酵素処理によるカカオ豆の収れん味の抑制

吉山 正章*・伊東 禎男*

Decrease of Astringency of Cacao Beans by an Enzymatic Treatment

Masaaki YOSHIYAMA* and Yoshio ITO*

* Lotte Central Laboratory Co., Ltd., 3-1-1, Numakage, Urawa-shi, Saitama 336

An efficient method to remove astringency from purple cacao beans (insufficiently-fermented beans) was developed. Purple beans contained much of polyphenolic substances than brown beans (well-fermented beans) and showed strong astringency. We have screened enzyme preparations being able to decrease astringency of purple bean water extracts. Polyphenol oxidase (PPO) from *Coriolus versicolor* was the most effective among the examined enzymes and then it was found that polyphenolic substances in purple bean water extracts were oxidized and insolubilized by the enzymatic reaction. Autoclaved purple beans were soaked in the PPO solution and incubated at 45°C for 3 h. The polyphenolic contents of purple beans were decreased to the level of those of brown beans by the enzymatic treatment.

(Received Feb. 8, 1995)

チョコレートの主要原料であるカカオ豆は原産地での発酵過程を経ることによって豆の内部でアミノ態窒素の増加¹⁾、還元糖の増加²⁾、ポリフェノールの酸化重合³⁾等の成分変化が起こり、フレーバー前駆体の生成蓄積が行われる。発酵を終えたカカオ豆の大部分は胚乳部が黒褐色に変化したブラウン豆であるが、この他に発酵が不完全なパープル豆と呼ばれる豆が少量ではあるが存在する。

このパープル豆は多量のアントシアニンを含み、その胚乳部は紫色を呈している。また、非常に収れん味が強く、カカオ豆の中にパープル豆が10%以上含まれているとチョコレートの嗜好性が著しく低下する⁴⁾ことが報告されている。この為、パープル豆の収れん味を抑えることにより、チョコレートの品質は大きく向上するものと期待される。

パープル豆は発酵が不完全である為、未酸化のポリフェノールを多量に含むと考えられるが、これまでカカオ豆のポリフェノールに関する研究は生豆⁵⁻⁸⁾や発酵過程での変化^{3,9)}を対象にしており、パープル豆に関してはアントシアニンの含量⁴⁾が調べられているのみであ

る。

そこで我々はパープル豆とブラウン豆のポリフェノール含量の違いを明確にし、パープル豆の収れん味を抑制する技術を開発する目的で本研究を行った。

実験方法

1. ブラウン豆及びパープル豆の選別

ガーナ産カカオ豆を一個づつ切断し、その断面の色調からブラウン豆及びパープル豆（以下、各々Br, Puと略記する）を選別した。

2. ポリフェノールの定量

カカオ豆から種皮、胚芽を取り除いたカカオニブをコーヒーマルで粉碎後、その10gを100ml容コニカルビーカーに入れ、純水100mlを加えて40°Cで1時間攪拌しながら抽出を行った後、濾過した濾液を検液とした。全ポリフェノール、プロアントシアニジンの測定は中林¹⁰⁾の方法に従い、各々(+)ーカテキン、シアニジンとして測定した。フラバノールは小宮山ら¹¹⁾の方法に従い(+)ーカテキンとして測定した。

* (株)ロッテ中央研究所 (〒336 浦和市沼影3-1-1)

3. 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck 製アルミニウムシートシリカゲルを使用し、ブタノール：酢酸：水 (4:1:5, v/v) で展開後、4% バニリン硫酸で発色させた。

4. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

「2.2. ポリフェノール成分の定量」で使用したカカオ豆水抽出液 10 ml をエバポレーターで濃縮乾固した固形分 0.8 g をシリカゲルカラム (1.8 cm×40 cm) に供し TLC と同じ溶媒を用いて流速 0.5 ml で溶出した。溶出液の各フラクション (8 ml/tube) は減圧により濃縮乾固した後、5 ml の純水に溶解し、プロアントシアニジン、全ポリフェノールを定量した。

5. 供試酵素

ナリンジナーゼ (田辺製薬)、ヘスベリジナーゼ (田辺製薬)、アントシアナーゼ (ヤクルト本社)、タンナーゼ (三共)、ヘミセルラーゼ (田辺製薬) は食品用酵素として市販されているものを使用した。カワラタケのポリフェノールオキシダーゼ (以下 PPO と略記) は以下の方法で調製したものを使用した。

培地 250 ml (シュクロース 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25%, 酵母エキス 1%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.009%, pH 4.5) を、500 ml 容の坂口フラスコに入れ、121°C、20 分間オートクレーブ殺菌し、カワラタケ (*Coriolus versicolor* IFO 30388) を植菌して 25°C、7 日間振とう培養 (120 rpm, 振幅 75 mm) 後、培養濾液を硫酸塩析 (90% 飽和) し、冷却遠心分離 (10 000×g, 30 min, 5°C) により沈殿を分離した。得られた沈殿を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.8) に溶解し、同緩衝液に対して透析したものを粗酵素液とした。

6. ポリフェノールオキシダーゼ活性の測定

ポリフェノールオキシダーゼ活性の測定は既報¹²⁾に従った。

7. 可視部吸収スペクトル測定

分光光度計 (日立, U-3200) で常法により測定した。

8. カカオ豆水抽出液の濁度の測定

酵素添加後のカカオ豆水抽出液の濁度は、生成した沈澱を遠心分離 (10 000×g, 15min) により回収し、純水で 2 回洗浄後、再び純水 10 ml に再懸濁し、660 nm の吸光度を測定した。

9. 電気泳動

電気泳動はアトー製濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (濃度 10-20%) を使用し、15 mA 定電流で行った。蛋白質の染色には関東化学製銀染色キットを用いた。

10. カカオ豆の酵素処理

PPO 2 000 U を純水 80 ml に溶解し PPO 溶液を調製した。この PPO 溶液に、粒径 5~7 mm 程度に粗粉碎した Pu 100 g を浸漬し、45°C、3 時間反応を行った。反応終了後 Pu は残存溶液と共にアルミ製トレー (25 cm×30 cm) に均一に広げ、90°C のドライオープン中で 6 時間乾燥した。

ヘミセルラーゼ処理を併用する場合は、80 ml の PPO 溶液 (25 U/ml) にヘミセルラーゼを 100 mg 溶解し PPO 処理を行った。

界面活性剤処理を併用する場合はショ糖脂肪酸エステル (三菱化成食品, S-1570) 100 mg を溶かした溶液で PPO 溶液を調製後、Pu ニブを浸漬した後に、20 分間減圧脱気したのち反応を行った。

Pu ニブに蒸煮処理を施す場合は、オートクレーブで 120°C、10 分間蒸煮した後、PPO 処理を行った。

実験結果と考察

1. Pu と Br のポリフェノール含量

Br と Pu のポリフェノールの定量結果を Table 1 に示したが、全ポリフェノール、フラバノール、プロアントシアニジンの全てについて Pu が高い値を示した。個々の数値を見ると、Pu は Br に対して全ポリフェノールは約 1.5 倍、フラバノールは約 3.0 倍、プロアントシアニジンは約 2.5 倍であった。

BRACCO¹³⁾ はカカオ豆の発酵が進むにつれて、全ポリフェノール量に対するフラバノールの割合は減少することから、その割合は発酵状態を示す重要な指標となると報告している。今回分析に供したカカオ豆についてその値を求めると Br は 0.45 であるのに対して Pu は 0.84 であり発酵が不完全であることが示唆された。

また、GOLDSTEIN¹⁴⁾ は全ポリフェノールに対するフラバノールの比が小さいほどポリフェノールの重合度が高いと述べており、Pu のポリフェノールの重合度は Br に比べて低いものと推定される。

さらに、ポリフェノールを TLC で分析した結果を

Table 1 Polyphenolic contents of purple beans and brown beans

	Total polyphenol (mg/g)	Flavanol (mg/g)	Proanthocyanidin (mg/g)
Brown	12.2	5.5	0.9
Purple	19.9	16.9	2.6

Fig. 1 に示したように、Br は原点付近と Rf 値 0.76 に薄いスポットしか認められなかった。これに対し、Pu はブロードなパターンを示したことから、多種類のポリフェノールが存在することが示唆される。なお、Rf 値 0.76 のスポットはエピカテキンの Rf 値と一致した。

発酵前の生豆中に含まれていたポリフェノールは発酵期間中に酸化重合し減少していく³⁾が、Pu ではポリフェノールの酸化重合が正常に起こらなかった結果、多量のポリフェノールが残存しているものと考えられる。

2. Pu のポリフェノールの分画

前述したように Pu は、より多くのポリフェノールを含んでおり、その水抽出液には強烈で不快な収れん味が感じられた。この抽出液中のポリフェノールをシリカゲルカラムで分画し、得られた各画分の呈味を確認した結果、溶出液量 800 ml 付近で溶出される画分はプロアントシアニジンを多量に含み、強い収れん味が感じられた。また、この画分に含まれるポリフェノールを TLC で分析した結果、Rf 0.38~0.51 の位置にあった。

この画分に含まれる収れん味成分の分離精製は現在検討中であるが、QUESNEL⁸⁾ は発酵前の生豆のポリフェノールのうちプロアントシアニジンのダイマーと重合物(フラクションⅢ)が非常に強い収れん味を有していることを報告しており、これらの化合物が発酵中に酸化を受けず Pu に残存していることが推察される。

3. 加熱によるポリフェノールの変化

チョコレートの製造工程においてカカオ豆は蒸煮、焙炒という加熱工程を経るため、この工程でのポリフェ

Fig. 1 The TLC pattern of polyphenols of brown beans and purple beans

1; Purple bean, 2; Brown bean

ノールの残存率について調べた。Pu 20 g をオートクレーブで 120℃、10 分蒸煮後、ドライオープン中で 120℃、20 分加熱し、各ポリフェノールを定量した。その結果、全ポリフェノール、フラバノール、プロアントシアニジンは各々 84%、82%、79% 残存していた。また、TLC パターンには殆ど変化が認められなかった。

このことから、Pu 中のポリフェノールは加熱工程を経ても、かなり残存し収れん味も残ってしまうものと示唆される。

4. 各種酵素処理によるカカオ豆抽出液のポリフェノールの変化

GOLDSTEIN¹⁴⁾ は、タンニンの収れん味は蛋白質とタンニンとの結合により発現されるが、タンニンの構成成分である低分子のフェノール化合物や重合度の高いタンニンでは、分子サイズが小さ過ぎたり、大き過ぎたりするため蛋白質と結合出来ず、収れん味も発現されないと述べている。Pu 中の収れん味を有するポリフェノールも分解し低分子化するか、逆に酸化重合により高分子化できれば、収れん味を抑制することが可能であると考え、そのための酵素の選択を行った。

Pu 水抽出液 10 ml に対し、ナリンジナーゼ、ヘスペリジナーゼ、アントシアナーゼ、タンナーゼは 50 mg、PPO は 20 U 加えて 40℃、3 時間反応後、100℃、5 分間加熱し反応を停止させた後、ポリフェノールの変化を TLC で分析した。

その結果、PPO を作用させた場合、ブロードなパターンは消失し、原点付近にスポットが認められるだけとなった (Fig. 2)。また反応後の抽出液には収れん味がほとんど感じられなかった。これに対し他の酵素を使用した場合には、TLC パターンの変化、収れん味の抑制は認められなかった。

5. PPO によるポリフェノールの変化

Pu 抽出液は PPO 添加後、反応の進行にともない著しく褐変化した。反応 1 時間後の吸収スペクトルを調べた結果、300 nm~700 nm にかけて吸光度が増加するとともに、380 nm 付近にカテキン類の酸化物のピーク¹⁴⁾が出現した (Fig. 3)。

Pu 抽出液 10 ml に PPO を 20 U 添加したときの、反応時間とポリフェノール残存率の関係を調べた結果、酵素添加後、反応は急速に進み反応 1 時間後にはプロアントシアニジン、全ポリフェノール、フラバノールは各々 45%、64%、87% となり、以後緩やかに減少した (Fig. 4)。ポリフェノールのうち、プロアントシアニジンは減少率が最も高く、酵素酸化を受け易いと考えられる。ま

Fig. 2 The TLC pattern of polyphenols in purple beans after the enzymatic reaction

1 ; Before the reaction, 2 ; After the reaction

Fig. 3 VIS spectra of the purple bean water extract

1 ; Before the reaction, 2 ; After the reaction

た、ポリフェノールの減少に伴って、その酸化重合物と考えられる不溶性物質が生成され、濁度が上昇した。

さらに、抽出液中の蛋白質の変化を電気泳動で調べた結果を Fig. 5 に示したが、抽出液中に存在していたメインの蛋白質のバンドが反応 1 時間後には消失していることが確認された。この現象は、加熱失活させた酵素を添加した場合には認められなかった（データ省略）ことや、ペプチドのバンドもほとんど見られなかったことから、

Fig. 4 The degradation of polyphenols by the enzymatic reaction

○ ; Total polyphenol, □ ; Flavanol, △ ; Proanthocyanidin, ● ; OD (660 nm).

Fig. 5 PAGE electrophoresis of protein from purple bean

a ; Purple bean water extract, left to right b to e ; Reaction time 0, 1, 2, 3 h, respectively.

ポリフェノールの酸化により生成したキノンと蛋白質との間で複合体の形成が起こり¹⁷⁾、蛋白質が不溶化されたものと考えられる。

以上のことから、PPO による収れん味の抑制にはポリフェノールが重合し不溶物に変化する¹⁴⁾ことや、ポリフェノールの酸化により生成したキノンと蛋白質が複合体を形成すること等が多面的に関与しているものと推察

Table 2 Changes in polyphenols contained in purple beans by polyphenol oxidase treatments

Treatments	Total polyphenol (mg/ml)	Flavanol (mg/ml)	Proanthocyanidin (mg/ml)
—	19.9	16.9	2.6
+ PPO ^{a)}	17.9	13.1	1.8
+ PPO+Sugar ester ^{b)}	18.2	12.9	1.8
+ PPO+Hemicellulase ^{c)}	17.6	12.3	1.7
+ PPO (autoclaved beans ^{d)})	15.1	7.6	1.0

^{a)} 100 g of purple beans were placed in 80 ml of the polyphenol oxidase solution (25 U/ml) and incubated for 3 h at 45°C.

^{b)} Hemicellulase (100 mg) was added in polyphenol oxidase solution (80 ml).

^{c)} Sugar ester (100 mg) was added in polyphenol oxidase solution (80 ml).

^{d)} Purple beans was autoclaved (120°C, 15 min) before the enzymatic treatments.

される。

中林¹⁶⁾ はレンコンの PPO はエピカテキンやカテコール等は良く酸化するが、会合型タンニンは全く酸化しないことを報告している。Pu 中の収れん味を有するポリフェノールが PPO により直接酸化されるのか、あるいはエピカテキン等が酸化され生成したキノンにより二次的に酸化されるのかは、今後検討する必要がある。

6. Pu の酵素処理

前述のように、Pu に含まれているポリフェノールの不溶化に PPO が有効であることが示されたので、本酵素を用いて Pu の酵素処理について検討した。

Pu を微粉砕し酵素処理すれば、抽出液と同様にポリフェノールを効果的に不溶化することは可能であった(データ省略)。しかし、チョコレートの製造工程では微粉砕したカカオ豆は原料として使用することが出来ないため、粒状のまま酵素処理を行う必要があった。

そこで、Pu 組織内のポリフェノールの浸出性を高めることを目的として、PPO 処理の際にヘミセルラーゼ、界面活性剤の併用や、PPO 処理の前に Pu の蒸煮を行う方法について検討した。

その結果を Table 2 に示したが、Pu を酵素処理した場合、全ポリフェノール、フラバノール、プロアントシアニジンは処理前に比べて 90%、78%、70% となったが、Br に比べるとかなりのポリフェノールが残存していた。また、ヘミセルラーゼや界面活性剤の併用は PPO 単独で処理した場合とほとんど差が認められなかった。Pu をオートクレーブで蒸煮した後に PPO 処理すると、全ポリフェノール、フラバノール、プロアントシアニジンは処理前に比べて 78%、45%、38% となり、Br とは

ほぼ同程度となった。さらに、処理後の Pu の収れん味は大きく軽減された。これは、蒸煮直後の Pu は非常に柔らかくなっており、ポリフェノールが浸出し易くなったことが原因と思われる。

要 約

1. カカオ豆の中で発酵が不完全で収れん味を呈するパープル豆と発酵が充分なブラウン豆を比較した結果、パープル豆はブラウン豆に比べて多量のポリフェノールを含んでいることが示された。

2. パープル豆に含まれているポリフェノールに由来する収れん味を抑制する酵素の選択を行った結果、カラタケのポリフェノールオキシダーゼが有効であった。

3. ポリフェノールオキシダーゼによる収れん味の抑制はポリフェノールの酸化重合反応による不溶性物質への変換やキノン蛋白質複合体形成が関与していることが示された。

4. パープル豆を PPO 処理する場合、予め蒸煮した豆を処理する方法が有効で、全ポリフェノール、フラバノール、プロアントシアニジンは処理前に比べて 78%、45%、38% となり、収れん味は大きく軽減された。

文 献

- 1) ROHAN, T.A. and STEWATT, T.: *J. Food Sci.*, **20**, 713 (1969).
- 2) ROHAN, T.A. and STEWATT, T.: *J. Food Sci.*, **32**, 39 (1967).
- 3) FORSYTH, W.G.C.: *Biochem. J.*, **51**, 516 (1952).
- 4) BOCA, C.D.: *Rev. Int. Chocolate*, **17**, 218 (1962).
- 5) FORSYTH, W.G.C.: *Biochem. J.*, **51**, 511 (1952).

-
6) MAHBUBUL, A.F. and COLLIN, H.A. : <i>Phytochemistry</i> , 16 , 1377 (1977).	13) BRACCO, U. : <i>J. Sci. Food Agric.</i> , 20 , 713 (1969).
7) RIGAUD, J. : <i>J. Chromatogr. A</i> , 654 , 255 (1993).	14) GOLDSTEIN, J.L. and SWAIN, T. : <i>Phytochemistry</i> , 2 , 371 (1963).
8) QUESNEL, V.C. : <i>Phytochemistry</i> , 7 , 1583 (1968).	15) 東野哲三 : 日食工誌, 38 , 563, (1991).
9) SEIKI, K. : <i>Rev. Int. Choc.</i> , 28 , 38 (1973).	16) 中林敏郎 : 日食工誌, 15 , 73 (1968).
10) 中林敏郎 : 日食工誌, 15 , 73 (1968).	17) PETER, M. G. : <i>Angew. Chem. Int. Ed. Engl.</i> , 28 , 555, (1989).
11) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄 : 日食工誌, 26 , 25 (1979).	
12) YOSHIYAMA, M. and ITO, Y. : <i>J. Ferment. Biotechnol.</i> , 78 , 188 (1994).	
-

(平成7年2月8日受理)