

可可单作与槟榔间作模式下可可豆发酵品质比较分析

周云帆^{1,2} 伍宝朵¹ 桂花² 王睿¹ 李付鹏^{1*}

1 中国热带农业科学院香料饮料研究所/农业农村部香料作物遗传资源利用重点实验室/海南省热带香料作物遗传改良与品质调控重点实验室

2 云南农业大学热带作物学院

DOI:10.32629/as.v8i12.3558

[摘要] 为探究种植模式对可可豆发酵过程中品质的影响,以‘热引4号’可可品种为材料,对比单作模式(MC)与槟榔间作模式(IC)下可可豆发酵0、3、6d的关键指标变化规律。结果表明:蛋白质和可可碱含量在单作模式与槟榔间作模式下无显著差异。发酵前,槟榔间作模式下可可豆的可可脂含量显著低于单作模式;发酵中期,槟榔间作模式下可可脂含量显著低于单作模式,多酚含量显著高于单作模式,高14.83%;发酵后,槟榔间作模式下可可豆色差值显著高于单作模式,咖啡因含量显著低于单作模式,低13.17%。利用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术检测发现,槟榔间作模式下发酵后的可可豆中包含更高的挥发性化合物含量。本研究表明槟榔间作模式不仅能影响可可豆发酵期间色泽变化和生物活性物质含量,还能增加发酵后可可豆中挥发性成分含量,为海南地区可可种植模式及可可豆发酵工艺优化提供参考。

[关键词] 可可豆; 种植模式; 生物活性成分; 挥发性风味物质; 发酵品质

中图分类号: S571.2 文献标识码: A

Comparative Analysis of Fermentation Quality of Cocoa Beans in Monoculture Cocoa and Cocoa-Areca intercropping Systems

Yunfan Zhou^{1,2} Baoduo Wu¹ Hua Gui² Rui Wang¹ Fupeng Li^{1*}

1 Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops of Hainan Province / Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops

2 Tropical Crops College, Yunnan Agricultural University, Pu'er,

[Abstract] To explore the impact of planting patterns on the quality of cocoa beans during fermentation, 'Reyan 4' cocoa variety was used as the material to compare the key indicator changes in single cropping mode (MC) and intercropping with betel nut (IC) modes at 0, 3, and 6 days at fermentation. The results showed that there were no significant differences in protein and caffeine content between the single cropping and intercropping modes. Before fermentation, the cocoa fat content of cocoa beans under the intercropping mode was significantly lower than that of the single cropping mode; during the middle stage of fermentation, the cocoa fat content under the intercropping mode was significantly lower than that of the single cropping mode, while the polyphenol content was significantly higher, by 14.83%; after fermentation, the color difference value of cocoa beans under the IC was significantly higher than that of the MC, and the caffeine content was significantly lower, by 13.17%. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupling technology for detection, it was found that the fermented cocoa beans under the intercropping mode contained a higher content of volatile compounds. This study indicates that the IC not only affects the color change and bioactive substance content of cocoa beans during fermentation but also increases the content of volatile components in fermented cocoa beans, providing reference for optimizing the planting pattern of cocoa in Hainan region and the fermentation process of cocoa beans.

[Key words] Cocoa beans; Planting mode; Bioactive components; Volatile flavor substances; Fermentation quality

可可(Theobroma cacao)是锦葵科(Malvaceae)可可属(Theobroma)多年生热带经济作物,又称巧克力树,与咖啡、茶并称为“世界三大饮料作物”^[1]。可可豆富含可可脂及多酚、生物碱等活性成分,具有抗氧化^[2]、抗炎^[3]及调节脂质代谢^[4]等生理功能。因其发酵形成的独特风味物质深受消费者喜爱。发酵是促使可可豆风味形成的关键环节^[5],可可发酵主要依赖酵母、乳酸菌和醋酸菌等微生物的协同作用。发酵过程中生成醇类、酯类、醛酮类等挥发性化合物,这些化合物是构成可可独特风味的基础^[6]。然而可可发酵受到发酵方式^[7]、发酵时间^[8]以及可可豆原材料^[9]的影响,易出现成分改变、风味缺陷等问题。因此,对可可的发酵品质研究非常必要。

可可原产于南美洲亚马孙流域的热带雨林,市场需求稳定,附加值高,目前种植已遍及中南美洲、非洲、大洋洲、东南亚的60多个国家和地区^[10]。我国可可主要种植在海南、云南等地^[11],海南产区可可种植主要采用槟榔/可可等间作模式。赵溪竹等^[12]研究表明,槟榔间作模式通过冠层优化有利于提高可可光合作用效率和产量。Kobi等人^[13]发现,间作模式通过改变光照强度与土壤养分竞争影响可可豆中功能性成分的积累,使可可豆表儿茶素与儿茶素含量较单作模式提升。

为明确不同种植模式对可可豆发酵过程中品质形成的影响,本研究选取中国热带农业科学院香料饮料研究所选育的‘热引4号’可可品种为试验材料,通过分析单作与槟榔间作模式下不同发酵时期的可可豆样品,研究其色泽、蛋白质、可可脂、多酚、可可碱、咖啡因含量及挥发性成分的变化,揭示种植模式对可可豆发酵过程中品质的影响,以期为品质调控提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料选用中国热带农业科学院香料饮料研究所培育的‘热引4号’可可品种,分别种植于海南万宁兴隆基地(WN)和琼海大路基地(QH)。其中万宁兴隆基地设置两种种植模式:单作模式(MC)为全光照可可园,采用2.5m×3m株行距,树龄8年;间作模式(IC)采用槟榔与可可复合种植体系,槟榔株行距为2.5m×3m,在4株槟榔中心位置定植1株可可,可可树龄8年。琼海大路基地种植模式与万宁兴隆基地间作模式完全一致。

采摘主产季成熟可可鲜果,剖开果实取出种子,将可可湿豆倒入木箱中,表层放入大小合适的香蕉叶,顶部盖好箱盖。发酵过程温度控制如下:第一天30℃、第二天35℃、第三天40℃、第四天45℃、第五天50℃、第六天45℃,连续发酵6天,每天定时翻动1次促进充分均匀发酵。保证在发酵过程中除温度外其他发酵条件不变。在发酵0天、发酵3天、发酵6天时,等量选取木箱中部的可可豆样品并做好标记,分别将样品在50℃恒温烘箱中干燥处理48小时并定时翻动。再将经过发酵、干燥后的可可豆样品去除种皮,粉碎,过40目筛后密封避光保存备用。依据种植地、种植模式和发酵时间分别将不同处理命名为MC-WN-0、IC-WN-0、IC-QH-0、MC-WN-3、IC-WN-3、IC-QH-3、MC-WN-6、IC-WN-6、IC-QH-6。

1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 实验仪器

DGX-9243BC-1电热恒温鼓风干燥箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);BSA2202S电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);APB-08A2C06苏泊尔破壁机(浙江省苏泊尔电器有限公司);CT18RT高速离心机(上海天美生化仪器设备有限公司);SB-5200DT超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Master-s-plusUVF全自动超纯水机(上海和泰仪器有限公司);Xrite色差分析仪(上海爱色丽色彩科技有限公司);1290InfinityII超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);7890B/5977B气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司);NDA701杜马斯定氮仪(意大利VELP公司);SynergyH1全波长扫描式多功能读数仪(美国BioTek公司)。

1.2.2 实验试剂

99.9%乙酸、99.9%甲醇、99.9%十二烷、99%无水碳酸钠、70%乙醇(西陇科学股份有限公司)、99%石油醚(山东飞鸿新材料有限公司)、10%福林酚(北京索莱宝科技有限公司)、99%可可碱标准品和99%咖啡因标准品(上海源叶生物科技有限公司)、99%没食子酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、99%EDTA标准品(上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

(1)参照张映萍等^[14]的方法,用色差仪测定可可豆色差;参照GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》测定蛋白质含量^[15];参照杨德伟等^[16]的方法测定可可脂含量。

(2)采用Folin-Ciocalteu法测定多酚总含量^[17]。称取0.1000g可可粉于50mL离心管中加入15mL70%乙醇溶液,室温下超声浸提60min,于25℃、10000r/min离心15min。精密移取100μL上清液于1.5mL离心管中,加入100μL10%Folin-Ciocalteu试剂,避光反应5min后加入500μL7%Na₂CO₃溶液,用70%乙醇定容至1mL,避光静置30min。采用酶标仪于765nm波长测定吸光度。标准曲线定量:精密称取0.01g没食子酸标准品,用去离子水溶解并定容至10mL,配制1mg/mL标准储备液。分别移取5、10、50、100、150、200、250μL储备液,按上述反应体系制备系列浓度标准液(0.005~0.25μg/mL)。以吸光度(y)对浓度(x,μg/mL)线性拟合,得标准曲线方程:y=0.0014x+0.2814(R²=0.9995)。样品中多酚总含量以没食子酸当量(μg/g)计,平行测定3次取均值。计算公式如下:

$$\text{多酚含量}/(\text{mg/g}) = \frac{x \times V \times N}{m}$$

式中,x为测量样品中多酚浓度(mg/mL),根据标准曲线算出;V为稀释的体积(15mL);N为稀释倍数(10倍);m为样品质量(g)。

(3)根据Yang等^[18]的方法改良后检测和定量样品中可可碱和咖啡因含量。称取脱脂可可粉0.2g于100mL离心管中先加入70mL去离子水,超声30min,再用去离子水定容至100mL,25℃、

8000r/min离心5min,取上清液用0.22 μm水性滤膜过滤。高效液相色谱法检测,色谱柱: ZorbaxXDB-C18 (4.6mm×250mm, 5-Micron), 流动相: 乙酸: 甲醇: 水=1:20:79, 检测波长: 275nm, 柱温: 25℃, 流速: 1.00mL/min, 进样量: 10.00 μL。通过可可碱和咖啡因标准品绘制标准曲线进行定量。可可碱标准曲线: $y=26.964x-86.827$ ($R^2=0.99965$), 咖啡因标准曲线: $y=21.234x+7.5133$ ($R^2=0.9972$)。计算公式计算如下:

$$\text{可可碱、咖啡因含量}/(\text{mg/g}) = \frac{x \times V}{m}$$

式中, x 为样品可可碱、咖啡因上机检测浓度(mg/mL), 根据标准曲线算出; V 为样品提取总体积(100mL); m 为样品质量(g)。

(4) 参照岳一轮^[19]等人的方法(HS-SPME-GC/MS)测定挥发性物质,加入0.375mg/L十二烷为内标。通过与NIST17数据库和文献中的化合物相比较进行化合物定性。采用面积归一化法按下式计算挥发性化合物的含量^[20]:

$$\text{挥发性化合物含量}/(\mu\text{g/kg}) = \frac{\rho_0 \times V_i \times \frac{S_j}{S_i}}{m}$$

式中: ρ_0 为内标质量浓度/(mg/L); V_i 为内标体积/ μL ; S_j 为挥发性化合物峰面积; S_i 为内标峰面积; m 为样品质量/g。

1.4 数据分析

所有样品均设3个平行,测定结果以平均值(mean)±标准差(SD)表示。采用Excel2019完成数据统计。SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),计算预测变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)。采用OriginLab OriginPro 2024b软件绘制柱状图,SPSS Statistics 27.0软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同种植模式及发酵时间对可可豆理化品质的影响

2.1.1 色泽特征变化分析

基于色度学参数分析,采用 L^* 、 a^* 、 b^* 色彩系统进行表征并用 ΔE 指标量化样品与白板的色差程度^[21]。 L^* 值可反映样品亮度,数值越高色泽越趋近白色。由表1可知,MC-WN-0处理 L^* 值显著高于IC-WN-0处理,MC-WN-6处理 L^* 值显著高于IC-WN-6处理,表明发酵前后,单作模式比槟榔间作模式下的可可豆具有更高的亮度。与发酵前相比,MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别降低8.62%、6.71%和11.59%,说明发酵能降低可可豆的亮度。IC-WN-0与IC-QH-0处理间的 L^* 值未达到显著差异,IC-WN-6与IC-QH-6处理间的 L^* 值无显著差异,说明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆的亮度没有明显影响。

ΔE 表示可可豆颜色与对照样本(白板)之间的色差,数值越高则表明样品与白板颜色差异越明显。MC-WN-0和IC-WN-0处理间的 ΔE 值未达到显著水平,IC-WN-6处理的 ΔE 值显著高于MC-WN-6处理,表明种植模式对可可豆发酵前的色差没有明显影

响;发酵后,槟榔间作模式下可可豆的色差显著高于单作模式,发酵过程中单作模式的色差波动高于槟榔间作模式。与发酵前相比,MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别升高3.55%、7.96%和12.10%,说明发酵能增加可可豆的色差。IC-WN-0与IC-QH-0处理间的 ΔE 值无显著差异,IC-WN-6与IC-QH-6处理间的 ΔE 值无显著差异,说明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆的色差没有明显影响。

表1 不同种植模式及发酵时间下可可豆色差值比较

样品编号	指标 Index			
	L^*	a^*	b^*	ΔE
MC-WN-0	48.24±1.42 ^a	5.36±0.33 ^a	0.79±0.20 ^a	47.88±1.97 ^a
MC-WN-3	40.85±1.86 ^c	6.12±0.39 ^b	1.05±0.17 ^c	52.74±1.89 ^{ab}
MC-WN-6	44.08±1.30 ^a	5.42±0.28 ^c	3.93±0.35 ^c	49.58±1.25 ^b
IC-WN-0	45.93±1.53 ^b	5.15±0.35 ^b	-1.1±0.16 ^c	47.59±1.50 ^a
IC-WN-3	45.08±1.44 ^a	7.05±0.43 ^a	2.92±0.13 ^a	48.78±1.38 ^c
IC-WN-6	42.85±1.57 ^b	7.95±0.32 ^a	5.92±0.41 ^{ab}	51.38±1.51 ^{ab}
IC-QH-0	46.86±0.41 ^a	5.97±0.09 ^c	3.14±0.08 ^a	46.87±0.42 ^a
IC-QH-3	42.61±0.90 ^b	6.92±0.21 ^{ab}	1.25±0.16 ^b	51.12±0.89 ^b
IC-QH-6	41.43±1.52 ^b	7.16±0.36 ^b	4.92±0.50 ^b	52.54±1.56 ^{ab}

注:数据形式为平均值±标准偏差;小写字母不同表示同一种种植模式不同发酵时间差异显著($P < 0.05$);大写字母不同表示同一发酵时间不同种植模式差异显著($P < 0.05$)。

2.1.2 蛋白质含量变化分析

蛋白质是形成可可豆香气成分的重要底物^[22]。如图1(A)所示,MC-WN-0和IC-WN-0处理间的蛋白质含量无显著差异,MC-WN-6和IC-WN-6处理间的蛋白质含量无显著差异,表明种植模式对可可豆发酵前后的蛋白质含量没有明显影响。随发酵的进行,各种种植模式下蛋白质含量均呈现下降趋势,与发酵前相比,MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别下降11.24%、10.08%和7.46%,说明发酵促使蛋白质降解。发酵前,各种种植模式和地区处理的蛋白质含量均无显著差异;发酵后,IC-QH-6处理的蛋白质含量显著高于IC-WN-6处理,说明在槟榔间作模式下,琼海地区发酵后的可可豆中有更多的蛋白质转变成其他物质。

2.1.3 可可脂含量变化分析

可可脂作为生产巧克力的重要原料,其含量会对可可制品的物理特性和口感具有直接影响^[23]。由图1(B)可以看出,MC-WN-0处理的可可脂含量显著高于IC-WN-0处理,MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理间的可可脂含量无显著差异,表明发酵前,单作模式比槟榔间作模式下的可可豆具有更高的可可脂含量。随发酵的进行,各种种植模式下可可脂含量均呈现上升趋势,与发酵前相比,MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别增加5.06%、10.58%和6.86%,说明发酵使可可脂含量上升。IC-WN-0与IC-QH-0处理

间的可可脂含量无显著差异, IC-WN-6与IC-QH-6处理间的可可脂含量无显著差异, 说明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中的可可脂含量没有明显影响。

2.1.4多酚含量变化分析

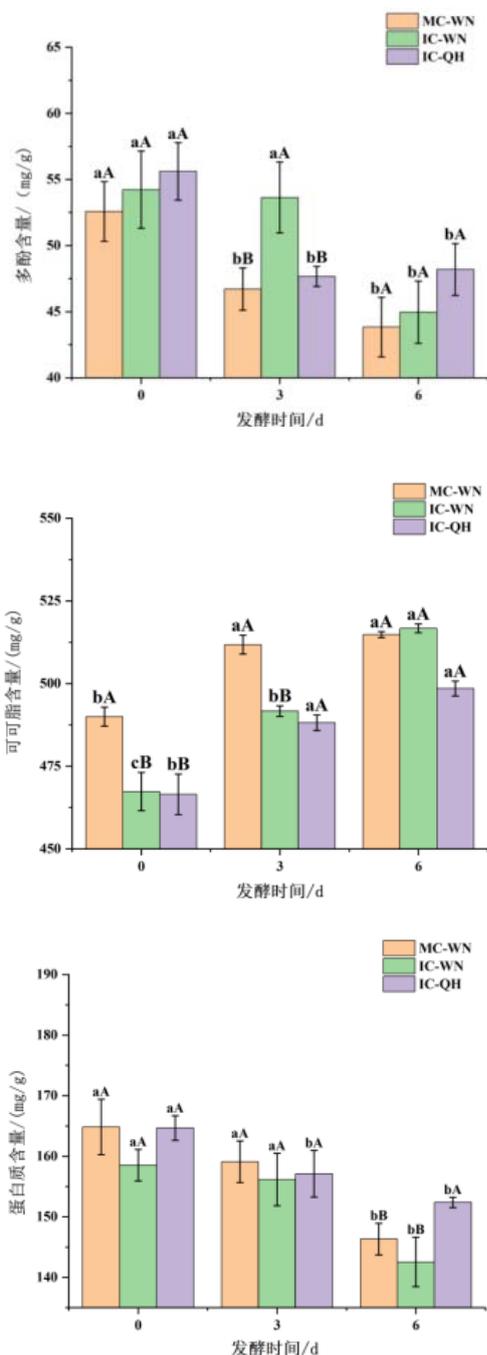


图1 种植模式对可可豆发酵期间蛋白质(A)、可可脂(B)、多酚(C)含量的影响

酚类化合物是储存在可可种子子叶色素细胞中的次级代谢物, 并在可可果实成熟过程中积累^[24]。可可豆中的总酚含量见图1(C), MC-WN-0和IC-WN-0处理间的多酚含量无显著差异, MC-WN-6和IC-WN-6处理间的多酚含量无显著差异, 表明槟榔间作与

单作模式对可可豆多酚含量没有明显影响。与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别显著下降16.64%、17.10%和13.34%, 说明发酵过程促使可可豆中的多酚转变成其他物质。IC-WN-0和IC-QH-0处理间的多酚含量无显著差异, IC-WN-6和IC-QH-6处理间的多酚含量无显著差异, 表明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中多酚含量没有明显影响。

2.1.5生物碱含量变化分析

可可碱(3,7-二甲基黄嘌呤)是可可豆中的主要甲基黄嘌呤, 其次是咖啡因(1,3,7-三甲基黄嘌呤)^[25]。如图2A所示, MC-WN-0和IC-WN-0处理间的可可碱含量无显著差异, MC-WN-6和IC-WN-6处理间的可可碱含量无显著差异, 表明种植模式对可可豆发酵前后的可可碱含量没有明显影响。随发酵的进行, 各种种植模式下可可碱含量均呈下降趋势, 与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别下降42.77%、31.98%和22.43%, 说明随发酵进行可可豆中可可碱含量会降低。IC-WN-0和IC-QH-0处理间的可可碱含量无显著差异, IC-WN-6和IC-QH-6处理间的可可碱含量无显著差异, 表明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中可可碱含量没有明显影响。

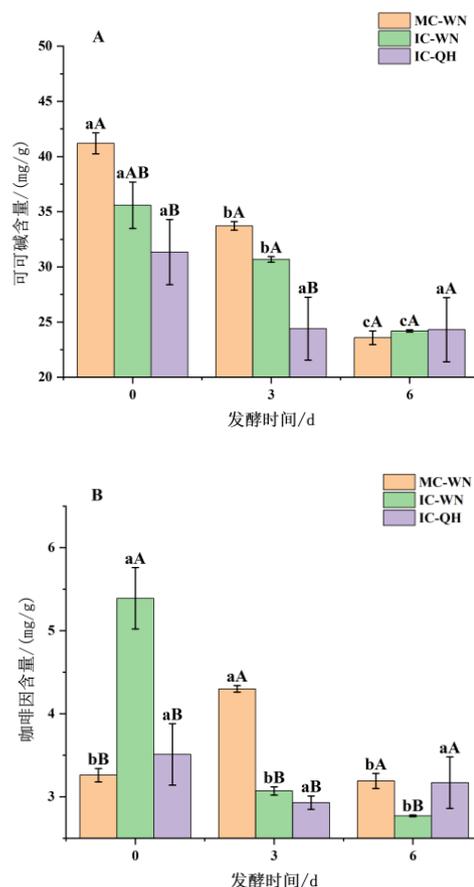


图2 种植模式对可可豆发酵期间可可碱(A)、咖啡因(B)含量的影响

如图2B所示, MC-WN-0处理的咖啡因含量显著低于IC-WN-0, 低39.52%, MC-WN-6处理显著高于IC-WN-6, 高15.16%, 表明发酵

前, 槟榔间作模式比单作模式下的可可豆中咖啡因含量更多; 发酵后, 单作模式比槟榔间作模式下的可可豆中咖啡因含量更多。与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理分别下降2.15%、48.61%和9.69%, 说明咖啡因含量在发酵过程中降低。IC-WN-0处理显著高于IC-QH-0, 高53.56%, IC-WN-6处理显著低于IC-QH-6, 低12.26%, 说明发酵前, 万宁地区比琼海地区槟榔间作模式下的可可豆有更高的咖啡因含量; 发酵后, 琼海地区比万宁地区槟榔间作下的可可豆有更高的咖啡因含量。

2.2 不同种植模式及发酵时间对可可发酵期间挥发性化合物分析

2.2.1 挥发性化合物组成及含量变化分析

利用HS-SPME-GC/MS方法对9个处理样品的挥发性化合物及相对含量进行分析鉴定, 共检出44种挥发性化合物, 按官能团划分为醛类5种、醇类11种、酸类1种、酮类4种、酯类12种、烯炔类5种、烷烃类3种、吡嗪类2种、其他1种。MC-WN可可豆共检测出32种化合物, 其中醛类2种、醇类7种、酸类1种、酮类3种、酯类12种、烯炔类4种、烷烃类1种、吡嗪类2种, 其中, 异戊醇、2,3,5-三甲基吡嗪2种物质为特有挥发性成分; IC-WN可可豆共检测出31种化合物, 其中醛类4种、醇类6种、酸类1种、酮类3种、酯类12种、烯炔类3种、烷烃类2种, 其中, 糠醛为特有挥发性成分; IC-QH可可豆共检测出40种化合物, 其中醛类4种、醇类9种、酸类1种、酮类4种、酯类12种、烯炔类5种、烷烃类3种、吡嗪类1种, 其他类1种, 其中, (S)-(-)-1-苯基乙醇、4-萜烯醇、苏合香醇、胡椒酮、石竹烯、2-基苯甲酸戊烷、苯甲腈6种物质为特有挥发性成分。由图3A可知, IC-QH-6处理的化合物种类最多(36种), 其次是IC-QH-3(31种)、IC-WN-6(26种)、MC-WN-3(23种)、IC-QH-0(24种)和MC-WN-6(25种)、IC-WN-3(23种)、IC-WN-0(22种), MC-WN-0处理的化合物种类最少, 为21种, 这表明槟榔间作模式下可可豆发酵后的挥发性化合物种类比发酵前更丰富。9个处理样品共有的挥发性物质有14种, 分别是苯甲醛、壬醛、苯乙醇、2-庚醇、乙醇、芳樟醇、乙酸、2-庚酮、苯乙酮、苯乙酸乙酯、丁二酸二乙酯、己酸乙酯、乙酸乙酯、 γ -丁内酯, 其中, 苯乙醇、2-庚醇、乙醇、芳樟醇这4种醇类的挥发性化合物变化特征与Oberparleiter等^[26]的研究结果一致, 表现出明显的代谢反应。

图3B为化合物类别的挥发性物质占总量的百分比, 不同处理的可可豆发酵过程中醇类、酯类挥发性化合物的相对含量较高, 其中, MC-WN处理的可可豆发酵过程中酯类物质的相对含量呈逐渐上升趋势, 与发酵前相比增长56.67%, 醇类物质的相对含量呈逐渐下降趋势, 主要原因为该模式下可可豆发酵中其酸性挥发性物质含量较多, 与Lima 等人^[27]的研究一致, 醇类由于菌群代谢继续合成酸类。Frauendorfer等^[28]研究表明, 一些短链羧酸如乙酸, 会在可可豆发酵的挥发性化合物中出现; IC-WN处理的可可豆发酵前醇类物质的相对含量最高, 占该时期挥发性物质种类的54%, 发酵中酯类物质的相对含量最高, 占该时期挥发性物质种类的63%; IC-QH处理的可可豆发酵中酯类物质基本

不变, 占36%~44%, 醇类物质在发酵第3天达到峰值44%, 发酵后与发酵前醇类挥发性化合物相比上升33.33%。

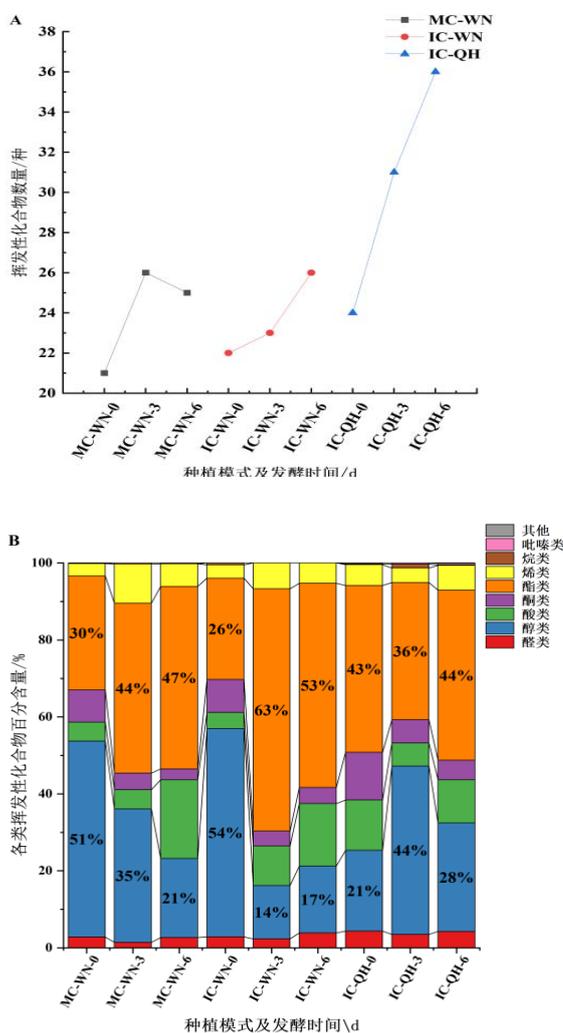


图3 不同种植模式及发酵时间下的挥发性成分数量(种) (A)、各类挥发性成分相对丰度(%) (B)

2.2.2 挥发性化合物差异分析

对44种挥发性化合物进行正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)。以44种挥发性化合物作为因变量, 不同种植模式及发酵时间作为自变量, 通过OPLS-DA(图4A), 可以实现不同种植模式下样品有效区分。本次分析中的自变量拟合指数(R_x^2)为0.990, 因变量拟合指数(R_y^2)为0.981, 模型预测指数(Q^2)为0.811, R^2 和 Q^2 超过0.5表示模型拟合结果可接受。经过200次置换检验, 如图4B所示, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于0, 说明模型不存在过拟合, 模型验证有效, 认为该结果可用于不同可可种植模式及发酵阶段的挥发性成分鉴别分析。

通过计算投影变量重要性(VIP值)筛选重要特征物质。以VIP>1为标准, 筛选出6种对可可豆分类贡献显著的挥发性物质(图4C), 包括苯乙醇、3-甲基-2-丁醇、2-戊醇、芳樟醇、乳酸乙酯、苯乙酮。醇类化合物往往与花香及甜美芳香特性密切相关

关, 苯乙醇能够呈现出玫瑰等香气^[29]。MC-WN-0和IC-WN-0处理间的苯乙醇含量无显著差异, MC-WN-6和IC-WN-6处理间的苯乙醇含量无显著差异, 表明种植模式对可可豆发酵前后的苯乙醇含量没有明显影响。随发酵的进行, MC-WN和IC-QH可可豆中苯乙醇含量呈现先上升再下降趋势, IC-WN可可豆中苯乙醇含量呈现下降趋势, 与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理可可豆中苯乙醇含量均上升, 说明发酵有利于苯乙醇含量上升。IC-WN-0和IC-QH-0处理间的苯乙醇含量无显著差异, IC-WN-6和IC-QH-6处理间的苯乙醇含量无显著差异, 表明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中苯乙醇含量没有明显影响。3-甲基-2-丁醇散发出麦芽香气, 仅在IC-QH-3和IC-QH-6处理中检测到且含量较高, 分别为 $166.18 \pm 19.31 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $187.44 \pm 21.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。2-戊醇具有“果香、柠檬草香和花香”的香气特征, 有助于产生优质可可中的果味和花香^[30], 仅在MC-WN-0和IC-WN-0处理中检测到, 且MC-WN-0处理显著高于IC-WN-0, 说明在发酵前, 万宁地区单作模式比槟榔间作模式具有更高的2-戊醇含量。

芳樟醇是可可豆挥发性物质中的主要醇类成分, 对一些可可品种的花香和茶香有较大贡献^[31], MC-WN-0和IC-WN-0处理间的芳樟醇含量无显著差异, MC-WN-6和IC-WN-6处理间的芳樟醇含量无显著差异, 表明种植模式对可可豆发酵前后的芳樟醇含量没有明显影响。随发酵的进行, MC-WN和IC-WN可可豆中芳樟醇含量呈现先下降再上升趋势, IC-QH可可豆中芳樟醇含量呈现下降趋势, 与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理可可豆中芳樟醇含量分别下降17.69%、53.32%和49.63%, 说明发酵使芳樟醇含量下降。IC-WN-0和IC-QH-0处理间的芳樟醇含量有显著差异, IC-WN-6和IC-QH-6处理间的芳樟醇含量有显著差异, 表明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中芳樟醇含量有明显影响。

酯类是仅次于吡嗪类的重要挥发性化合物, 主要来源于发酵厌氧阶段有机酸与醇的反应, 可提供可可豆的水果风味^[32]。乳酸乙酯具有朗姆酒、水果和奶油的香气, 仅在发酵期间产生。MC-WN-6和IC-WN-6处理间的乳酸乙酯含量有显著差异, 表明种植模式对可可豆发酵前后的乳酸乙酯含量有明显影响。随发酵的进行, 乳酸乙酯含量均呈现上升趋势, 与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理可可豆中乳酸乙酯含量分别上升94.25%、2.21%和35.45%, 说明发酵使乳酸乙酯含量上升。IC-WN-6和IC-QH-6处理间的乳酸乙酯含量有显著差异, 表明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中乳酸乙酯含量有明显影响。

苯乙酮具有香豆素和扁桃的气味, 是可可香气的组成部分之一^[33]。MC-WN-0和IC-WN-0处理间的苯乙酮含量有显著差异, MC-WN-6和IC-WN-6处理间的苯乙酮含量无显著差异, 表明发酵前, 种植模式对可可豆发酵前后的苯乙酮含量有明显影响; 发酵后, 种植模式对可可豆发酵前后的苯乙酮含量没有明显影响。随发酵的进行, MC-WN可可豆中苯乙酮含量呈现下降趋势, IC-WN和IC-QH可可豆中苯乙酮含量呈现先下降再上升趋势, 与发酵前相比, MC-WN-6、IC-WN-6和IC-QH-6处理可可豆中苯乙酮含量分

别下降70.49%、28.51%和48.10%, 说明发酵使苯乙酮含量下降。IC-WN-0和IC-QH-0处理间的苯乙酮含量有显著差异, IC-WN-6和IC-QH-6处理间的苯乙酮含量有显著差异, 表明在槟榔间作模式下不同种植区对可可豆中苯乙酮含量有明显影响。

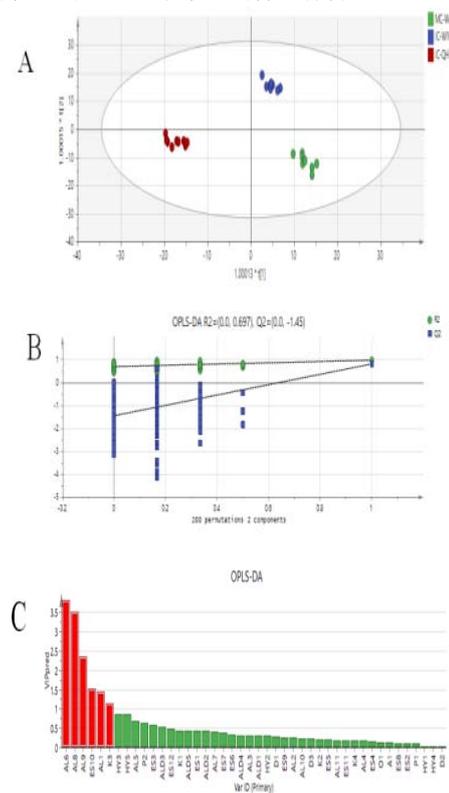


图4 不同种植模式及发酵时间可可豆的OPLS-DA(A)、模型交叉验证结果(B)及投影变量重要性值(C)

3 讨论

可可豆的化学成分会因生长条件的差异而有所不同^[34], 进而影响可可豆发酵品质。本研究表明, 在理化特性方面, 槟榔间作模式下可可豆的L*值在发酵前显著低于单作模式, 这可能与槟榔间作模式下遮荫诱导的酚类物质(如醌类聚合物)积累相关^[35]。单作模式下可可豆蛋白质降解现象与谷风林等^[36]关于可可蛋白酶解规律的研究一致, 随着发酵进程, 蛋白质含量降低, 发酵后槟榔间作模式下的蛋白质含量低于单作模式, 推测槟榔间作模式为后续美拉德反应提供更多的风味前体。可可脂既参与细胞膜构建, 又以三酰基甘油(TAG)形式储存能量^[37]。不同种植模式的光照条件差异直接关联TAG中脂肪酸的合成过程, 其光依赖性特征需依赖光合作用光反应阶段产生的还原能力及三磷酸腺苷(ATP)供应^[38], 一定程度上影响了槟榔间作模式下可可豆中可可脂的合成, 导致万宁地区发酵前槟榔间作模式下可可脂含量低于单作模式。

多酚代谢的差异进一步凸显了种植模式对次生代谢的调控效应。发酵前, 槟榔间作模式下多酚含量显著高于单作模式, 但多酚含量随发酵下降幅度更大, 这与Isah等^[39]关于遮荫诱导次生代谢增强的结论相印证, 槟榔冠层降低了光合有效辐射, 促使

可可植株通过多酚合成增强抗逆性,而发酵阶段微生物的活跃代谢则加速了多酚转化。但槟榔间作模式发酵后仍维持更高的多酚保留量,暗示其代谢路径可能更倾向于生成多酚衍生物而非完全降解,这一机制需通过靶向代谢组学进一步解析。在发酵前,可可豆表现出较高含量的咖啡因。然而,随着发酵过程的进行,咖啡因含量降低,在可可发酵中和发酵后达到较低的水平。可可豆内的可可碱、咖啡因含量主要通过物理渗透途径下降,其含量变化与种植模式关系不大。

HS-SPME-GC/MS鉴定结果显示,可可豆挥发性成分种类主要由醇类、酸类、酯类、酮类、吡嗪类、醛类、烯炔和烷烃类化合物组成,这与Counet等^[40]的研究结论一致。万宁地区槟榔间作模式下发酵后可可豆中挥发性化合物含量多于单作模式,万宁地区槟榔间作模式下可可豆中挥发性化合物含量多于琼海地区槟榔间作模式。在发酵后,万宁地区槟榔间作模式下,检测到更多具有理想风味的醇类物质,如苯乙醇、2-戊醇、芳樟醇等,这些醇类能产生花香、果香和青草香气,其中,苯乙醇是精细风味的关键成分^[41]。同时,万宁地区槟榔间作模式比单作模式检测出种类和含量更多的酯类化合物,这可能是由于槟榔凋落物分解释放的钾离子通过激活丙酮酸脱羧酶促进酯基生成^[42]。苯乙酸乙酯作为玫瑰蜜香的关键载体,是通过苯丙氨酸代谢途径合成的,其浓度水平与巧克力产品的花香复杂度和消费者接受度呈显著正相关^[43],暗示槟榔间作模式可能优化了特定代谢通路的活性。除醇类和酯类外,吡嗪类化合物作为可可干燥阶段美拉德反应的产物,对坚果风味的形成具有独特贡献^[44]。单作模式发酵中和发酵后均检出微量吡嗪类物质,琼海地区发酵后可可豆中2,3-二乙基-5-甲基吡嗪含量最高。挥发性化合物的协同作用表明,槟榔间作模式不仅改变了单一化合物的含量,还对可可豆风味形成产生了影响,为提升可可豆发酵品质提供了物质基础。种植地区差异也会在一定程度上影响可可豆发酵品质。

4 结论

本研究表明,发酵前单作模式下可可豆中可可脂含量更高,发酵后槟榔间作模式下可可豆中蛋白质和多酚含量更高。随发酵的进行,槟榔间作模式下可可豆中多酚含量下降幅度更大。可可单作与槟榔间作模式下,可可豆发酵过程中的挥发性化合物种类组成相似,由醇类、酸类、酯类、酮类、吡嗪类、醛类、烯炔和烷烃类化合物组成。而部分挥发性化合物的含量变化有差异,其中苯乙醇、3-甲基-2-丁醇、2-戊醇、芳樟醇、乳酸乙酯、苯乙酮这6种挥发性化合物,在不同种植模式的可可豆发酵过程中,其含量变化对可可豆发酵品质差异具有显著贡献。发酵后,槟榔间作模式下可可豆中苯乙醇、乳酸乙酯、苯乙酮含量均高于单作模式。3-甲基-2-丁醇仅在琼海地区槟榔间作模式下可可豆的发酵中和发酵后阶段被检测到。可可单作与槟榔间作模式下的可可豆,在发酵过程中的理化指标和挥发性成分组成及含量变化存在一定差异。研究结果为优化可可种植及可可豆发酵工艺提供了理论依据。

[基金项目]

万宁市重点科研项目 槟榔/可可间作模式下可可新品种品质表现研究与应用(2023wnkj04); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项热带饮料作物(咖啡、可可)优质抗逆种质创制与新品种选育(1630142022003)。

[参考文献]

- [1]VERNA R.The history and science of chocolate[J].Malaysian Journal of Pathology,2013,35(2):111-121.
- [2]CORTI R,FLAMMER A J,HOLLENBERG N K,LÜSCHER T F. Cocoa and cardiovascular health[J].Circulation,2009,119(10):1433-1441.
- [3]BEHZADI M,BIDESHIKI M V,AHMADI-KHORRAM M,ZAREZADEH M, HATAMI A.Effect of dark chocolate/cocoa consumption on oxidative stress and inflammation in adults:A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis of controlled trials[J].Complementary Therapies in Medicine,2024,84(1):1-15.
- [4]ZHANG M J,ZHANG H F,JIA L,ZHANG Y,QIN R W,XU S H,MEI Y W.Health benefits and mechanisms of theobromine[J].Journal of Functional Foods,2024,115(1):1-7.
- [5]FEBRIANTO N A,WANG S,ZHU F.Chemical and biological properties of cocoa beans affected by processing:A review[J].Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2022,62(30):8403-8434.
- [6]LEFEBER T L,GOBERT W,VRANCKEN G,CAMU N,DE VUYST L.Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels[J].Food Microbiology,2011,28(3):457-464.
- [7]ARULMARI R,VISVANATHAN R.Effect of Fermentation Methods and Turning Interval on the Quality of Cocoa Beans(Theobroma cacao)[J].Agricultural Research,2024,13(1):586-598.
- [8]MANUEL J C C,LAURA G,GABRIELA M Z M,JOSE M M M.Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (Theobroma cacao L.)Beans[J].Journal of Food Quality,2018(1):1-14.
- [9]LIMA C O DE C,CASTRO G M DE,SOLAR R,VAZ A B M,LOBO F, PEREIRA G, RODRIGUES C,VANDENBERGHE L,PINTO L R M, COSTA A M DA,KOBLITZ M G B,BENEVIDES R G, AZEVEDO V, UETANABARO A P T, SOCCOL C R, GÓES-NETO A.Unraveling potential enzymes and their functional role in fine cocoa beans fermentation using temporal shotgun metagenomics[J].Frontiers in Microbiology, 2022,13(1):1-12.
- [10]FRANZEN M,BORGERHOFF M.Ecological,economic and social perspectives on cocoa production worldwide[J].Biodiversity and Conservation,2007,16(13):3835-3849.

- [11]周波.海南可可中多酚和可可碱的提取分离技术及成分分析研究[D].广东海洋大学,2017.
- [12]赵溪竹,朱自慧,秦晓威,等.槟榔间作条件下不同修剪方式对可可生长和产量的影响[J].中国热带农业,2021(1):69-73.
- [13]KOBİ H DE BARROS,FERNANDES R B ALVES, SENNA D SAL GADO DE, BORGES L L RODRIGUES,VIDIGAL M C T R,MARROCOS P C L,FREITAS V V,SOUZA M S DA SILVEIRA DE,CASTRO G A D,FERNANDES S A,FERRAZ K DA C R,STRINGHETA P C.Metabolic profile of fatty acids, phenolic compounds and methylxanthines of cocoa kernels from different cultivars produced in cabruca and full sun farming systems[J].Food Research International,2024,197(1):1-13.
- [14]张映萍,徐飞,穆明兴,等.7种不同果型草果果实的挥发性成分及粉质特性分析[J].热带作物学报,2024,45(4):813-824.
- [15]国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.食品中蛋白质的测定:GB/T 5009.5—2016[S].中国标准出版社,2016.
- [16]杨德伟,伍宝朵,吴国星,等.11份可可种质果实性状及品质综合评价[J].热带作物学报,2025,46(2):322-332.
- [17]汤雯.可可多酚主要成分鉴定及其体外抗氧化活性评价[D].浙江大学,2012.
- [18]YANG D W,WU B D,QIN X W,ZHAO X,ZHU Z H,YAN L,ZHANG F J,WU G X,LI F P.Quality differences and profiling of volatile components between fermented and unfermented cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.)of criollo, forastero and trinitario in China[J].Beverage Plant Research,2024,4(1):1-10.
- [19]岳一轮,秦晓威,李付鹏,等.不同基因型可可发酵过程中挥发性香气成分变化规律研究[J].热带作物学报,2024,45(3):564-575.
- [20]ASIMI S,REN X,ZHANG M,LI S X,GUAN L N,WANG Z H, LIANG S,WANG Z Y.Fingerprinting of volatile organic compounds for the geographical discrimination of rice samples from Northeast China[J].Foods,2022,11(12):1-11.
- [21]吴雅璐.不同干燥方法对花椒叶色泽、挥发性物质及抗氧化性的影响[D].山西师范大学,2019:245-249.
- [22]ESCOBAR S,SANTANDER M,ZULUAGA M,CHACÓN I,RODRÍGUEZ J,VAILLANT F.Fine cocoa beans production:Tracking aroma precursors through a comprehensive analysis of flavor attributes formation[J].Food Chemistry,2021,365(19):1-10.
- [23]FANG Y M,LI R,CHU Z,ZHU K X,GU F L,ZHANG Y J.Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.)during primary fermentation[J].Food Science & Nutrition, 2020,8(8):4121-4133.
- [24]NAIKOO M I,DAR M I,RAGHIB F,JALEEL H,AHMAD B,RAINA A,KHAN F A, NAUSHIN F.Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance:An Overview[C].Plant Signaling Molecules.2019(1):157-168.
- [25]ZHENG X Q,KOYAMA Y,NAGAI C,ASHIHARA H.Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits[J].Journal of Plant Physiology,2004, 161(4):363-369.
- [26]OBERPARLEITER S,ZIEGLER G.Amyl alcohols as compounds indicative of raw cocoa bean quality[J].Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A,1997,204(2):156-160.
- [27]LIMA L J R,ALMEIDA M H,NOUT M J R,ZWIETERING H M.*Theobroma cacao* L., "the food of the gods":Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation[J].Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011,51(8):731-761.
- [28]FRAUENDORFER F,SCHIEBERLE P.Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(21):10244-10251.
- [29]RODRIGUEZ-CAMPOS J,ESCALONA-BUENDÍA H B,CONTRERAS-RAMOS S M,OROZCO-AVILA I,JARAMILLO-FLORES E,LUGO-CERVANTES E.Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa[J].Food Chemistry,2012,132(1): 277-288.
- [30]DUCKI S,MIRALLES-GARCÍA J,ZUMBE A,TORNERO A,STOREY D M. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products[J].Talanta, 2008,74(5):1166-1174.
- [31]ZIEGLER G.Linalool contents as characteristic of some flavor grade cocoas[J].Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung,1990,191(4):306-309.
- [32]APROTOSOLE A C,LUCA S V,MIRON A.Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview[J].Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,2016,15(1):73-91.
- [33]ALASTI F M,ASEFI N,MALEKI R,SEIEDLOUHERIS S S.Investigating the flavor compounds in the cocoa powder production process[J].Food Science & Nutrition,2019,7(12):3892-3901.
- [34]KONGOR J E,HINNEH M,VAN DE WALLE D,AFOAKWA E O,BOECKX P,DEWETTINCK K.Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao* L.)bean flavour profile—A review[J].Food Research International,2016,82(1):44-52.
- [35]GU F,TAN L,WU H,FANG Y,XU F,CHU Z,WANG Q H.Comparison of Cocoa Beans from China, Indonesia and Papua New Guinea [J].Food,2013,5(2):183-197.
- [36]谷凤林,房一明.可可发酵过程中蛋白质降解与吡嗪类化合物变化分析[J].热带作物学报,2012,33(12):2267-2272.
- [37]FAN J,ZHOU C,YU L H,LI P,SHANKLIN J,XU C C.Diversion of carbon flux from sugars to lipids improves the growth of an

arabidopsis starchless mutant[J].Trends in Plant Science,2019,8(7):229-235.

[38]GARRIDO A,CONDE A DE V,RIC C H CUNH A.The influence of light microclimate on the lipid profile and associated transcripts of photosynthetically active grape berry seeds[J].Frontiers in Plant Science,2023,4(13):1022-1037.

[39]ISAH T.Stress and defense responses in plant secondary metabolites production[J].Biological Research,2019,52(1):1-19.

[40]COUNET C,OUWERX C,ROSOUX D,COLLIN S.Relationship between p.

[41]rocyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(20):6243-6249.

[42]TEJEDA J F,ARANGO-ANGARITA J,CUERVO J L.Impact of solar pre-drying and yeast starter inoculation treatments on volatile compounds in cocoa(Theobroma cacao L)beans from Southwestern Colombia[J].Applied Food Research,2024,4(2):1-8.

[43]TIGRERO-VACA J,MARIDUEÑA-ZAVALA M G,LIAO H L, PRA

DO-LINCE M,ZAMBRANO-VERA C S,MONSERRATE-MAGGI B,CEVALLOS-CEVALLOS J M.Microbial diversity and contribution to the formation of volatile compounds during fine-flavor cacao bean fermentation[J].Foods,2022,11(7):1-16.

[44]BECERRA L D,RUIZ-PARDO R Y,VAILLANT F,ZULUAGA M V,BOULANGER R, SANTANDER M, ESCOBAR S. Modulating fine flavor cocoa attributes:Impact of seed-to-bean transformation under controlled conditions on metabolite, volatile and sensory profiles[J].Food Research International,2024,196(1):1-11.

作者简介:

周云帆(2003--),女,汉族,云南玉溪人,本科,中国热带农业科学院香料饮料研究所/农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室/海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室、云南农业大学热带作物学院,研究方向:食品科学与工程。

*通讯作者:

李付鹏,博士,研究员,从事热带作物种质资源与遗传育种研究。