

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

巧克力原料之研究

—從可可莢果到可可粉及可可脂

Studies on the Preparation of Raw Materials for Chocolate
Making – from Cacao Pod to Cocoa Powder and Butter

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central design with a scale of justice and a book, symbolizing research and education. The outer ring contains the university's name in Chinese characters: '國立臺灣大學' at the top and '勵學圖強' at the bottom.

陳似蘭

Szu-Lan Chen

指導教授：蘇南維 博士

Advisor: Nan-Wei Su, Ph.D.

中華民國 100 年 1 月

January, 2011

謝 誌

經歷將近三年與可可為伍的日子後，我終於完成自己的第一本著作。回顧這約莫一千個日子，心中感慨油然而生，因為我所邁出的每一個步伐，都是踏在名為「幫助」的基石之上。

喜歡品嚐巧克力，卻從未想過會以其為主題進行相關研究，若非蘇南維教授牽起這條線，並在許多時刻點起明燈，給予我指引和啟發，我可能至今還不曉得巧克力的奧秘。蘇教授不僅在研究上惠予指導，更在過程中帶領懵懂的我培養獨立思考的能力與生活的哲學，感謝之情難以言喻。

本論文的撰寫，承蒙臺灣大學農化系鍾仁賜系主任、李敏雄名譽教授、中華穀物研究所副所長施坤河與宏亞股份有限公司林冠宇副總經理在百忙之中撥冗審閱，不吝賜予指導，使其更臻完備，我銘記於心、由衷感謝。

可可材料珍貴，感謝屏東的邱先生與劉先生願意提供相關研究材料；而中量可可豆實驗室處理不易，感謝富味鄉食品有限公司大方惠予協助。研究期間需使用諸多儀器，感謝臺灣大學農化系賴喜美教授、農藝系張孟基老師、生物產業機電工程系盧福明教授、大同大學生物工程系林銘澤副教授與李綉鈴教授、熱心提供儀器設備之使用，使本研究得以順利完成。當研究遇到瓶頸時，感謝顏文俊老師撥冗指點迷津。進行巧克力製作期間，更是再次感激施坤河副所長以及屏東李氏夫婦不吝給予協助，也感謝農化系顏瑞泓教授以高明的拍攝手法紀錄相關進展。

許多時刻，如果沒有食化實驗室的同伴作伙，我不可能完成研究與論文。謝謝瑛哥、培益、佑生、彥志、方董、小葡萄在我初進這個環境時，給予我溫暖和歡樂；實驗室大家共同的媽—劉王春花阿姨，總是打理許多我們搞不清楚的事（笑）；網球公主馬力圭和網拍公主派大星總讓實驗生活熱鬧不已；偉如、曉雯、丁丁、名俞、昱圻、宛琳、玠錡、雅俐、好硬、姿元、小強、于淨、尚翰、秀霞，使我延畢生活不虞枯燥匱乏；農化系同學們，在去年畢業季節給予我偌大的鼓勵。

而三年多來，騰旭學長是有問必有答的「TIMI 百科」，也是活生生的創意王，

但對於磨練我們卻仍不失嚴肅，決策的時刻都以成熟、穩重的氣度帶領我們，但我知道唱歌跳舞喜感第一名絕對是你！感謝騰旭學長給我良好的典範。這三年多的期間，還有一個人陪我一起哭、一起笑、一起成長，那就是小 QQ。沒有你就沒有今天的我，沒有我就沒有今天的你（咦？），雖然有時我知道你皮很癢，但我知道若沒有你，我就沒有如此豐富的研究所生活了，所以我還是知恩相惜地忍住不打你 XD。

另外，我的好友們，愛菲、羅、藍國熊、低能瑋、Troy、霹靂點點、佩霓、伍笨弟、乃，我知道沒有你們，我一定卡在半路上。還有特別感謝王阿 no 常駐程式讓我不致把 CPU 耗盡，並適時替我補充高能量（熱量= =）。最後也謝謝我的家人在一旁支持我。

我想，回顧研究期間，我真的取之於人群太多，謝謝每個人的支持與陪伴，每一句話都是我走向畢業的動力，感謝再感謝，我一定會一直記得這一切。



陳似蘭 謹誌

國立臺灣大學農業化學系

中華民國一百年一月

摘要

本論文研究以可可 (*Theobroma cacao* L.) 的加工為主軸，探討新鮮可可豆之發酵條件、發酵可可豆中特定化學成分之定量，與可可脂的結晶性質。研究分為三個部分，分述如下：

一、可可豆小量發酵最適條件之探討：以產自台灣的新鮮可可豆進行小量發酵，固定溫度、濕度及翻攪頻率，探討發酵期間需氧量與發酵品質之關係。分為好氣發酵(aerobic fermentation)與兼性厭氣發酵(facultative-anaerobic fermentation)兩種方式進行。結果兼性厭氣發酵之可可豆氣味、色澤等品質均較好氣發酵之可可豆良好，因此，兼性厭氣發酵被認為是小量發酵適合的方式，並確定厭氣程度對可可豆發酵有重要的影響。

二、台灣可可與外國可可的成分、化性之比較：產自台灣屏東的發酵可可豆以及農民提供之現成可可脂 (CB) 與可可粉 (CP)，和購自越南與馬來西亞的發酵可可豆商品，經榨油與研磨取得之 CB 與 CP，三個不同產地之加工原料 (CB、CP) 和副產物可可豆殼 (CS) 分別進行油脂性質及組成分析及機能性成分分析。台灣 CB 之酸價與過氧化價略高，但仍在可接受之範圍；脂肪酸與三酸甘油酯 (TAG) 之組成整體而言，無明顯差異，惟台灣 CB 的不飽和脂肪酸及雙不飽和 TAG 略高。CP 中可可鹼含量：馬來西亞 > 越南 > 台灣，在 CS 中則有相反的趨勢。CP 中咖啡因含量無顯著差異，在 CS 中：越南 > 馬來西亞 > 台灣，但含量都很低。CP 中總多酚含量：越南 > 馬來西亞 > 台灣，CS 中總多酚含量均偏低 (< 8 GAE g/kg)。台灣 CP 中，生物可利用率較高的原花青素 ($n \leq 3$) 比例是三產地中最高。

三、可可脂調溫條件與油脂結晶變化之關係：利用 DSC (differential scanning calorimetry) 以台灣可可脂為樣品進行不同調溫程序與油脂結晶型態變化之分析。確定調溫確實為促進 CB 生成 β 晶型之有效方式；調溫之維持溫度、降溫速率以及

升降溫次數都對 β 型結晶的生成有所影響。調溫之維持溫度可隨升降溫次數微調，剛開始結晶溫度以 22°C 為佳；降溫速率不可過快或過慢，以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 較合適；調溫之升降溫次數越多， β 型結晶之比例越高。

關鍵字：可可、可可豆、可可粉、可可脂、發酵、調溫



Abstract

This work is studied on cocoa (*Theobroma cacao* L.) processing, including the fermentation processes of fresh cacao beans, chemical quantitation of some selected components of cacao beans, and crystallization behavior of cocoa butter. The context of this thesis is composed of three parts described as followed.

1. The study of the optimal conditions of small-scale fermentation of cacao beans.

Fresh cacao beans from Taiwan were used. Based on the same condition of temperature, humidity, and stirring frequency, the aim was to explore the relation between the demand of O₂ and the fermentation quality of cacao. This experiment was processed in 2 methods, aerobic fermentation and facultative-anaerobic fermentation. The result showed that cacao beans proceed through the facultative-anaerobic fermentation produced better quality product. The fragrance, color and quality of processed cacao beans were better than the ones through anaerobic fermentation. Therefore facultative- anaerobic fermentation is better for small-scale fermentation process. This experiment confirmed that the anaerobic level is critical to the state of cacao fermentation.

2. The comparison of components and chemical properties between cocoa from

Taiwan and foreign countries. Raw materials from three different countries were investigated, the fermented cocoa bean from Pingtung, Taiwan and cocoa butter (CB) and cocoa powder (CP) provided by its local farmer; and the fermented cocoa products purchased from Vietnam and Malaysia and its CB and CP obtained by pressing and grinding processes. Using food industrial materials (CB and CP) and its by-product, cacao shells (CS), to analyze properties and compositions of fat and functional component in CP or CS. The acid value and peroxide value of CB from Taiwan was slightly higher, which was in an

acceptable level. Among three resources, there was no apparent difference in composition of fatty acid and triacylglycerol. The theobromine contents in CP are showed as follows: Malaysia > Vietnam > Taiwan; however in CS showed opposite. The caffeine content in CP had no obvious discrepancy among all. For CS, the result was Vietnam > Malaysia > Taiwan, with low content. The total polyphenol content in CP: Vietnam > Malaysia > Taiwan; it was low in CS of all three. The CP from Taiwan contained the highest procyanidins ($n \leq 3$) which were considered higher bioavailability.

3. The relation between tempering of condition and crystallization behavior of cocoa butter. Based on the sample of CB from Taiwan, this experiment used DSC (differential scanning calorimetry) to accomplish different tempering procedures, as well as exploring how these affect CB crystallization behavior. It confirmed that tempering is an effective method to improve β polymorph formation in CB. The temperature maintenance, temperature cooling rate and the times of temperature changing cycles during tempering, all of which can affect β polymorph formation. The temperature maintenance could be slightly raised with temperature changing cycles. The best crystallization temperature at the beginning was 22°C. The temperature cooling rate should not be either too fast or too slow, and the appropriate rate was 1°C/min. The more times of temperature changing cycles was processed, the more β polymorph formed.

Key words: *Theobroma cacao* L., cacao bean, cocoa powder, cocoa butter, fermentation, tempering

目 錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XII
第一章、前言.....	1
第二章、文獻回顧.....	2
第一節、巧克力原料—可可.....	2
一、發展歷史與產地.....	2
二、植株特徵.....	4
三、果肉、子葉與種皮之一般成分.....	6
四、可可脂.....	7
(一) 油脂結晶與同質多晶性.....	8
(二) 可可脂之化學組成與性質.....	10
(三) 可可脂之物理性質.....	13
(四) 可可脂之應用.....	18
(五) 可可脂與可可豆殼脂之比較.....	18
五、可可中的機能性成分.....	20
(一) 生物鹼.....	20
(二) 多酚.....	22
第二節、可可的加工.....	28
一、由莢果到巧克力工業原料之過程.....	28
(一) 發酵與乾燥.....	29
(二) 焙烤.....	32

(三) 可可碎粒加工.....	33
(四) 鹼處理.....	34
二、巧克力產品製作之流程.....	35
(一) 配方.....	35
(二) 混合與精煉.....	38
(三) 調溫.....	39
第三章、材料與方法	42
第一節、試驗大綱.....	42
第二節、試驗材料.....	43
第三節、試驗儀器.....	45
第四節、試驗方法.....	46
一、可可豆小量發酵最適條件之探討.....	46
(一) 新鮮可可豆前處理.....	46
(二) 可可豆小量發酵.....	46
1. 好氣發酵.....	47
2. 兼性厭氣發酵.....	47
(三) 乾燥.....	47
二、台灣可可與外國可可的成分、化性之比較.....	49
(一) 可可脂之化學性質.....	49
1. 油脂基本性質.....	49
2. 可可脂淨化.....	51
3. 脂肪酸組成.....	51
4. 三酸甘油酯組成.....	52
(二) 可可粉之機能性成分分析.....	53
1. 可可粉前處理.....	53

2. 生物鹼含量.....	53
3. 總多酚含量.....	54
4. 原花青素組成.....	55
(三) 可可豆殼之機能性成分分析.....	56
三、可可脂調溫條件與油脂結晶變化之關係.....	58
第四章、結果與討論.....	59
第一節、小量發酵條件之探討.....	59
一、發酵過程之比較.....	59
二、發酵可可豆之比較.....	62
第二節、台灣可可與外國可可之比較.....	62
一、可可脂化學性質之比較.....	62
(一) 油脂基本性質.....	62
(二) 脂肪酸組成.....	66
(三) 三酸甘油酯組成.....	70
二、可可粉中機能性成分之比較.....	74
(一) 生物鹼含量.....	74
(二) 總多酚含量.....	77
(三) 原花青素組成.....	79
三、可可豆殼中機能性成分之比較.....	83
(一) 生物鹼含量.....	83
(二) 總多酚含量.....	85
第三節、可可脂調溫條件與結晶變化之關係.....	87
一、建立 β 型結晶形成之溫度模式.....	87
二、降溫速率對 β 型結晶之影響.....	91
三、維持溫度對 β 型結晶之影響.....	95

四、調溫次數對 β 型結晶之影響.....	98
五、調溫與否對可可脂之影響.....	98
第五章、結論.....	102
第六章、參考文獻.....	104



圖目錄

圖 2-1 可可產地分佈於赤道南北緯 15 度間之區域.....	5
圖 2-2 (a) 三酸甘油酯分子結構	9
圖 2-2 (b) TAG的三種典型結晶型態	9
圖 2-3 (a) 以三硬脂酸甘油酯為例，比較 α 、 β' 與 β 晶型之示意圖	9
圖 2-3 (b) 三酸甘油酯分子於結晶中的排列方式	9
圖 2-4 理想可可脂之固體脂含量曲線圖.....	14
圖 2-5 可可脂晶型轉變與相變化之示意圖.....	17
圖 2-6 (a) SOS分子結構式	17
圖 2-6 (b) SOS三種晶型之結構模擬圖	17
圖 2-7 (a) 黃嘌呤分子結構	20
圖 2-7 (b) 三種常見的黃嘌呤類化合物	20
圖 2-8 類黃酮基本結構.....	22
圖 2-9 (a) 兒茶素與表兒茶素	24
圖 2-9 (b) 原花青素單體間基本鍵結方式	24
圖 2-10 可可漿、可可脂與可可粉之生產流程概觀.....	28
圖 2-11 發酵期間可可豆堆中心之溫度曲線.....	30
圖 2-12 巧克力製作流程.....	30
圖 2-13 (a) 五滾輪式研磨機結構簡圖	38
圖 2-13 (b) 最早的 conching 機器簡圖	38
圖 2-14 牛奶巧克力調溫程序與油脂結晶變化	40
圖 3-1 好氣發酵與兼性厭氣發酵之條件	46
圖 3-2 (a)(b) 可可莢果中的新鮮可可豆	48
圖 3-2 (c)(d) 可可豆小量好氣發酵	48
圖 3-2 (e)(f) 可可豆小量兼性厭氣發酵	48

圖 3-3 原花青素萃取液製備之流程圖	57
圖 4-1 (a) 取出可可豆的莢果內側	61
圖 4-1 (b) 新鮮果肉黏稠	61
圖 4-1 (c) 果肉轉變為果泥質地	61
圖 4-1 (d) 果肉出現細微凸起之氣泡	61
圖 4-1 (e) 發芽可可豆之子葉內部	61
圖 4-1 (f) 兼性厭氣發酵過程中，部分可可豆滲出紫紅色.....	61
圖 4-2 (a) 好氣發酵之可可豆	63
圖 4-2 (b) 兼性厭氣發酵之可可豆	63
圖 4-3 台灣可可脂 (CB _T) 之脂肪酸分析層析圖譜.....	68
圖 4-4 馬來西亞可可脂 (CB _M) 之脂肪酸分析層析圖譜	72
圖 4-5 台灣可可粉 (CP _T) 之生物鹼分析層析圖譜.....	75
圖 4-6 (a) 台灣、越南及馬來西亞可可粉之可可鹼含量	76
圖 4-6 (b) 台灣、越南及馬來西亞可可粉之咖啡因含量	76
圖 4-7 (a) 總多酚含量之標準檢量線	78
圖 4-7 (b) 台灣、越南及馬來西亞可可粉之總多酚含量	78
圖 4-8 可可粉原花青素分析層析圖譜	81
圖 4-9 原花青素在台灣、越南及馬來西亞可可粉中之相對含量	82
圖 4-10 (a) 台灣、越南及馬來西亞可可豆殼之可可鹼含量	84
圖 4-10 (b) 台灣、越南及馬來西亞可可豆殼之咖啡因含量	84
圖 4-11 台灣、越南及馬來西亞可可豆殼之總多酚含量	86
圖 4-12 參考巧克力調溫過程，未出現β型結晶	88
圖 4-13 修飾後的程序可產生β結晶	90
圖 4-14 以 0.3°C/min 之速率緩慢降溫，未有明顯之結晶型態	92
圖 4-15 以 0.3°C/min 之降溫速率進行 tempering	93

圖 4-16 以 1°C/min 之降溫速率進行 tempering	94
圖 4-17 修改 β 結晶溫度為 22°C	96
圖 4-18 (a) 以 28°C/24°C 之維持溫度進行四次調溫	97
圖 4-18 (b) 四次調溫，最後一次維持溫度改以 29°C/25°C	97
圖 4-19 (a) 經過三次升降溫程序	100
圖 4-19 (b) 經過四次升降溫程序，可提高 β 型結晶之比例	100
圖 4-20 未調溫之結晶以 β' 結晶為主	101



表目錄

表 2-1 可可豆主要產地 2006 至 2008 年間產量	3
表 2-2 象牙海岸、奈及利亞與馬來西亞可可果肉之一般成分	7
表 2-3 可可豆碎粒與可可豆殼之一般成分	7
表 2-4 來自不同國家可可脂之脂肪酸組成	11
表 2-5 來自不同國家可可脂之三酸甘油酯組成	12
表 2-6 可可脂結晶型態分類與各晶型之熔點範圍與 XRD 分析之 short spacings .	15
表 2-7 可可豆殼脂之脂肪酸組成	19
表 2-8 可可脂與豆殼脂的物理及化學性質	19
表 2-9 可可中鑑定出之多酚	25
表 2-10 美國巧克力產品配方與名稱之定義	36
表 2-11 歐洲巧克力產品配方與名稱之定義	37
表 3-1 脂肪酸分析之溫度變化程序	52
表 3-2 TAG 分析之移動相流洗梯度	52
表 3-3 原花青素分析之移動相流洗梯度	56
表 4-1 好氣發酵與兼性厭氣發酵可可豆之比較	63
表 4-2 台灣、越南及馬來西亞可可脂之油脂基本性質	65
表 4-3 台灣、越南及馬來西亞可可脂之三酸甘油酯組成	73
表 4-4 台灣、越南及馬來西亞可可脂之脂肪酸組成	73
表 4-5 可可脂中 TAG 的理論碳數 (TCN)	73

第一章、前言

巧克力是全世界受到最多人迷戀的食物之一，尤其獨特的香氣與滑順的口感，是其他食物無可取代的原因。巧克力之所以能擁有如此獨特的風味與質地，來自於其原料，可可 (*Theobroma cacao* L.) 之種子—可可豆本身富有的特質。可可豆中有一半的油脂，即可可脂，因天然性質特殊、氣味迷人，且原料取得不易，因此，價值較其他食用油脂更高。另一部分為可可固形物，研磨成可可粉後，其與可可脂同為食品工業原料。從可可豆至可可脂與可可粉中間須經過一段原料加工的過程，發酵、乾燥、焙烤、榨油和研磨等，生產至可可脂與可可粉才具有直接的經濟價值。因此，可可別於其他農作物，新鮮可可莢果 (pods) 亦非市場上流通的生料，而在產地採收並進行發酵乾燥後的發酵可可豆，才是流通的原料商品。近年來，巧克力的需求持續成長，但可可豆產量卻有下降趨勢，供不應求的情形使其價格節節攀升。

可可樹生長於濕熱的環境，且喜好遮蔭，台灣屏東縣具有得天獨厚的氣候、土壤、以及檳榔樹提供遮蔭的優勢，倘將可可樹間作於檳榔樹之間，能夠滿足其對環境的需求，因而屏東被認為有發展可可樹栽種的潛力，並以此作為檳榔園轉型之契機，具有促進社會健康之效益。但在台灣並未有大量種植可可樹的經驗，更遑論可可豆採收後的加工與原料生產，而後段處理卻是可可作物經濟價值之所在。有鑑於此，了解可可從採收莢果，到生產發酵可可豆，乃至可可脂與可可粉等食品工業原料等過程，以及其成分和油脂性質，成為推廣其種植必備的基石。

為提昇對可可豆發酵程序的了解，本研究以小量發酵的方式探討可可豆發酵的條件；另購買越南及馬來西亞的發酵後可可豆，分析其油脂組成與機能性成分，並與台灣發酵後可可豆比較，以期提供未來相關加工產業作為參考依據；基於可可脂性質特殊，對於巧克力產品具有舉足輕重的重要性，本研究模擬不同的巧克力調溫程序，探討調溫因素與可可脂結晶性質之關係，盼能深入了解巧克力製作的關鍵技術。

第二章、文獻回顧

第一節、巧克力原料—可可

一、發展歷史與產地

可可 (*Theobroma cacao* L.) 的發源地並無文獻切確記載，但學者根據其幹生花的植物特性研判最可能原生於中南美洲的亞馬孫河 (Amazon River) 以及奧利諾科河 (Orinoco River) 流域的雨林，且很可能是經由遊牧部落而傳佈至美洲其他地區 (Chatt, 1953)。關於可可作物的栽種及食用，最早的紀錄是出現在西元前 250-900 年，中美洲馬雅 (Mayas) 文化，雖然許多文字並無完整保留，但仍有證據指出馬雅人已將可可作為一種神聖的食物，並崇拜相關的神祇 (McNeil et al., 2006)。馬雅文化沒落後，十二、三世紀墨西哥地區的阿茲提克民族 (Aztecs) 受馬雅文化影響，流傳與可可相關的神話 (Bergmann, 1969; Knapp, 1923)。Prescott 研究說明阿茲提克文明的農事技術成熟，可可即為其重要作物之一；1502 年哥倫布在航行期間曾接觸過可可豆的貿易船隻，並取得些許可可豆帶回西班牙，此為可可與歐洲的初次接觸，也證明可可可在當時已屬於有貿易行為的農產。阿茲提克皇帝 Montezuma 喜愛將可可豆曬乾研磨後添加配料沖泡成的飲料 *chocolatl*，1519 年西班牙人佔領阿茲提克城，接收並改良配方，可可也逐漸傳入歐洲各國 (Prescott, 1834)。十七世紀，英、法、德國等都有與可可相關的記載，歐洲人對巧克力的興趣亦水漲船高，此時主要生產於西印度區域的可可供不應求，歐洲開始將可可樹的種植擴展至殖民地，十七世紀時，可可樹傳至非洲國家，由於合適的氣候條件，到二十世紀已超越南美洲成為全球主要生產地；十九世紀中也於亞洲的斯里蘭卡等地栽植成功 (FAO, 2003; Chatt, 1953)。

根據聯合國農業及糧食組織 (FAO, Food and Agriculture Organization) 與國際可可組織 (ICCO, International Cocoa Organization) 統計，2008 年可可豆年產量已屆三百五十萬公噸，而其中西非地區的產量就佔全球的 70%，近年來亞洲

產量則有崛起之勢。截至 2009 年統計，以象牙海岸為全球可可豆最大生產國，其年產量約佔全球產量的 35-40%，其次則依序為迦納、印尼、奈及利亞（表 2-1）（ICCO, 2009; FAO, 2003）。觀察主要生產國家不難發現，除了氣候等自然條件外，人工低廉更是許多歐美國家投資於此處的主因。但去年產量開始銳減，除了低開發國家的童工問題以及勞工所得不符合公平交易之爭議以外，還有病蟲害雪上加霜，可可豆之產量與價格問題漸漸浮上檯面。

表 2-1. 可可豆主要產地 2006 至 2008 年間產量

Table 2-1. Major world production of cacao beans during 2006 to 2008

	Production of cacao beans			
	2006-2007		2007-2008	
	(10 ⁶ kg)	% of total yield	(10 ⁶ kg)	% of total yield
Africa	2688	72.00	2484	70.70
Cameroon	185	4.96	210	5.97
Ivory Coast	1382	37.04	1222	34.77
Ghana	729	19.54	662	18.83
Nigeria	220	5.90	240	6.83
Others	171	4.58	150	4.27
America	452	12.10	456	13.00
Brazil	171	4.58	157	4.47
Ecuador	111	2.98	112	3.19
Others	171	4.58	187	5.32
Asia & Oceania	591	15.80	575	16.30
Indonesia	485	13.00	475	13.51
Papua New Guinea	52	1.39	52	1.48
Others	54	1.45	48	1.37
World total	3731	100.00	3515	100.00

(ICCO, 2009)

二、植株特徵

可可為梧桐樹科 (*Sterculiaceae*) 常綠喬木，學名 *Theobroma cacao*，其中「*Theobroma*」源自於拉丁文「神的食物」之意，可可相關食品受人喜愛的程度由此可見一斑。生長 5-7 年才為成熟的可可樹，高度約 4-8 公尺，一般壽命為 50 年。其葉片寬闊，具有厚度，幹生花為白色或粉紅色，聚繖狀花序成簇直接開於枝幹上。每棵樹平均年產 20-30 個果實，稱為莢果 (pod)，呈紡錘狀，長約 20-30 公分，外殼厚實且具溝紋，溝紋形式與外殼顏色因品系不同而有差異。莢果每年可採收兩次，產量在第 25 年左右達到高峰，接著逐年下降失去經濟價值。每個莢果內含有 25-50 個以白色具果香味的果肉包覆之種子，即為俗稱的可可豆 (cacao bean)。

可可樹適於熱帶、高濕度環境生長，最適溫度為 26.6°C，理想相對濕度為 100%，不耐乾旱，且其栽培土壤必須排水及通氣良好，主要分佈於赤道南北緯 15 度間之熱帶林區 (圖 2-1) (Bhattacharjee and Kumar, 2007; Reed, 1976)。儘管可可為熱帶植物，全日照之下卻生長不佳，屬需要遮蔭的植物，且其對風之耐受性較弱，因此，常與其他植物如芭蕉、椰子等樹一起栽種，既可防風又可增加遮蔭。

經過長時間栽培，不同產地所採收的可可莢果出現不同的特徵，最初被 Morris 分為兩個族群，並取名為 Criollo 及 Forastero，前者為「原生 (native)」之意，後者則為「外來 (foreign)」之意。1964 年，Cuatrecasas 將此兩個族群認定為同種的兩亞種，並分別命名為 *T. cacao* subsp. *cacao* 與 *T. cacao* subsp. *sphaerocarpum*。其後，此二亞種雜交產生的最主要亞種被命名作 Trinitario。此三亞種即為一般所知的三種品系，然而，實際上可可與許多熱帶植物一樣，有自交不親合 (self-incompatibility) 的特性以防止自花受粉，易於雜交，故進一步細分品系成為一件艱難的任務，近年則有許多學者致力於利用分析基因圖譜細分可可之品系 (Bhattacharjee and Kumar, 2007)。



(Reed, 1976)

圖 2-1. 可可產地分佈於赤道南北緯 15 度間之區域

Fig. 2-1. Cocoa production is mainly between 15 degrees north and south of the equator.

最原始的品系 Criollo 主產於中南美地區，莢果呈綠色、溝紋略深，其可可豆發酵時間較短，因具有層次豐富的風味及香氣而被認為是品質最佳的一支，但同時也是最嬌弱易受病害的品系，全球產量相當低，品質與產量皆反映在高昂的價格之上，高價位產品中會混合少量 Criollo 加以提味。Forastero 亦屬栽種歷史悠久的品系，主產於南美洲與西非地區，莢果多為淺綠色、表面較光滑，其風味和香氣單純、略帶酸味，繁殖力優良且適應力佳，為目前可可豆產量之大宗，因而價格屬三者中最低，一般相關產品常以其作為基底。由 Criollo 與 Forastero 雜交而生的 Trinitario 特徵較無一致性，不同族群呈現出的莢果外表及可可豆的風味都略有差異，但平均來說風味比 Forastero 更佳，卻仍保有 Forastero 易栽種、易繁殖的特性，價格則比 Criollo 低，因此，常被混合於產品中增加風味 (Bhattacharjee and Kumar, 2007)。

三、果肉、子葉與種皮之一般成分

新鮮的可可豆自成熟的莢果中取出時，表面帶有一層濕潤黏稠的白色果肉（pulp），此時可可豆內部（即子葉的部分）呈紫色。倘若再經後續的發酵及乾燥，子葉則轉變為深褐色且質地硬脆，此時可輕易地將種皮與子葉分離，而壓碎的子葉會進一步加工成製作巧克力的原料（詳見第二節）。

可可果肉除了含有大量水份外，主要的組成為醣類，約佔鮮重的 12%，而果膠與纖維素分別約佔乾重的 5%，不僅造成其黏稠的質地，更提供微生物生長所需的營養源。因此，果肉在發酵過程中扮演不可或缺的角色。另外，根據 Pettipher（1986）的研究顯示不同地區可可果肉組成成分並無明顯差異（表 2-2）。可可果肉是可可豆發酵的重要原料，一般而言，並無大量生產成加工製品，不過在產地確實有少量應用於食品，如果肉榨汁、直接冷凍作為類似冰淇淋的食品，或是將果汁釀酒；又由於內含果膠，亦有製成果醬、抹醬等製品販售。

發酵、乾燥的可可豆，經脫殼與壓碎後取得子葉碎粒（cocoa nibs）。可可 nibs 是巧克力的靈魂原料，其一般成分列於表 2-3，值得一提的是 nibs 中含有約 54% 的油脂，含油量相當高，且特殊的組成與性質使之身價高於其他植物油脂，後續將詳加介紹。

發酵乾燥後的可可豆表面已無果肉，露出薄脆的種皮，被稱為可可豆殼（cacao shell, CS），約佔乾燥可可豆的 1.5%，屬於可可加工之副產物。可可豆殼之一般成分如表 2-3，其中亦含有 6.8-11% 的油脂，但最主要的成分為纖維，表中纖維含量差異甚大是分析方式不同的結果。另外，也有許多研究指出豆殼為良好的抗氧化物來源，維生素 D 含量達 28 IU/g (Arlorio et al., 2005; Knapp and Coward, 1935)。可可豆殼一般的用途是做為肥料及飼料，近年來亦有學者針對其纖維進行研究，指出其所含之纖維多屬膳食纖維，具有應用於食品添加物的潛力 (Aregheore, 2002; Borchers et al., 2000; Martín-Cabrejas et al., 1994; Valiente et al., 1994)。

表 2-2. 象牙海岸、奈及利亞與馬來西亞可可果肉之一般成分

Table 2-2. General composition of Ivorian, Nigerian and Malaysian cocoa pulp

Component	Ivory Coast	Nigeria	Malaysian
	(g/100 g fresh pulp)		
Water	82.60	82.50	85.90
Mono- and disaccharides	11.15	13.05	11.06
Protein	0.74	0.64	0.65
Fat	0.45	0.75	0.35
Metals	0.24	0.22	ND
Vitamins	0.05	0.05	ND

ND: not determined.

(Pettipher, 1986)

表 2-3. 可可豆碎粒與可可豆殼之一般成分 (%乾重)

Table 2-3. General composition of cocoa nibs and shells (% dry base)

Component	Cocoa nibs ^a	Cacao shells ^b
Fat	54.6 ± 1.4	6.8-11.0
Protein	10.6 ± 0.1	13.8-18.1
Fiber	17.8 ± 0.7	31.7-60.6
Ash	3.0 ± 0.1	9.0-8.1
Water	2.4 ± 0.1	9.0-10.1

^a Valiente (1994).

^b Arlorio (2005); Aregheore (2002).

四、可可脂

可可脂 (cocoa butter, CB) 來自於可可子葉，是巧克力產品的主原料。由於特殊的化學組成與物理特性，使其於常溫下呈現固態，是植物油脂中少見的例子。在巧克力中，可可脂同時提供了咬下時應聲而斷的清脆感以及入口即化的滑順感，遂成為價格不菲的食品原料。以下先介紹油脂結晶特性，再針對可可脂的組成與性質詳加說明，並與可可豆殼脂加以比較。

(一) 油脂結晶與同質多晶性

當物質從液態變為固態的過程中，分子會以不同的方式有序地排列，這樣的微觀結構即為結晶。結晶可以分成數個步驟，首先最重要的是供給足夠的能量以作為驅動力，才能進行成核 (nucleation) 的過程，即小單位逐漸聚集並發展成晶格，隨後才能以這些初始晶格為晶核作長晶 (crystal growth) 的依據。相同分子可能因堆疊方式不同有不同的結晶型態，故稱為「同質多晶性 (polymorphism, 又稱同質多相性)」。根據熱力學以及 Ostwald step rule 預測，在自然的情況下結晶變化過程有以下之趨勢：同質多晶體會由最不穩定的晶型開始形成，再一步步轉變為較穩定的型態，且此為不可逆之轉變。

油脂中最主要的分子為三酸甘油酯 (triacylglycerol, TAG) (圖 2-2(a))，故 TAG 分子扮演油脂結晶的要角，又由於 TAG 的脂肪酸基多帶有較長的碳鏈，易於有不同堆疊方式而表現出同質多晶性的特徵。TAG 屬於 monotropic 系統，在同一溫度壓力下僅有一種相對最穩定的型態，結晶變化為單向。

一般而言，TAG 有三種典型的晶型，稱為 α 、 β' 、 β 型 (參考圖 2-2(b))，圖中的分子片段是脂肪酸烴鏈的最小重複單位 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)，利用此片段堆積方式的不同以表達三種晶型 (Larsson, 1966)。其中， α 型為正六方堆積，而烴鏈片段在其中隨機排列，無固定位向，自由度最大，穩定性最低； β' 型之晶胞頂點四個烴鏈片段與中心烴鏈片段呈正交堆疊，規律性較 α 型高，穩定性亦較 α 型佳，但其烴鏈片段並非位於同一平面上； β 型為三斜晶型，烴鏈片段位向一致且排列更密實，故穩定性為三者中最高。以三硬脂酸甘油酯 (tristearin, SSS) 為例，其三種結晶如圖 2-3(a) 所示， α 型的脂肪酸基為隨機排列，以直線表示，實際上並非堆疊於同一平面上； β' 型之脂肪酸基有部分並未排列在同一平面上； β 型的烴鏈片段皆呈現同一位向，且所有脂肪酸基皆在同一平面上。

TAG 在晶格中多呈現椅式，當 TAG 具三個相同或類似脂肪酸基則容易以兩倍碳鏈長 (double chain length) 的形式排列；反之，若三個脂肪酸基中有性質差異較大者，如飽和與不飽和脂肪酸，則性質相近的碳鏈會聚集而呈現三倍碳鏈

長 (triple chain length) 排列 (圖 2-3(b)) (Goto et al., 1992)。

結晶型態的判斷，一般常使用示差掃描量熱儀 (differential scanning calorimetry, DSC) 與 X 光繞射儀 (X-ray diffraction, XRD) 分析。

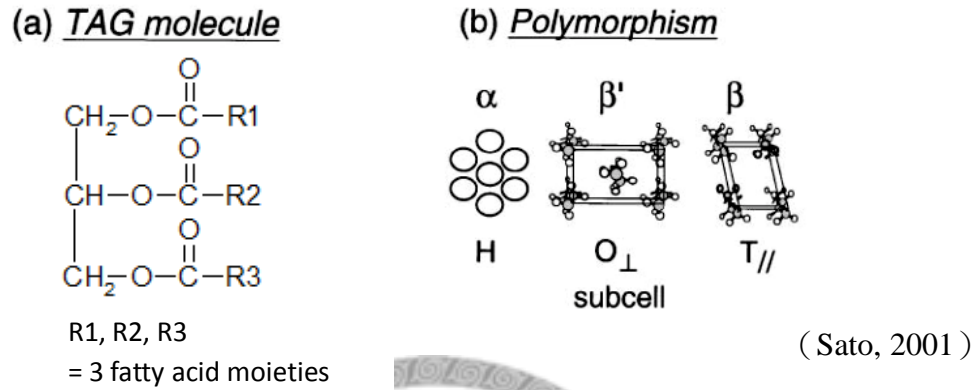


圖 2-2. (a)三酸甘油酯分子結構 (b) TAG 的三種典型結晶型態
Fig. 2-2. (a) Structure of triacylglycerol (b) Three basic polymorphs of TAG.

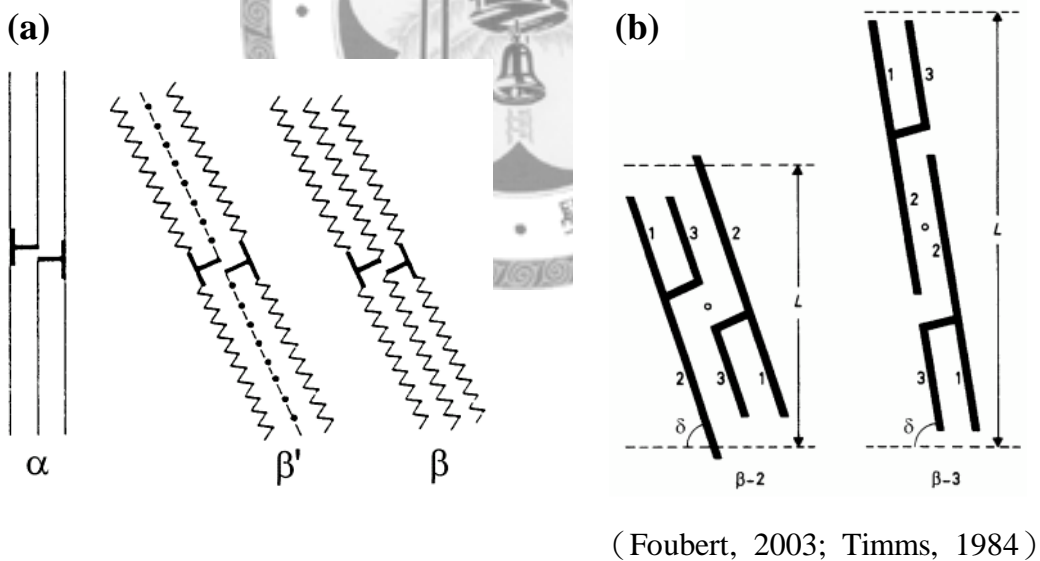


圖 2-3. (a)以三硬脂酸甘油酯為例，比較 α、β'與 β 晶型之示意圖
 (b)三酸甘油酯分子於結晶中的排列方式：兩倍碳鏈長與三倍碳鏈長排列。圖中 L 為結晶層厚度，δ 為傾斜角度
Fig. 2-3. (a)Schematic diagrams comparing the polymorphs α, β' and β as exemplified by tristearin;
 (b)Arrangement of the triacylglycerol molecules in the crystalline phase: double and triple chain arrangements. L is the layer thickness and δ is the angle of tilt.

(二) 可可脂之化學組成與性質

可可脂中約 97% 為三酸甘油酯，其餘 3% 則為其他少量化學物質，如：游離脂肪酸、單酸甘油酯、雙酸甘油酯、磷脂質、醣脂及非皂化物等 (Shukla, 1995)。Schlichter-Aronhime 與 Garti (1988) 指出，植物合成油脂儲存在種子中以便提供發芽所需之能量，於油脂合成期間之外在條件 (例如氣候)，以及種子的成熟度等因素都會輕微地影響油脂的組成，研究也證實不同產地之可可脂組成上有些微的差異。

可可脂之脂肪酸組成較其他油脂為單純，如表 2-4 所示，近 85% 是由棕櫚酸 (palmitic acid, P, 16:0)、硬脂酸 (stearic acid, S, 18:0) 和油酸 (oleic acid, O, 18:1) 組成，分別約佔可可脂肪酸的 25%、35% 和 34%。其餘的部分則由亞麻油酸 (linoleic acid, L, 18:2) 與花生酸 (arachidic acid, A, 20:0) 各佔約 3% 與 1%，而其他脂肪酸僅微量存在 (Foubert, 2003; Lipp and Anklam, 1998)。由此可知，可可脂係由過半的飽和脂肪酸所構成，而高飽和脂肪酸的特性亦影響其物理性質。此外，來自不同產地的可可脂之脂肪酸組成並無顯著差異，但產自巴西 (Brazil) 的可可脂其總不飽和脂肪酸之比例 (41%) 略高於其他產地 (約 36%)。

TAG 分子的結構由一個甘油分子作骨架，於三個羥基—OH 部分以酯化方式接合三個脂肪酸基團 (圖 2-2(a))。一般將不同脂肪酸所組成之 TAG 以三個的脂肪酸字母縮寫 (如表 2-4) 表示，例如：POS 即甘油 1 號立體位置 (*sn*-1) 的羥基接上棕櫚酸、2 號立體位置 (*sn*-2) 的羥基接上油酸、3 號立體位置 (*sn*-3) 的羥基接上硬脂酸的 TAG。由可可脂脂肪酸組成，大約可推測其 TAG 多半為含有一個油酸的單不飽和 TAG，而研究結果也的確證實可可脂中含有一個油酸之單不飽和 TAG 約佔 80% (表 2-5)，包括 40% 的 POS、約 25% 的 SOS 以及 15% 的 POP，這幾種 TAG 在室溫下呈現固態，總體而言，可可脂之 TAG 組成單純，而其中於室溫下會呈現液態的 TAG 僅含不到 20% (Shukla, 1995)。

表 2-4. 來自不同國家可可脂之脂肪酸組成(%)

Table 2-4. Fatty acid composition (%) of cocoa butters from different countries of origin

Countries of origin	Ecuador	Brazil	Ghana	India	Nigeria	Ivory Coast	Indonesia	Malaysia
Palmitic acid (P, 16:0)	25.6	23.9-25.2	25.1-25.4	25.6	25.8	25.7-25.9	24.2	25.0
Stearic acid (S, 18:0)	36	33.2-33.4	37.6-37.8	36.6	36.3	35.4-37.0	37.4	37.5
Oleic acid (O, 18:1)	34.6	36.5-37.8	32.7-33.6	33.9	33.6	32.9-34.5	34.4	33.6
Linoleic acid (L, 18:2)	2.6	3.5-4.1	2.6-2.8	2.8	3.2	2.8-3.4	2.8	2.6
Linolenic acid (Ln, 18:3)	0.1	0.2	0.1-0.2	ND	ND	0.2	ND	0.2
Arachidic acid (A, 20:0)	1	1-1.3	1-1.2	1-1	1.1	1.1-1.2	1.2	1.1-1.2
Unsaturated FA	37.3	40.2-42.1	35.4-36.6	36.7	36.8	35.9-38.1	37.2	36.4

ND: not determined.

(Lipp and Anklam, 1998; Foubert, 2003)

表 2-5. 來自不同國家可可脂之三酸甘油酯組成 (mole %)

Table 2-5. Triacylglycerol composition (mole %) of cocoa butters from different countries

Countries of origin	Ghana	India	Brazil	Ivory Coast	Malaysia	Sri Lanka	Nigeria
PSS	0.4	0.5	trace	0.3	0.5	1.9	0.5
POP	15.3	15.2	13.6	15.2	15.1	14.8	15.5
POS	40.1	39.4	33.7	39	40.4	40.2	40.5
SOS	27.5	29.3	23.8	27.1	31.0	31.2	28.8
SOA	1.1	1.3	0.8	1.3	1.0	1.0	1.0
POO	2.1	1.9	6.2	2.7	1.5	2.3	1.7
SOO	3.8	3.3	9.5	4.1	2.7	3.9	3.0
PLP	2.5	2.0	2.8	2.7	1.8	2.5	2.2
PLS	3.6	3.1	3.8	3.6	3.0	1.4	3.5
SLS	2.0	1.7	1.8	1.9	1.4	0	1.8
PLO	0.6	0.5	1.5	0.8	0.3	0.8	0.4

(Shukla, 1995)

表 2-5 中，不同產地的可可脂之 TAG 組成並無明顯差異，僅產自巴西的組成略有不同，以油酸在 *sn*-2 之單不飽和 TAG (POP、POS 與 SOS) 及雙不飽和 TAG (POO 與 SOO) 最明顯，前者較其他產地低、後者則較高，而這樣的結果恰好與脂肪酸組成的結果相呼應。亦有學者指出，不同地區生產的可可脂其雙不飽和 TAG 之比例會有差異，如：產自亞洲的雙不飽和 TAG 比例都偏低。而 Lehrian 等人以人為調控生長溫度的方式，探討在可可莢果生長後期環境溫度對可可脂組成的影響，亦發現生長溫度對不飽和脂肪酸之比例具有明顯相關性，氣溫高則不飽和度越低 (Foubert, 2003; Lehrian et al., 1980)。因此，巴西可可脂含有較高的不飽和度很可能肇因於主要產區緯度稍高，而氣溫較表中所列其他國家略低。另外，不同的品系或成熟度等因素都有可能影響脂肪酸與 TAG 組成 (Chaiseri and Dimick, 1989)。

除了 TAG，可可脂中還含有約 3% 的其他化合物，儘管含量不高，卻仍與品質風味有關。游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 因為直接影響油脂品質，在各相關單位都有制定其含量之上限。可可脂之 FFA 含量在 0.4-3% 之間，產地、可可豆發酵過程以及油脂提煉方式與條件都是造成 FFA 含量有此差異的主因；Chaiseri 和 Dimick 的研究則發現，可可豆發酵後乾燥不完全引起黴菌的滋生，其所帶有的脂解酶會使 FFA 含量增加而影響可可脂品質 (Chaiseri and Dimick, 1989)。雙酸甘油酯 (diacylglycerol) 約佔可可脂的 1.1-2.8%，單酸甘油酯 (monoacylglycerol) 則僅有非常微量，雖然這兩類化合物在不同產地的油脂中也有不同的含量，但產地與含量並未被發現具有相關性。也有微量 (<1%) 的磷脂質 (phospholipid)、醣脂 (glycolipids) 以及非皂化物 (unsaponifiable matter) 存在可可脂中，其中亦包含脂溶性的抗氧化物質 (Shukla, 1995; Chaiseri and Dimick, 1989; Schlichter-Aronhime and Garti, 1988)。

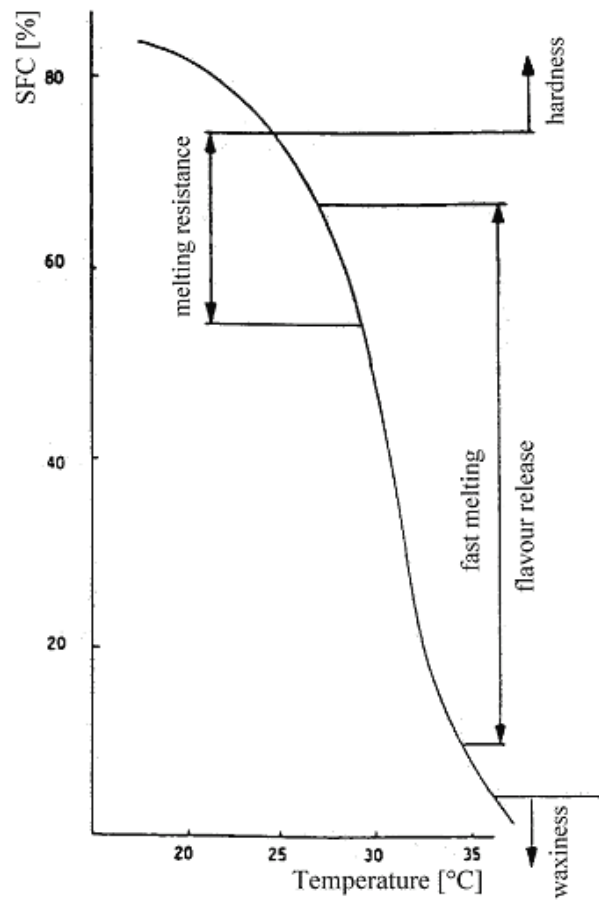
物質的化學性質直接因成分而異，油脂的化性直接與組成有關。可可脂的 TAG 組成有較高的平均分子量，且非皂化物含量偏低，使其皂化價落在 190-195 mg KOH/g 左右 (Chaiseri and Dimick, 1989)。酸價與 FFA 含量有密切相關性，兩者亦可以特定脂肪酸為基準互相換算，一般最常以油酸為基準，轉換算式如下：

$$\% \text{ FFA (as oleic acid)} \times 1.99 = \text{acid value}$$

在前面提到可可脂之 FFA 含量較不固定，因而測得酸價亦無一定的值，但由於酸價為油脂品質的重要指標，相關機構都有油脂酸價規範，品質良好的可可脂最好能低於 4 mg KOH/g。碘價與油脂的不飽和度有關，可可脂碘價在 33-42 g I₂/100 g 之間，視其脂肪酸組成不同而異。

(三) 可可脂之物理性質

由於特殊的化學組成，可可脂擁有別於其他油脂的物理性質，使巧克力擁有獨特的口感，是其他糖果無法取代的原因。



(Klagge and Gupta, 1990)

圖 2-4. 理想可可脂之固體脂含量曲線圖

Fig. 2-4. Idealized SFC curve of cocoa butter.

可可脂最為人所熟知的特點是熔點範圍相當窄，這是其 TAG 組成單純之故。而主要三種 TAG 的熔點較高，使可可脂熔點在 30-35°C 附近，恰巧接近人體溫度 37°C，此特性使得可可脂在室溫（25°C）下保持硬脆，卻能在放入口中後立刻熔化，並伴隨氣味分子的釋放；快速吸熱的過程也同時為舌尖帶來輕微的清涼感。圖 2-4 為理想可可脂之固體脂含量（solid fat content, SFC）曲線圖，即以 SFC 對溫度作圖。圖中的曲線可以分成四個區段，並對應到可可脂應用於巧克力的各種特質。首先，在 25°C 以下，可可脂之 SFC 須保持至少 75% 才能使巧克力被咬時應聲而斷，若 SFC 稍低則韌性會提高，增添橡膠般的口感。25-30°C 間，可可脂之 SFC 下降緩慢，因此，當溫度略高的環境下巧克力仍不至熔化。當接近熔點之溫度範圍（約 27-35°C）時呈現相當陡峭的曲線，此即可可脂

典型的特徵，顯示出其熔點範圍相當窄，巧克力於是帶有入口即化的優點。隨著溫度漸增，SFC 亦不斷減少，最後在 37°C 左右降至近乎於 0%，因此，吃完巧克力後不會有如同食畢豬油般的滑膩感 (Klagge and Gupta, 1990)。另外，由於產地不同會有不同的化學組成，亦造成物理性質的差異，Shukla (1995) 指出，產自巴西的可可脂質地較馬來西亞的可可脂更軟，推測原因可能與前者的雙不飽和 TAG 含量較高有關。

可可脂另一個備受重視的特性是同質多晶性 (詳見 5.1 小節)。由於 TAG 組成單純，容易規則堆疊，產生多種以不同方式排列的結晶型態。結晶型態的緊密度及穩定度與熔點具有密切相關性，因此，同質多晶性不僅與可可脂的質地有關，更影響到熔點範圍的高低。數十年來，學者們極欲了解可可脂的結晶型態而投入大量研究，並提出不同的分類與命名：最初 Vaeck (1960) 利用 DSC 分析結果將之分為四類，爾後 Wille 和 Lutton (1966) 以 XRD 的數據將晶型分為六類，近幾年由 Van Malssen 等人 (1999) 提出的新分類法則結合前述二者，將結晶型態分為五類。表 2-6 列出各分類命名方式以及學者所測得各種晶型之熔點與 XRD 的 short spacings。

表 2-6. 可可脂結晶型態分類與各晶型之熔點範圍與 XRD 分析之 short spacings
Table 2-6. Polymorphs classifications of cocoa butter and overview of melting point (range) and XRD short spacings to different polymorphs

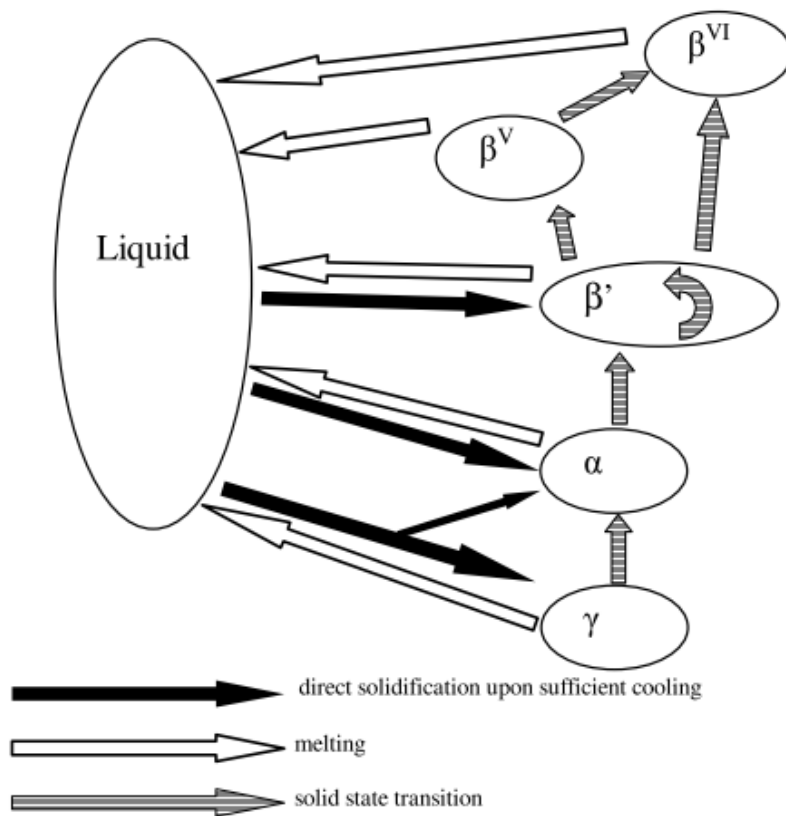
Polymorphs			Melting points or ranges (°C)			Short spacing (Å)	
Ref.(1)	Ref.(2)	Ref.(3)	Ref.(1)	Ref.(4)	Ref.(3)	Ref.(1)	
I	γ	γ	17.3	16-18	-5-+5	4.19	3.7
II	α	α	23.3	20.7-24.2	17-22	4.24	
III			25.5			4.25	3.86
IV	β'	β'	27.5	26-28	20-27	4.35	4.15
V		$\beta(V)$	33.8			4.58	
VI	β	$\beta(VI)$	36.3	33.7-34.9	29-34	4.59	

Ref.(1): Wille and Lutton (1966);
 Ref.(2): Vaeck (1960);

Ref.(3): Van Malssen, et al (1999);
 Ref.(4): Merken and Vaeck (1980).

目前三種方式都屬於廣為接受的分類法，本論文使用 DSC 判斷可可脂結晶型態，採用 Vaeck (1960) 提出之分類法表示，根據 DSC 呈現的熔點範圍將結晶分為 γ 、 α 、 β' 及 β 等四種，熔點亦列於表 2-6 中，因可可脂並非僅由單一 TAG 組成，故在此時的可可脂結晶名稱代表整體 TAG 之結晶型態。一般凝固條件下，液態可可脂可能直接形成 γ 、 α 或 β' 型結晶，以直接形成 α 型最為常見。 γ 型結晶又稱作 sub- α ，若將熔化之可可脂直接置於 4°C 以下低溫存放，極短時間即可形成 γ 型結晶，惟其屬於相當不穩定的晶型，很容易轉變成 α 型； α 型穩定度介於 γ 與 β' 型之間，只需短時間就會轉變為更穩定的 β' 型結晶。Van Malssen 等人 (1999) 經試驗測得 β' 有數種不同的 XRD 圖譜，且熔點範圍廣，提出應將其視為一段相變化範圍而非單一晶相，可能是由於可可脂並非由單一 TAG 所組成； β' 相範圍也是可可脂最常被測得之結晶狀態。而 β 型被公認為最適合應用於甜點的晶型，其結晶穩定、熔點理想，產品呈現的光澤亦較佳；但 β 型無法由液態可可脂直接凝結形成，必須經由 β' 排列而成，故如何取得含有高比例 β 結晶的可可脂成為一個重要課題。圖 2-5 表達可可脂之各種晶型轉變具有一定的方向性， β 型結晶僅能由 β' 型結晶排列而成，無法由液相直接凝固排列而成。

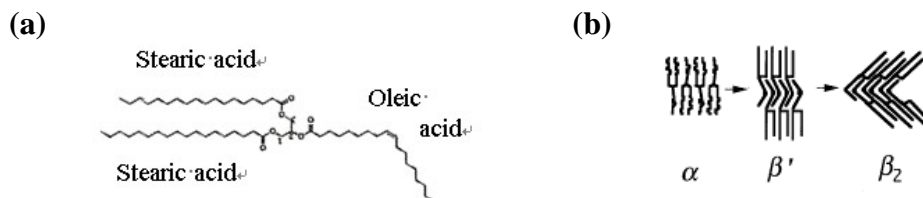
不過卻有學者發現，若油脂加熱溫度不夠高或時間不夠長，原本固態脂的結晶結構會被「記憶」，即所謂的「記憶效應 (memory effect)」，這樣的現象亦可在可可脂中發現。記憶效應歸因於原本穩定的結晶粒子在熔化過程中仍有部分保有規律堆疊，尚未被熱能破壞結構，此時再度結晶的過程相當於已擁有穩定晶核可依附，於是能夠直接形成較穩定的晶型。記憶效應使得液態可可脂可能直接形成 β 結晶，而破壞 β 結晶之記憶效應所需加熱的溫度 β -MPT (β -memory point temperature) 則在 $32.5\text{-}38^{\circ}\text{C}$ 之間，其高低與可可脂中 SOS 含量呈正相關，此關係也顯示 SOS 對可可脂 β 型結晶具有決定性的影響 (Van Malssen et al., 1996; Chaiseri and Dimick, 1995)。圖 2-6 為 SOS 結晶結構模擬圖，此圖可作為可可脂各種晶型結構之參考，圖中 β_2 結晶被認為是與可可脂之 β 晶型最接近的結構。



(Van Malssen et al., 1999)

圖 2-5. 可可脂晶型轉變與相變化之示意圖

Fig. 2-5. Transition scheme of cocoa butter polymorphs and phases.



(Sato, 2001)

圖 2-6. (a) SOS 分子結構式 (b) SOS 三種晶型之結構模擬圖

Fig. 2-6. (a) Structure formula of SOS molecule (b) Structure models of three polymorphs of SOS.

針對 TAG 多形性，Sato 和 Kuroda (1987) 指出當環境溫度改變且接近某結晶型態之熔點時，很容易轉為穩定度更高的晶型，此現象稱為 melt-mediated crystallization，其轉變依照下列過程進行：(1) 原先相對較不穩定的晶體開始部分熔化，(2) 較穩定的晶核形成並緩慢長晶，(3) 較不穩定的晶體繼續熔化並將質量傳輸至較穩定之晶核。液態 TAG 透過較不穩定晶型一步步形成更為穩定的晶型，此過程反應速率較快，每一步驟所需能量相對較少。可可脂之結晶型態直接決定品質，因此，melt-mediated crystallization 的特性被放大運用於可可工業上，加快形成 β 型結晶以提供最佳品質，此加工過程即為調溫 (tempering)，在第二節將深入說明 (Sato, 2001)。

(四) 可可脂之應用

可可脂最主要使用於巧克力點心中，但因其性質特殊，亦有少量應用於其他領域。在醫藥方面，接近體溫的熔點使可可脂被用來製作塞劑類的藥用品。因富含抗氧化物質，保存期限較一般常用油脂更久，進而被應用在美妝產品，且其被認為具有保濕、緊實等功效，因此，在除紋霜、妊娠霜以及一些乳液中都能見到以可可脂為成分的產品，儘管近年已有學者證實其並無確實的緊緻效果，可可脂帶有的獨特香氣仍受到消費者的青睞 (Osman et al., 2008)。

(五) 可可脂與可可豆殼脂之比較

在第 3 小節中介紹過可可豆殼，其中脂肪含量約佔乾重的 6.8-11%。理想狀態下，nibs 進入榨油程序之前都應經過脫去外殼的動作，但加工過程中難免夾帶部分外殼碎屑，造成榨油時可可脂與豆殼中所含的油脂一併被收集。故了解豆殼脂的成份與性質是必要的，而比較其與可可脂之差異更有助於了解加工過程中豆殼殘留對可可脂品質造成的影響。

El-Saied 等人 (1981) 針對同一批可可豆之 nibs 和豆殼萃出油脂進行研究，他們指出豆殼脂的脂肪酸組成以棕櫚酸、油酸以及癸酸 (Capric acid, 10:0) 為

主，且短鏈脂肪酸較可可脂為多，而硬脂酸含量則低許多，但整體而言，摻入少量豆殼脂並不會對可可脂之化學組成造成顯著改變（表 2-7）。觀察其物理與化學性質（表 2-8），豆殼脂之物理性質與可可脂近似，但化學性質卻有差異，尤以酸價明顯高出可可脂許多，碘價則略高於可可脂，因此，榨油之前若未將 nibs 與豆殼善加分離，可能造成所榨出的可可脂安定性稍弱並且帶有些許不良的氣味。

表 2-7. 可可豆殼脂之脂肪酸組成

Table 2-7. Fatty acid composition of cocoa shell fat

Fatty acid		%
Capric acid	(10:0)	16.89
Lauric acid	(12:0)	trace
Tridecanoic acid	(13:0)	trace
Myristic acid	(14:0)	3.19
Myristoleic acid	(14:1)	2.43
Palmitic acid	(16:0)	27.27
Palmitoleic acid	(16:1)	2.55
Margaric acid	(17:0)	trace
Stearic acid	(18:0)	12.05
Oleic acid	(18:1)	28.16
Linoleic acid	(18:2)	7.49

(El-Saied et al., 1981)

表 2-8. 可可脂與豆殼脂的物理及化學性質

Table 2-8. Physical and chemical properties of cocoa butter and shell fat

Properties	Cocoa butter	Shell fat
<i>Physical constants</i>		
Specific gravity at 40°C	0.9012	0.9034
Melting point (°C)	34.10	31.00
<i>Chemical constants</i>		
Acid value (as oleic %)	1.680	9.123
Saponification value	191.214	205.708
Iodine value	35.575	38.727

(El-Saied et al., 1981)

五、可可中的機能性成分

可可製品是全世界最受歡迎的糖果甜品之一，尤其在某些西方國家，平均每人每年吃進 5-10 公斤的巧克力。近一、兩個世紀以來，學者們開始研究可可中的化學成分，發現其中的生物鹼與多酚類化合物含量豐富，另外也有少量與神經系統相關的胺類化合物及植物醇。這些化學物質都屬具機能性的成份，加工後大部分存在於可可餅或可可粉中。

(一) 生物鹼

生物鹼 (alkaloids) 是一類帶有鹼性氮原子的化合物，有時氮原子雖為鹼性，但化合物整體呈現中性或偏酸性。生物鹼分子多達兩萬七千多種，絕大多數被發現於天然物中，僅少數屬人工合成；而天然來源則以植物來源為大宗，如許多草藥之有效成分即為生物鹼化合物，有些生物鹼已做為藥物運用。

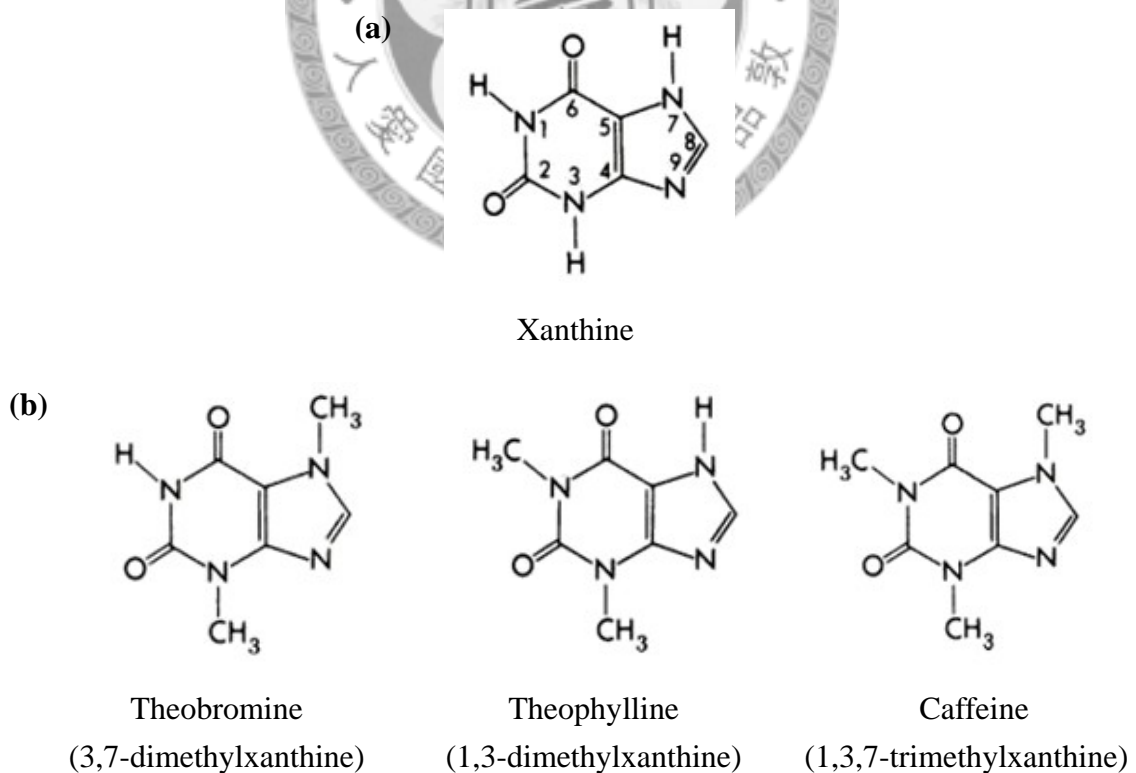


圖 2-7. (a)黃嘌呤分子結構 (b)三種常見的黃嘌呤類化合物

Fig. 2-7. (a)Structure of xanthine (b)Three common compounds of methylxanthine class

生物鹼又可分为數大類，主要的一大類為帶有含氮雜環之化合物，另一類則為氮原子位在直鏈部分的化合物。可可中含量較高的生物鹼屬於帶含氮雜環的甲基黃嘌呤（methylxanthine）類，即黃嘌呤（圖 2-7(a)）的氮原子甲基化，圖 2-7(b) 列出三種常見的甲基黃嘌呤類化合物，分別為可可鹼（theobromine）、茶鹼（theophylline）與咖啡因（caffeine）。在可可中含量最高的生物鹼即可可鹼，咖啡因次之，而茶鹼僅微量，故以下針對可可鹼與咖啡因加以說明。

顧名思義，可可鹼主要存在於可可中（子葉與豆殼），含量可達可可豆的 1-2%，另也被發現存在於其他植物中，如：茶葉、可樂果實等。純可可鹼為白色或無色結晶、難溶於水但可溶於熱水，帶有苦味。可可鹼對人體具有利尿、血管舒張與刺激心肌等作用，早期最主要作為利尿藥物使用，但因其水溶性不佳，且後來許多利尿藥物發展，可可鹼逐漸不再作藥物之用。可可鹼亦帶有輕微刺激中樞神經的性質，但效果比咖啡因差（Scheindlin, 2007）。近年來，研究發現可可鹼能抑制迷走神經而具有止咳的功效，效果甚至比市售藥物更好，而其放鬆平滑肌的性質則可舒緩氣喘症狀，作為呼吸道症狀用藥是目前可可鹼發展的重點（Usmani et al., 2004）。此外，也有少數學者認為可可鹼具有抗癌活性（Lee et al., 2004）。但代謝較慢者，如老人，若攝入大量可可鹼（0.8-1.5 g/day）仍有中毒之虞；部分脊椎動物（如：狗、貓等）對其代謝困難，食入易造成中毒甚至死亡，尤其對具有甜味覺受器的狗最需小心（Scheindlin, 2007）。

咖啡因在咖啡中含量相當高，另外在茶、可可和其他植物中都可見其蹤影，是一種極為常見的生物鹼，可可豆中約含有 0.2-0.5% 的咖啡因。純化的咖啡因為白色結晶，略有苦味。和可可鹼一樣，咖啡因具有刺激中樞神經的性質，效果較可可鹼更強，最明顯的徵候是興奮而難以入眠、血壓稍微升高、呼吸急促等，許多人將咖啡因作為提神的工具，但其並無實際降低疲勞的效果；而能夠快速達到前述效果的主因是人體對其吸收良好，且咖啡因能夠直接通過血腦障壁。藥物應用方面，咖啡因被用來治療新生兒的呼吸暫停（apnea），因為其能夠刺激呼吸中樞對 CO₂ 的敏感度（Benowitz, 1990）。咖啡因對大鼠的半

致死劑量（口服）為 192 mg/kg，但對人的劑量並無一定標準。

除了甲基黃嘌呤類之外，可可中也帶有少量另一類型的生物鹼，苯乙胺（phenylethylamine, PEA），屬於氮原子在直鏈上的類型，與安非他命成分類似。雖然在可可豆中含量僅約 10 mg/kg，但早期人們對它相當關注，因為苯乙胺是一種影響神經傳導的物質，可以在腦內作用引起愉悅的心情，亦有人認為其能帶動「戀愛」的感受，故有「吃巧克力如同戀愛的滋味」一說，也被認為是吃巧克力容易成癮的原因。不過試驗證實，經由口服的方式得到的 PEA，在人體內還未來得及抵達腦部就會被迅速地代謝成苯基醋酸（Phenylacetic acid），因此，推翻上述說法，也許人們喜愛巧克力只是單純受到香氣與風味的吸引（Ter Laak et al., 2004; Sabelli and Javaid, 1995）。

（二）多酚

多酚（polyphenols）是由一個以上的酚衍生而成之化合物，為一類廣泛存在於植物界的植物二級代謝物，具抗氧化性質，被認為對人體有許多益處。多酚化合物又可分為數大類，其中類黃酮（flavonoids）佔有相當高的比例，也是最重要的一種多酚，其基本架構為 $C_6-C_3-C_6$ ，即兩個芳香環間以三個碳連結，此三個碳與鄰近原子形成一含氧雜環，芳香環稱為 A、B 環，中間雜環稱為 C 環（圖 2-8）。類黃酮根據結構上的差異又可細分為許多子類，而可可主要所含之類黃酮屬於黃烷醇（flavanols）以及原花青素（procyanidins），以下就此兩類作深入介紹。

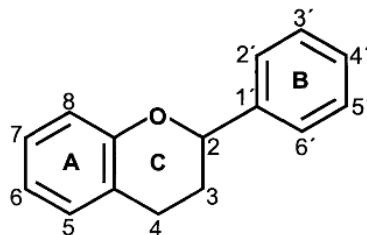


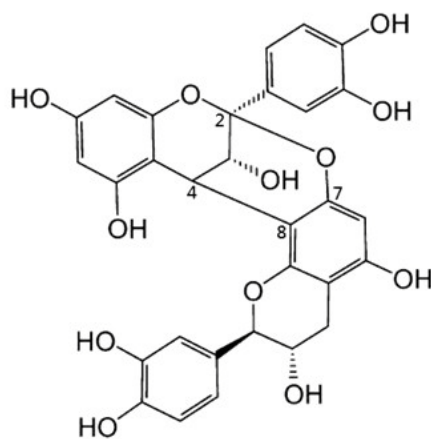
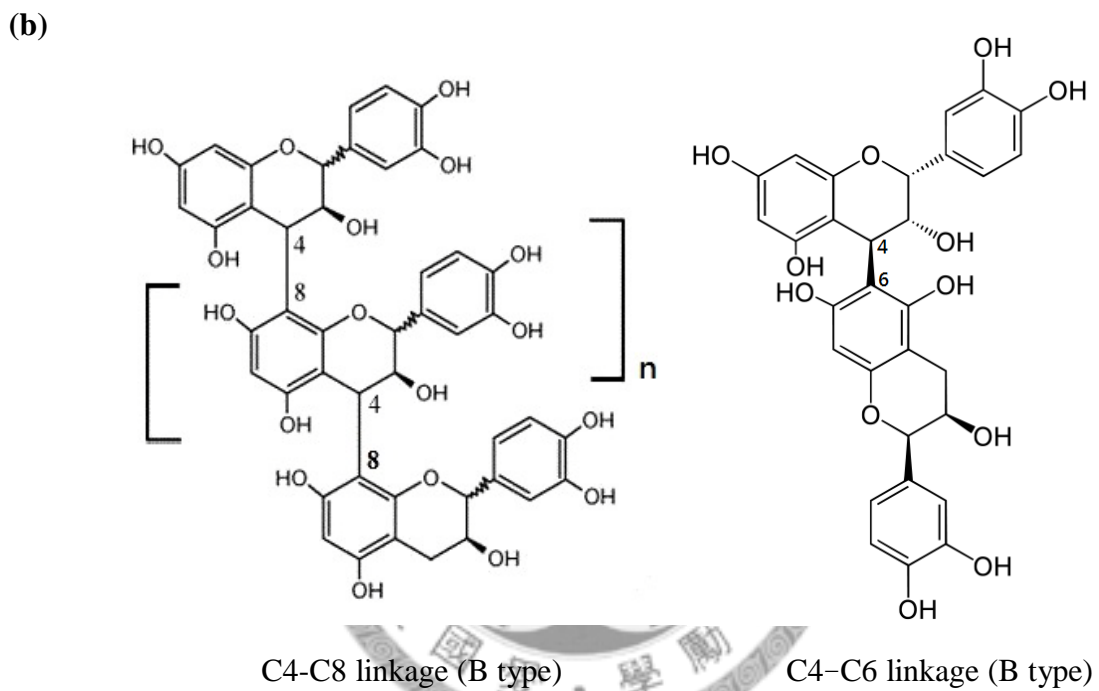
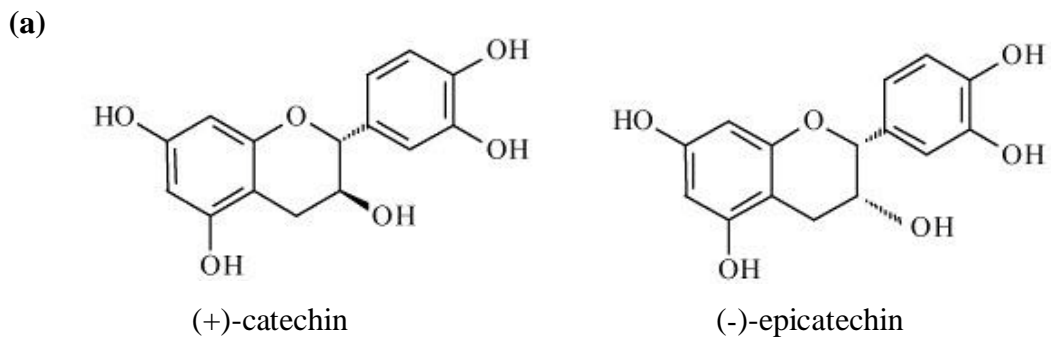
圖 2-8. 類黃酮基本結構

Fig. 2-8. Basic structure of flavonoids

在圖 2-8 結構上接一個以上的氫氧基，即為黃烷醇。最主要的一類黃烷醇是氫氧基接在 3 號位置上的 flavan-3-ol，例如茶中含量相當豐富的兒茶素 (catechin) 與其立體異構物表兒茶素 (epicatechin) (圖 2-9(a))、gallocatechin、epigallocatechin，以及與沒食子酸 (gallic acid) 酯化後的 epicatechin gallate 和 epigallocatechin gallate，這些化合物都具有良好的抗氧化性質，也是原花青素與縮合單寧 (condensed tannin) 化合物的單體。

原花青素是一群由黃烷醇為單體組成的聚合體分子，單體間以碳-碳鍵結，鍵結的位置不同則有不同的結構與性質，鍵結位置有 C4-C8 或 C4-C6 的 B type，以及帶有環氧鍵結方式聚合，即同時具有 B type 鍵結與 C2-O-C7 或 C2-O-C5 鍵結的 A type (圖 2-9(b))。根據單體的數量及單體間鍵結的方式將原花青素分為幾種類型：二聚體以環氧的方式鍵結，稱為 procyanidin A；二聚體以單一碳-碳鍵結，稱為 procyanidin B；三聚體以單一碳-碳鍵結，稱為 procyanidin C；同理，四聚體則稱為 procyanidin D。而根據單體分子種類又可將各化合物加以編號，可參考表 2-9。原花青素寡聚體多具水溶性、無色，經酵素水解成花青素 (anthocyanidins) 則帶有顏色。

研究發現，人體對 flavan-3-ol 單體的吸收遠比原花青素良好；對 epicatechin 的吸收也較 catechin 更佳，這可能是立體障礙不同所造成的差異 (Keen et al., 2005; Tsang et al., 2005)。原花青素在生物體內主要是被水解為單體後再由小腸吸收利用，也因此多數學者認為分子量越小越易受到分解而利於吸收，尤以二聚體 (dimer) 與三聚體 (trimer) 被認為具有較佳的生物有效性 (Spencer et al., 2001)。有趣的是，人體對 epicatechin 組成之二聚體比 catechin 組成的更容易吸收 (Keen et al., 2005)。不過 Arteel 等人 (2000) 卻發現四聚體 (tetramer) 本身就具有良好與 peroxynitrite 反應之能力，可降低體內氧化壓力，而人體對各種大小的原花青素之吸收利用能力仍無相關人體試驗提供確實數據，故原花青素的生物可利用率與分子量大小未必呈絕對負相關。



C4-C8 and C2-O-C7 linkage (A type)

圖 2-9. (a)兒茶素與表兒茶素 (b)原花青素單體間基本鍵結方式

Fig. 2-9. (a)Catechin and epicatechin (b)Basic linkage types of procyanidins

表 2-9. 可可中鑑定出之多酚

Table 2-9. Polyphenols identified from cocoa

Flavan-3-ols	~37%
(-)-epicatechin	~35%
(+)-catechin	
(+)-gallocatechin	
(-)-epigallocatechin	
Procyanidins	~58%
procyanidin B1	epicatechin-(4 β →8)-catechin
procyanidin B2	epicatechin-(4 β →8)-epicatechin
procyanidin B3	catechin-(4 β →8)-catechin
procyanidin B4	catechin-(4 β →8)-epicatechin
procyanidin B5	epicatechin-(4 β →6)-epicatechin
procyanidin C1	epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin
procyanidin D	epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin
Anthocyanins	~4%
cyanidin-3- α -L-arabinosid	
cyanidin-3- α -D-arabinosid	
Flavonol glycosides	trace
quercetin-3-O- α -D-arabinosid	
quercetin-3-O- β -D-glucopuranosid	
Others	trace
clovamide	
dideoxyclovamide	

(Wollgast and Anklam, 2000)

多酚化合物被儲存於可可子葉的色素細胞中，總可溶性多酚約佔未發酵可可豆去脂固形物的 15-20%，(-)-epicatechin 就佔了其中的 35%，是可可中的單一種多酚化合物含量之冠，其他 flavan-3-ol 佔 2%，花青素約佔 4%，總原花青素則約佔了 58% (Wollgast and Anklam, 2000; Kim and Keeney, 1984)。自可可中鑑定出之多酚化合物整理於表 2-9。Criollo 品系中之 epicatechin 含量僅 Forastero 品系的三分之二，雖然品系有差，但影響最甚的是加工過程。不論是發酵、乾燥、焙烤等過程，榨油時較高溫的環境，或是可可粉的鹼處理，都會減低多酚類的含量，且對 epicatechin 影響尤為顯著，文獻指出新鮮可可豆經過發酵後 epicatechin 會減低為原來的 10%，因為發酵過程中 epicatechin 會從色素細胞滲出進行氧化及聚合反應，形成單寧；原花青素亦有相同的趨勢，但減少的程度不若 epicatechin 嚴重 (Osakabe et al., 1998; Kim and Keeney, 1984)。可可中的原花青素幾乎都是以 epicatechin 為單體，由 2-18 個單體以 C4-C8 連接而成的寡聚體或多聚體，以二聚體佔有最高的比例，因而被部分學者認為可可帶有的原花青素較其他食物來源更易被吸收、更具營養價值 (Wollgast and Anklam, 2000)。

近十多年來，可可逐漸從高醣、高油脂、高熱量的致肥胖食物之窠臼中跳脫，許多研究證實攝取可可有益於心血管的功能，包括促進血管舒張、幫助冠狀動脈舒縮，以及降低血壓、血小板凝集等作用，也有研究顯示可可的攝取與減低心血管疾病之死亡率具有一定的相關性 (Flammer et al., 2007; Taubert et al., 2007; Buijsse et al., 2006; Hermann et al., 2006; Rein et al., 2000)。上述現象主要是由於可可中富含的多酚類具有的機能性，不論是 epicatechin 或是原花青素都是良好的抗氧化劑，主要是因其化學結構帶有許多氫氧基，這些氫氧基能夠捕捉自由基或是與具有氧化活性的金屬螯合，但其他因素如立體障礙、分子長度與大小、生物可利用率等都會影響其在人體中之抗氧化能力。許多研究顯示 epicatechin 和原花青素在人體內作用之機制並不相同 (Keen et al., 2005; Steinberg et al., 2003)。其抗氧化的性質最直接表現在抑制低密度脂蛋白 (LDL) 氧化，保護紅血球避免溶血，降低白血球生成氧化物，以及抑制 UV 造成的

DNA 損傷 (Keen et al., 2005; Bearden Monica et al., 2000)。此外，可可中含有的多酚也能減緩血管中產生的細胞因子引起的發炎反應 (Keen et al., 2005)。

多酚類除了最主要的 epicatechin 與原花青素外，可可中也有部分的花青素，以及帶醣基的槲黃素 (quercetin) 和 clovamide 等成分，皆屬良好的抗氧化劑，前者具有調節免疫的性質，後者則具有保護神經的效果 (Fallarini et al., 2009)。

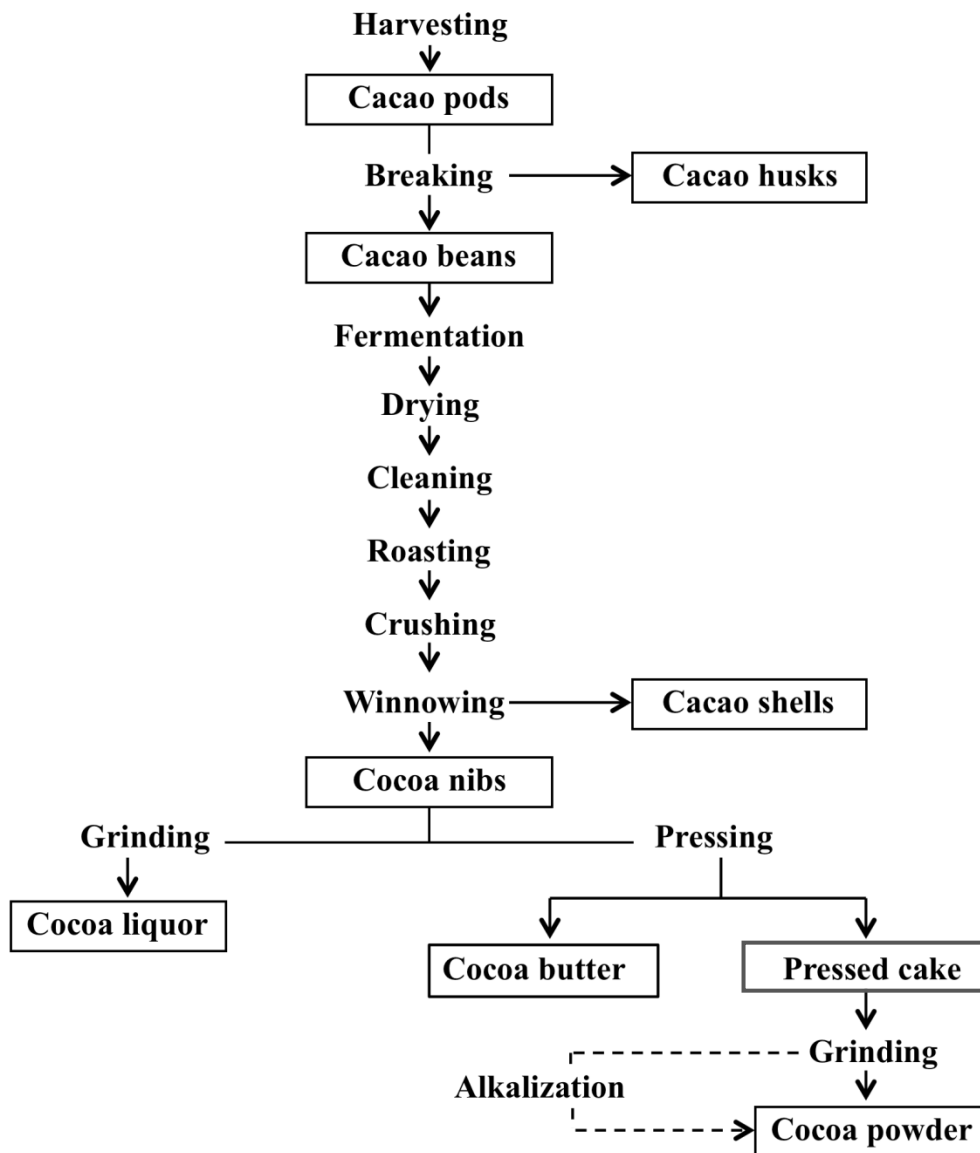


第二節、可可的加工

一、由莢果到巧克力工業原料之過程

可可莢果從可可樹採收後，到成為工業原料：可可漿、可可脂與可可粉，其過程如下圖 2-10 所示。

本小節針對過程中重要的步驟進行介紹。



(Minifie, 1989)

圖 2-10. 可可漿、可可脂與可可粉之生產流程概觀

Fig. 2-10. Overview of the steps in the production of cocoa liquor, butter, and powder.

(一) 發酵與乾燥

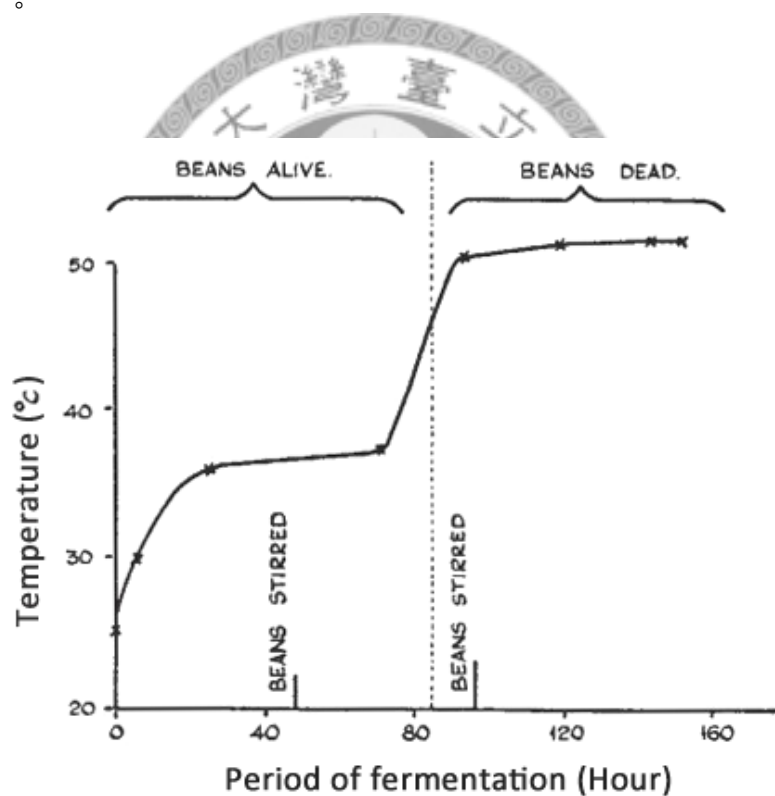
可可莢果需在剛好成熟時採收，但其成熟的程度較難判定，若過熟則其中的可可豆會有發芽的現象，影響產品風味。一般而言，採收後的莢果會直接在當地剖開，取出可可豆進行發酵(fermentation)。發酵與焙烤為可可發展風味、色澤及香氣的兩個關鍵步驟，直接影響可可豆的品質。

早期的發酵方式為Heap法，將可可豆直接在地上堆成小丘，並覆蓋以芭蕉葉等大型葉片，葉片的覆蓋提供保溫、防止雨水與維持豆堆表面的濕度等效果。隨著時代演進，也逐漸發展出利用木箱或是木板平台等方式進行發酵，底部留有孔洞或縫隙以利發酵期間產生的液體排出，亦有助於氣體交換。以Heap法發酵，可可豆堆放量不受限制；但若堆放量過大，易造成中心之可可豆溫度較高、氣體交換較差的情形，雖然有經過翻攪仍有發酵程度不均勻之虞；利用容器或平台發酵，能控制可可豆堆疊高度，比較不易有發酵不均的問題，但堆放量受到容器限制而較不彈性。發酵的時間需四到六天，根據當地氣溫與濕度，以及各地方的發酵技術不同而有所調整 (Howat et al., 1957)。

可可豆的發酵有別於其他飲料作物，同時需要其本身所帶有的酵素以及微生物兩者自然發展、交互作用。可可中作用於碳水化合物、蛋白質及多酚的酵素，包括 aminopeptidase、invertase、polyphenol oxidase (PPO)、glycosidases、carboxypeptidase 以及 endoprotease，使許多風味化合物之前驅物得以順利產生。不過由 Hansen 等人 (1998) 的研究指出，在發酵過程期間的溫度及 pH 值使得可可中大部分的酵素活性都很低，僅 endoprotease 和 glycosidase 仍具有活性，因此，上述二類酵素為可可發酵的重要角色之一，前者能產生許多寡肽與胺基酸，後者則可作用於 anthocyanins 使可可子葉顏色改變。目前普遍認為實際上酵素在可可發酵的作用時間短暫，但仍屬重要的一環，尤其多酚等物質的轉變能提供風味前驅物、減低苦澀味並展現巧克力應有的色澤。

微生物對於可可的發酵則有不可取代之地位，能夠消耗果肉並代謝可可中的化合物產生與風味相關的物質。發酵初期微生物種類繁多，可可果肉含豐富

的多醣供其作為營養源，絲狀真菌、酵母菌、乳酸菌（lactic acid bacteria）和醋酸菌（acetic acid bacteria）等都會開始生長。酵母菌、乳酸菌與醋酸菌是發酵期間的主要菌種，一開始由酵母菌進行厭氣發酵，果肉經分解果膠作用代謝產生酒精，乳酸菌也進行兼性厭氣發酵產生檸檬酸、乳酸和甘露醇（mannitol）；之後再由醋酸菌進行好氣發酵，此時酒精被其代謝成醋酸並產生熱。*Bacillus* 屬的菌種也在發酵的末期被發現（環境較高溫、好氣、酸度中等），但目前此類微生物對於可可發酵的貢獻尚未被釐清。高濕度是微生物喜好的生長環境，在產地擁有高濕度的優勢，適合良好的發酵進行（Camu et al., 2008; Ardhana and Fleet, 2003）。



(Wadsworth and Howat, 1954)

圖 2-11. 發酵期間可可豆堆之中心溫度曲線

Fig. 2-11. The temperature curve of cacao heap center during fermentation

酵素或微生物都對環境的溫度與酸鹼度較敏感，故此二者為發酵的重要因素。在自然的發酵情形下，可可豆堆中心溫度的變化如圖 2-11 所示，前 3.5 天溫度需低於 38°C，後 3 天則需達到 50°C。研究顯示，發酵前半段可可豆處於準

備發芽的階段，此階段可能有一些利於風味生成的酵素會被活化，研究透過發芽試驗了解種子存活與否，確認溫度過高會使可可豆死亡，無法進行準備發芽的過程。因此，除了在發酵前需確定可可豆的新鮮度，發酵前半段也要注意溫度不可過高以免導致可可豆死亡。於第 3.5 天左右，發酵過程中產生的熱使可可豆堆中心溫度自然升高至約 45-50°C。研究發現發酵的後半段期間可可豆已無法發芽而呈現死亡狀態，主要原因為高溫與微生物產生的酸滲入子葉中。後半段時期的溫度若未能接近 50°C，生產出的可可豆品質會稍差，紫色豆較多。理想狀態下，發酵過的可可豆子葉應呈褐色；紫色豆是指子葉仍帶有偏紫的顏色，通常紫色豆風味比較差，亦會對產品色澤造成影響，因此，整批可可豆中紫色豆的比例也是評斷可可豆品質的指標之一。學者推斷色素等多酚物質之氧化或聚合反應在發酵後期發展旺盛，此時溫度對可可本身酵素之活性影響甚鉅，因此，總多酚含量也被用作發酵品質判定的依據。若發酵後總多酚含量仍大於可可去脂固形物的 10%，則可視為發酵不良。另外，雖然希望發酵初期可可豆保持發芽活性，但並不希望可可豆發芽，發酵完需將發芽豆挑出，以免影響風味及口感（Wollgast and Anklam, 2000; Howat et al., 1957; Wadsworth and Howat, 1954）。

發酵期間酸鹼度會不斷變化，新鮮果肉本身含有檸檬酸等使其 pH < 4，當酵母菌與部分乳酸菌分解果肉後，環境之 pH 值會稍微上升，利於乳酸菌及醋酸菌之生長；果肉組織亦逐漸鬆散，使部分空氣進入果肉與子葉間，醋酸菌開始進行有氧發酵產生醋酸，發酵環境酸鹼度又再次下降（pH 值約為 5），此時屬發酵的中後期，子葉漸漸因滲入的酸與醋酸菌發酵產生的熱導致死亡。此外，微生物的生長過程會釋放 CO₂，當其濃度不斷增加會使環境過酸，氧氣比例下降。尤其在發酵前段過酸則易導致豆子提前死亡，不利於發酵。因此，翻攪的動作是必要的，除了能減低 CO₂ 濃度防止酸度過高外，還可調節豆堆中心溫度，以均衡整體豆堆的發酵程度（Camu et al., 2008; Camu et al., 2007; Wadsworth and Howat, 1954）。

發酵結束後，可可豆需接著進行乾燥（drying）的步驟。乾燥最常使用的方式是將可可豆平鋪日曬，環境和發酵時一樣具有高濕度與高溫；亦可使用熱風乾燥、陰乾或是煙燻，但以日曬乾燥的豆子風味最佳。乾燥是為了後續存放以及運送，含水量過高容易受黴菌污染，乾燥至水份含量低於 6% 可以避免其發生。不僅如此，乾燥也被認為是屬於延續發酵的過程，故有「後發酵」的別稱，由於發酵剛結束時仍含有高水份含量，且乾燥過程仍有多酚會被氧化，部分單寧物質也會再發生變化，使澀度降低，不良氣味也在此時部分減少，故被認為屬於發酵的延伸（Afoakwa et al., 2008）。

發酵、乾燥後的可可豆已經成為一種原料商品，當地農民加工至此步驟後就會將整批可可豆販售至中盤商，或是直接出貨到有簽約契作的巧克力製造公司，因此整批商品的品質影響農民們能夠取得的售價。發酵可可豆的品質有數種指標，如前述之紫色豆的比例或是總多酚的含量，另外，若剝開子葉呈現灰白的色澤，稱為灰豆（slat beans），也是發酵不佳、風味不良的豆子。以上提到的指標，不一定會在產地執行評估，有經驗的收購者只需憑敏銳的嗅覺即可評斷發酵豆的等級。發酵豆在進行焙烤前會經過清理與選別，將發酵時夾帶的泥土、砂石或枯葉等雜質清除，而前述幾種不良的豆子亦會在此時被剔除（Misnawi et al., 2003）。

（二） 焙烤

乾燥後的可可豆會大量從產地轉運至加工地，並進行焙烤（roasting）的處理，另一個對可可風味形成的重要步驟。可可豆的焙烤溫度較咖啡豆為低，在 90-150°C 間，過高的溫度會影響油脂品質。溫度和時間長短因可可品種、發酵品質、成品用途、烤箱效率與個人經驗而異，製作巧克力使用溫度比製作可可粉為低，每次焙烤時間從 5-120 分鐘都有人使用。可可豆通常會先以低於 100°C 預熱再加以焙烤。焙烤後，水份含量更低，可可豆殼會與子葉剝離且變得硬脆，以便之後作破碎去殼的動作；子葉顏色更深，質地變得易碎。發酵後釋放

出的胺基酸、短胜肽與還原醣等風味分子前驅物，在焙烤期間進行梅納反應，是產生香氣最主要的過程。而許多明顯的不良氣味因屬於易揮發性，在焙烤過程中會揮發消散。近來也有改為先去殼破碎後再焙烤，如此可去除可可殼一起焙烤產生的異味（Afoakwa et al., 2008; Minifie, 1989）。

（三）可可碎粒加工

焙烤後的可可豆質地硬脆、含水量少，最好能趁熱度未減時直接去破碎分離（winnowing），破碎分離機利用豆殼與子葉比重不同進行風選，將較輕的雜質、豆殼、子葉中的胚芽與較重的子葉碎粒分離，取得可可碎粒（nibs）。Nibs 的加工分為兩種，一為直接研磨，一為磨細後榨油。

Nibs 直接研磨至一定程度後，細胞被破壞，釋出存放於其中的油脂，並與深褐色的固形物粒子均勻地形成糊漿狀，即為可可漿（cocoa liquor）。可可漿已帶有濃厚香氣，並呈現巧克力的色澤，是製作巧克力產品的主要工業原料之一。

若將 nibs 再稍加磨碎，進行榨油的步驟，則可以將 nibs 中的油脂與固形物加以分離，前者即為可可脂，後者即為可可餅（cocoa cake or pressed cake）。因可可的油脂分離較困難，現在多半使用油壓式榨油機。可可餅是高壓下的產品，質地結實，經過進一步研磨可得到可可粉（cocoa powder）。也有以可可漿進行榨油處理的方式。可可脂與可可粉都是巧克力的主要工業原料，可可粉更是糕餅業常用的材料，可可粉中仍含有油脂，含量多寡端看榨油機效率與壓榨時間長短而定。可可粉可粗分為低脂（10-14% fat）或高脂（18-24% fat）兩類，但也可再細分（如：中脂）。兩者主要用途不同，低脂可可粉多用於巧克力產品的製作，高脂可可粉則以沖泡飲料為主。可可粉的顆粒大小對產品口感影響甚大，一般要求粒徑 $\leq 75 \mu\text{m}$ ，糕餅應用影響較小，但飲料與巧克力都需顆粒越小才能得到越好的口感；另外，顆粒大小也會影響顏色（Minifie, 1989）。

(四) 鹼處理

可可粉依據需求，會選擇性的進行鹼處理 (alkalization or Dutching)。鹼處理是將可可粉浸泡於鹼液中，常見的鹼液為碳酸鉀溶液。其主要的目的為：(1) 提高可可粉於水中的分散性，有助於可可飲品的品質；(2) 加深可可粉顏色，一般未經鹼處理的可粉稱天然可可粉 (natural cocoa powder)，多半呈淺褐色或紅褐色，鹼化的可可粉則呈現漂亮的深褐色；(3) 去除些許苦味 (Miller et al., 2008)。

鹼處理對風味的影響是優是劣卻見仁見智，雖然苦味減低，但有許多人認為可可特殊的風味也被破壞 (Minifie, 1989)。不僅如此，鹼處理的最大缺點是減低總多酚含量，尤其對原花青素影響甚鉅。Hershey 的研究機構指出，鹼處理程度不同，總黃烷醇含量減少 60-78% 不等，若是為了增加色澤美觀度則處以輕量鹼處理即可。天然可可粉的 pH 值落在 5.2-5.8，鹼化可可粉則為 pH 7-8 (Miller et al., 2008)。

鹼處理除了運用於可可粉，也有人直接對整個可可豆、nibs、liquor 或可可餅進行鹼處理，目的都是為了後續直接得到鹼化的可可粉，但是對於未將可可脂分離的原料作鹼處理，很可能影響其中可可脂的品質，不可不慎。

二、巧克力產品製作之流程

取得可可之工業原料後，工廠依照各種配方調配製作巧克力。巧克力製作的每個步驟都對品質有不同層面的影響，歐洲人將之視為一種藝術，而巧克力則是許多熱衷者眼中的工藝品。

製作巧克力的流程概要地以圖 2-12 介紹：

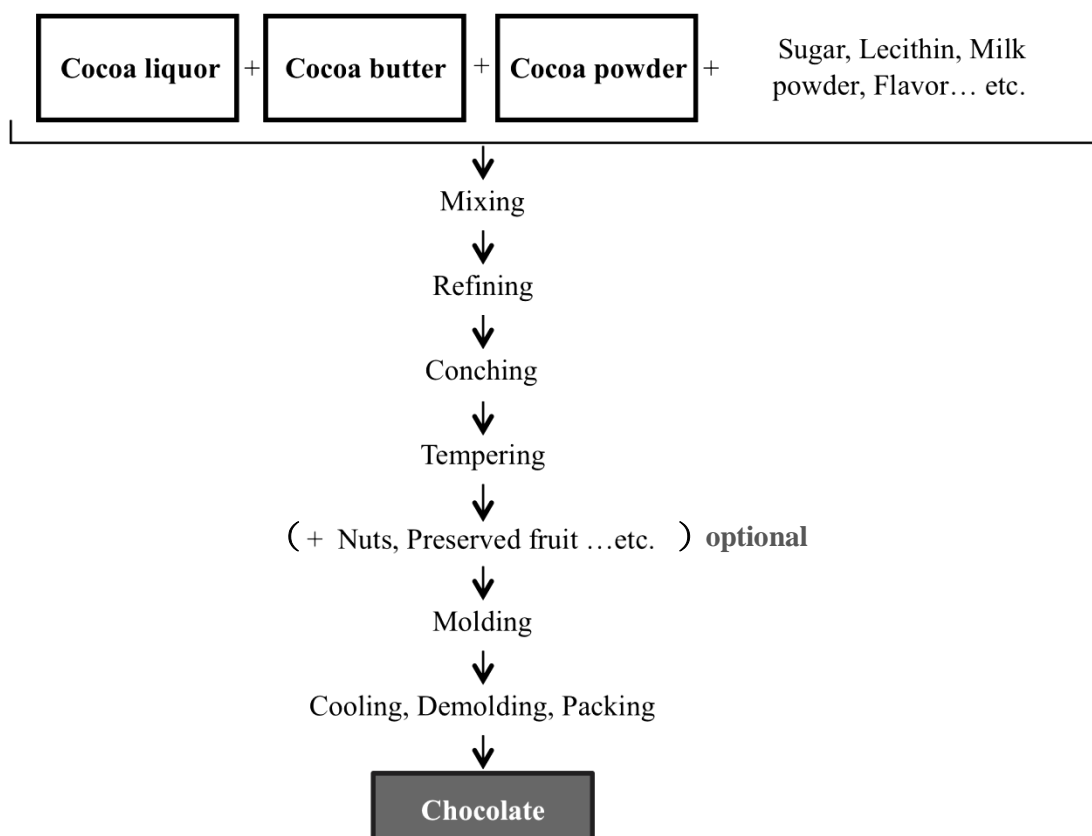


圖 2-12. 巧克力製作流程

Fig. 2-12. Process of chocolate manufacture

(一) 配方

圖 2-12 最上方列出巧克力製作經常使用的原料，粗框者為可可來源之原料，包含可可漿、可可脂及可可粉，三者間的比例是各品牌的秘方，主要以總可可脂與總固形物之比例去推估三者的用量是否理想。其中可可脂的總含量越高，口感越好，成本也越高，屬於高單價的調溫巧克力。許多市售商品以類可

可脂 (cocoa butter equivalent, CBE) 或可可代用脂 (cocoa butter replacement, CBR) 取代可可脂的使用，若產品中無添加可可脂，僅以上述二者加入可可粉等固形物製作，則只能稱為複合巧克力 (compound chocolate)。

除了可可來源之原料以外，巧克力中最主要的原料就是糖，純可可帶著苦味與酸味，若無甜味的修飾一般人難以入口。使用的糖不同，對成品也有影響。可可原料與糖及微量香料製成的巧克力為黑巧克力，若添加奶粉則為牛奶巧克力。一般常用的香料有肉桂和香草，現今口味變化多端，也有許多其他的調味劑，只是不能加入過多以免干擾巧克力本身的風味。乳化劑如卵磷脂的添加量也不可超過 0.5%，添加過多會影響巧克力糊的流變性質，微量即可達到幫助混勻的效果 (Minifie, 1989)。

根據巧克力的成份比例不同，各國對於其標示名稱有相關的規定。美國食品藥物管理局 (FDA) 的規定中，主要針對可可來源之原料、糖、以及牛奶固形物之比例定義巧克力種類 (表 2-10)；相對而言，歐洲對巧克力食品分類則較詳細，對於可可脂、去脂可可固形物、以及乳脂等影響品質的成份有詳實的比例規定 (表 2-11)。

表 2-10. 美國巧克力產品配方與名稱之定義

Table 2-10. The definition of names and ingredients of U.S. chocolate products

Product	Chocolate Liquor ^a	Milk Solids	Sugar
Semisweet or Bittersweet (Dark) Chocolate	≥ 35%		< 12%
Sweet Chocolate	≥ 15%	< 12%	
Milk Chocolate	≥ 10%	≥ 30%	
White Chocolate	≥ 20% (Cocoa butter only)	≥ 14%	≤ 55%

^a Chocolate liquor is the solid or semiplastic food prepared by finely grinding cacao nibs. The fat content of chocolate liquor may be adjusted by adding one or more of the optional ingredients. Some optional ingredients may be used under the conditions and limitations.

(FDA, 2010)

表 2-11. 歐洲巧克力產品配方與名稱之定義

Table 2-11. The definition of names and ingredients of European chocolate products

Product	Total Dry Cocoa Solids	Cocoa Butter	Non-Fat Cocoa Solids	Total Fat	Milk Fat	Milk Solids	Flour/starch
Chocolate	≥ 35%	≥ 18%	≥ 14%				
Couverture Chocolate	≥ 35%	≥ 31%	≥ 2.5%				
Chocolate Vermicelli or Flakes	≥ 32%	≥ 12%	≥ 14%				
Milk Chocolate	≥ 25%		≥ 2.5%	≥ 25%	≥ 3.5%	≥ 14%	
Couverture Milk Chocolate	≥ 25%		≥ 2.5%	≥ 31%	≥ 3.5%	≥ 14%	
Milk Chocolate Vermicelli or Flakes	≥ 20%		≥ 2.5%	≥ 12%	≥ 3.5%	≥ 12%	
Family Milk Chocolate	≥ 20%		≥ 2.5%	≥ 25%	≥ 5%	≥ 20%	
Cream Chocolate	≥ 25%		≥ 2.5%	≥ 25%	≥ 5.5%	≥ 14%	
Skimmed Milk Chocolate	≥ 25%		≥ 2.5%	≥ 25%	≤ 1%	≥ 14%	
White Chocolate		≥ 20%				≥ 14%	
Chocolate a la taza	≥ 35%	≥ 18%	≥ 14%				≤ 8%
Chocolate familiar a la taza	≥ 30%	≥ 18%	≥ 12%				≤ 18%

(EC, 2000)

(二) 混合與精煉

將大部分的配方先混合，但此步只是粗略的將原料拌成糊糰、稍作均質，緊接著還須加以細磨精製 (refining) 使顆粒更細。將巧克力糰塊加溫使其成糊後，以研磨機細磨，傳統研磨機為五滾輪式研磨機 (圖 2-13(a))，巧克力糊從兩滾輪間隙流出，而每個間隙壓力不等，每個滾輪也有些許溫度差，在高速與高壓力的滾輪間巧克力糊混合均勻且顆粒變細。Refining 完成時，巧克力糊細緻度提升，理想粒徑為 30 μm 以下，此為舌尖難以辨別顆粒的程度，若產品品質較高則被要求需至 20 μm 以下，巧克力類型不同亦有不同程度的要求。

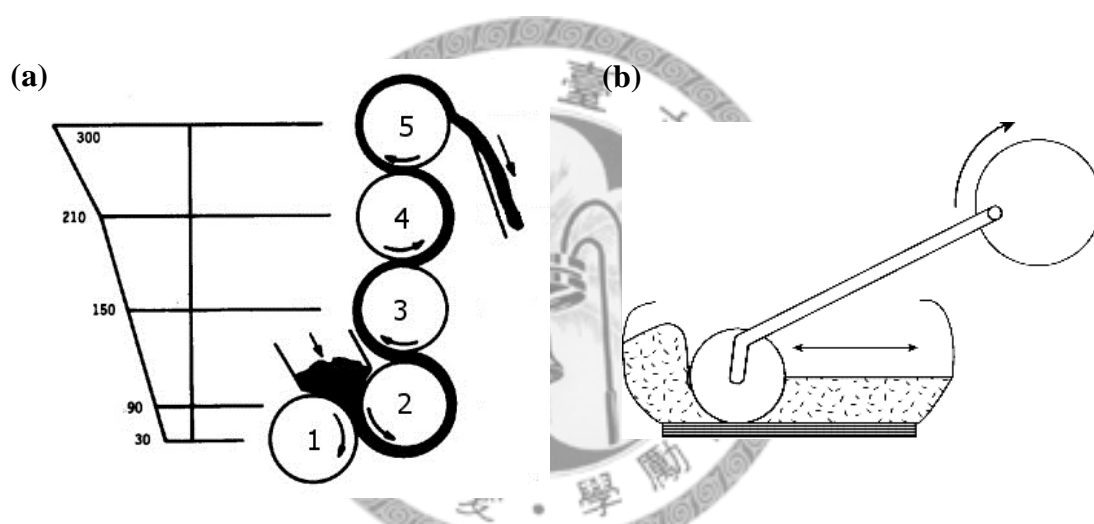


圖 2-13. (a)五滾輪式精製研磨機結構簡圖，滾輪左方對應的數字為各滾輪之轉速 (rpm)。 (b)最早的 conching 機器簡圖

Fig. 2-13. (a) Scheme of five-roll refiner. The numbers on the left indicate every rotational speed (rpm) of the rolls on the right, respectively. (b) Scheme of the original conching machine

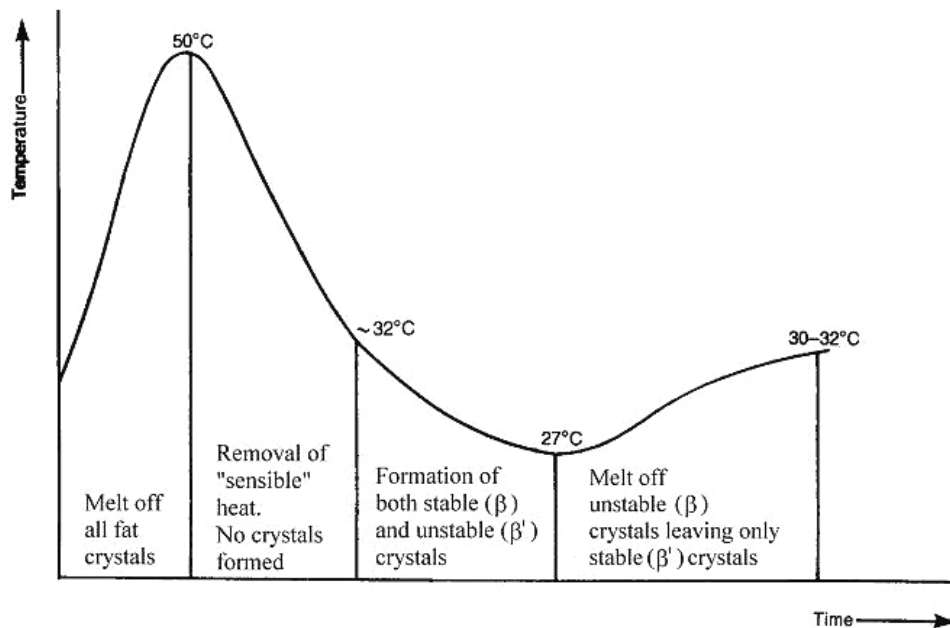
細緻化的工作並未結束，還有一個非常重要的碾揉精煉 (conching) 程序。「Conche」一字源於歐洲，意為海螺貝殼，最初發明此種精煉程序的機器其形狀如同海螺貝殼般 (圖 2-13(b))，故將此程序稱為 conching 並沿用至今。Conching 的功能有：(1) 使巧克力糊之顆粒更細緻，(2) 使所有原料充分均質、乳化，(3) 降低巧克力糊中的水份含量，使巧克力糊的流變性質更臻理想，增進滑順的質

地，(4) 去除揮發性的不良氣味與酸味，(5) 氧化單寧及其他苦味化合物，(6) 進行化學反應產生更多風味成分，(7) 使色澤更美觀。雖然可可原料本身含水量很低，但糖與奶粉等配料中會夾帶少許水份，會使整個巧克力糊糰帶有相當的黏稠度，且對成品而言含水量越高越不安定，水份減少則能提升流動性與成品安定性。在 conching 的過程因不斷摩擦，溫度會自然上升，在此時有一定溫度有助於碾揉，也能幫助不良氣味揮發，亦促進化學反應。目前 conching 時產生的反應仍不很明確，但應有梅納反應的參與，而經過 conching 後確實有更良好的風味。黑巧克力的 conching 所需溫度較牛奶巧克力高，最高溫可達 70-80 °C。而機器之效率不同，原料的體積不同，conching 時間也差異頗大，由 12 小時至六天都有可能，但時間過長也要注意油脂氧化的問題 (顏, 2007; Minifie, 1989)。

(三) 調溫

Conching 過後巧克力糊的風味已成形，但在 conching 的過程間溫度維持至少約 50°C 的時間很長，整個原料一直呈現流動狀態，其中可可脂的結晶粒子已經處於最不安定的形式，若此時直接製作成巧克力，成品的口感與光澤度將令人失望。在第一節 4.3 小節中有提到，利用 melt-mediated crystallization 特性調整可可脂中的結晶型態，在加工製程上稱為調溫 (tempering)。

理想的巧克力之可可脂結晶分布是以 β 型為主，其優點為：(1) 若以其他較不穩定的形態存在，巧克力存放一段時間後，其中的結晶還會慢慢轉為更穩定的形態，造成巧克力表面出現「巧克力油花 (chocolate fat bloom)」，雖不會造成安全問題，卻降低產品的價值與美觀；(2) β 型為主的可可脂之 SFC 才能呈現如圖 2-4 般的陡峭曲線，以及入口即化的舌感；(3) 不穩定的結晶在產品冷卻後收縮率較差，使脫模困難，對產品外觀造成損傷，表面也不夠光亮。



(Foubert, 2003)

圖 2-14. 牛奶巧克力調溫程序與油脂結晶變化

Fig. 2-14. Tempering sequence during lipid crystallization in milk chocolates

由於巧克力原料中還含有可可脂以外的成分，故實際操作時溫度並非 β 型與 β' 型之熔點，會再往高溫偏移一點。牛奶巧克力的基本 tempering 方式如圖 2-14，黑巧克力溫度會再偏高 2-3°C，tempering 是很需要經驗與技術的步驟，溫度與時間的掌控視配方、tempering 機器、室溫以及成品用途作修飾。一開始將巧克力糊加熱至 50°C，為使所有結晶粒子由固態熔化為液態；當冷卻至 32°C 左右時，可維持一段時間，等待可於此溫度下維持固態的 β 型結晶產生，以將其作為晶核進行產品的過程，故此時溫度緩降至約 27°C，接近原料中 β' 型結晶的熔點，維持一段時間，希望透過這個溫度以及剛剛產生的 β 型晶核，能順利產生 β 型結晶。最後再升回 32°C 左右，確保在低溫時生成的不穩定晶型可再被熔化。後續的升溫（32°C）及降溫（27°C）可重複多次，重複的次數越多則能得到越高比例的 β 型結晶。最後調回 32°C 左右使之呈現液態，即可倒入模具中。另外，加以攪拌能夠加速成晶，攪拌的力道與速率也會影響結晶生成的效率。

早期沒有 tempering 機器，所有溫度控制皆為人工，一般加熱用隔水法，

降溫方式則有冷水降溫或大理石台降溫法，用到水的部分必須小心不能摻入原料中。大理石台降溫法對有經驗的專家而言，能夠獲得完美的質感，將部分熱巧克力糊取出抹在大理石台上，並來回塗抹幫助冷卻直到其質地黏稠，再回添於整個原料中，不論是取出的量、大理石溫度和室溫都會影響需要的時間，回添的時間點也須憑經驗判斷，但此方式能穩定平緩降溫，對理想結晶效果佳。另外也有人利用相同原理，取小量的巧克力或可可脂（帶有 β 型結晶）添加至欲 tempering 之原料中提供晶種，加快 β 型結晶的生成，稱為種晶法。

Tempering 成功的巧克力糊經過成模、震動除氣泡、冷卻及脫模的程序後，做出最基本的款式；少數堅果、糖果或是蜜餞等可於倒入模具時添加。另外，許多其他類型的巧克力也都是使用經過 tempering 的巧克力糊為原料，然後藉由各種幫助成形的機器發展出多變化的巧克力產品。



第三章、材料與方法

第一節、試驗大綱

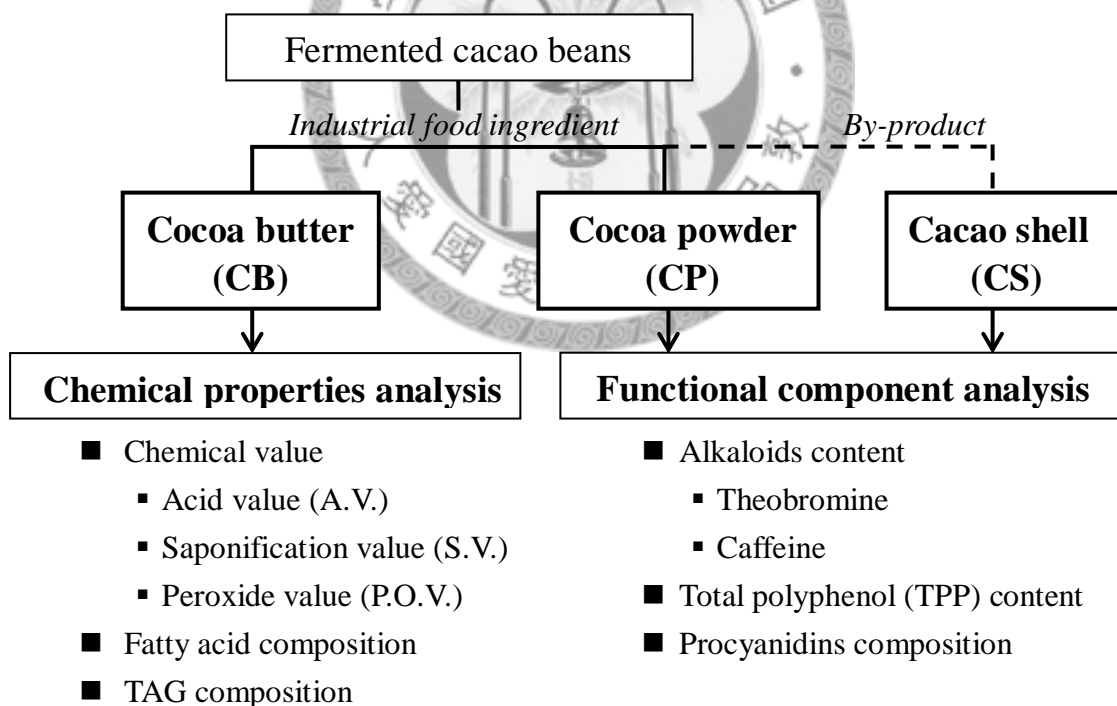
本論文一共分為三個部分：

一、可可豆小量發酵最適條件之探討

由新鮮的台灣可可莢果取出新鮮可可豆進行小量發酵的最適條件探討。

二、台灣可可與外國可可的成分、化性之比較

發酵可可豆為國際間交易的原料商品，比較台灣的發酵可可豆與他國商品之間的差異有助於了解商品的水平。主要分成兩種工業原料—可可脂與可可粉，以及副產品—可可豆殼，共三個部分進行分析。



三、可可脂調溫條件與油脂結晶變化之關係

利用 DSC (differential scanning calorimetry) 以台灣可可脂為樣品進行不同調溫程序與油脂結晶型態變化之分析。

第二節、試驗材料

一、進行小量發酵之新鮮可可豆

新鮮的可可莢果是由屏東農民邱先生與劉先生提供。可可莢果採收後直接裝箱郵寄，以確保莢果的新鮮。欲進行發酵時才取出其中的新鮮可可豆。

二、台灣、馬來西亞、越南之可可原料

三個產地的可可原料（可可脂、可可粉與可可豆殼）皆來自發酵可可豆。各原料詳述如下：

（一）台灣可可原料

發酵可可豆：屏東農民邱先生種植、自行發酵提供。

可可脂（CB）：由屏東農民邱先生榨油提供。此可可脂亦為進行第三部分試驗「可可脂調溫條件與油脂結晶變化」之材料。

可可粉（CP）：由屏東農民邱先生生產提供。

可可豆殼（CS）：將發酵可可豆乾燥、焙烤及脫殼，收集之豆殼。

（二）外國可可原料

發酵可可豆：分別購自馬來西亞與越南，由當地生產、發酵。

可可脂（CB）：將兩種發酵可可豆委請油品公司分別榨油得之。

可可粉（CP）：將兩種發酵可可豆委請油品公司榨油後，分別收集榨油後的可可粉塊，再經磨粉，即為可可粉。

可可豆殼（CS）：將發酵可可豆乾燥、焙烤及脫殼，收集之豆殼。

三、藥品與試劑

（一）溶劑與移動相

- 精製酒精，友和
- Acetic acid, Sigma

- Acetone, Merck
- Acetonitile (ACN), Merck
- Dichloromethane (CH₂Cl₂), Merck
- Ethyl acetate (EtOAc), Merck
- Hexane, Merck
- Isopropanol, Sigma
- Methanol (for HPLC), Merck

(二) 藥品

- Caffeine, Sigma
- Folin-Ciocalteu's reagent, Merck
- Gallic acid, Sigma
- Hydrochloric acid (HCl), Sigma
- Phenolphthalein, Sigma
- Potassium hydroxide (KOH), Nacalai tesque
- Potassium iodide (KI), Nacalai tesque
- Silica gel, SiliaFlash G60, SiliCycle Inc.
- Sodium carbonate (Na₂CO₃), Nacalai tesque
- Sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃), 昭和化學
- Theobromin, Sigma
- 25% TMAH (tetramethylammonium hydroxide) in MeOH, Aldrich



第三節、試驗儀器

一、脂肪酸分析

- GC / FID : Varian 3400 Gas Chromatograph, Varian, U.S.A.

二、三酸甘油酯分析

- HPLC pump : Spectra System P1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Barrington, IL, U.S.A.
- Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) : Alltech 2000, Alltech Assoc. Inc., Deerfield, IL, U.S.A.

三、生物鹼測定

- HPLC pump : ConstaMetric 3200, Thermo Instrument Systems Inc., Riviera Beach, FL, U.S.A.
- HPLC detector : SpectroMonitor 3200, Thermo Instrument Systems Inc., Riviera Beach, FL, U.S.A.

四、原花青素分析

- HPLC pump : Model 582, Esa Inc., Boston, MA, U.S.A.
- HPLC detector : L-7455 diode array detector, Hitachi, Tokyo, Japan

五、可可脂 tempering 與結晶變化

- DSC : MSDC 2910, TA Instruments, New Castle, DE, U.S.A.

六、其他儀器設備

- 批式粉碎機 : Braun KSM 2, Kronberg, Germany
- 往復式振盪恆溫水槽 : B603, Firstek Scientific, Taipei, Taiwan
- 離心機 : AVANTI J-20, Beckman Inc., Taipei, Taiwan

第四節、試驗方法

一、可可豆小量發酵最適條件之探討

(一) 新鮮可可豆前處理

將新鮮的可可莢果剖開，取出其中仍被白色果肉包覆的可可豆（圖 3-2(a)、(b)），為避免受到雜菌干擾發酵，先進行簡單食品殺菌的步驟：以 300 mg/L 之二氧化硫水溶液 $\text{SO}_2(\text{aq})$ （每公升蒸餾水加入 521 g 之 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5(\text{s})$ ）稍微浸泡後瀝乾，收集簡單殺菌後的可可豆立即進行發酵。

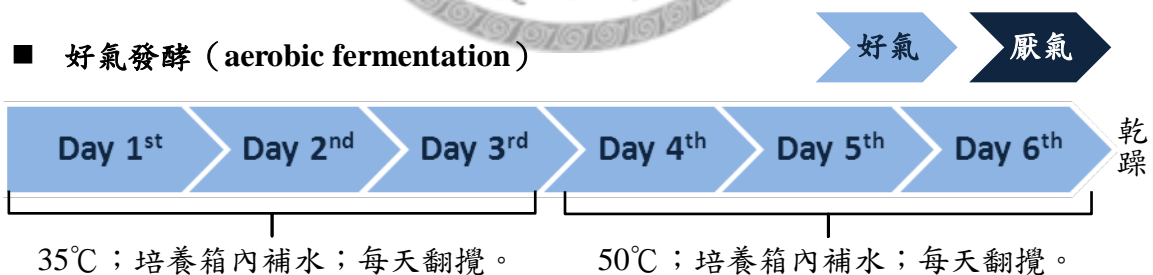
(二) 可可豆小量發酵

本試驗參考 Wadsworth 與 Howat (1954) 研究之結論，固定以下因素：

(1) 高濕度，(2) 溫度以圖 2-11 為基準，前三天維持約 35°C 、後三天維持在 50°C ，(3) 為防止 CO_2 過多以及豆堆中心溫度過高，固定每天翻攪一次。

本研究為探討發酵期間的需氧程度，分為好氣發酵與兼性厭氣發酵兩種方式進行，發酵條件參考圖 3-1。

■ 好氣發酵 (aerobic fermentation)



■ 兼性厭氣發酵 (facultative-anaerobic fermentation)

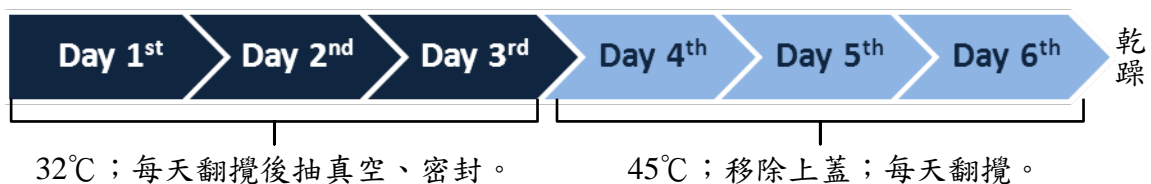


圖 3-1. 好氣發酵與兼性厭氣發酵之條件

Fig. 3-1. Conditions of aerobic fermentation and facultative-anaerobic fermentation

1. 好氣發酵

取一不鏽鋼盤，放置尼龍網與其邊緣作固定，尼龍網需架高不可與盤底接觸，以利於可可豆排水。將殺菌處理後的新鮮可可豆直接堆放在尼龍網上，整個不鏽鋼盤用覆以紗布的塑膠籃罩住，幫助濕度的保持，亦可防止過多水氣凝結於盤中。整個裝置放入培養箱中進行小量的 heap 發酵法（圖 3-2(c)、(d)）。為維持環境的濕度，培養箱中須再放置水盤。發酵期間如有感染黴菌的情形需去除之，並噴以 75% 酒精。

2. 兼性厭氣發酵

取大小適中的真空乾燥皿，下方空間盛水，放入有孔洞的中隔板後，將經過殺菌處理的可可豆堆放於隔板上。下方空間盛水有助於高濕度環境的保持，但水面不可太接近隔板，以免浸濕可可豆。堆放可可豆時，將靠近乾燥皿邊緣處的可可豆堆高，中心處凹陷，呈漏斗狀的擺放可使發酵較均勻，且散熱較容易。接著即蓋上上蓋，邊緣用石蠟膜密封，再由抽氣嘴抽氣，關閉真空閥後亦將抽嘴用石蠟膜密封好，再把整個真空乾燥皿移入培養箱中保溫（圖 3-2(e)、(f)），此時發酵過程中環境呈現缺氧狀態，可可豆在厭氣情形下進行發酵，如此的抽氣密封步驟在每天一次的開蓋翻攪後仍需要重複，厭氣發酵過程共三天；而從第四天（96 小時）開始打開上蓋，使可可豆接觸空氣，進行好氣發酵。由於乾燥皿內的空間較封閉、散熱不易，可可豆堆溫度容易較外界環境為高，故培養箱的溫度需調整，低於目標溫度 3-5°C，使可可豆堆溫度仍保持 35 與 50°C，避免中心溫度過高。

（三） 乾燥

經過為期六天的發酵後，將可可豆移出平鋪於不鏽鋼盤中，放入 55°C 烘箱中，每 24 小時調升 5°C，直到 70°C 不再調整溫度，乾燥時間共約六至七天。由較低溫開始乾燥以延續發酵過程，再緩慢升溫降低可可豆水份。

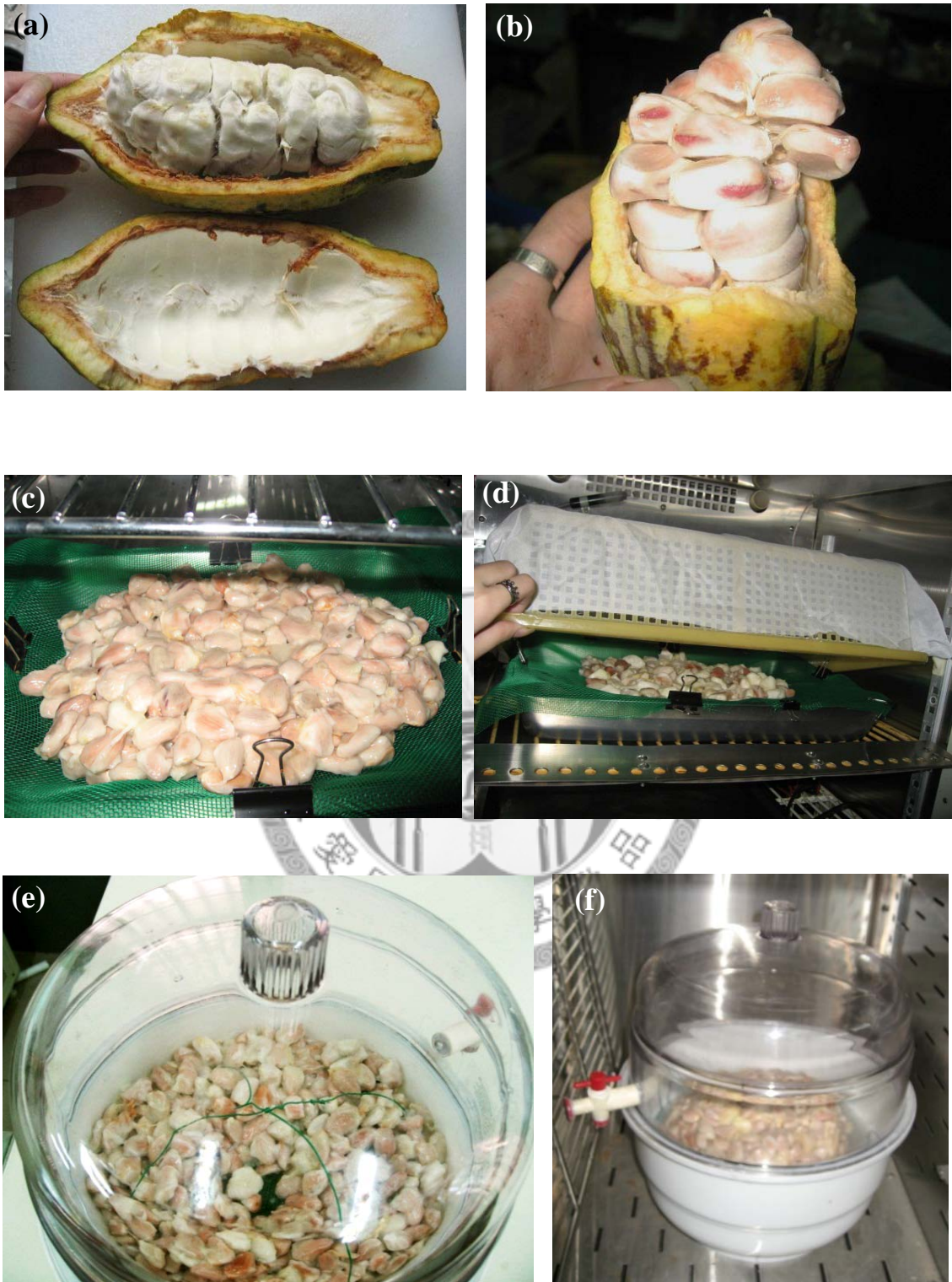


圖 3-2. (a)(b)可可莢果中的新鮮可可豆 (c)(d)可可豆小量好氣發酵 (e)(f)可可豆小量兼性厭氣發酵

Fig. 3-2. (a)(b) Fresh cacao beans in cacao pod (c)(d) Small-scale aerobic fermentation of cacao beans (e)(f) Small-scale facultative-anaerobic fermentation of cacao beans

二、台灣可可與外國可可的成分、化性之比較

(一) 可可脂之化學性質分析

本試驗針對不同可可脂(CB)測定油脂的基本性質、脂肪酸組成以及三酸甘油酯組成。

1. 油脂基本性質

■ 酸價 (acid value, A.V.)

參考中華民國國家標準 CNS3647 「食用油脂檢驗法—酸價之測定」，方法如下。

精秤 CB 樣品 0.5-1 g 於三角瓶中，加入酒精 / 乙酸乙酯(1:1, v/v) 50 mL，滴入 2-5 滴 1% 酚酞指示劑後，以標定過之 0.01 N 氫氧化鉀溶液滴定至粉紅色可維持 10 秒不退色即為滴定終點。另取 50 mL 之酒精 / 乙酸乙酯 (1:1, v/v) 作空白試驗。

計算公式：

$$A.V. \left(\frac{\text{mg KOH}}{\text{g fat}} \right) = \frac{(S - B) \times C \times 56.1}{W}$$

B：空白試驗以氫氧化鉀溶液滴定之體積 (mL)

S：試樣以氫氧化鉀溶液滴定之體積 (mL)

C：氫氧化鉀溶液實際濃度 (N)

W：CB 取樣重量 (g)

■ 皂化價 (saponification value, S.V.)

參考中華民國國家標準 CNS3648 「食用油脂檢驗法—皂化價之測定」，方法如下。

精秤 CB 樣品 1-2 g 於 250 mL 之圓底瓶中，精確吸取 0.5 N 氫氧化鉀酒精溶液 25 mL，迴流冷凝器下加熱 2 小時以確保皂化完全。

取出圓底瓶，待冷卻但未凝成膠狀物前進行滴定，加入 1% 酚酞指示劑 0.5 mL，用已標定過的 0.5 N 鹽酸溶液滴至粉紅色消失。另取 25 mL 之 0.5 N 氫氧化鉀酒精溶液作空白試驗。

計算公式：

$$\text{S.V.} \left(\frac{\text{mg KOH}}{\text{g fat}} \right) = \frac{(B - S) \times C \times 56.1}{W}$$

B：空白試驗以鹽酸溶液滴定之體積 (mL)

S：試樣以鹽酸溶液滴定之體積 (mL)

C：鹽酸溶液實際濃度 (N)

W：CB 取樣重量 (g)

■ 過氧化價 (peroxide value, P.O.V.)

參考中華民國國家標準 CNS3650 「食用油脂檢驗法—過氧化價之測定」，方法如下。

精秤 CB 樣品 2 g 於 250 mL 之三角瓶中，加入冰醋酸 / 正己烷 (3：2，v/v) 50 mL，混合均勻後，再加入飽和之 KI 溶液，搖動混合 1 分鐘，加入 30 mL 蒸餾水停止反應。加入 0.5 mL 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液及 0.5 mL 澱粉指示劑後，用已標定過的 0.05 N 硫代硫酸鈉溶液緩緩滴定至藍色消失為止。另取 50 mL 之冰醋酸 / 正己烷 (3：2，v/v) 作空白試驗。

計算公式：

$$\text{P.O.V.} \left(\frac{\text{meq}}{\text{Kg fat}} \right) = \frac{(S - B) \times C \times 1000}{W}$$

B：空白試驗以硫代硫酸鈉溶液滴定之體積 (mL)

S：試樣以硫代硫酸鈉溶液滴定之體積 (mL)

C：硫代硫酸鈉溶液實際濃度 (N)

W：CB 取樣重量 (g)

2. 可可脂淨化

由於 CB 樣品為直接榨油收集，並未經過精製處理，為使脂肪酸與三酸甘油酯組成分析更精確，需先去除色素等較極性的雜質。

取 10 g 烘乾的 silica gel 以 100 mL 之 n-hexane 膨潤後，充填於管柱中，並將 n-hexane 液面調整至接近 silica gel 表面。取 5 g 之 CB 樣品溶於 10 mL n-hexane，緩緩倒入填充好的管柱中，待樣品皆進入 silica gel 後再以 n-hexane 流洗，以圓底瓶收集流洗液。收集完畢後，再將其減壓濃縮去除 n-hexane，即可得到淨化後的 CB。

3. 脂肪酸組成

(1) 甲基酯化 (methylation)

使用 TMAH 法進行脂肪酸甲基酯化反應。

取 0.1 g 淨化的 CB 於試管中，加入 3 mL 乙醚與 0.5 mL 之 25% TMAH / MeOH 試劑，反應 10 分鐘後加水 3 mL 停止反應。取上層有機相至樣品瓶，加入無水硫酸鈉除水後以 GC 分析之。

(2) 氣相層析 (GC) 分析

甲基酯化後的樣品利用 GC/FID 進行脂肪酸組成分析，使用管柱與分析條件如下：

- Column : WCOT fused-silica 30 m x 0.53 mm, coating with CP WAX 52CB, DF=1.0 μ m, Varian, U.S.A.
- Carrier gas : H₂, 4 mL/min ▪ FID gas : H₂, 30 mL/min
- Air, 300 mL/min
- Injector temperature : 240°C ▪ Detector temperature : 260°C
- Oven temperature program : 根據 CB 脂肪酸組成，調整升溫

程序如下表 3-1。

表 3-1. 脂肪酸分析之溫度變化程序

Table 3-1. Temperature program of fatty acid analysis

Temp. (°C)	Holding time (min)	Rate (°C/min)
50	4	30
170	0	3
195	0	2
210	0	10
230	10	

層析圖譜以 SISC 軟體進行分析 (SISC Chromatography data system, SISC Inc., Taipei, Taiwan)。

4. 三酸甘油酯組成

以體積比為 1 : 9 (v/v) 的 isopropanol / acetonitrile 溶劑與淨化之 CB 配製成 2% 的 CB 溶液，以 HPLC / ELSD 進行分析，使用管柱與分析條件如下：

- Column : Develosil C30-UG-5, Nomura Chemical Co., Ltd., Japan
- Mobile phase : (A) Acetone (B) Acetonitrile
- Flow rate of mobile phase : 1.2 mL/min
- Mobile phase gradient : 如下表 3-2。

表 3-2. TAG 分析之移動相流洗梯度

Table 3-2. Mobile phase gradient of TAG analysis

Time (min)	A%	B%
0	70	30
40	50	50
42	10	90

- Detector evaporation temperature : 70°C
- Flow rate of gas (air) : 2 L/min

層析圖譜以 SISC 軟體進行分析。

由於 TAG 種類繁多，標準品價格高昂且種類較少，因此，參考 El-Hamdy 與 Perkins 之方法，以達到不需使用眾多標準品即可確認 TAG 種類的目的。先將 TAG 依照其組成的脂肪酸計算 ECN (equivalent carbon number) 與 TCN (theoretical carbon number)，而滯留時間與 TCN 會呈現線性相關，可繪製標準曲線，將其他未知 TAG 波峰的滯留時間代入後可得其對應之 TCN，再由 TCN 回推可能之 TAG 為何 (El-Hamdy and Perkins, 1981)。ECN 與 TCN 計算方式如下：

$$ECN = CN - 2 \times DB$$

$$TCN = ECN - U_0$$

CN：TAG 之脂肪酸基的總碳數

DB：TAG 脂肪酸基中所含有的總雙鍵數

U_0 ：脂肪酸基不飽和鍵影響 TAG 極性之常數

Oleic acid (O, 18:1) 為 0.6

Linoleic acid (L, 18:2) 為 0.7

(二) 可可粉機能性成分分析

1. 可可粉前處理

不同來源的乾燥可可粉 (CP) 先以批式粉碎機研磨後過篩 (40 mesh)，再以 5 倍 (v/w) n-hexane 萃取三次以去除油脂，抽氣過濾去除 n-hexane 後，將殘餘物抽乾、粉碎、研磨後備用。

2. 生物鹼含量

(1) 生物鹼萃取液之製備

參考 Risner (2008) 的萃取方法，取 0.02 g 經前處理的 CP 與 5

mL 的 HPLC 移動相溶劑 MeOH / H₂O / Acetic acid (20 : 78 : 2, v/v) 加至 16 mL 試管中，在 60°C 水浴中振盪萃取 20 分鐘，再將之以 3000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液即為生物鹼萃取液。由於總體積較小，定容會造成的誤差較大，且此萃取液無需其他處理，直接以 HPLC 分析，故收集的上清液不經定容的步驟。

(2) HPLC 分析

生物鹼萃取液經 0.45 μm 濾膜過濾後，以 HPLC 進行分析。

HPLC 分析使用管柱與條件如下：

- Column : Waters Atlantis dC₁₈, 5 μm (φ4.6 × 250 mm)
- Mobile phase : MeOH / H₂O / Acetic acid (20 : 78 : 2, v/v)
- Detection wavelength : 275 nm

層析圖譜以 SISC 軟體進行分析。

另以外標準品製作檢量線定量，分別用 20% 甲醇配製 20、40、60、80 mg/L 之 theobromine 與 caffeine 標準品溶液，經 HPLC 分析後計算波峰積分面積對濃度的標準曲線公式：

$$\text{Theobromine 濃度 (mg/L)} = 3.3208 \times 10^{-10} \times \text{波峰積分面積}$$

$$\text{Caffeine 濃度 (mg/L)} = 3.6878 \times 10^{-10} \times \text{波峰積分面積}$$

3. 總多酚含量

先萃取 CP 中的總多酚。取 0.5 g 經前處理之 CP 加入 50 mL 80% 甲醇 (100 倍萃取)，室溫下振盪萃取四小時，過濾後將上清液定容至 50 mL，即為 CP 之總多酚萃取液。由於總多酚萃取液仍需要再進行下述的呈色反應，為了後續推算 CP 中的總多酚含量更為精確，萃取液的定容有其必要性。

總多酚含量的測定使用 Folin-Ciocalteu 呈色法 (Singleton et al.,

1999)。取 20 μL 的 CP 總多酚萃取液，再加入 1.58 mL 蒸餾水與 100 μL 之 Folin-Ciocalteu 試劑，混勻並靜置 8 分鐘，其後添加 300 μL 之 20% $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ ，靜置反應兩小時後，測定 765 nm 之吸收值。另以 50、100、250、500 mg/L 之 gallic acid 標準品溶液，重複上述步驟，將反應後測得之吸光值與其濃度繪製標準品檢量線（見圖 4-7）：

$$\text{Gallic acid 濃度 (mg/L)} = 100 \times \text{OD}_{765 \text{ nm}} - 5.9$$

CP 的總多酚含量以 GAE (gallic acid equivalent) g/kg 為單位表示。

4. 原花青素組成

(1) 原花青素萃取液之製備

參考 Counet 與 Collin (2003) 的方法並加以修飾，如圖 3-3 之流程。取 2 g 去脂 CP，以 80 mL 之丙酮 / 水 / 醋酸 (70 : 28 : 2, v/v) 於室溫下萃取隔夜，離心分離上清液與沉澱物，沉澱物再以 20 mL 之萃取溶劑在室溫下進行第二次萃取，3 小時後離心去除沉澱物，將兩次萃取液合併、過濾、並定容至 100 mL，即為 50 倍 (v/w) 之原花青素粗萃液。

粗萃液因含有其他雜質，影響 HPLC 測定，故須以固相萃取加以淨化濃縮，使用 C18 之 cartridge。在進入固相萃取前，先置換萃取液的溶劑，由於原花青素具水溶性，將丙酮去除應能保留於剩餘之水中；減壓去除丙酮之前應先添加蒸餾水約 20 mL，以避免濃縮過程間環境過酸促使原花青素水解。丙酮去除後有部分固體殘留於容器內，則以 5% 甲醇洗之，可溶解者併入萃取液中。C18 cartridge 要以甲醇及蒸餾水預處理，再將置換過溶劑的粗萃液以低於 2 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 5 mL 之甲醇洗出淨化後的原花青素萃取液。

(2) HPLC 分析

淨化後之原花青素萃取液經 0.45 μm 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; Hammerstone et al., 1999)：

- Column：Phenomenex SphereClone 5 μm , normal-phase silica ($\phi 4.6 \times 250$ mm), Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA
- Detection wavelength：280 nm
- Mobile phase：
 - (A) $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O} / \text{Acetic acid}$ (82 : 14 : 2 : 2, v/v)
 - (B) $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O} / \text{Acetic acid}$ (96 : 2 : 2, v/v)
- Flow rate：1 mL/min
- Mobile phase gradient：如下 (表 3-3)

表 3-3. 原花青素分析之移動相流洗梯度

Table 3-3. Mobile phase gradient of procyanidins analysis

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

(三) 可可豆殼機能性成分分析

不同來源的可可豆殼經乾燥後，以批式粉碎機研磨、過篩 (40 mesh)，測定總多酚含量與生物鹼含量，試驗方法同 2.2 小節可可粉之測定方式。

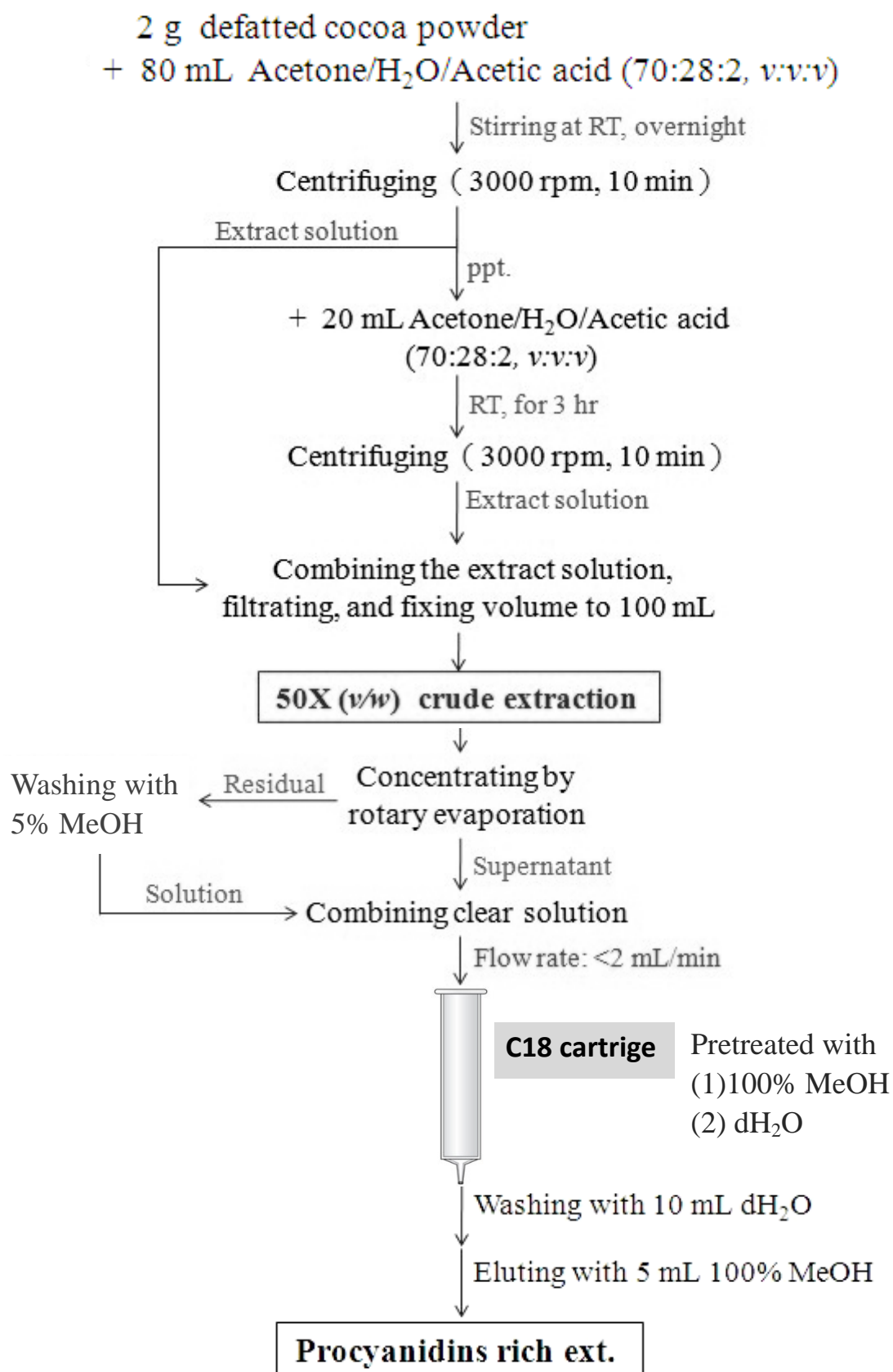


圖 3-3. 原花青素萃取液製備之流程圖

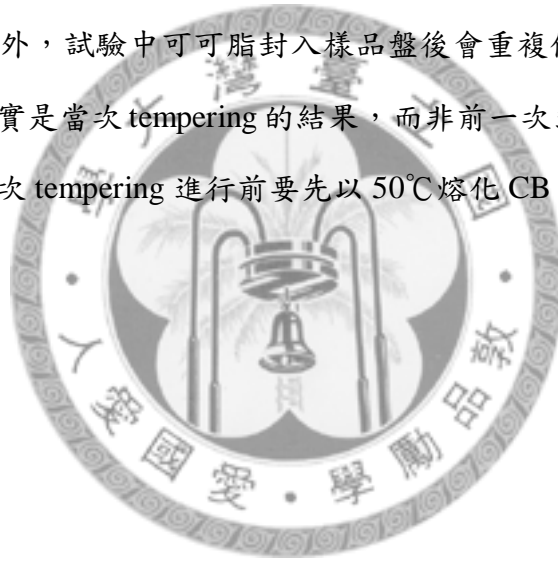
Fig. 3-3. Diagram of preparation of procyanidins extraction

可可脂調溫與油脂結晶變化之關係

精秤約 5 mg 之淨化的台灣可可脂加至樣品盤中，使用 DSC 樣品封裝壓片器密封之。另取一組等重的空樣品盤密封，作參考物。將兩者放入 DSC 樣品槽中，通入 Ar 氣幫助傳熱均勻，設定升降溫程序，程序中包含兩個部分：

- (一) 調溫 (tempering)，詳見結果與討論；
- (二) 熔點之測定；經 tempering 程序後，以 5°C/min 之升溫速率升溫至 45°C 進行熔點測定 (Attama and Mullergoymann, 2006; Schlichter Aronhime et al., 1988)。

最後以 DSC 軟體 (TA Instrument analyzing software, New Castle, DE, U.S.A.) 分析結果圖譜。另外，試驗中可可脂封入樣品盤後會重複使用，為了確保當次分析所得的熔點確實是當次 tempering 的結果，而非前一次或是試驗前保存狀態的記憶效應，在每次 tempering 進行前要先以 50°C 熔化 CB、打散結晶粒子。



第四章、結果與討論

第一節、可可豆小量發酵最適條件之探討

一、發酵過程之比較

可可豆從可可莢果取出後立即進入發酵的步驟，才能確保可可豆的新鮮。莢果的最佳採收時機是取出的可可豆能夠粒粒分明，但尚未到達發芽的階段。若剖開莢果後發現內含已出芽的豆子，代表已經過熟。莢果內側為白色，一旦與空氣接觸會快速褐變（圖 4-1(a)）。

好氣發酵與兼性厭氣發酵的過程中，可以觀察到可可豆變化是不相同的。在一開始（第 0 小時），可可豆外包覆的白色果肉有如同果醬般黏稠的膠質觸感（圖 4-1(b)），並帶有如山竺一類熱帶水果的果香。發酵的前 24 小時內並無明顯變化。

第 48 小時：由於小量好氣發酵的可可豆與空氣有接觸，可可豆水分之減少較兼性厭氣發酵可可豆為多一些，但整體而言，仍屬高水分含量的情況，在此時間點翻攪，可可豆的果肉已有部分呈現果泥的質地（圖 4-1(c)），香氣已稍減，酒精味與些許酸味取而代之，且出現感染黴菌的情形。兼性厭氣發酵可可豆之果肉在此時還保有部分膠質質感，但小部分開始出現果肉稍微凸起之現象（圖 4-1(d)），可能與微生物產氣有關；散發出果肉香氣較好氣發酵可可豆更為濃厚。兩種發酵方式都有取數個可可豆樣品，撥開內部觀察，兩種發酵之可可豆皆有即將出芽的情形，有極少量的可可豆發芽（圖 4-1(e)），此種豆子在最後需要篩選去除（Wadsworth and Howat, 1954）。

第 72 小時：好氣發酵可可豆的果肉都已變薄，可以明顯看出可可豆種皮的紋路，以及隱約可見子葉的顏色，而氣味也更酸並帶有淡淡黴味。兼性厭氣發酵之可可果肉仍一目了然，部分可可豆透出紫紅色（圖 4-1(f)），推測是子葉的色素細胞已經開始被破壞而釋出多酚化合物（包括紫色的花青素），根據文獻指出，如此情形出現時可可豆已逐漸死亡，而此死亡時間點（第 3-3.5 天）也合

乎本計畫之發酵過程 (Kim and Keeney, 1984)。此時兼性厭氣發酵的可可豆散出之酒精氣味與酸味都比好氣發酵強烈。

第 96 至 144 小時 (發酵結束)：兩種發酵方式在此期間都以好氣的方式進行。好氣發酵因為此過程溫度提高，水份降低稍快，可可豆殼顏色逐漸變深，除了黴味外無其他明顯氣味。兼性厭氣發酵含水量稍微降低，外表色澤比好氣發酵可可豆更淺，前段仍帶有些許酒精味，發酵結束時則留有部分果香味。

在第 48 小時好氣發酵可可果肉已經開始失去果膠質感，顯示微生物分解果肉較兼性厭氣發酵快，但由於有黴菌感染，顯示果肉不完全是被酵母菌利用，為較不理想的狀況；氣味已帶有酒精味與酸味，表示仍有進行發酵產生酸和酒精。同一時間，兼性厭氣發酵的可可果肉仍帶有黏稠果膠質地，微生物利用的速度稍慢，由第 72 小時才出現的酒精氣味也符合發酵速度較好氣發酵慢的推論，雖然剛開始發酵較慢，但此時間點其氣味濃厚，推斷其發酵作用比好氣發酵更旺盛。文獻皆指出，可可發酵初期以酵母菌及乳酸菌之厭氣發酵為主，好氣之環境應較不理想，與此時間點的觀察相符合 (Camu et al., 2008; Ardhana and Fleet., 2003)。在一般大量的發酵處理時，溫度會因微生物作用 (主要為醋酸菌) 而自然上升至 45-50°C。小量發酵產生的熱以及堆疊的厚度都不足以促成如此的溫度變化，但在 72 小時打開真空乾燥皿翻攪兼性厭氣可可豆確實有感覺到溫度較前兩天高，而好氣發酵的豆堆在翻攪時並無感到溫度改變，推測原因是在好氣發酵的中後段時期，醋酸菌沒有得到良好發展 (Ardhana and Fleet., 2003)。

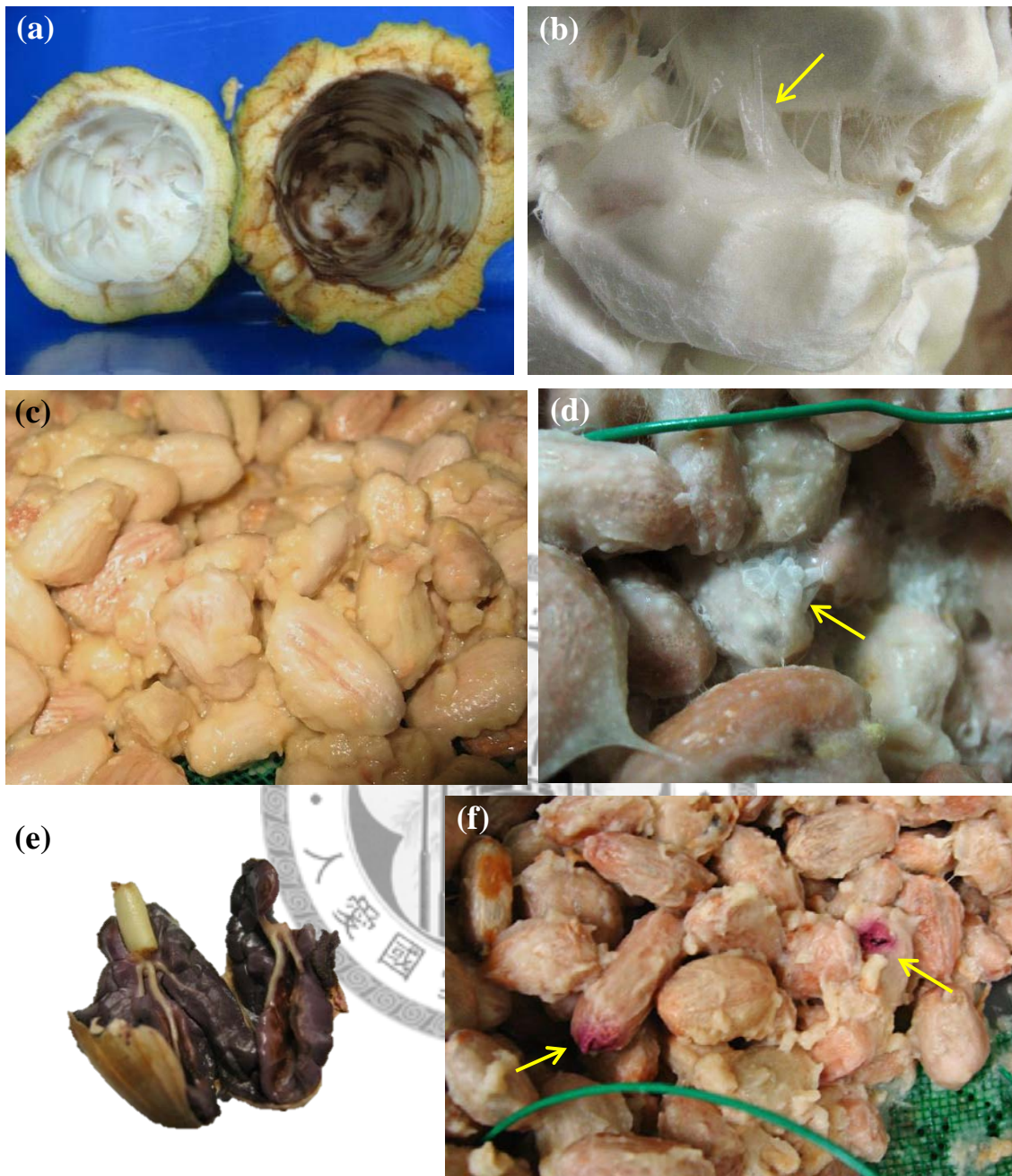


圖 4-1. (a)取出可可豆的莢果內側。左為剖開時呈現白色，右為放置數分鐘後褐變。(b)新鮮果肉黏稠 (c)果肉轉變為果泥質地 (d)果肉出現細微凸起之氣泡 (e)發芽可可豆之子葉內部 (f)兼性厭氣發酵過程中，部分可可豆滲出紫紅色。

Fig. 4-1. (a) The inside of the pod appeared to be originally white when beans were removed (left), and became brown in minutes (right). (b) Fresh mucilage pulp (c) Texture of the pulp became like puree. (d) The pulp was found some bubbles. (e) The inside of a germinating cotyledon. (f) Some cacao beans were observed reddish-purple color during facultative- anaerobic fermentation.

二、兩種發酵可可豆之比較

好氣發酵與兼性厭氣發酵之可可豆所發展出的外觀與氣味都不相同，外觀照片見圖 4-2，並將觀察結果整理於表 4-1。

由圖 4-2 可以發現兩者外觀上的差異很大，由於黴菌感染留下的孢子使好氣發酵可可豆外殼上留有黑灰色，氣味也有發黴味，豆殼本身呈現淺黃褐色，與兼性厭氣發酵的可可豆殼較偏膚粉色有差異。剝開可可豆內部觀察子葉顏色，好氣發酵豆的子葉帶有偏紫的色澤，兼性厭氣發酵豆雖然亦非完美的深咖啡色，但其褐色與前者相較之下帶有紫色的程度很低。新鮮子葉中所含的花青素（anthocyanins）使其呈現葡萄般的紫色，發酵的過程中色素等多酚化合物隨著細胞質從被破壞的細胞中流出，因此，微生物及可可中的酵素能以其為基質進行反應，多酚被氧化或聚合成大分子使子葉轉為褐色。前人研究亦指出紫色的發酵豆發酵不良、風味不佳，本試驗中好氣發酵之子葉帶有紫色顯示其發酵不良，多酚氧化或聚合的比例不高，相形之下，兼性厭氣發酵的效果較好（Camu et al., 2008; Wadsworth and Howat, 1954）。以上結果對應至氣味的比較也能得到相同的結論。

一般在產地進行大量可可發酵時，堆疊厚度足夠，豆堆內部實際上為厭氣環境，也可對應於微生物作用的過程（剛開始為酵母菌與乳酸菌進行厭氣的代謝），但小量發酵無法達成豆堆內部的厭氣環境，藉由本試驗證明發酵前段若無良好的發展，可可豆無法持續理想的發酵狀態，產出的發酵可可豆風味不良；更在試驗中確立了於可可豆發酵的前段需要較厭氣的環境以促成可可豆優良風味的產生。

(a)



(b)



圖 4-2. (a)好氣發酵之可可豆 (b)兼性厭氣發酵之可可豆

Fig. 4-2. (a) Cacao beans of aerobic fermentation (b) Cacao beans of facultative-anaerobic fermentation

表 4-1. 好氣發酵與兼性厭氣發酵可可豆之比較

Table 4-1. Comparison between the cacao beans of aerobic fermentation and facultative-anaerobic fermentation

Methods of fermentation	Aerobic	Facultative-anaerobic
Appearance	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 外殼為淺黃褐色。因過程中會有黴菌生長旺盛的情形，故外殼會帶有灰黑色 ▪ 子葉呈深紫色 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 外殼偏膚粉色，且較乾淨 ▪ 子葉呈褐色
Smell	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 黴味 ▪ 酸味 ▪ 生豆味 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 可可果肉香氣 ▪ 些微可可香

第二節、台灣可可與外國可可的成分、化性之比較

一、可可脂化學性質之比較

(一) 油脂基本性質

將三種可可脂測定油脂基本性質，列於表 4-2。

比對酸價，CB 與其他油脂不同，游離脂肪酸較多，且一般食用油脂生產時會經脫酸等精製處理，但為了保留 CB 獨特的可可香氣，其加工製程並不會進行此類精製處理，因而酸價較一般食用油稍微高，屬正常現象。表 4-2 中，台灣、越南及馬來西亞 CB 之酸價分別為 3.07、2.27 及 1.85 mg KOH/g fat，都在一般可可商品可接受的範圍，惟台灣 CB 酸價稍微偏高。酸價代表油脂的品質，由於台灣 CB 樣品為現成之材料，無法確定其生產後的存放條件，故僅能推測酸價較高可能肇因於未存放在最佳的條件下。再參考台灣可可脂之過氧化價為 5.46 meq/kg fat，亦偏高，可得到相同的推論。CB 中含有脂溶性抗氧化物，在食用油中，相對而言，安定性較佳，但仍須注意存放條件，應密封後放置於低溫環境。不過鮮少文獻提供 CB 的過氧化價數據，以及相關的研究，但一般共同的認知是品質優良的油脂其過氧化價應越低越好，而當過氧化價高於 10 meq/kg fat 則認為油脂已劣變。皂化價三者無明顯差異，都屬於正常值範圍 (Foubert, 2003)。

表 4-2. 台灣、越南及馬來西亞可可脂之油脂基本性質

Table 4-2. Chemical values of cocoa butters from Taiwan, Vietnam and Malaysia

Cocoa Butter	Acid Value (mg KOH/g fat)	Saponification Value (mg KOH/g fat)	Peroxide Value (meq/kg fat)
CB _T	3.07 ± 0.16	186 ± 2.5	5.46 ± 0.39
CB _V	2.27 ± 0.02	185 ± 0.5	1.90 ± 0.84
CB _M	1.85 ± 0.01	188 ± 2.9	5.75 ± 0.62

CB_T, CB_V, and CB_M are referred to the cocoa butters from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

(二) 脂肪酸組成

以 GC / FID 分析脂肪酸組成，來自不同產地的三種 CB 之脂肪酸組成並無顯著差異，故層析圖譜擇一展示供作參考，圖 4-3 為台灣 CB 之氣相層析圖譜。三種 CB 脂肪酸組成則整理於表 4-3。

圖 4-3 的上圖中，有三根最高的波峰，即 CB 中含量最高的三種脂肪酸。含量由多至少依序為：硬脂酸 (18:0, S)、油酸 (18:1, O) 以及棕櫚酸 (16:0, P)。將 GC 圖尺度範圍縮小後可以辨認數根波峰，與前人研究 CB 之脂肪酸組成對照後將各波峰代表的脂肪酸標出，其中較特別的是其他植物油脂中少見的 17:0，在 CB 相關文獻中也比較少被提及，本試驗 CB 樣品中含量約 0.2-0.3%，符合前人研究之結果 (0-0.4%)。CB 中的飽和脂肪酸含量較高，不飽和脂肪酸以油酸和亞麻油酸 (18:2, L) 為主。整體而言，台灣、越南與馬來西亞的 CB 脂肪酸組成與前人研究無異 (Foubert, 2003; Lipp and Anklam, 1998; El-Saied et al., 1981)。

值得探討的是，Chaiserri 與 Dimick 研究指出，可可生長時環境若出現較低之氣溫，則 CB 中不飽和脂肪酸比例會較高，例如巴西的可可主產區巴伊亞州 (Bahia) 和一般可可產地相比，屬於較高緯度區域，均溫偏低 (約 23.5 °C)，產自當地的 CB 即含有 36% 的油酸，不飽和脂肪酸比例明顯偏高；他們也提到部分西非國家因為日夜溫差大，入夜後會有低於 20°C 之低溫，也可能是部分西非可可的 CB 含有高於 34% 的油酸之原因；而多數東南亞生產可可的地區則為全日高溫、年溫差不大，推論此為東南亞可可之 CB 中不飽和脂肪酸稍微偏低的原因 (Chaiserri and Dimick, 1989)。此現象以飽和脂肪酸對不飽和脂肪酸之比值 (sat./unsat.) 作比較會更顯著。此試驗三個 CB 產地緯度之比較：馬來西亞緯度最低，越南之地理位置橫跨緯度較多，但平均仍低於台灣之緯度，台灣則位於較高緯度。試驗結果顯示，來自越南與馬來西亞的 CB 不飽和脂肪酸比例確實有較低的情形，此二地區都位於東南亞，

可能如同 Chaiser 與 Dimick 所提出的地理位置與氣溫有關連；台灣 CB 的不飽和脂肪酸之比例接近 35%，為本試驗中比例最高者，但不確定與西非或美洲地區比是否較高；但巴西的巴伊亞州緯度較台灣低，其 CB 的不飽和脂肪酸比例卻達到 40%，遠超過台灣 CB，推測可能是屏東全年最低溫仍比當地之最低溫高，屏東全年均溫 25°C 也較當地均溫高之故。



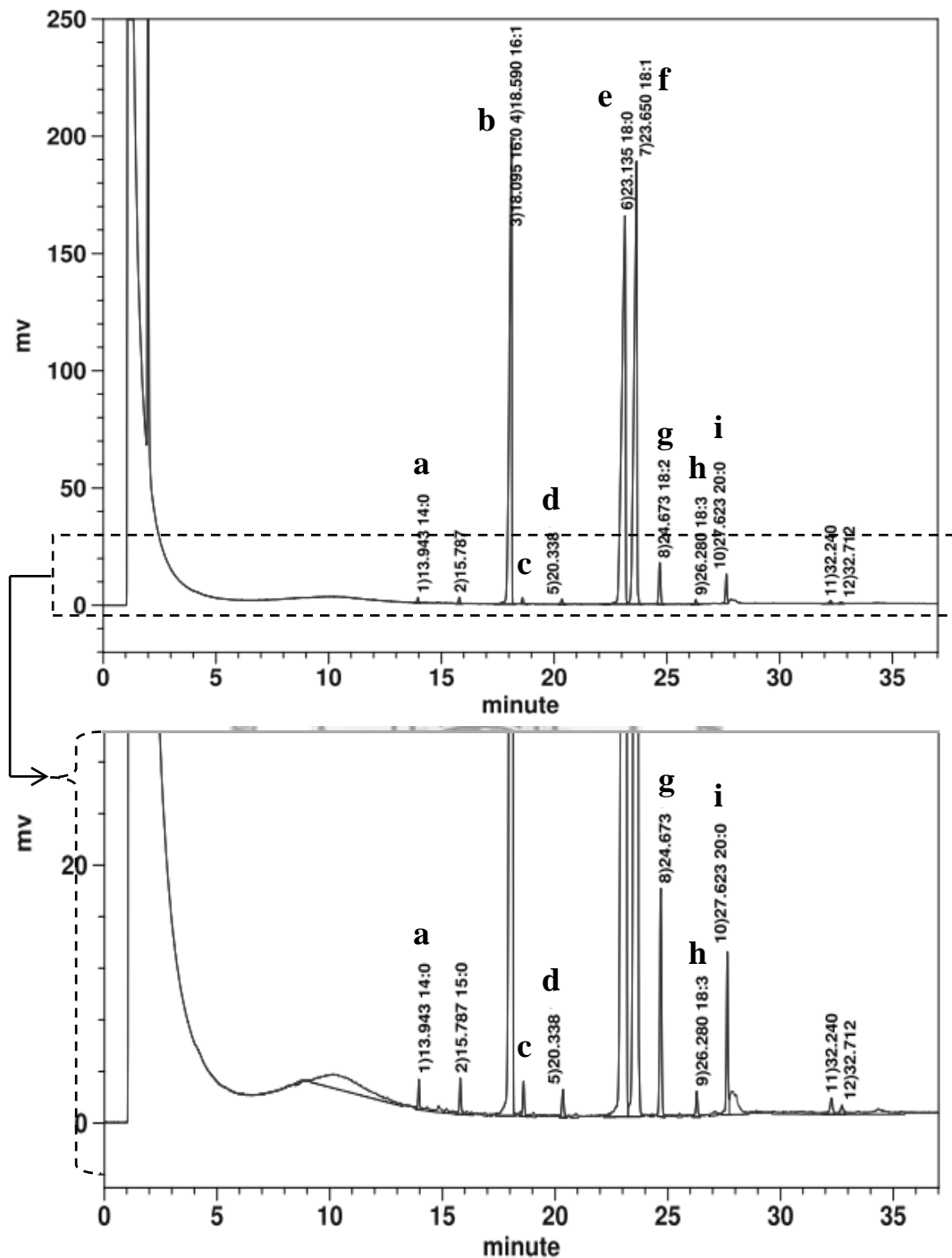


圖 4-3. 台灣可可脂 (CB_T) 之脂肪酸分析層析圖譜，上圖為全尺度，下圖為小尺度放大。波峰 a：14:0，波峰 b：16:0，波峰 c：16:1，波峰 d：17:0，波峰 e：18:0，波峰 f：18:1，波峰 g：18:2，波峰 h：18:3，波峰 i：20:0

Fig. 4-3. Chromatogram of fatty acid analysis of CB_T with full scale (top) and detail view (bottom). Peak a: 14:0, peak b: 16:0, peak c: 16:1, peak d: 17:0, peak e: 18:0, peak f: 18:1, peak g: 18:2, peak h: 18:3, peak i: 20:0.

表 4-3. 台灣、越南及馬來西亞可可脂之脂肪酸組成 (area %)

Table 4-3. Fatty acid composition (area %) of cocoa butters from Taiwan, Vietnam and Malaysia

Fatty acid	14:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	Unsatur. FA	Satur. FA
		(P)			(S)	(O)	(L)	(A)		Unsatur. FA	
CB_T	0.13	24.2	0.23	0.22	37.6	32.8	1.65	0.17	1.41	34.7	1.83
CB_V	0.09	28.1	0.28	0.26	37.3	30.2	1.86	0.13	1.32	32.3	2.07
CB_M	0.11	26.3	0.21	0.23	38.6	30.7	2.10	0.12	1.04	33.0	2.01

CB_T, CB_V, and CB_M are referred to the cocoa butters from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

(三) 三酸甘油酯組成

三酸甘油酯 (TAG) 以 HPLC / ELSD 分析，來自不同產地的 CB 之 TAG 組成並無明顯不同，擇一圖譜展示 (圖 4-4)，三種 CB 之三酸甘油酯組成整理於表 4-4。

圖 4-4 中有三根明顯的波峰，即為 CB 中最多的三種單不飽和 TAG，含量由多至少依序為：POS、SOS 和 POP，在預試驗中，將此三根波峰的滯留時間 (RT) 對應理論碳數 (TCN) 作圖可得一標準線，並參考文獻算出其他 CB 中含有之 TAG 的 TCN (表 4-5)，利用標準線回推其 RT，可以推測出所有波峰代表的 TAG。之後進行 TAG 的分析時，波峰出現的排序理論上不會有所變動。但此時會發現 TAG 的分析僅能以 TCN 間接推測，而不同 TAG 卻有機會算出相同的 TCN 值，因此，分析 TAG 有部分限制，若兩種 TAG 具有相同或是很接近的 TCN，則可能會存在於圖譜上的同一根波峰，例如 PLS 與 POP 的 TCN 分別為 47.3 與 47.4，因此，圖 4-4 中 POP 的波峰可能包含 PLS 的訊號，不過由於 CB 中 PLS 僅微量存在，故估計波峰面積為 POP 之訊號。如上述方式對照後，將 TAG 標示於圖 4-4 中，而 TCN 值最大的 SOA 則因圖譜後段雜訊較多而無法切確辨認訊號 (El-Hamdy and Perkins, 1981)。

對照前人的研究發現，本試驗 TAG 組成之比例高低趨勢如同文獻數據，但是 POS 較文獻數據高，POP 較低，可能的原因是試驗儀器對不同成分的靈敏度有差異，但目前在各種儀器中，以 ELSD 分析 TAG 具有較多優勢，其整體靈敏度高，分析 TAG 造成的損耗小，故仍以 ELSD 進行本試驗的分析，惟無法針對各種 TAG 作訊號靈敏度的校正。本試驗主要目的是為了比較台灣 CB 與他國 CB 有無顯著不同，因此，三種 CB 皆以同一儀器進行評比仍能了解其之間的差異。

整體而言，三種 CB 的 TAG 組成趨勢沒有明顯差異，但回顧脂肪酸分析時探討不飽和脂肪酸比例，學者也指出，可可生長時有較低溫的環境，除了含有較多不飽和脂肪酸，亦可發現雙不飽和 TAG 比較多。CB 中含有

的雙不飽和 TAG 以 POO 與 SOO 為主，在台灣、越南及馬來西亞 CB 的分析結果中（表 4-4），確實發現東南亞兩國的 CB 之雙不飽和 TAG 較台灣的 CB 低，此結果與脂肪酸分析結果相符，推測與可可生長環境之溫度有關。CB 中的 TAG 組成和 CB 結晶性質有關，雙不飽和 TAG 較高則油脂較軟；另外，有研究指出 SOS 是 CB 能否快速長晶的重要因素，在一定的含量範圍內，SOS 比例越高對巧克力製作以及成品越有利（Gilabert-Escriva et al., 2002; Chaiseri and Dimick, 1995; Chaiseri and Dimick, 1989）。



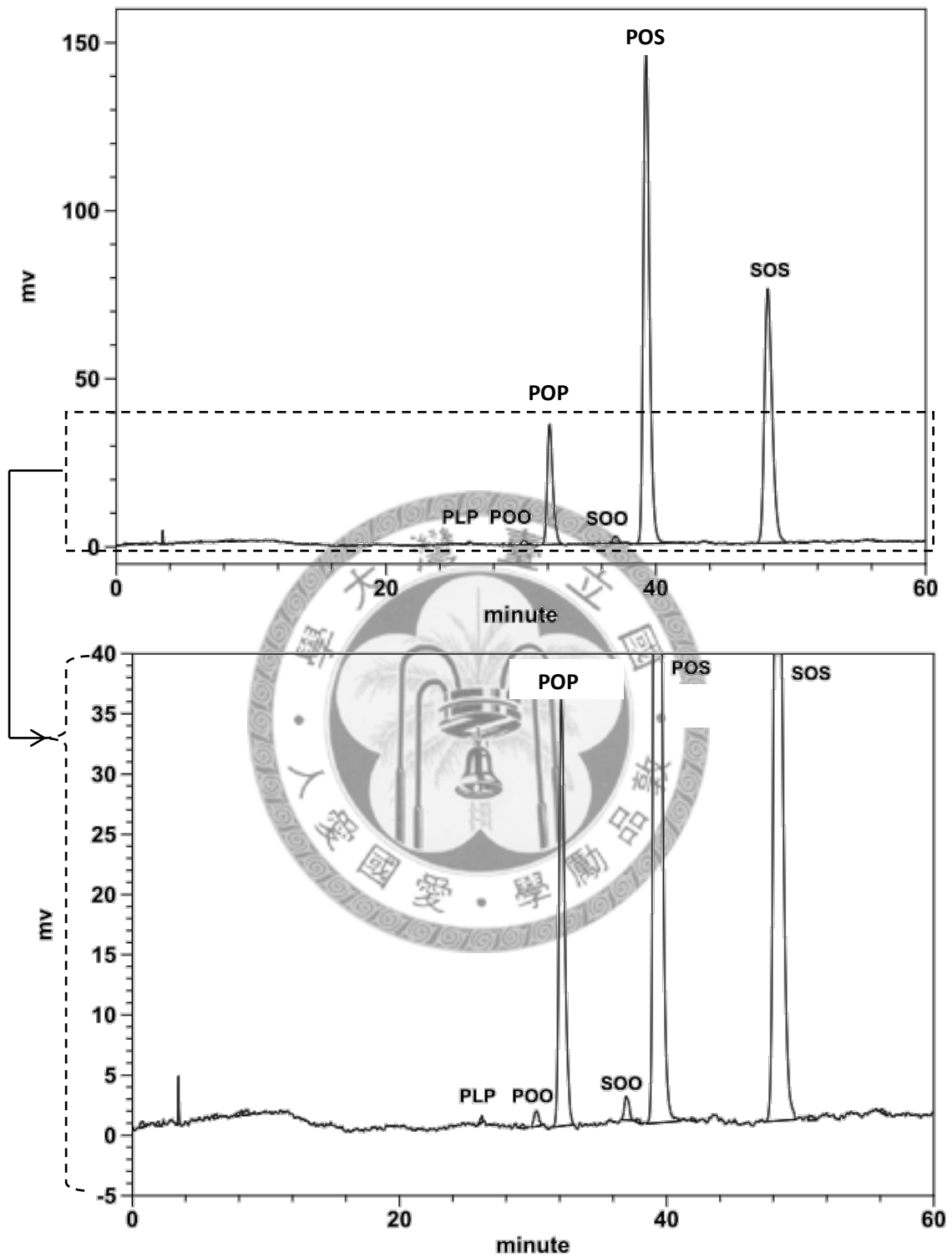


圖 4-4. 馬來西亞可可脂 (CB_M) 之三酸甘油酯 HPLC 圖譜，上圖為全尺度，下圖為小尺度放大

Fig. 4-4. HPLC chromatogram of triacylglycerols of CB_M with full scale (top) and detail view (bottom).

表 4-4. 台灣、越南及馬來西亞可可脂之三酸甘油酯組成 (area %)

Table 4-4. Triacylglycerol composition (area %) of cocoa butters from Taiwan, Vietnam and Malaysia

TAG	POS	SOS	POP	SOO	POO	PLP	di-unsat. TAG
CB _T	52.2	33.9	12.0	0.85	0.56	0.13	1.40
CB _V	54.0	31.7	13.1	0.40	0.31	0.11	0.71
CB _M	52.7	34.5	11.5	0.54	0.36	0.08	0.90

CB_T, CB_V, and CB_M are referred to the cocoa butters from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

表 4-5. 可可脂中三酸甘油酯的理論碳數 (TCN)

Table 4-5. Theoretical carbon number (TCN) of triacylglycerols in cocoa butter

TAG	PLP	POO	PLS	POP	SOO	SLS	POS	SOS	SOA
ECN	46	48	48	48	50	50	50	52	54
TCN	45.3	46.8	47.3	47.4	48.8	49.3	49.4	51.4	53.4

二、可可粉中機能性成分之比較

(一) 生物鹼含量

來自台灣、越南及馬來西亞去脂可可粉 (CP) 的生物鹼含量分析，包括可可鹼及咖啡因，HPLC 圖譜擇一示於圖 4-5，結果示於圖 4-6。

與前人的研究比較後，本試驗針對三種 CP 測定可可鹼與咖啡因的含量皆落在正常範圍內。實際上，咖啡因的含量在各試驗樣品中並無差異，與文獻的數據也相當近似，顯示咖啡因在可可豆中的含量不易受到加工或產地等因素影響。相形之下，可可鹼含量的範圍較廣，在本試驗的結果中呈現於 14-28 g/kg 之間，且以馬來西亞的 CP 含量最高 (27.7 g/kg)，越南的次之 (16.0 g/kg)，台灣的最低 (13.9 g/kg)。由於可可鹼屬於安定的化合物，且目前並無相關文獻記載可可之產地與可可鹼含量的關係，故無法確定造成如此差異的原因；惟前人提到發酵的過程會使可可鹼降低 25-30%、發酵的時間點、以及品系的不同會有不同含量的生物鹼 (如 Criollo 品系可可豆的總生物鹼含量較低)，由此推測含量差異可能與發酵和品系有關。為了確認是否僅有上述因素影響，另以台灣發酵可可豆直接研磨去脂，測得可可鹼含量為 28.3 g/kg，對照前述現成的台灣 CP 可可鹼含量 (13.9 g/kg)，推論後者經榨油加工的高溫可能使可可鹼受到破壞，但對咖啡因則沒有影響。

儘管含量有所差異，將可可鹼含量對咖啡因含量的比值 (T/C) 算出，台灣、越南及馬來西亞分別為 7.28、7.56 及 12.44，則仍在 Zoumas 等人研究結果的範圍內 (2.5-23)，由此可見可可鹼在 CP 中並無相當穩定的含量標準。此一比值 (T/C) 也被 Brunetto 等學者認為與基因型有相關，目前相關研究尚在進行中。可可鹼的存在會增添產品的苦味，對風味有所影響，若將馬來西亞可可作成商品，將是三者中苦味最濃者 (Camu et al., 2008; Brunetto et al., 2007; Meyer et al., 1996; Zoumas et al., 1980; Timbie et al., 1978)。

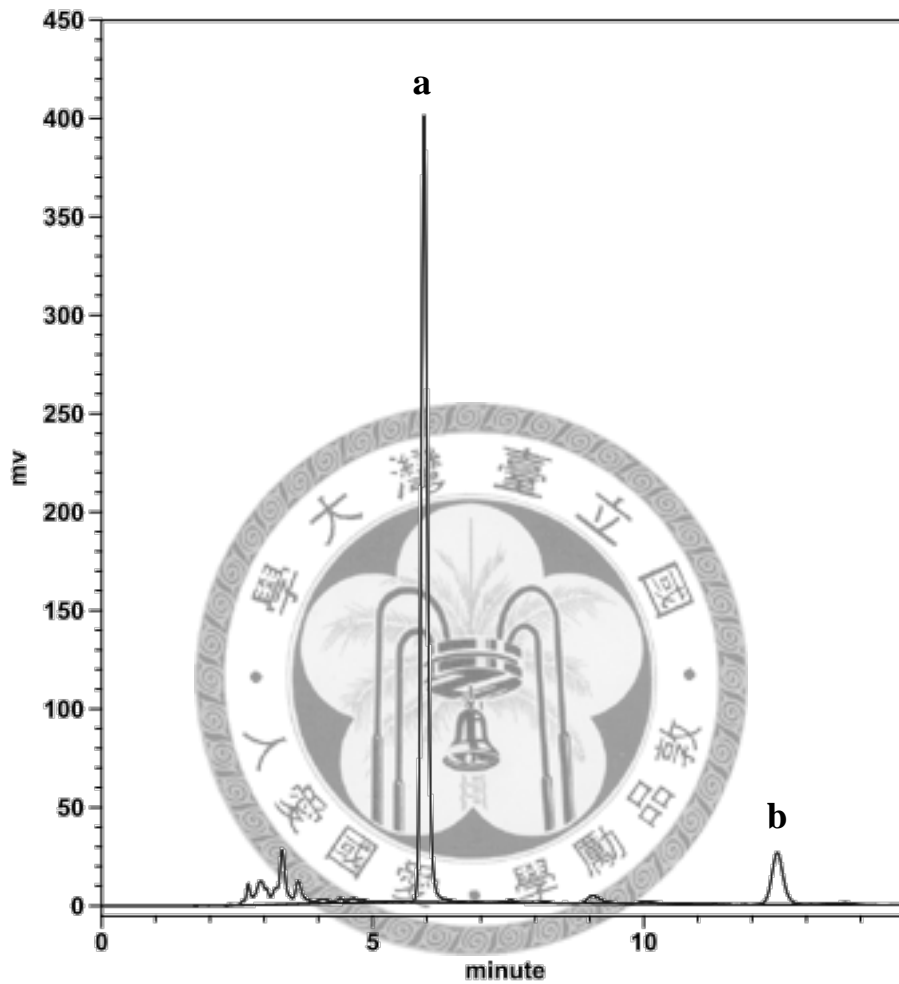


圖 4-5. 台灣可可粉 (CP_T) 之生物鹼分析層析圖譜；波峰 **a**：可可鹼，波峰 **b**：咖啡因

Fig. 4-5. Chromatogram of alkaloids analysis of CP_T. Peak **a**: Theobromine, peak **b**: Caffeine.

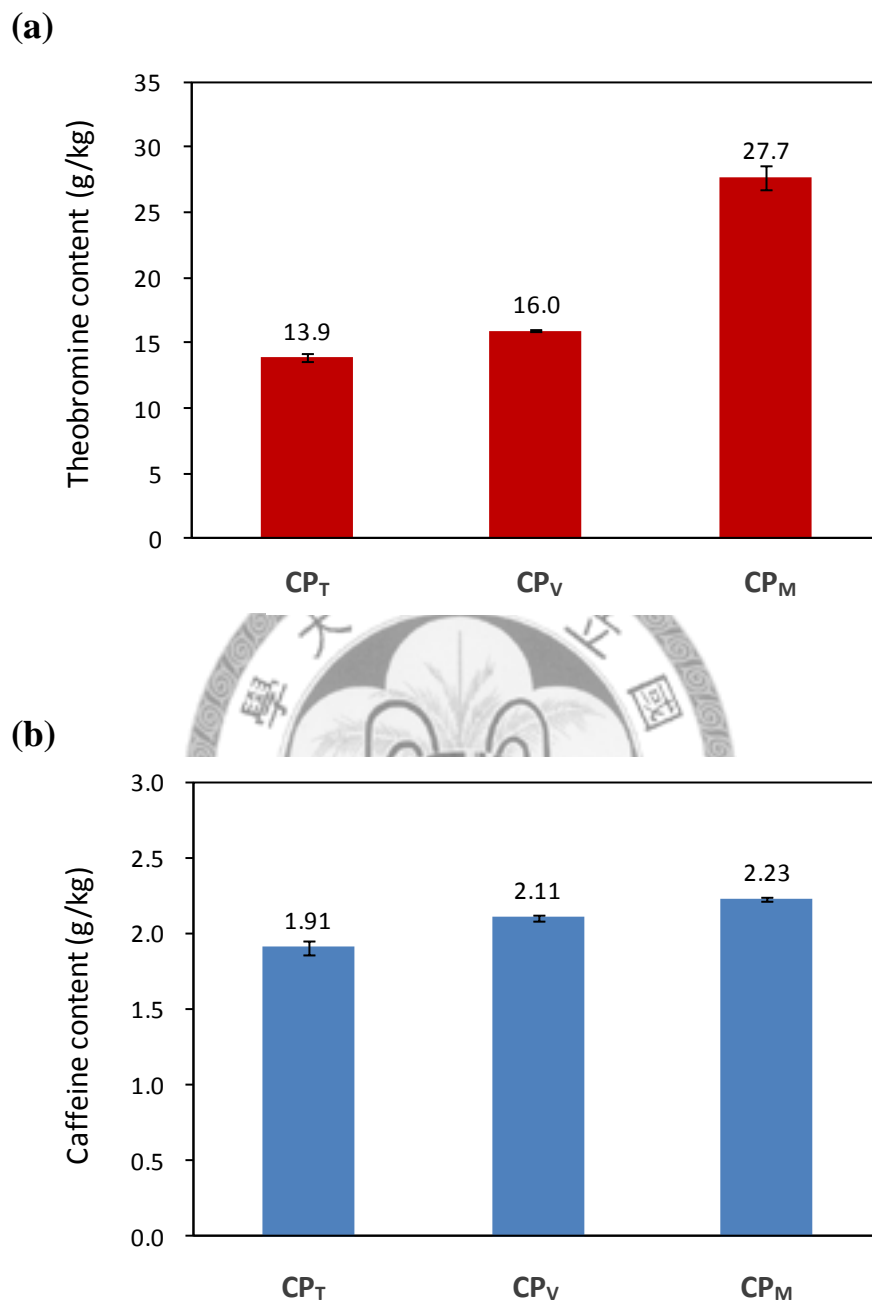


圖 4-6. 台灣、越南及馬來西亞可可粉之 (a)可可鹼含量 和 (b)咖啡因含量

Fig. 4-6. (a) Theobromine contents and (b) Caffeine contents of cacao powders from Taiwan, Vietnam and Malaysia. CP_T, CP_V, and CP_M are referred to the cocoa powders from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

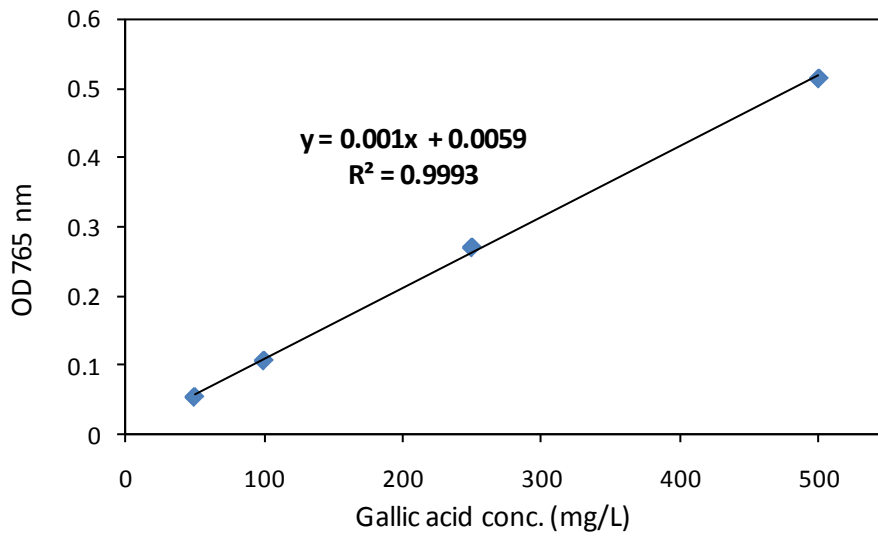
對於茶鹼 (theophylline) 在圖譜中雖有微弱訊號，但因低於偵測極限而不列入分析結果中，對照文獻也有相同的情形，由於可可中茶鹼含量很低而有如此現象 (Risner, 2008; Gurney et al., 1991)。

(二) 總多酚含量

以 Folin-Ciocalteu 呈色法分析台灣、越南及馬來西亞去脂 CP 的總多酚含量，以 gallic acid 為標準品繪製標準檢量線如圖 4-7(a)， R^2 值為 0.9993，為可信賴之檢量線；總多酚分析結果如圖 4-7(b)所示。

檢視本試驗結果，總多酚含量在 CP 中差異頗大，尤其以越南 CP 之含量最高 (66.3 GAE g/kg, GAE = gallic acid equivalent)，甚至可達台灣 CP (29.6 GAE g/kg) 的兩倍。但參考 Miller 等人 (2008) 的研究，確認本試驗結果仍屬於一般 CP 之總多酚含量範圍。本試驗的樣品皆未經過鹼處理，因此，以天然 CP 而言，台灣 CP 的總多酚含量偏低，台灣 CP 與 CB 一樣都是現成樣品，無法得知原來的存放條件，僅能推論此結果有可能肇因於儲存條件不夠完善。如以健康為取向，總多酚含量越高、人體攝取到的抗氧化物質也越多，但過高總多酚含量也可能表示發酵品質不良。越南 CP 含有 66.3 GAE g/kg 的總多酚，並未超過前面提到的 10%，其發酵品質可被視為可接受之品質 (Miller et al., 2008; Wollgast and Anklam, 2000)。

(a)



(b)

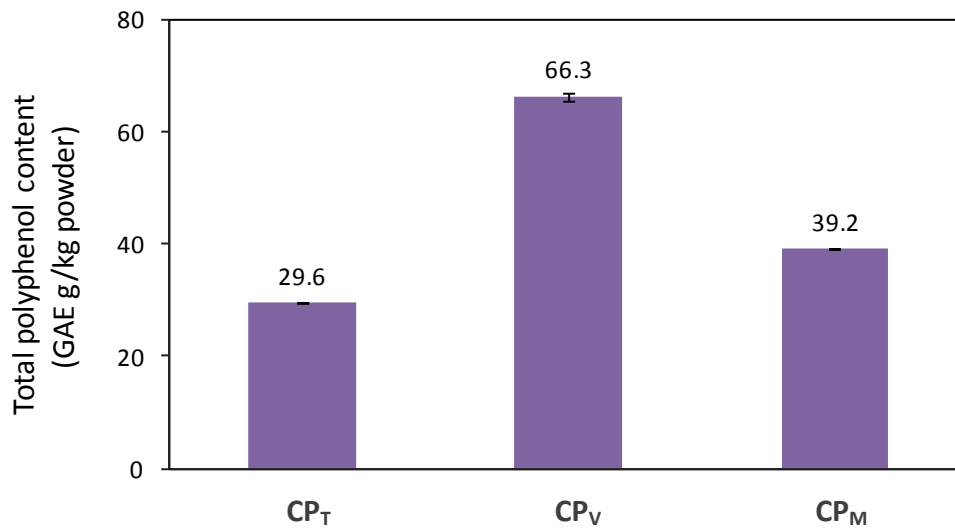


圖 4-7. (a) 總多酚含量之標準檢量線 (b) 台灣、越南及馬來西亞可可粉之總多酚含量

Fig. 4-7. (a) Calibration curve of total polyphenol content (b) Total polyphenol contents of cocoa powders from Taiwan, Vietnam and Malaysia. CP_T, CP_V, and CP_M are referred to the cocoa powders from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

(三) 原花青素組成

可可中最主要的多酚類物質為原花青素 (procyanidins)，約 20 年前此事被證實後，許多學者遂投入可可之原花青素的研究。但原花青素由一群寡聚體或多聚體所組成，儘管可可中的原花青素幾乎都是以 epicatechin 為單體組成，針對每一種分子都使用標準品實有執行上的困難。

本試驗參考 Adamson 等人 (1999) 與 Hammerstone 等人 (1999) 的研究方法，使用正相 HPLC 以二氯甲烷配合甲醇為移動相作梯度流洗。剛開始就遇到瓶頸，後續再參考 Counet 與 Collin (2003) 的固相萃取 (solid phase extraction)，發現以此方式去除雜質以後即可出現與文獻中類似的層析圖譜 (圖 4-8) (Porter et al., 1991)。

由於標準品較為昂貴，本研究以其他試驗確認圖中之波峰代表的物質。得到此圖譜後，先與前人研究之圖譜比對，再利用半製備型 HPLC (Pump: Intelligent HPLC pump PU-2087, JASCO, Tokyo, Japan. Detector: Intelligent PU-2075 UV/Vis, JASCO, Tokyo, Japan) 蒐集每個波峰的流出液，進行 LC-MS (Finnigan LXQ MS, Thermo Finnigan, San Jose, CA., U.S.A.) 的分析，以作為每個波峰代表之化合物的依據。另外，也針對每個波峰作全波長掃描，確認與原花青素之全波長圖譜相同。將各波峰代表的原花青素標示於圖 4-8。

各種原花青素，以不同數目的單體組成，將台灣、越南及馬來西亞的分析結果以相對含量整理於圖 4-9，從二至六聚體的訊號都可明顯辨認，且一般常見的寡聚體都以六個以下的單體為主，故整理時也計算至六聚體。參照美國農業部 (USDA) 之資料庫，可發現 CP 商品中原花青素含量與組成差異甚大，例如七個樣品中，二聚體含量就出現 26.6-1381.0 mg/100 g 如此廣的範圍，其二聚體：三聚體：四到六聚體 (dimers : trimers : 4-6mers) 含量比例為 1.15:1.00:3.29，顯示二聚體含量最高，而四到六聚體總和約為二聚體的三倍，本試驗的三個樣品中以馬來西亞 CP 最符合此趨勢，越南 CP 四聚體的相對含量明顯較高，而台灣 CP 的二聚體比例較高，故四到六聚體總量

僅約二聚體的兩倍。又參考 Gu 等人 (2002) 的研究，可可未發酵直接凍乾後分析原花青素含量，其中六聚體是寡聚體中含量最高者，四聚體次之，此結果與前述可可粉商品有落差，推斷主因為發酵時多酚化合物的改變。因此，本試驗中三者有落差，最主要的因素仍為發酵，其次才是品系差異，但此落差屬正常現象，畢竟發酵期間多酚化合物的變化有太多機制，大分子原花青素會裂解、小分子會聚合。目前多數學者認為二到三聚體為人體有效性較佳的原花青素，台灣 CP 在本試驗中顯示其二到三聚體相對含量較高，可視為三者中機能性成分較好的 CP (USDA, 2004; Gu et al., 2002; Wollgast and Anklam, 2000)。另外，進行原花青素萃取液之安定性試驗，在甲醇中、4°C 下放置 50 天，圖譜仍然不變，顯示原花青素低溫保存於甲醇中，其安定性佳。



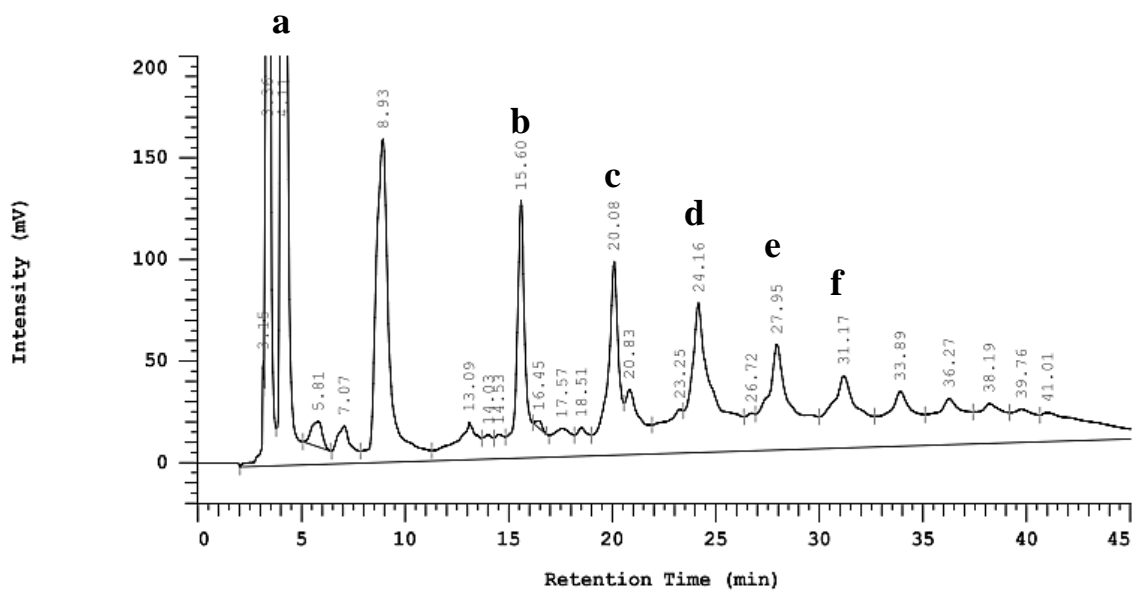


圖 4-8. 可可粉原花青素分析 HPLC 圖譜。波峰 a：單體，波峰 b：二聚體，波峰 c：三聚體，波峰 d：四聚體，波峰 e：五聚體，波峰 f：六聚體，依此類推

Fig. 4-8. HPLC chromatogram of procyanidins analysis of cocoa powder.

Peak a: monomer, peak b: dimer, peak c: trimer, peak d: tetramer, peak e: pentamer, peak f: hexamer, and so on.

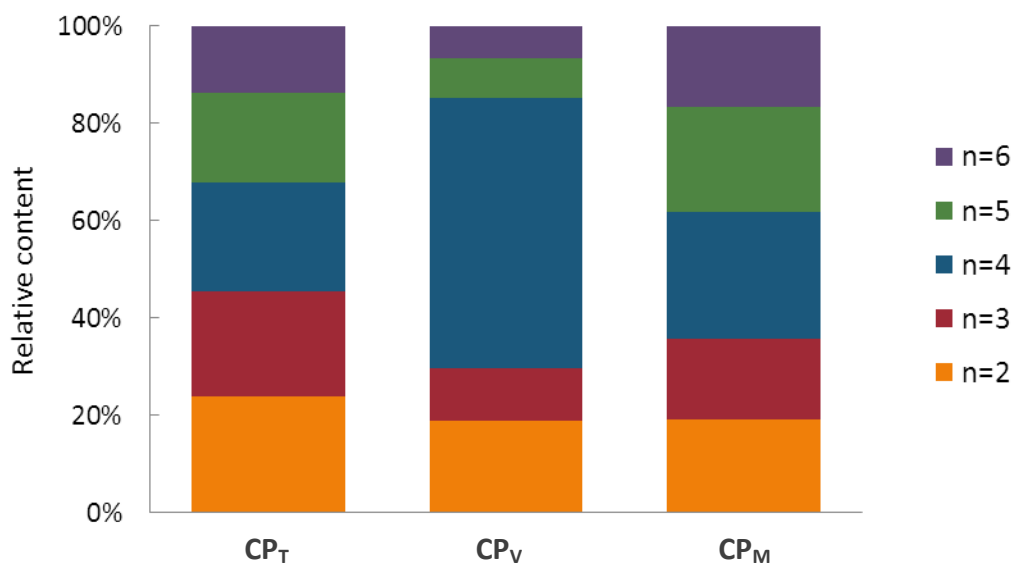


圖 4-9. 原花青素在台灣、越南及馬來西亞可可粉中之相對含量

Fig. 4-9. Relative contents of procyanidins in cocoa powders from Taiwan, Vietnam and Malaysia. CP_T, CP_V, and CP_M are referred to the cocoa powders from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

三、可可豆殼中機能性成分之比較

可可豆殼 (CS) 為可可加工過程中最主要的副產物，過去在產地對 CS 的應用多以飼料、堆肥為主，近年來 CS 被發現其中可可鹼的含量最高可超過 1%，而可可鹼對許多動物而言代謝困難、恐具有毒性，遂逐漸不再作為飼料之用 (Eteng et al., 1997)。台灣如有機會發展可可種植，產量亦難以與西非、中南美或東南亞並論，而副產物 CS 產量將更低，其應用有待另闢途徑。在西班牙已有人將 CS 代替茶葉作為飲料原料，本試驗針對 CS 中的生物鹼與總多酚兩項機能性成分之含量進行分析，以期了解台灣 CS 應用於機能性飲料食品的潛力 (Belitz and Grosch, 1988)。

(一) 生物鹼含量

來自台灣、越南及馬來西亞可可豆殼 (CS) 的生物鹼含量分析，包括可可鹼及咖啡因，結果見圖 4-10。

可可鹼的含量，在台灣、越南及馬來西亞的 CS 中分別為 8.71、8.21 及 5.75 g/kg，此結果與在 CP 中的結果有相反的趨勢，台灣 CS 最高、馬來西亞最少，而在 CP 中卻是台灣最少、馬來西亞最高，為一個有趣的現象。在發酵後期，除了多酚化合物以外，生物鹼也會滲出子葉細胞，往可可豆表面移動，但在發酵的前一、兩天卻是果肉中的生物鹼先往子葉移動，因而取不同發酵程度的可可豆與其豆殼分析，可發現子葉中生物鹼的含量先增後減、豆殼中含量先增加、減少、增加再減少的情形，就是因生物鹼於果肉和子葉間擴散時都會經過 CS，正因如此，發酵的程度與天數都會造成可可鹼含量變動。馬來西亞的 CP 與 CS 之可可鹼含量總和為三者最高，除了可能與發酵有關外，亦有可能為品系不同之故；同理，台灣與越南的 CP 及 CS 可可鹼總和較低，也可能是發酵中流失或是此二者本為同品系 (Brunetto et al., 2007)。

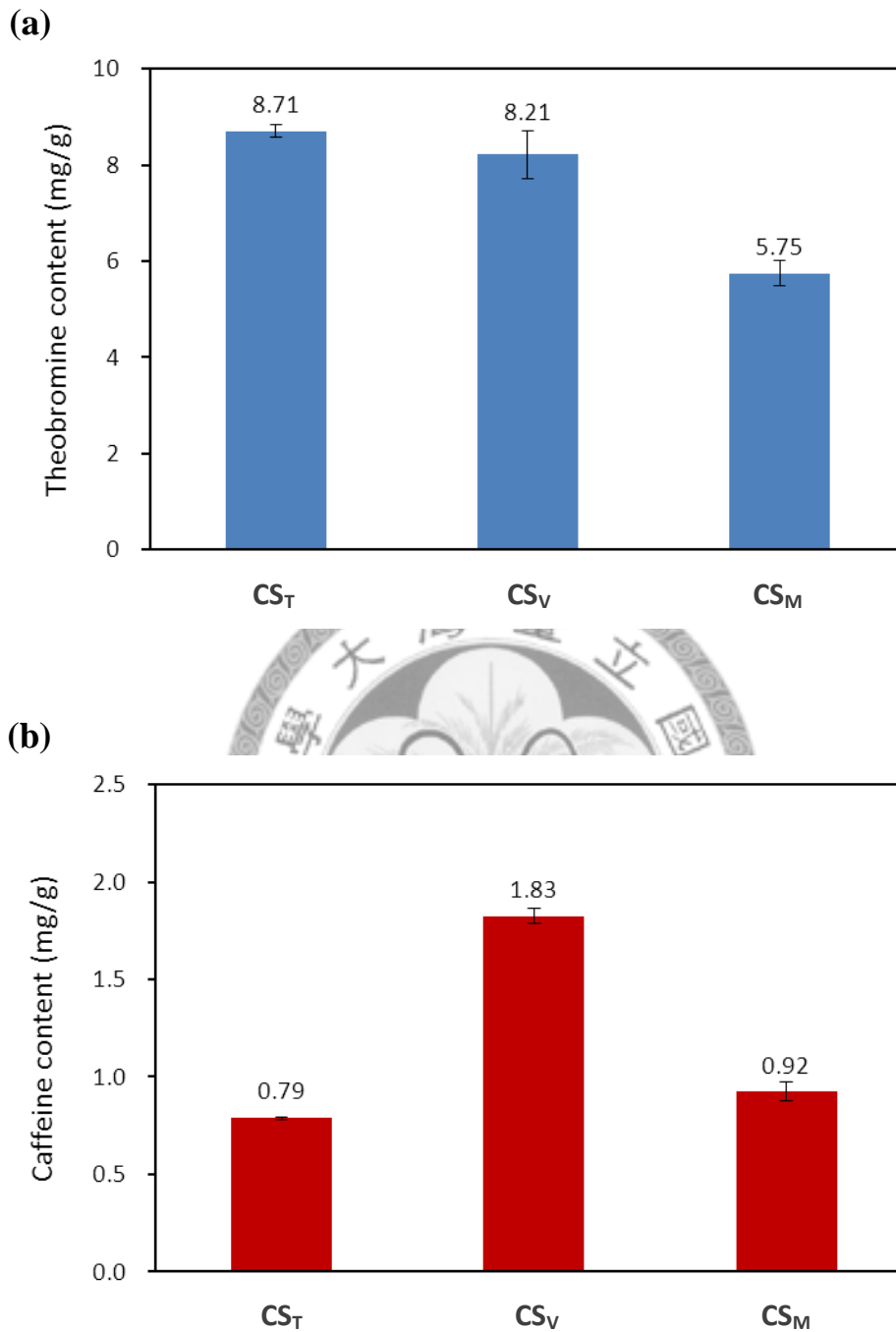


圖 4-10. 台灣、越南及馬來西亞可可豆殼之 (a)可可鹼含量 和 (b)咖啡因含量
Fig. 4-10. (a) Theobromine contents and (b) Caffeine contents of cacao shells from Taiwan, Vietnam and Malaysia. CS_T, CS_V, and CS_M are referred to the cacao shells from the beans of Taiwan, Vietnam, and Malaysia, respectively.

Gurney 等人 (1991) 的研究測得 CS 中含有 9.53 g/kg 之可可鹼，本試驗中台灣與越南的可可鹼含量接近此結果，但 Arlorio 等人 (2005) 則分析出接近 20 g/kg 的可可鹼，推論是萃取方法的不同所致。本研究和 Gurney 等人皆使用熱水萃取，而 Arlorio 等人則是利用超臨界 CO₂ 流體萃取；過去文獻以溶劑或是熱水萃取之數據都大約為 10 g/kg，CS 中可能確實含有近 20 g/kg 的可可鹼，但需以 CO₂ 超臨界流體才能萃取完全，且本試驗目的是針對 CS 應用於飲料的潛力進行探討，如有機會將 CS 發展為簡單的沖泡飲品，熱水萃取的分析較接近實際應用時的含量，故選擇此方式進行分析。台灣、越南及馬來西亞 CS 之咖啡因的含量分別為 0.79、1.83 及 0.92 g/kg，與文獻指出 CS 中含 1.80 g/kg 的咖啡因相比，台灣與馬來西亞 CS 之咖啡因含量偏低，但整體而言，CS 中咖啡因含量並不高，對於其應用於飲料或食品方面並無太大的影響 (Arlorio et al., 2005; Gurney et al., 1991; Kim and Keeney, 1984; Timbie et al., 1978)。

(二) 總多酚含量

以 Folin-Ciocalteu 呈色法分析台灣、越南及馬來西亞去脂 CS 的總多酚含量，以 gallic acid 為標準品繪製標準檢量線 (同 CP 之總多酚含量檢量線，圖 4-6(a))；總多酚分析結果見圖 4-11。

台灣、越南與馬來西亞 CS 中之總多酚含量分別為 7.71、7.41 及 4.99 GAE g/kg，對照 Arlorio 等人 (2005) 之結果相對偏低，比較有可能的原因是可可豆脫殼後並未立刻對 CS 進行研磨，雖然放置乾燥櫃中仍有氧化之虞，且 CS 中所含油脂酸價較高，安定性原本就比 CP 差。因此，若要將 CS 應用於食品，需注意安定性與食用期限等相關問題。

整體而言，台灣 CS 的可可鹼含量並未與前人研究有明顯落差，且咖啡因含量稍低，雖然總多酚含量稍低，仍具有未來發展為機能性飲品的潛力。

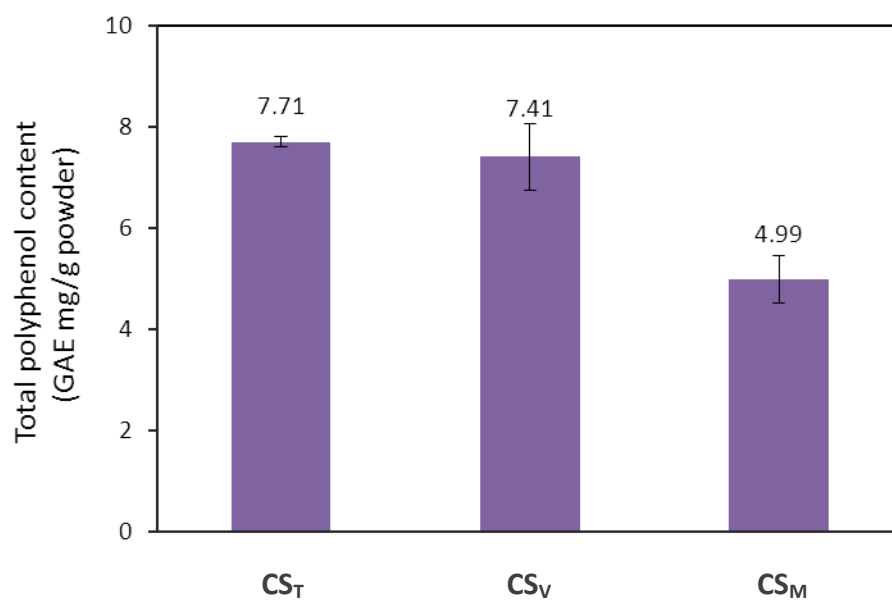


圖 4-11. 台灣、越南及馬來西亞可可豆殼之總多酚含量

Fig. 4-11. Total polyphenol contents of cocoa powders from Taiwan, Vietnam and Malaysia

第三節、可可脂調溫與油脂結晶變化之關係

本試驗以 DSC 的升降溫程序模擬可可脂 (CB) 的調溫 (tempering) 的情形，改變 tempering 的條件，利用熔點分析觀察油脂結晶變化。故 DSC 溫度程序分為 tempering 及熔點測定兩部分。在本試驗中，tempering 要探討的因素有：

- (一) 降溫速率，
- (二) Tempering 維持之高低溫度，
- (三) Tempering 的次數。

CB 進行 tempering 的目的是為了加快 β 型結晶生成、提高其比例，了解上述因素對 CB 之 β 型結晶形成之影響為試驗主要目的。

測定熔點以判別結晶型態，參考表 2-6 中所列 CB 各晶型之熔點。

一、建立 β 型結晶形成之模式控溫程序

由於 tempering 的目的是為了快速增加 β 型結晶，為了後續的試驗，須先確立能夠產生 β 型結晶的基本升降溫程序，並制定為本試驗的模式程序。能夠產生 β 型結晶，才能探討其生成與前述因子的關係。

首先參考巧克力加工的 tempering 過程，由高溫（本研究為 50°C ）降至 $24^{\circ}\text{C} \rightarrow 28^{\circ}\text{C} \rightarrow 24^{\circ}\text{C} \rightarrow 28^{\circ}\text{C} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$ ，每個溫度皆維持 15 分鐘，升降溫速率固定為 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ； 28°C 是參考 β' 型結晶完全熔化的溫度、 24°C 在有助於 β 型結晶生成的溫度範圍（關於維持溫度的因素將於本節第三小節探討）。但以上程序的結果只得到 α 或 β' 型結晶（圖 4-12）（Afoakwa et al., 2007; 顏, 2007; Stapley et al., 1999）。

爾後將次數由前述的兩次升降增加至三次甚至四次，或是改變升降溫的速率，或是延長各溫度的 holding time，或是稍微調整維持之高溫與低溫，熔點的測試結果仍然只有 β' 型結晶的增減，並無 β 型結晶的出現（結果皆近似於圖 4-12）。

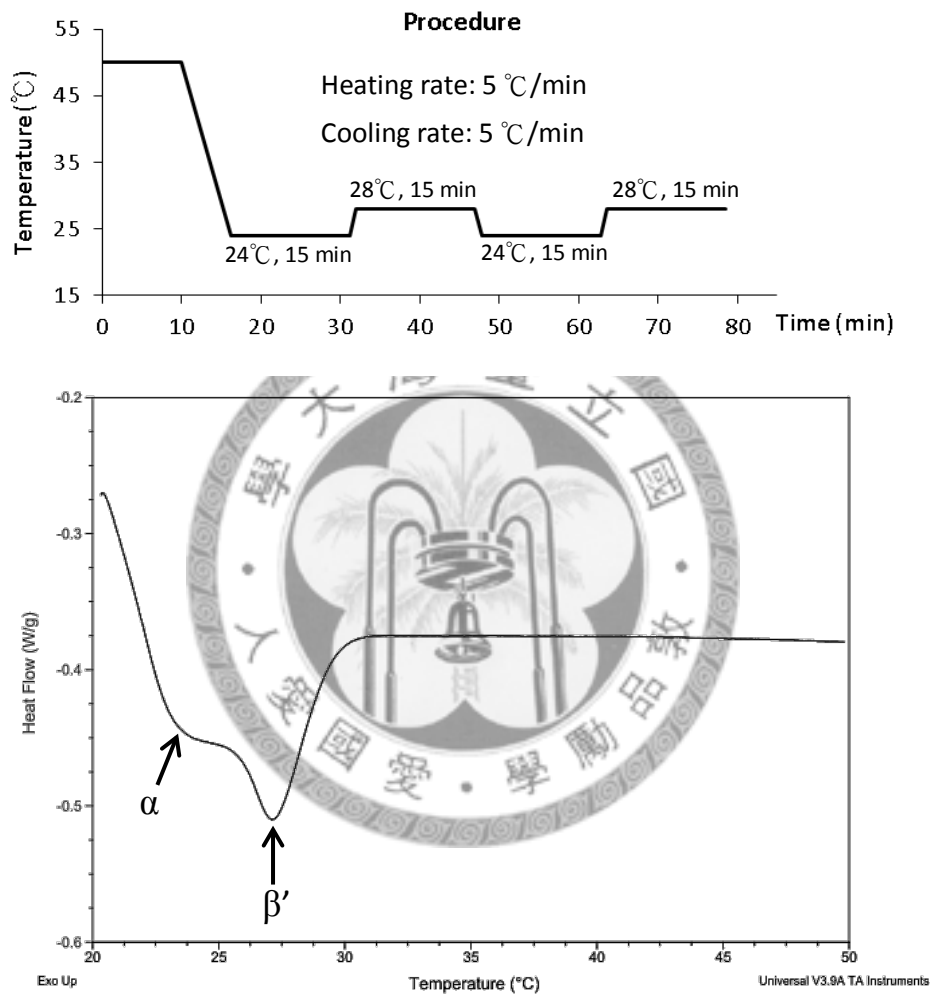


圖 4-12. 參考巧克力調溫程序，未出現 β 型結晶

Fig. 4-12. There was no β polymorph through the traditional procedure of chocolate tempering.

探討原因，認為程序的最開始，為了去除記憶效應而使用的高溫，確實將所有結晶粒子打散，分子需要放熱及時間重新排列，此過程與實際巧克力的製作不同，在實作時並不會將整個巧克力糊融化至打散所有結晶的程度。假設真的去除記憶效應，所有分子在降溫過程會緩慢重新排列，最先生成 γ 與 α 型，再慢慢排列成 β' 型，但此時時間不夠長或溫度不夠低，來不及繼續排列成 β 型結晶，溫度就再次升溫到 28°C ，因此，才剛形成的 β' 型結晶又快速因環境的溫度達到其熔點而回到液態。在毫無 β 型結晶粒子做晶種的情況下，進行第二次的升降溫並無任何實質效果，更遑論第三次或第四次。故修改程序，使 β 型結晶能夠生成以繼續 tempering 的試驗是此步驟的課題。

在參考多篇研究並將程序加以修飾且歷經諸多嘗試後，採取先由高溫以 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 之速率快速降溫至 26°C → 以 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 緩慢降溫至 20°C 並維持 30 分鐘，以期能在這段時間內排列出 β 型結晶，為接下來的 tempering 預備晶種。圖 4-13 為加入上述步驟後再以 $28^{\circ}\text{C} \rightarrow 24^{\circ}\text{C} \rightarrow 28^{\circ}\text{C} \rightarrow 24^{\circ}\text{C}$ 升降溫度，所得之結果，明顯看出 β' 型之波峰的右方出現一個小波峰，熔點約為 30.4°C ，即為理想的 β 型結晶。若將低溫維持的時間縮短，成晶時間不夠，測試結果並不理想，故仍維持在 30 分鐘 (Schlichter Aronhime et al., 1988)。

以上程序為本試驗之結晶的控溫模式。不過經過嘗試，將結晶溫度由 20°C 改為 18°C 後，得到更多的 β 型結晶。因此，本試驗提供 β 型結晶之最佳模式程序應為：

高溫 (50°C) $\xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 26°C $\xrightarrow{0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 18°C , 30 min $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 調溫程序

後續利用本模式繼續探討各種因素對 β 型結晶之影響。

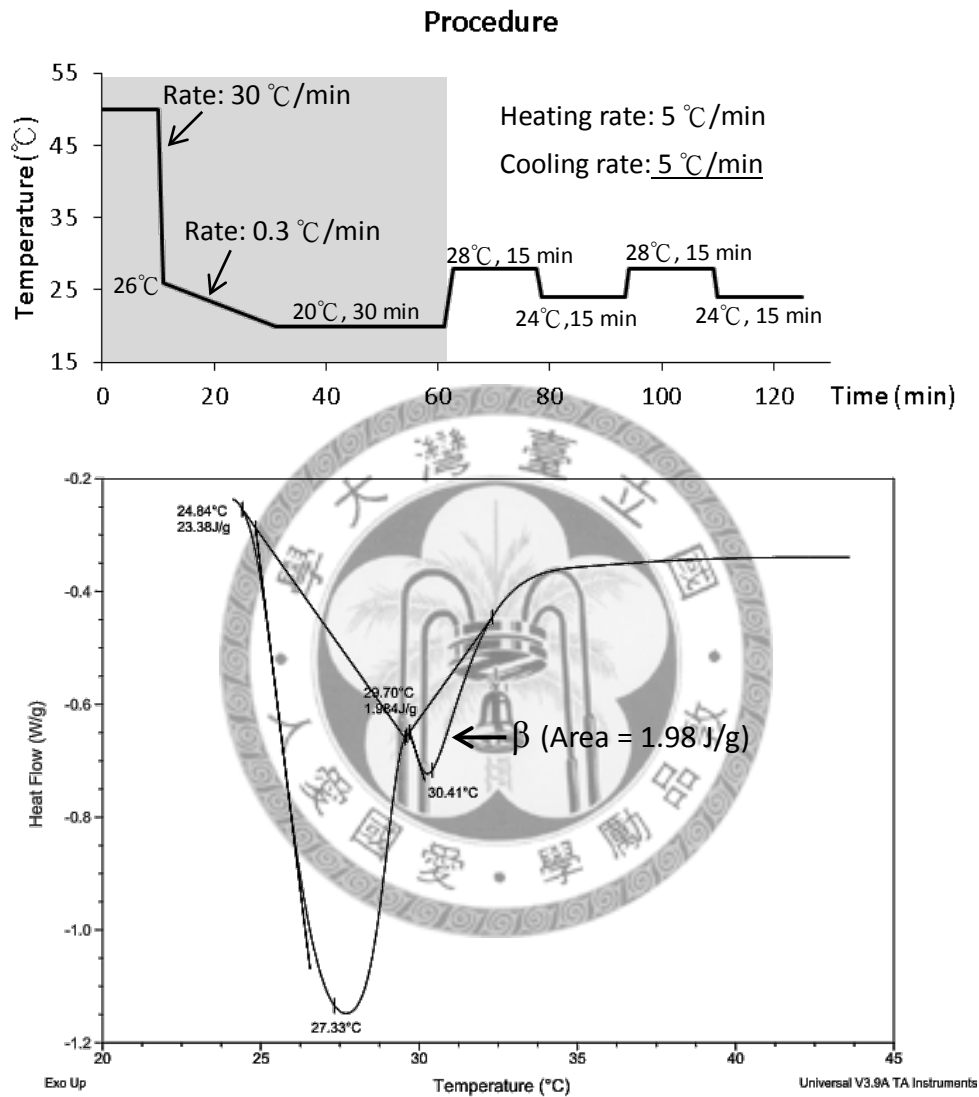


圖 4-13. 修飾的程序（加入之預結晶過程如灰色區域所示）可產生 β 結晶
Fig. 4-13. β polymorph was generated during modified procedure (with grey region of pre-crystallization procedure).

二、降溫速率對 β 型結晶之影響

前人的研究普遍認為降溫速率較升溫速率更為重要。升溫的目的是將不理想的結晶熔化，留下理想的 β 型結晶；降溫則與熔化的粒子能否形成 β 型結晶息息相關。升溫速率雖然影響不大，但速度過慢也會使粒子增加亂度，影響後續的排列，速度快固然較理想，但過快也須注意儀器與樣品之間會有延遲，故後續試驗的升溫速率皆固定為 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。降溫速率影響結晶形成，由於形成 β 型結晶有一定的熱焓值，降溫過慢無法直接達到此值，粒子緩緩排列成均勻但非穩定的結晶。將 CB 直接由 50°C 以 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 之慢速降溫至 20°C ，其 DSC 圖譜如圖 4-14，圖中波峰相當寬，無法辨別熔點，推斷是由於 α 型與 β' 型粒子分布均勻、並無以單一狀態堆疊成晶，故沒有單一結晶的熔點，此結果符合降溫過慢不利於 β 型結晶生成之推論 (Bouzidi and Narine, 2010; Debaste et al., 2008; Cebula and Smith, 1991)。

為了比較調溫時，降溫速率對 β 型結晶生成的影響，另以 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 兩種不同之降溫速率進行 tempering，tempering 程序皆為 $28^{\circ}\text{C} \rightarrow 24^{\circ}\text{C} \rightarrow 28^{\circ}\text{C} \rightarrow 24^{\circ}\text{C}$ ，升溫速率以及維持時間都固定，DSC 結果圖譜分別為圖 4-15、圖 4-16。將圖 4-15、圖 4-16 與圖 4-13 (降溫速率各為 0.3 、 1 、 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 比較，三個圖中 β 型結晶波峰積分面積分別為 2.88 、 3.44 和 1.98 J/g 。波峰積分面積代表單位質量的樣品吸收之能量 (J/g)，結晶越多則需吸收的熱能越高，因此，波峰面積與結晶數量為正相關。由三圖比較後，確認以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 之降溫速率擁有最多的 β 型結晶，與推論符合，往後試驗中調溫程序的降溫速率都固定為 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

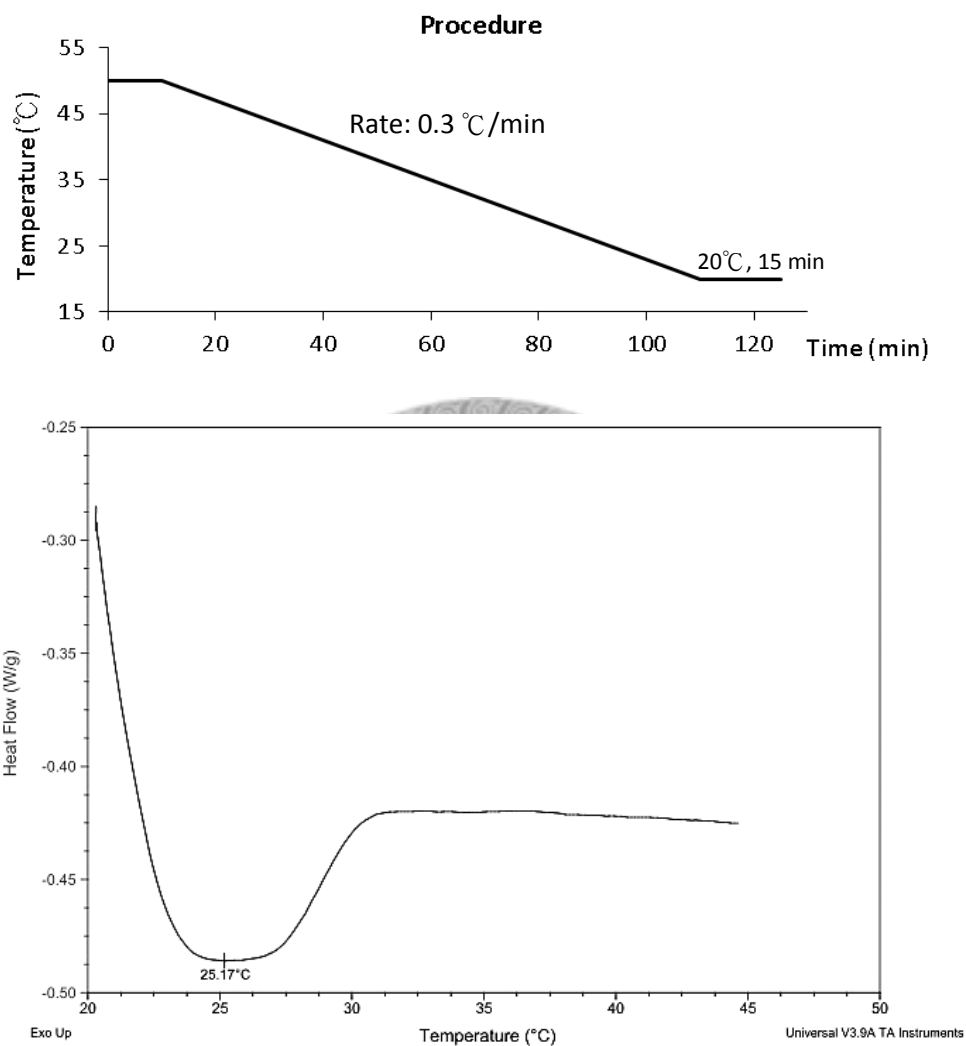


圖 4-14. 以 0.3°C/min 之速率緩慢降溫，未有明顯之結晶型態
 Fig. 4-14. There was no significant crystal type showing after cooling with rate of 0.3°C/min.

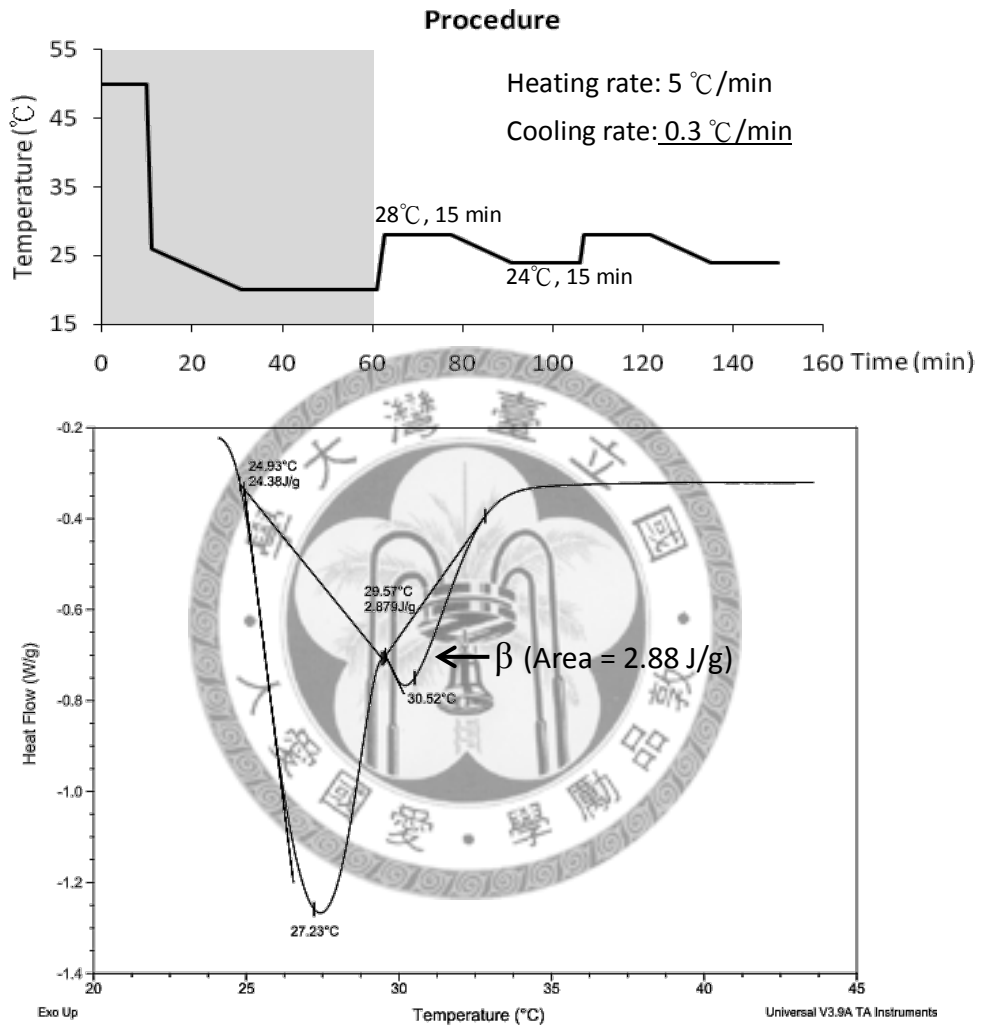


圖 4-15. 以 0.3°C/min 之降溫速率進行 tempering
Fig. 4-15. Tempering with cooling rate of 0.3°C/min.

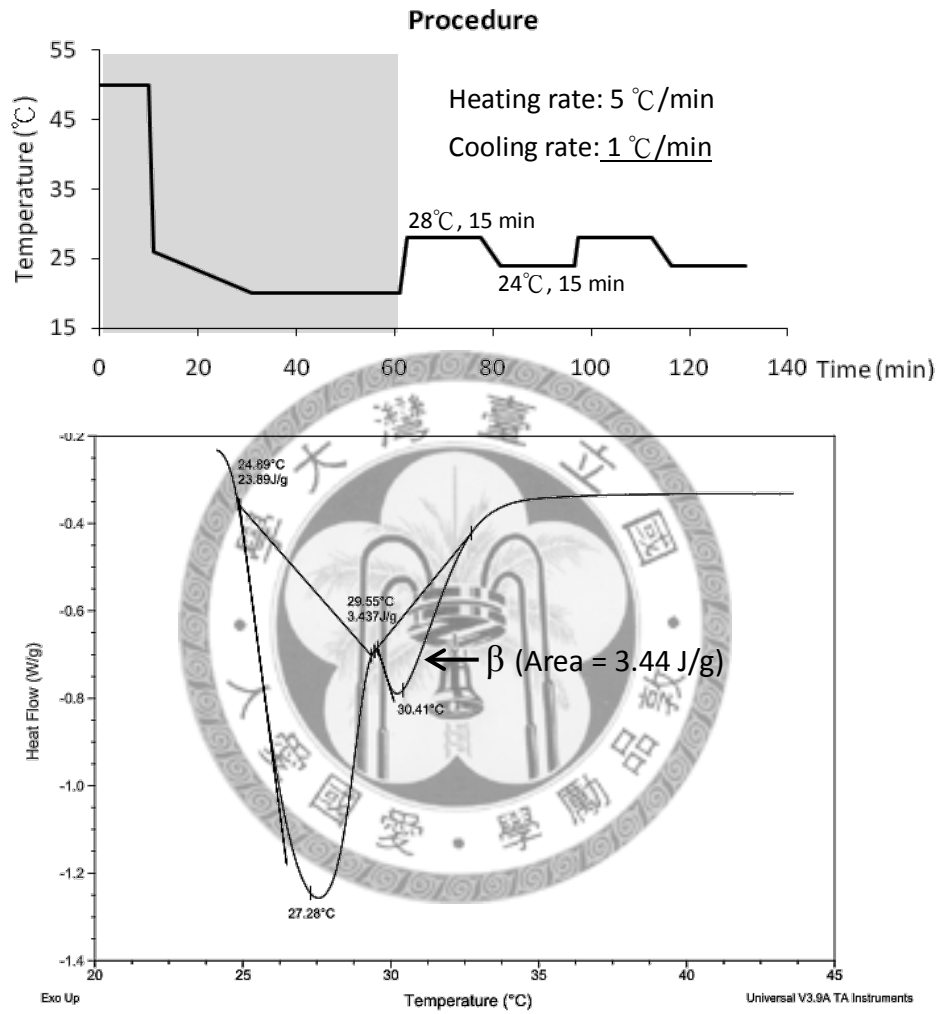


圖 4-16. 以 1°C/min 之降溫速率進行 tempering
Fig. 4-16. Tempering with cooling rate of 1°C/min.

三、維持溫度對 β 型結晶之影響

由於前人的研究中提到適合 β 型結晶生成之溫度為 19-25°C，理論上環境之結晶溫度越低，結晶形成越快；但針對 β 型結晶，卻又須考慮過低的溫度較傾向於先排列成較不穩定的 β' 型甚至更不穩定的 α 型，因此，結晶溫度的控制相當重要。在 Van Malssen 等人的研究中，以單一固定溫度使 CB 結晶，觀察維持時間與晶型的關係，其中以 22°C 之結晶溫度所需要生成 β 型結晶的時間最短，因此，本試驗將先前調溫程序的 24°C 改為 22°C，高溫（28°C）與維持時間均不變，結果如圖 4-17，圖中 β 型結晶之波峰面積明顯增加，顯示以 22°C 為結晶溫度確實更適合 β 型結晶生成（Langevelde et al., 2001; Van Malssen et al., 1999）。

在尚未形成 β 型結晶時，溫度較高結晶過程會比較慢，倘若已經有 β 型結晶，則稍微提高溫度有助於防止形成較不穩定之晶型，故可於多次 tempering 的程序中，微調後期之升降溫度，但調幅不可過大，以免新生成的 β 型尚未足夠穩定就被環境之高溫熔化。圖 4-18 是兩個相同的 tempering 程序（升降溫四次），在最後一次的升溫與降溫時調整溫度各上升 1°C，結果顯示雖然積分面積並無差異，但 β 型結晶之波峰溫度顯示熔點隨後續溫度調高而有些微上升。本研究亦嘗試於其他的維持溫度下，調高最後一次調溫之維持溫度，也有結晶熔點上升的趨勢。以此結果，推斷結晶溫度越高，形成之結晶越趨穩定（熔點的上升代表結晶的排列越整齊、結晶越安定）。

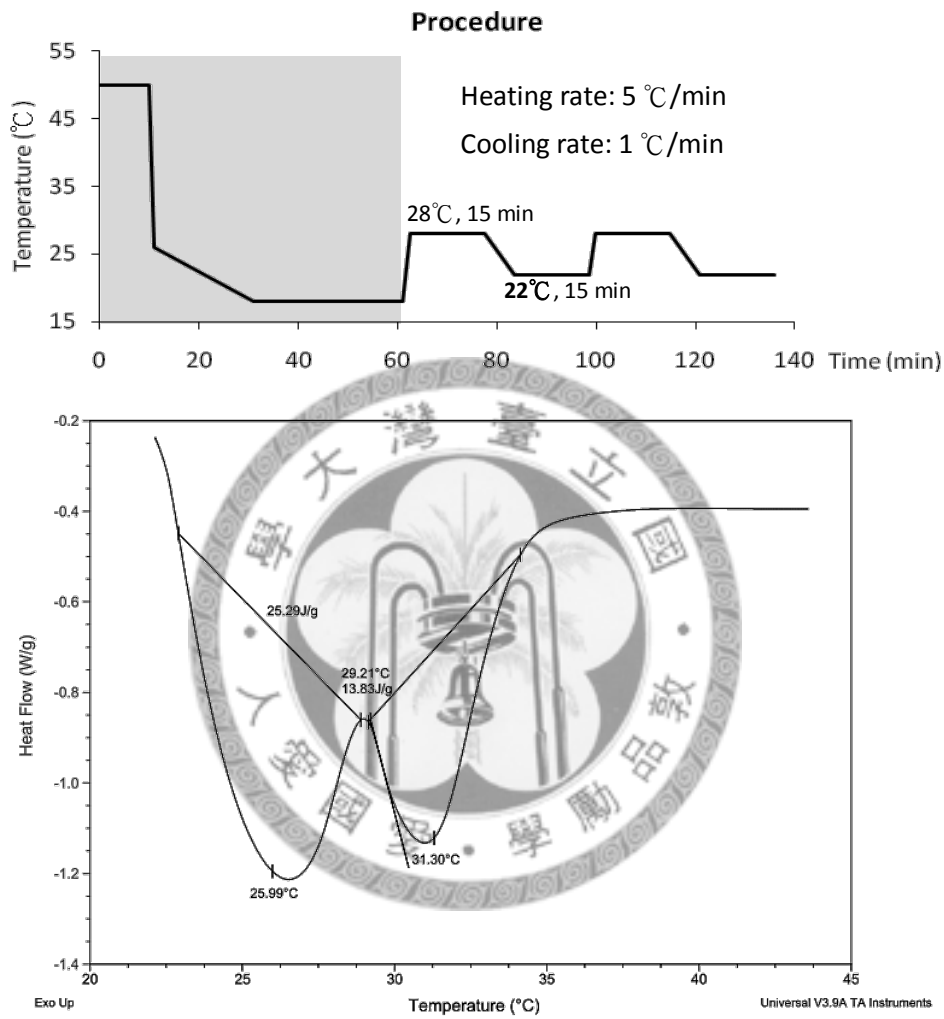


圖 4-17. 修改 β 結晶溫度為 22°C，可提高 β 型結晶之比例

Fig. 4-17. Changing the temp. of crystallization to 22°C and the ratio of β polymorph could be raised.

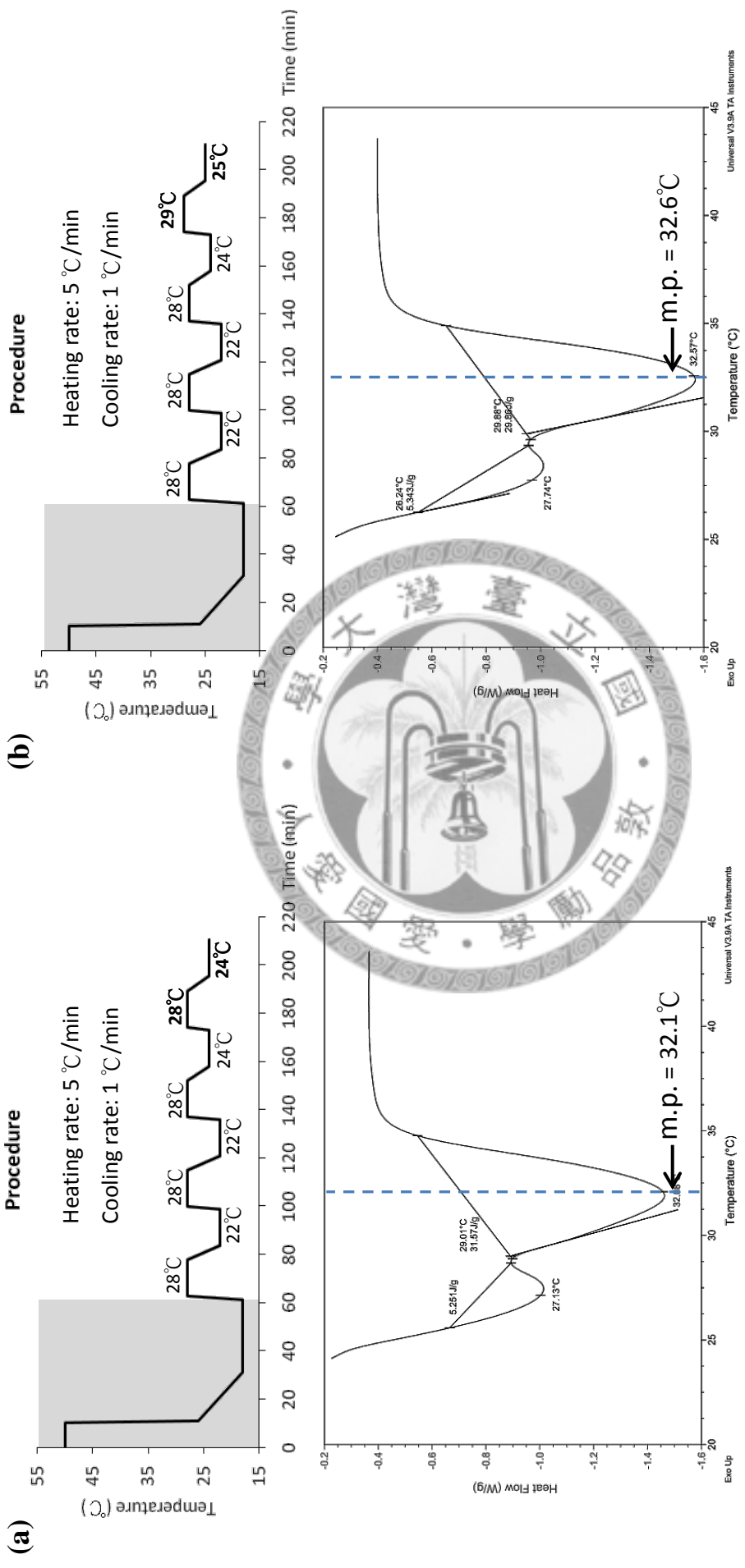


圖 4-18. (a)以 28°C/24°C 之維持溫度進行四次 tempering (b)四次 tempering，最後一次維持溫度改以 29°C/25°C
Fig. 4-18. (a) Tempering with maintenance temperature at 28°C/24°C for four times changing cycle (b) Tempering with four times changing cycle but maintenance temperature at 29°C/25°C for the last time

四、調溫次數對 β 型結晶之影響

理論上，tempering 次數越多、 β 型結晶之比例也會越高，但並未發現相關研究佐證，故進行此試驗以期證實 tempering 次數與 β 型結晶之比例的相關性。

圖 4-19(a)、(b)分別為 tempering 升降溫三次與四次，由 β 型結晶的波峰積分面積和熔點都可看出結晶數量上升，熔點往右平移、結晶更臻安定的現象。實際進行巧克力 tempering 時，因還有攪拌等因素，且粒子數量較大，升降溫的步驟並不一定需要進行至三、四次，但以此試驗可以確定 CB 的多晶性可經由多次升降溫改變晶型比例。

五、調溫與否對可可脂之影響

在進行過許多 tempering 程序後，回頭確認 tempering 此程序本身是否有為形成 β 型結晶提供幫助，故僅以第 1 小節訂定的結晶模式控溫，結束後不外加升降溫的程序，即：

高溫 (50°C) $\xrightarrow{30^\circ\text{C}/\text{min}}$ 26°C $\xrightarrow{0.3^\circ\text{C}/\text{min}}$ 18°C, 30 min \rightarrow 測定熔點

並與有 tempering 過程之圖譜比較。經上述控溫過程後，以 DSC 測得之圖譜如圖 4-20，與前面試驗之結果相比，完全沒有 β 型結晶的產生，由於最後一個步驟中低溫維持長時間，分子排列時間足夠，能夠將大部分的 α 型結晶轉為 β' 型。事實上， α 型結晶是 CB 結晶初期最容易存在的一種晶型 (γ 型易於極低溫之環境形成，但會迅速轉為 α 型)，而 β' 型則是最常見到的 CB 結晶，一般巧克力若未做好 tempering，則其內部的結晶幾乎都以 β' 型為主，因此型態已有相當的穩定度，但質地則不如 β 型良好，且在穩定環境下 β' 型粒子也會趨向更穩定的 β 型排列，此時巧克力成品就有可能出現油花斑 (bloom)，因此，儘管 β' 型是可接受的結晶，巧克力成品還是希望能以 β 型結晶為主。本試驗證明了 tempering 是有效促使生成 β 型結晶的方式 (顏, 2007; Van Malssen et al., 1996)。

以 DSC 進行可可脂 tempering 的模擬，以及探討各因素對結晶的影響，可得到以下結果：

- β 型結晶需要一定的低溫與時間醞釀成晶，尤其對於完全熔化之 CB。
- Tempering 過程之降溫速率過快不利於 β 型成晶、過慢則可能形成不同型態粒子均勻分布的情形。本試驗以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 為 tempering 降溫速率。
- Tempering 中維持的溫度對結晶有相當重要的影響，改以 22°C 做結晶溫度比 24°C 佳；隨著次數而微量提高所維持的溫度，有助於 β 型結晶熔點的提升。
- Tempering 之升降溫次數越多，有助於 β 型結晶比例提高。
- Tempering 確實為幫助 β 型結晶生成的加工程序。

利用 DSC 探討 tempering 因素並非完全無限制，例如 tempering 時攪拌的速率與力道，也對 β 型結晶之生成有所影響。而 DSC 樣品僅微量，故不再此試驗中討論攪拌的因素。



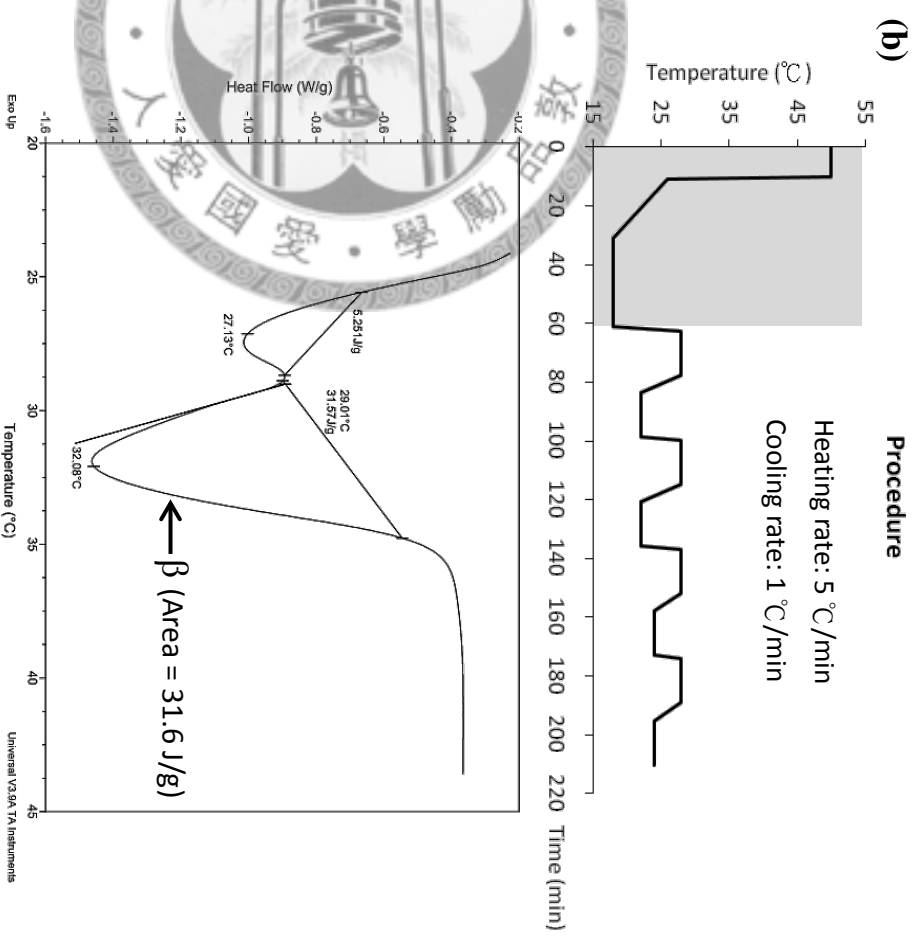
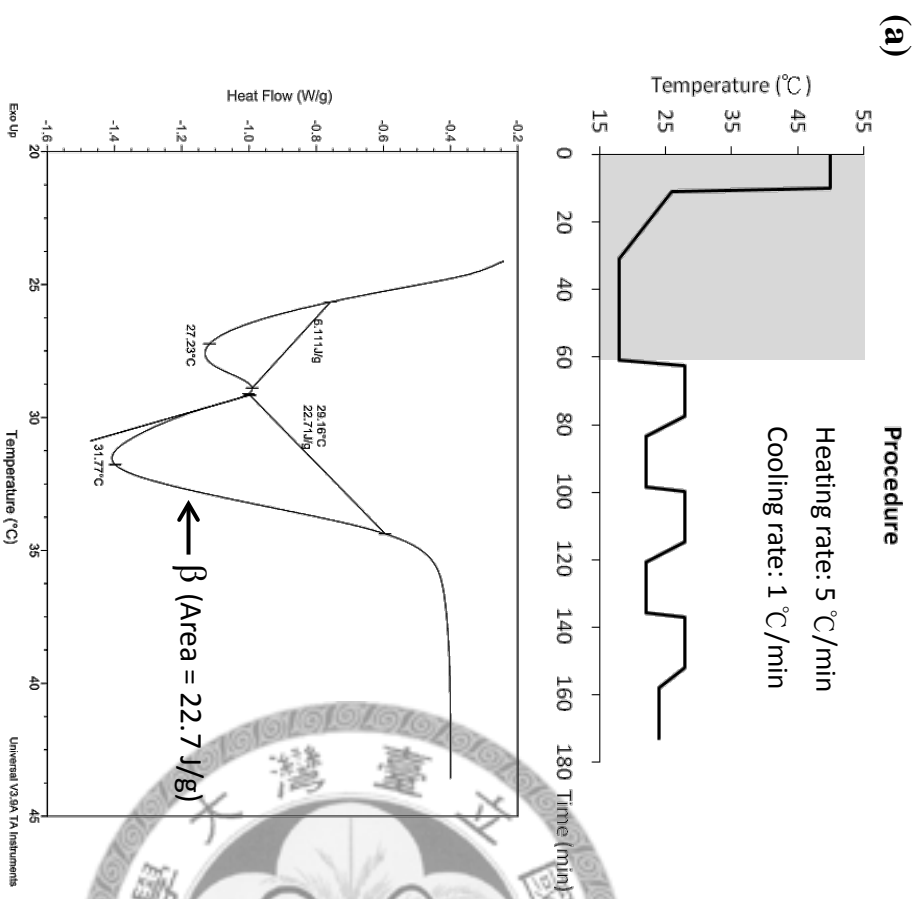


圖 4-19. 經過 (a) 三次 與 (b) 四次 升降溫程序，四次可提高 β 型結晶之比例
Fig. 4-19. Tempering procedure with (a) three times or (b) four times temperature changing cycles. It was found the ratio of β polymorph raise with the four-time procedure

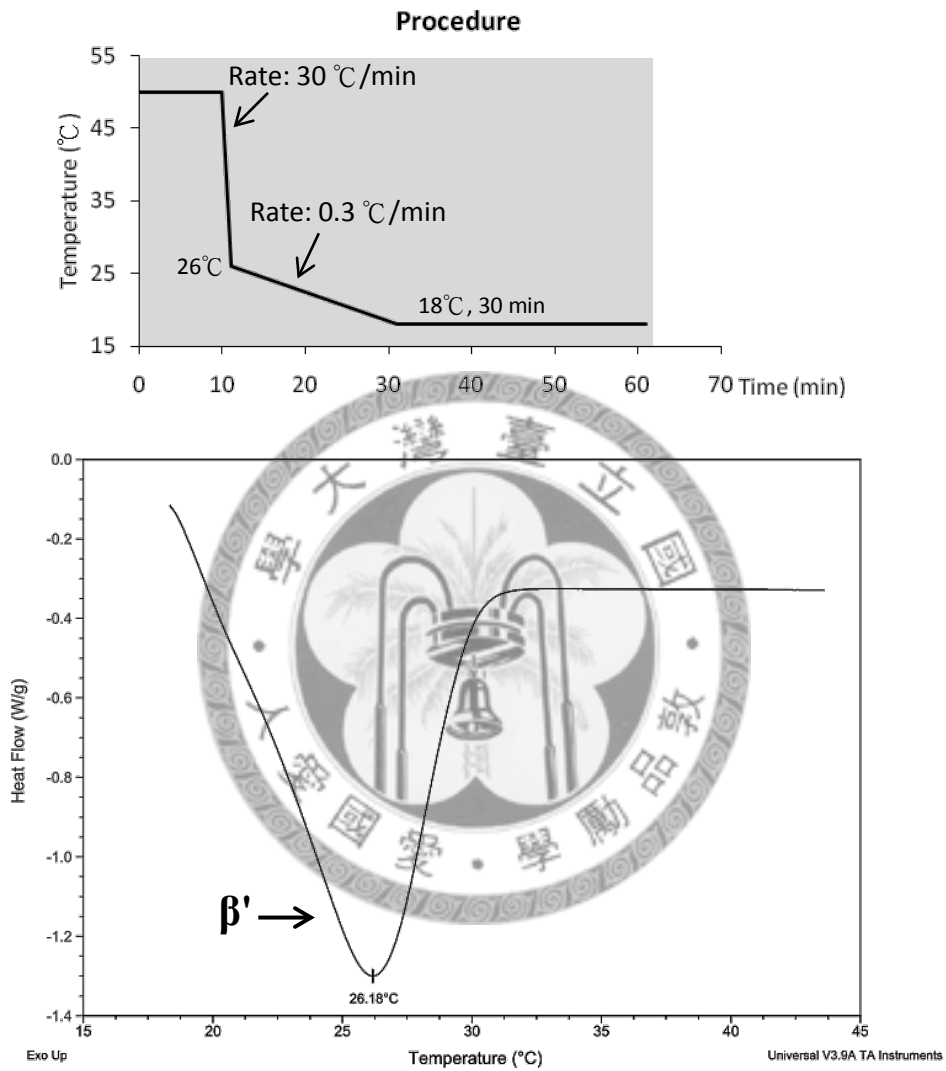


圖 4-20. 未調溫之結晶以 β' 型結晶為主
Fig. 4-20. The main polymorph is β' without tempering.

第五章、結論

- 一、 兼性厭氣發酵為較合適的可可豆小量發酵模式，以此方式生產的發酵可可豆不論外觀與香氣都較好氣發酵為佳。可可豆發酵的條件中，厭氣程度具有重要的影響。
- 二、 來自台灣、越南以及馬來西亞發酵可可豆，其可可脂的基本性質都在可接受之範圍，其中台灣可可脂有稍高的酸價及過氧化價，須注意儲存條件。三產地之可可脂脂肪酸組成與 TAG 組成並無顯著差異，但台灣的不飽和度較另外兩者稍高。
- 三、 來自台灣、越南以及馬來西亞發酵可可豆，其榨油後取得之可可粉中，可可鹼含量分別為：馬來西亞 (27.7 g/kg) > 越南 (16.0 g/kg) > 台灣 (13.9 g/kg)；咖啡因含量三者無明顯差異，平均約 2.09 g/kg。總多酚含量以越南最高(66.3 GAE g/kg)、馬來西亞次之(39.2 GAE g/kg)、台灣最少(29.6 GAE g/kg)。
- 四、 三種可可粉中的原花青素組成，以台灣擁有最高的生物可利用率良好之小分子量原花青素 ($n \leq 3$) 比例。
- 五、 來自台灣、越南以及馬來西亞發酵可可豆取下之豆殼中，可可鹼含量分別為：台灣 (8.71 g/kg) > 越南 (8.21 g/kg) > 馬來西亞 (5.75 g/kg)，此趨勢恰與可可粉之結果相反；咖啡因含量以越南最高 (1.83 g/kg)、馬來西亞與台灣之含量較接近 (分別為 0.79 和 0.92 g/kg)。總多酚含量皆不高，以馬來西亞(4.99 GAE g/kg)最低，越南與台灣之含量較接近，分別為 7.41 和 7.71 GAE g/kg)。
- 六、 以 DSC 進行模擬 tempering，建立 β 型結晶的溫度模式程序：

高溫 (50°C) $\xrightarrow{30^\circ\text{C}/\text{min}}$ 26°C $\xrightarrow{0.3^\circ\text{C}/\text{min}}$ 18°C, 30 min $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 調溫

七、 調溫對提高可可脂中 β 型結晶之比例有明顯的效果。調溫中的因素：

- (一) 降溫速率，不可太快或過慢，本試驗結果以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 為較合適之速率。
- (二) 維持之溫度， 22°C 為適合 β 型長晶之溫度。此外，維持溫度可隨升降溫次數些微調升，有助於提高 β 型結晶比例。
- (三) 升降溫度之次數，多次升降溫可逐漸提昇 β 型結晶之比例。



第六章、參考文獻

- 顏文俊 (2007)。“神仙美食巧克力”。食品資訊，**218**：60-67。
- 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. B., Ritter, K. A. and Schmitz, H. H. (1999). "HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4184-4188.
- Afoakwa, E., Paterson, A. and Fowler, M. (2007). "Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review." *Trends in Food Science & Technology* **18**: 290-298.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M. and Ryan, A. (2008). "Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**: 840-840.
- Ardhana, M. M. and Fleet, G. H. (2003). "The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia." *International Journal of Food Microbiology* **86**: 87-99.
- Aregheore, E. M. (2002). "Chemical evaluation and digestibility of cocoa (*Theobroma cacao*) byproducts fed to goats." *Tropical Animal Health and Production* **34**: 339-348.
- Arlorio, M., Coisson, J., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G. and Martelli, A. (2005). "Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from hulls extracted with supercritical CO₂." *Food Research International* **38**: 1009-1014.
- Arteel, G. E., Schroeder, P. and Sies, H. (2000). "Reactions of Peroxynitrite with Cocoa Procyanidin Oligomers." *Journal of Nutrition* **130**: 2100S-2104-2100S-2104.
- Attama, A. and Mullergoymann, C. (2006). "A critical study of novel physically structured lipid matrices composed of a homolipid from *Capra hircus* and theobroma oil." *International Journal of Pharmaceutics* **322**: 67-78.
- Bearden Monica, M., Pearson Debra, A., Rein, D., Chevaux Kati, A., Carpenter Dana, R., Keen Carl, L. and Schmitz, H. (2000). Potential Cardiovascular Health Benefits of Procyanidins Present in Chocolate and Cocoa. *Caffeinated Beverages*, American Chemical Society. **754**: 177-186.
- Belitz, H. D. and Grosch, W. (1988). Café, té y cacao. *Química de los Alimentos*.

Spain, Acribia Zaragoza: 747-781.

- Benowitz, N. L. (1990). "Clinical Pharmacology of Caffeine." *Annual Review of Medicine* **41**: 277-288.
- Bergmann, J. F. (1969). "The Distribution of Cacao Cultivation in Pre-Columbian America." *Annals of the Association of American Geographers* **59**: 85-85.
- Bhattacharjee, R. and Kumar, P. L. (2007). Cacao. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg. **6**.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Hannum, S. M. and Gershwin, M. E. (2000). "Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability, and Health Implications." *Journal of Medicinal Food* **3**: 77-105.
- Bouzidi, L. and Narine, S. S. (2010). "Evidence of Critical Cooling Rates in the Nonisothermal Crystallization of Triacylglycerols: A Case for the Existence and Selection of Growth Modes of a Lipid Crystal Network." *Langmuir* **26**: 4311-4319.
- Brunetto, M. d. R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., Ramos, G. and Romero, C. (2007). "Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system." *Food Chemistry* **100**: 459-467.
- Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F. J. and Kromhout, D. (2006). "Cocoa Intake, Blood Pressure, and Cardiovascular Mortality: The Zutphen Elderly Study." *Arch Intern Med* **166**: 411-417.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H. and De Vuyst, L. (2008). "Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**: 2288-2297.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M. and De Vuyst, L. (2007). "Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana." *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1809-1824.
- Cebula, D. J. and Smith, K. W. (1991). "Differential scanning calorimetry of confectionery fats. Pure triglycerides: Effects of cooling and heating rate variation." *Journal of the American Oil Chemists Society* **68**: 591-595.

- Chaiseri, S. and Dimick, P. S. (1989). "Lipid and hardness characteristics of cocoa butters from different geographic regions." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **66**: 1771-1776.
- Chaiseri, S. and Dimick, P. S. (1995). "Dynamic crystallization of cocoa butter. I. characterization of simple lipids in rapid- and slow-nucleating cocoa butters and their seed crystals." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72**: 1491-1496.
- Chatt, E. M. (1953). *Cocoa: Cultivation, Processing, Analysis*, Inter-science Publishers.
- Counet, C. and Collin, S. (2003). "Effect of the Number of Flavanol Units on the Antioxidant Activity of Procyanidin Fractions Isolated from Chocolate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 6816-6822.
- Debaste, F., Kegelaers, Y., Liegeois, S., Amor, H. and Halloin, V. (2008). "Contribution to the modelling of chocolate tempering process." *Journal of Food Engineering* **88**: 568-575.
- El-Hamdy, A. H. and Perkins, E. G. (1981). "High performance reversed-phase chromatography of natural triglyceride mixtures." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **58**: 49-53.
- El-Saied, H. M., Morsi, M. K. and Amer, M. M. (1981). "Composition of cocoa shell fat as related to cocoa butter." *Z Ernährungswiss* **20**: 145-151.
- Eteng, M. U., Eyong, E. U., Akpanyung, E. O., Agiang, M. A. and Aremu, C. Y. (1997). "Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review." *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* **51**: 231-243.
- Fallarini, S., Miglio, G., Paoletti, T., Minassi, A., Amoruso, A., Bardelli, C., Brunelleschi, S. and Lombardi, G. (2009). "Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death." *British Journal of Pharmacology* **157**: 1072-1084.
- FAO (2003). Medium-term Prospects for Agricultural Commodities. *Projections to the Year 2010*, FAO.
- Flammer, A. J., Hermann, F., Sudano, I., Spieker, L., Hermann, M., Cooper, K. A., Serafini, M., Luscher, T. F., Ruschitzka, F., Noll, G. and Corti, R. (2007). "Dark Chocolate Improves Coronary Vasomotion and Reduces Platelet Reactivity." *Circulation* **116**: 2376-2382.

- Foubert, I. (2003). Modelling isothermal cocoa butter crystallization: influence of temperature and chemical composition. Gent University Ph.D Thesis. Gent, Belgian.
- Gilibert-Escriva, M. V., Goncalves, L. A. G., Silva, C. R. S. and Figueira, A. (2002). "Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**: 1425-1431.
- Goto, M., Kodali, D. R., Small, D. M., Honda, K., Kozawa, K. and Uchida, T. (1992). "Single crystal structure of a mixed-chain triacylglycerol: 1, 2-dipalmitoyl-3-acetyl-sn-glycerol." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 8083-8083.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S. and Prior, R. L. (2002). "Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 4852-4860.
- Gurney, K. A., Evans, L. V. and Robinson, D. S. (1991). "Extraction of purine alkaloids from cocoa tissues and determination by high-performance liquid chromatography." *Phytochemical Analysis* **2**: 15-19.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R. and Schmitz, H. H. (1999). "Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 490-496.
- Hansen, C. E., Olmo, M. d. and Burri, C. (1998). "Enzyme activities in cocoa beans during fermentation." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**: 273-281.
- Hermann, F., Spieker, L. E., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., Lüscher, T. F., Riesen, W., Noll, G. and Corti, R. (2006). "Dark chocolate improves endothelial and platelet function." *Heart* **92**: 119-120.
- Howat, G. R., Powell, B. D. and Wood, G. A. R. (1957). "Experiments on cocoa fermentation in West Africa." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **8**: 65-72.
- ICCO (2009). "ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics." *Cocoa Year* **15**.
- Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G. and Schmitz, H. H. (2005). "Cocoa

antioxidants and cardiovascular health." *American Journal of Clinical Nutrition* **81**: 298-303.

- Kim, H. and Keeney, P. G. (1984). "(-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans." *Journal of Food Science* **49**: 1090-1092.
- Klagge, P. and Gupta, A. K. S. (1990). "Kakaobutter und ihre Alternativen für Schokoladenprodukte." *Fat Science Technology* **92**: 485-492.
- Knapp, A. W. (1923). *Cocoa And Chocolate*, Plain Label Books.
- Knapp, A. W. and Coward, K. H. (1935). "The vitamin D activity of cacao shell." *Biochemical Journal* **29**: 2728-2735.
- Langevelde, A., Malssen, K., Peschar, R. and Schenk, H. (2001). "Effect of temperature on recrystallization behavior of cocoa butter." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**: 919-925.
- Larsson, K. (1966). "Classification of glyceride crystal forms." *Acta Chemica Scandinavica* **20**: 2255-2260.
- Lee, H. J., Lee, K. W., Kang, K. S., Kim, D. Y., Park, H. H., Lee, M. J., Kim, H. S. and Kwon, I. B. (2004). "Theobromine with an anti-carcinogenic activity." USA patent, US 6693104.
- Lehrian, D. W., Keeney, P. G. and Butler, D. R. (1980). "Triglyceride characteristics of cocoa butter from cacao fruit matured in a microclimate of elevated temperature1." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **57**: 66-69.
- Lipp, M. and Anklam, E. (1998). "Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate—Part A. Compositional data." *Food Chemistry* **62**: 73-97.
- Martín-Cabrejas, M. A., Valiente, C., Esteban, R. M., Mollá, E. and Waldron, K. (1994). "Cocoa Hull: A Potential Source of Dietary Fibre." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **66**: 307-311.
- McNeil, C. L., Chase, D. Z. and Chase, A. F. (2006). *Chocolate in Mesoamerica: A Cultural History of Cacao*. Gainesville, University Press of Florida.
- Meyer, A., Ngiruwonsanga, T. and Henze, G. n. (1996). "Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **356**: 284-287.
- Miller, K. B., Hurst, W. J., Payne, M. J., Stuart, D. A., Apgar, J., Sweigart, D. S. and Ou, B. (2008). "Impact of Alkalization on the Antioxidant and Flavanol Content

of Commercial Cocoa Powders." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 8527-8533.

Minifie, B. W. (1989). *Chocolate, Cocoa, and Confectionery: Science and Technology*, Springer.

Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B. and Nazamid, S. (2003). "Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans." *International Journal of Food Science and Technology* **38**: 285-295.

Osakabe, N., Yamagishi, M., Sanbongi, C., Natsume, M., Takizawa, T. and Osawa, T. (1998). "The antioxidative substances in cacao liquor." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **44**: 313-321.

Osman, H., Usta, I. M., Rubeiz, N., Abu-Rustum, R., Charara, I. and Nassar, A. H. (2008). "Cocoa butter lotion for prevention of striae gravidarum: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial." *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **115**: 1138-1142.

Pettipher, G. L. (1986). "Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37**: 297-309.

Porter, L. J., Ma, Z. and Chan, B. G. (1991). "Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites." *Phytochemistry* **30**: 1657-1663.

Prescott, W. H. (1834). *The Conquest of Mexico*. London, Routledge.

Reed, C. F. (1976). *Information Summaries On 1000 Economic Plants*, Typescripts submitted to the USDA.

Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R. and Keen, C. L. (2000). "Cocoa inhibits platelet activation and function." *American Journal of Clinical Nutrition* **72**: 30-35.

Risner, C. H. (2008). "Simultaneous Determination of Theobromine, (+)-Catechin, Caffeine, and (-)-Epicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter." *Journal of Chromatographic Science* **46**: 892-899.

Sabelli, H. C. and Javaid, J. I. (1995). "Phenylethylamine modulation of affect: therapeutic and diagnostic implications." *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **7**: 6-14.

- Sato, K. (2001). "Crystallization behaviour of fats and lipids -- a review." *Chemical Engineering Science* **56**: 2255-2265.
- Sato, K. and Kuroda, T. (1987). "Kinetics of melt crystallization and transformation of tripalmitin polymorphs." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **64**: 124-127.
- Scheidlin, S. (2007). "A new look at the xanthine alkaloids." *Molecular Interventions* **7**: 236-242.
- Schlichter-Aronhime, J. and Garti, N. (1988). Solidification and Polymorphism in Cocoa Butter and the Blooming Problems. *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*. Garti, N., Sato, K. New York, Marcel Dekker Inc. pp. 363-393.
- Schlichter-Aronhime, J., Sarig, S. and Garti, N. (1988). "Reconsideration of polymorphic transformations in cocoa butter using the DSC." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **65**: 1140-1143.
- Shukla, V. K. S. (1995). "Cocoa butter properties and quality." *Lipid Technology* **7**: 54-57.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Lester, P., Academic Press. **299**: 152-178.
- Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Rechner, A. R. and Rice-Evans, C. (2001). "Bioavailability of Flavan-3-ols and Procyanidins: Gastrointestinal Tract Influences and Their Relevance to Bioactive Forms In Vivo." *Antioxidants and Redox Signaling* **3**: 1023-1039.
- Stapley, A. G. F., Tewkesbury, H. and Fryer, P. J. (1999). "The effects of shear and temperature history on the crystallization of chocolate." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**: 677-685.
- Steinberg, F. M., Bearden, M. M. and Keen, C. L. (2003). "Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health." *Journal of the American Dietetic Association* **103**: 215-223.
- Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N. and Schomig, E. (2007). "Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide: A Randomized Controlled Trial." *Journal of the American Medical Association* **298**: 49-60.

- Ter Laak, W., Verdegem, P. J. E. and Riggers, R. J. (2004). "Composition comprising cocoa." USA patent, US 10/608095.
- Timbie, D. J., Sechrist, L. and Keeney, P. G. (1978). "Application of high-pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans." *Journal of Food Science* **43**: 560-565.
- Timms, R. E. (1984). "Phase behaviour of fats and their mixtures." *Progress in Lipid Research* **23**: 1-38.
- Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Bornet, A. I., Rouanet, J.-M., Crozier, A. and Teissedre, P.-L. (2005). "The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats." *British Journal of Nutrition* **94**: 170-181.
- Usmani, O. S., Belvisi, M. G., Patel, H. J., Crispino, N., Birrell, M. A., Korbonits, M., Korbonits, D. and Barnes, P. J. (2004). "Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough." *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*: 231-233.
- Vaeck, S. (1960). "Cocoa butter and fat bloom." *The Manufacturing Confectioner* **40**: 35-74.
- Valiente, C., Esteban, R. M., Molla, E. and Lopez-Andreu, F. J. (1994). "Roasting effects on dietary fiber composition of cocoa beans." *Journal of Food Science* **59**: 123-124.
- Van Malssen, K., Langevelde, A., Peschar, R. and Schenk, H. (1999). "Phase behavior and extended phase scheme of static cocoa butter investigated with real-time X-ray powder diffraction." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**: 669-676.
- Van Malssen, K., Peschar, R., Brito, C. and Schenk, H. (1996). "Real-time X-ray powder diffraction investigations on cocoa butter. III. Direct β -crystallization of cocoa butter: Occurrence of a memory effect." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**: 1225-1230.
- Wadsworth, R. V. and Howat, G. R. (1954). "Cocoa Fermentation." *Nature* **174**: 392-394.
- Wille, R. L. and Lutton, E. S. (1966). "Polymorphism of cocoa butter." *Journal of the American Oil Chemists Society* **43**: 491-496.
- Wollgast, J. and Anklam, E. (2000). "Review on polyphenols in Theobroma cacao:

changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification." *Food Research International* **33**: 423-447.

Zoumas, B. L., Kreiser, W. R. and Martin, R. (1980). "Theobromine and caffeine content of chocolate products." *Journal of Food Science* **45**: 314-316.

