction effect of total proanthocyanidins (PAC) in commercially available cocoa powder by different solvents

Solvent	Total proanthocyanidins, PACs (mg/g)	Recovery (%)
Methanol	43.09	15.39
95%Ethanol	47.05	18.75
Isopropanol	75.38	20.47
Ethyl acetate	82.80	13.59
100%Acetone	118.29	10.85
70%Acetone	219.11	34.11
n-Hexane	23.71	9.86

(三) 不同國家產地可可豆黃烷醇單體到 10 聚體的含量探討

不同國家產地可可豆(包括 Taiwan, Venezuela, Peru, Nicaragua 和 Ecuador)以正相 HPLC 方法分析檢測黃烷醇單體到 10 聚體的含量，圖 1 顯示黃烷醇及原花青素(聚合度 DP1-10)之正相 HPLC 分析圖譜。黃烷醇分析結果如表 4 所示。顯示熱風 50 °C 乾燥可可豆之黃烷醇含量，為 55.91 ± 2.82 mg/g，而日曬乾燥可可豆之黃烷醇含量，為 49.27 ± 2.49 mg/g。同時分析市售國外可可豆黃烷醇單體到 10 聚體的含量，其含量範圍在 34.06 ± 1.21 mg 到 47.33 ± 1.70 mg/g 之間。而詳細黃烷醇及原花青素(聚合度 DP1-10)之分布情形如圖 2 所示。結果顯示台灣自然落菌發酵經熱風乾燥可可豆的黃烷醇含量顯著的高於國外可可豆($p < 0.05$)。可能原因是台灣產可可豆比較新鮮導致黃烷醇含量較高，或者是台灣的氣候環境土壤等地理條件所影響。

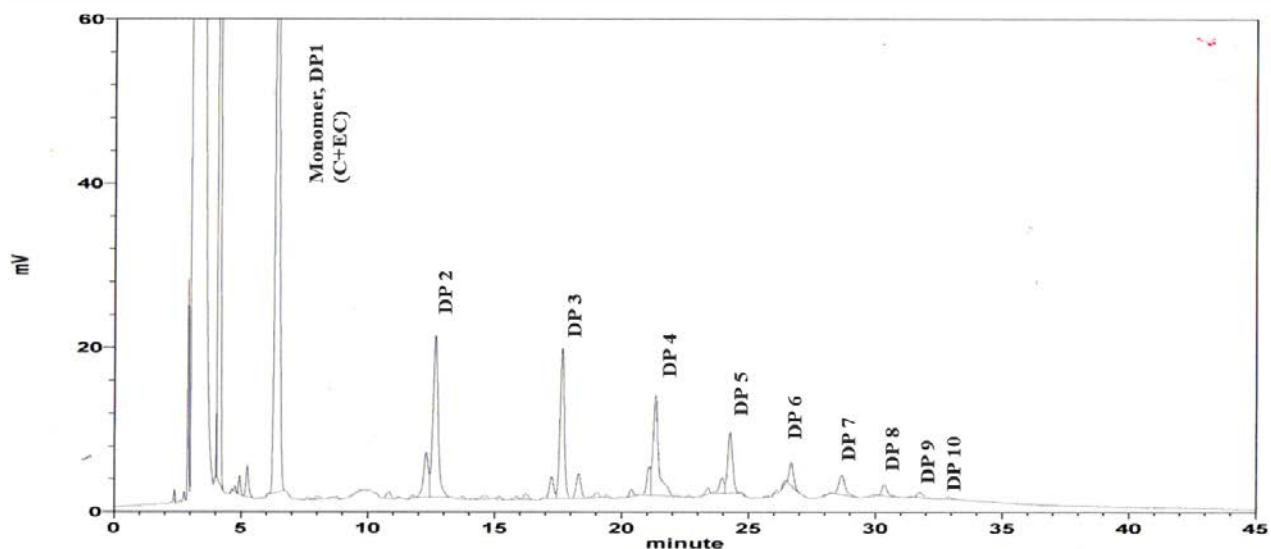


圖 1、可可黃烷醇萃取物的黃烷醇及原花青素(聚合度 DP1-10)之正相 HPLC 分析圖譜。

表 4. Flavanol and proanthocyanidin content in cocoa beans from different sources

Sample	Results (mg/g)
Taiwan oven-dried	55.91±2.82 ^a
Taiwan sun-dried	49.27±2.49 ^b
Venezuela	47.33±1.70 ^{bc}
Peru	46.74±1.63 ^c
Nicaragua	37.94±1.31 ^d
Ecuador	34.06±1.21 ^e

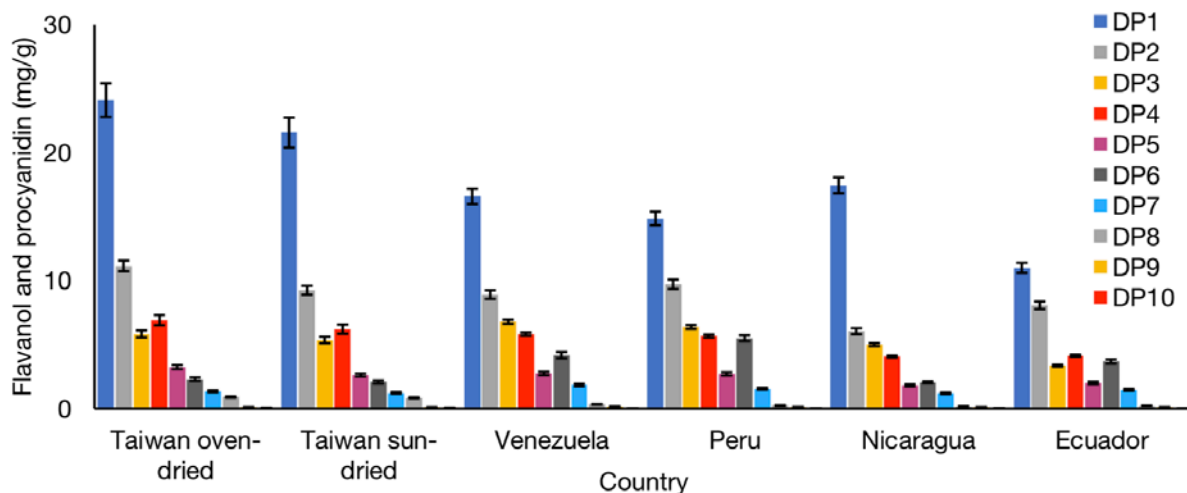


Fig. 2. The detailed (DP1-DP10) flavanol and procyanidin content of cocoa bean from different country sources

(四) 不同乾燥方式對可可豆黃烷醇單體到 10 聚體的含量影響

可可果實不經發酵而直接乾燥(包括殺菁，熱風乾燥與日曬乾燥)後可可豆之黃烷醇單體到 10 聚體之變化情形如表 5 所示，發現可可黃烷醇之含量，以殺菁後熱風乾燥最高達 68.94±2.37 mg/g，熱風乾燥次之為 51.11±1.77 mg/g，日曬乾燥最低為 32.53±1.10 mg/g。究其原因可能是在殺菁過程中多酚氧化酵素已被破壞而減緩了黃烷醇單體到 10 聚體的裂解，保留了較多的抗氧化物質，但當製成巧克力產品時，未經發酵直接乾燥的可可豆缺乏巧克力的風味，無法被消費者接受。如何在巧克力的美味與保健功效取得平衡成為一重要之議題。

表 5. Flavanol and proanthocyanidin content in Taiwan cocoa beans by different drying treatments

Sample	Results (mg/g)
Blanching and unfermented cocoa bean by oven-dried	68.94±2.37 ^a
Fermented cocoa bean by oven-dried	55.91±2.82 ^b
Fermented cocoa bean by sun-dried	49.27±2.49 ^c
Unfermented cocoa bean by oven-dried	51.11±1.77 ^c
Unfermented cocoa bean by sun-dried	32.53±1.10 ^d

(五) 不同烘烤條件對可可豆黃烷醇單體到 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，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。結果(表 6)顯示黃烷醇及其具體(DP1-DP10)含量隨著烘烤溫度與時間的增加而減少。從最高 55.30±1.95mg/g(低溫 110°C 和 15min) 緩降至 9.12±0.66mg/g (高溫 150°C 和 35min)。圖 3 是利用統計迴歸分析得到的反應曲面圖及迴歸方程式，利用此方程式可以預測在此烘烤條件內的黃烷醇與原花青素的濃度，成為生產具保健功效巧克力的重要參考依據。

表 6. Effects of different baking temperature treatments on the content of cocoa flavanol and procyanidin (Degree of Polymerization 1-10)

Cocoa bean (Temp°C -min)	Results (mg/g)										
	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DP9	DP10	Total
Control	24.09 ±1.31	11.15 ±0.42	5.83± 0.27	6.91± 0.40	3.24± 0.16	2.30± 0.13	1.35± 0.07	0.90± 0.05	0.12± 0.01	0.05± 0.00	55.91± 2.82
110-15	20.53 ±0.73	9.36± 0.35	7.08± 0.17	6.48± 0.13	5.13± 0.24	2.94± 0.12	1.64± 0.08	1.07± 0.05	0.64± 0.04	0.45± 0.02	55.30± 1.95
110-25	19.28 ±0.69	9.30± 0.35	6.15± 0.15	6.08± 0.12	2.53± 0.12	1.91± 0.08	1.33± 0.07	0.89± 0.04	0.52± 0.04	0.13± 0.01	48.09± 1.65
110-35	20.71 ±0.74	8.90± 0.34	5.74± 0.13	1.85± 0.04	2.09± 0.10	1.50± 0.06	1.04± 0.06	0.72± 0.03	0.38± 0.03	0.14± 0.01	43.05± 1.53
130-15	20.93 ±0.74	10.12 ±0.38	6.09± 0.15	4.91± 0.10	1.71± 0.08	1.06± 0.04	0.69± 0.04	0.48± 0.01	0.22± 0.01	0.07± 0.01	46.27± 1.57
130-25	18.77 ±0.66	9.26± 0.35	4.96± 0.12	6.15± 0.12	2.33± 0.11	2.59± 0.11	0.72± 0.04	0.45± 0.02	0.42± 0.03	0.16± 0.01	45.77± 1.57
130-35	14.52 ±0.52	6.26± 0.24	3.18± 0.08	1.92± 0.04	0.44± 0.03	0.24± 0.01	0.20± 0.01	0.04± 0.00	0.02± 0.00	0.02± 0.00	26.81± 0.91
150-15	17.80 ±0.63	7.40± 0.28	2.96± 0.08	1.76± 0.04	0.39± 0.01	0.17± 0.00	0.18± 0.01	0.03± 0.00	0.01± 0.00	0.00± 0.00	30.68± 1.05
150-25	14.53 ±0.52	5.18± 0.20	2.35± 0.06	1.01± 0.02	0.28± 0.01	0.14± 0.00	0.01± 0.00	0.03± 0.00	0.00± 0.00	0.00± 0.00	23.51± 0.81
150-35	12.15 ±0.43	3.76± 0.14	1.88± 0.04	0.99± 0.02	0.21± 0.01	0.09± 0.01	0.02± 0.00	0.03± 0.00	0.00± 0.00	0.00± 0.00	19.12± 0.66

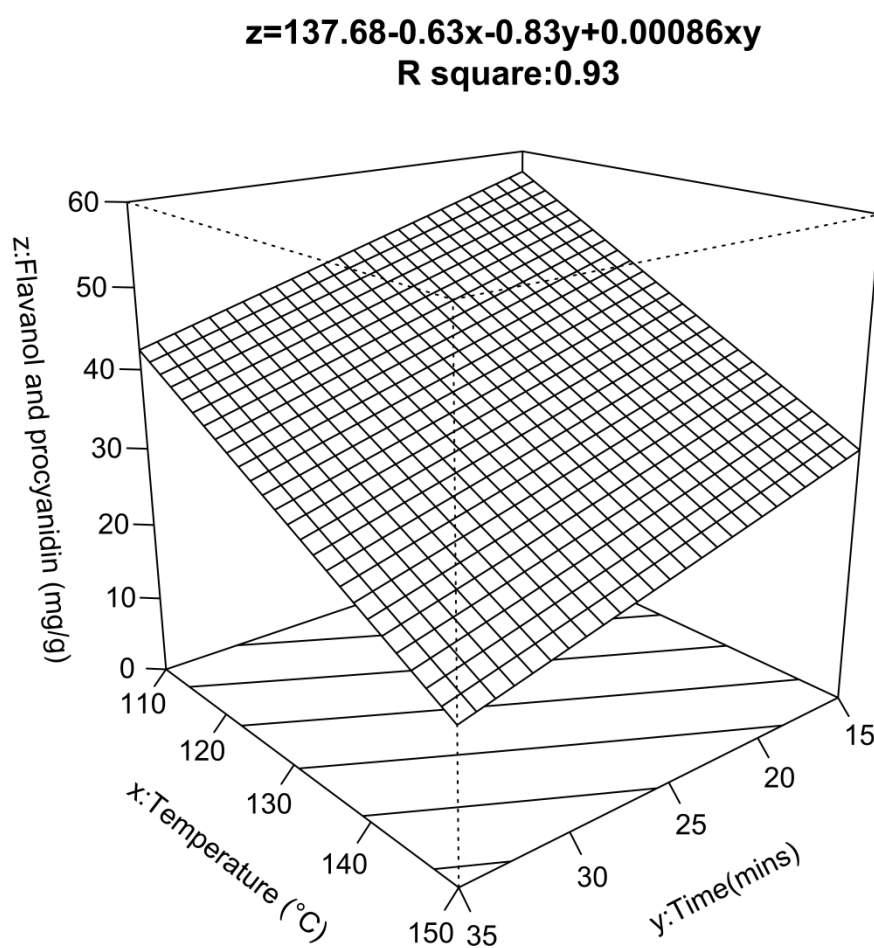


圖 3. 黃烷醇及其聚體隨烘烤溫度與時間變化之關係圖

(六) 可可豆黃烷醇含量變化之動力學研究

反應動力學應用到食品科技上是最近十幾年的事，對於可可豆黃烷醇在烘烤過程中濃度的改變，可利用一次反應方程式來表示：

$$\frac{-dc}{dt} = kC$$

其中 C=黃烷醇之濃度

t=時間

k=一次反應的速率常數

將上述方程式積分可以得到下式

$$\ln \frac{C_0}{C} = kt$$

其中 C_0 = 在時間等於零時黃烷醇濃度的大小

C=在經過一段時間 t 之後黃烷醇濃度的大小

在固定的溫度下，利用 $\ln \frac{C_0}{C}$ 對時間 (t) 作圖，可以得到一條直線，其斜率就代表該溫度下反應速率。而溫度與反應速率常數(k)之間的關係通常可以用 Arrhenius 方程式來表示：

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

其中 E_a =活化能，

k_0 =頻率因子，

R=氣體常數 $\frac{2cal}{mol.k}$ ，

T=絕對溫度 (K)。

當反應速率常數取對數($\ln k$)對溫度($\frac{1}{T}$)做圖，如圖 4 所示，圖的斜率為 $-\frac{E_a}{R}$ 。所得到的線性迴歸方程

式 $\ln k = 9.9 - 5636(\frac{1}{T})$ ， R^2 為 0.98。 $\ln(k_0) = 9.9$ ， $k_0 = 19930 min^{-1}$ ； $slope = -\frac{E_a}{R} = -5636$ ，

$E_a = 11.2(\frac{kcal}{mol})$ 。因此，可可豆黃烷醇在烘烤過程中變化的動力學研究顯示其含量的變化遵守一級

反應，反應速率與溫度的關係遵循阿瑞尼爾士方程式 (Arrhenius equation)。得到的參數 k_0 (頻率因子) 其值為 $19930 min^{-1}$ 與反應活化能 E_a 為 $11.2 kcal/mol$ 。根據此方程式可以有效地預測在一般商業化巧克力烘烤製程溫度下，計算其反應速率常數(k)，同時利用一級反應方程式，可以計算出可可豆中黃烷醇含量隨烘烤時間的變化情形。

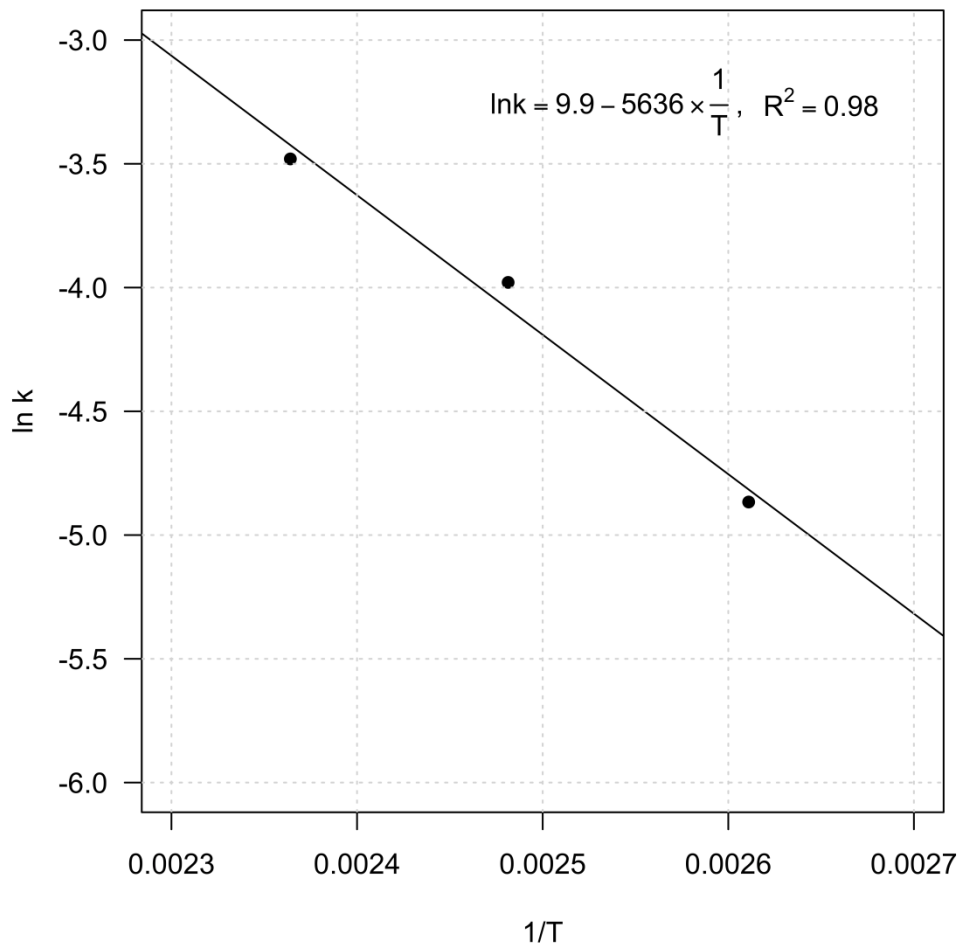


圖 4. 反應速率與溫度之關係圖

(七)巧克力品評分析

感官品評是以科學方法藉著人類的五種感覺:味覺、嗅覺、聽覺、視覺、觸覺，以測定食品特色或調查人類對食品的嗜好。本次官能品評的測試共有 44 個品評員，9 種台灣巧克力樣品，測試外觀、香氣、風味、甜度、酸度、苦味、澀味、整體接受度，評分以 9 分為最高分，1 分為最低分數。所得到的評分結果如表 7 所示，感官品評整體接受度分析以 130 °C 烘烤 25 min 所製成的巧克力的評價最高，110°C、15min 和 25min 與 150°C、25min 和 35min 所製成的巧克力的評價較差，適度的烘培產生的梅納反應會增加香味減少澀味，可增加消費者接受性。但過度烘培(150°C)可能產生苦味，影響消費者接受性。對於開發具保健功效的巧克力產品時宜適度的調控烘烤條件來確保消費者接受性。

表 7. The organoleptic assessment (point) of chocolates under different roasting conditions

Roasting conditions		Organoleptic properties							
Time(min)	temperature (°C)	Appearance	Aroma	Chocolate Flavor	Sweetness	Acidity	bitterness	Astringency	Acceptability
15	110	5.81 ^a	4.63 ^{abc}	4.74 ^{abc}	3.98 ^{ab}	4.53 ^a	5.12 ^{abc}	5.26 ^{abc}	4.02 ^{bcde}
	130	6.07 ^a	5.35 ^{abc}	5.14 ^{ab}	4.40 ^a	3.88 ^a	4.56 ^{bc}	4.74 ^{bc}	4.74 ^{abc}
	150	5.65 ^a	5.67 ^a	4.95 ^{abc}	4.44 ^a	5.02 ^a	4.67 ^{bc}	4.67 ^{bc}	4.26 ^{bcd}
25	110	6.14 ^a	4.84 ^{abc}	4.67 ^{abc}	3.86 ^{ab}	4.42 ^a	5.26 ^{abc}	5.30 ^{abc}	3.86 ^{cde}
	130	6.05 ^a	5.51 ^{ab}	5.60 ^a	4.72 ^a	4.37 ^a	4.07 ^c	4.2 ^{6c}	5.67 ^a
	150	6.26 ^a	5.07 ^{ab c}	4.35 ^{abc}	3.60 ^{abc}	4.47 ^a	4.79 ^{abc}	4.98 ^{bc}	3.72 ^{cde}
35	110	5.63 ^a	4.88 ^{abc}	4.91 ^{abc}	4.09 ^{ab}	4.84 ^a	5.00 ^{abc}	5.26 ^{abc}	4.37 ^{bcd}
	130	6.14 ^a	5.23 ^{abc}	5.49 ^a	4.58 ^a	4.88 ^a	4.02 ^c	4.86 ^{bc}	5.16 ^{ab}
	150	5.85 ^a	4.40 ^{abc}	3.91 ^{bc}	3.58 ^{abc}	4.19 ^a	4.86 ^{abc}	4.19 ^c	3.67 ^{cde}

Note : Values are means of 44 sensory panels.

Means followed by the same letter in a column are not significantly different ($p < 0.05$) .

(八) 添加不同菌種發酵對台灣產可可豆的品質風味與黃烷醇的影響

發酵方式採用傳統的木箱固態發酵(菌株將分別採用自然落菌，強制添加酵母菌、強制添加乳酸菌及強制添加醋酸菌)，結果(表 8)顯示針對強制添加不同菌種的發酵可可豆其黃烷醇的含量以強制添加乳酸菌之發酵可可豆最低為 $43.17 \pm 1.73 \text{ mg/g}$ ，以自然落菌之發酵可可豆最高為 $44.38 \pm 1.74 \text{ mg/g}$ ，經由統計平均值檢定並沒有顯著差異($p > 0.05$)。但不論添加何種菌種發酵的國內可可豆其黃烷醇的含量均顯著的高於國外 Nicaragua 產的可可豆($p < 0.05$)。

表 8. Effects of different strains fermenting Taiwan cocoa beans on the content of flavanols and procyanidin

Chocolate products	Results (mg/g)
Acetobactor aceti inoculated	44.29 ± 1.23^a
Natural occurring microorganisms	44.38 ± 1.74^a
Saccharomyces cerevisiae inoculated	43.98 ± 1.58^a
Lactobacillus plantarum inoculated	43.17 ± 1.73^a
Nicaragua cocoa bean	36.28 ± 1.51^b

不同發酵方式的可可豆利用電子鼻進行氣味分析，將所得到的成分利用主成份分析方法發現不同菌種發酵的可可豆之風味有明顯不同，如圖 5 所示。但至於是那些成分或其濃度所造成的差異則須進一步的研究與確認。

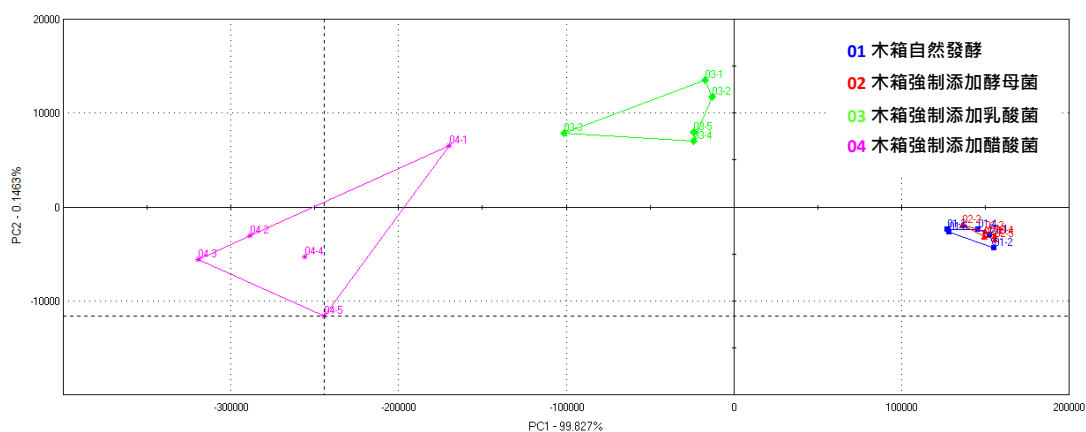


圖 5 不同菌種發酵的可可豆其風味變化的主成分分析

四、參考文獻：

徐均宜，2016。"可可豆控制發酵之探討"國立屏東科技大學碩士論文。

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.

Counet,C.,&Collin,S.(2003).Effect of number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,51,6816-6822.

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

H0, V.T.T., Zhao,J. and Fleet, G.(2014).Yeasts are essential for coca 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.

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 Microbiolgy*, 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.

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.

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.

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.

107年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林盈君					計畫編號：107-2637-E-041-001-					
計畫名稱：不同發酵及乾燥方法對台灣產可可豆品質與黃烷醇多酚類成分變化之影響										
成果項目					量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)			
國內	學術性論文	期刊論文			0	篇				
		研討會論文			3		1篇發表於2019 International Conference on Hospitality, Tourism, and Leisure: Impact of Artificial Intelligence and Educational Adjustment (2019 ICHTL)篇名 Antioxidant Activity and Cytoprotective Effect of Taiwan Cacao Pod Husk and Cocoa Bean Shell Extracts 2篇發表於2019年食科年會			
		專書			0		本			
		專書論文			0	章				
		技術報告			0	篇				
		其他			0	篇				
		智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件			
	已獲得				0					
	新型/設計專利			0						
	商標權			0						
	營業秘密			0						
	積體電路電路布局權			0						
	著作權			0						
	品種權			0						
	其他			0						
	技術移轉		件數			0		件		
		收入			0	千元				
	國外	學術性論文	期刊論文			0	篇			
			研討會論文			0				
專書			0	本						
專書論文			0	章						
技術報告			0	篇						
其他			0	篇						
智慧財產權及成果			專利權	發明專利	申請中	0	件			
		已獲得			0					

			新型/設計專利	0		
		商標權		0		
		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生		7	人次	本計畫共有7位大學生參與。他們學到可可豆發酵技術篩菌。也學會了巧克力的製作技術，同時也學到可可多酚的分析技術。
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士級研究人員		0		
		專任人員		0		
	非本國籍	大專生		0		
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士級研究人員		0		
		專任人員		0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)						

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以100字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文：☐ 已發表 ☐ 未發表之文稿 ☒ 撰寫中 ☐ 無

專利：☐ 已獲得 ☐ 申請中 ☒ 無

技轉：☐ 已技轉 ☐ 洽談中 ☒ 無

其他：（以200字為限）

將發表於2019食科年會題目為"台灣可可豆在不同烘烤條件下黃烷醇變化之動力學研究"。與"烘烤條件對台灣巧克力的抗氧化性及品質特性之效應"共2篇

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

本研究成果可以有效地預測在一般商業化巧克力烘烤製程下，可可豆中黃烷醇的含量，對於開發具保健功效的巧克力產品提供有用的資訊。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：☒ 否 ☐ 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現：☐ 否 ☐ 是

說明：（以150字為限）