ベネズエラ産カカオ豆の発酵過程における 各種成分の変化

後藤泰信, 相原武志, 奥山知子, 上脇達也,
塚田陽康, 鶴澤昌好

Compositional Changes of Venezuelan Cacao Beans during the Fermentation

Yasunobu Goto, Takeshi Aihara, Satoko Okuyama,
Tatsuya Kamiwaki, Kiyoyasu Tsukada
and Masayoshi Uzawa

Lotte Co., Ltd., Central Laboratory, 3-1-1, Numakage,
Saitama-shi, Saitama 336-0027

The fermentation of cacao beans is an important process for the quality development, and it has great effect on cacao flavor. Cacao flavor is influenced by the place of production, because there are many varieties of fermentation methods depending on the areas, farmers, cultivars, seasons and so on. The object of this investigation was to make use of its for development in order to produce delicious and high quality cacao beans with strong antioxidative activity by studying the fermentation of the cacao beans in detail. In this paper, we investigated the changes of various compositions such as proximate compositions and polyphenol content and so on in Venezuelan cacao beans during the fermentation for total six days. The results were as follows. 1) The concentrations of proximate compositions, polyphenol, caffeine and theobromine contents except for acid value and lipid content decreased at the first half of the fermentation, and these concentrations did not change significantly after the fourth day. 2) The color tone of the cacao beans changed into the dark brown which took on red from purple during the fermentation. 3) The total polyphenol content decreased about 20%, and the (–)-epicatechin content decreased to half during the fermentation. Therefore DPPH radical scavenging activity decreased during the fermentation. 4) The alkylpyrazines, which are one of the most

important flavor for cacao beans, were included very slight in unfermented cacao beans and did not change until the third day, 2,3,5,6-tetramethyl pyrazine increased after the third day of the fermentation, remarkably. From the results in this study about Venezuelan cacao beans, it suggests that the changes of compositions concerned with the taste were almost finished at the first half of the fermentation period, and the cacao flavor and flavor precursor such as alkylpyrazines, in particular 2,3,5,6-tetramethyl pyrazine, were formed at the latter half of the fermentation period, and characteristic flavor of cacao bean was produced in that period.

(Received Apr. 18, 2002 ; Accepted Aug. 20, 2002)

カカオ豆はアオギリ科の木本植物で、学名を *Theobroma cacao* L.¹⁾ と呼ぶ。カカオはチョコレートやココア飲料の主原料として知られているが、カカオに含まれる食物繊維²⁾やマグネシウム等のミネラルの生理効果が注目されている。

一方、近年では活性酸素が各種の疾病に関与していることが知られてきており、生体内抗酸化物質としてのポリフェノールの効果が注目されている。緑茶ポリフェノール³⁾等と共にカカオに含まれるポリフェノールの抗酸化性の研究⁴⁾が盛んに行われ、その効果が報告されている。

従来よりカカオポリフェノールは発酵中に減少することが知られている⁵⁾が、発酵はカカオ豆の品質を高める上で重要な工程であり、カカオ豆の風味に大きな影響を与えるものである。カカオ豆の発酵のプロセスを調べ、抗酸化能を維持しつつ風味を高める発酵条件を見出すことにより、高品質なカカオ豆を作り出せる可能性が考えられる。我々は既報⁶⁾にてインドネシア産カカオ豆(ジャワ AA)の発酵中の成分変化について報告したが、今回はジャワ AA と比較して発酵期間が長いベネズエラ産カカオ豆の、発酵中の成分変化について検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

1. 実験方法

(1) 試料及び発酵工程

実験に用いたカカオ豆は、ベネズエラのスクレ州にある農園で 2001 年 2 月に収穫されたクリオロ系トリニタリオ種と呼ばれる品種のカカオ豆を用いた。発酵の工程は、収穫したポッド(果実)をそのままの状態で 3 日間

熟成させ、4日目にポッドを二つに割り、バルブがついた状態で豆(種子)を取り出し、木製の発酵箱に約50 kg入れ、その上にバナナの葉を被せて発酵させた。発酵中の箱の内部の温度は発酵が開始すると50℃前後まで上昇し、発酵箱を移し替える時を除いてその温度で推移した。発酵は6日間行ない、2日に1回の発酵箱の移し替えによりエアレーションを行ない、菌の生育環境の好適化と発酵の均一化を図った。試料のサンプリングは24時間ごとに行ない、約3 kgの豆を発酵箱から抜き取り発酵試料とした。尚、発酵箱に入れる前の豆を未発酵試料(0日目試料)とした。各発酵試料の乾燥は5日間の日程で行ない、1日あたり3~8時間天日で乾燥を行った。最終的に各試料の水分は、簡易水分計で8%以下となり、常温で速やかに輸送し、その後20℃以下の湿度が一定の場所で保管した。

(2) 試料調製

試料の調製は、既報⁶⁾と同様にして行ない、各発酵日数のカカオマスを実験試料とした。最終的に各実験試料の水分は4%程度であった。

(3) 一般成分の測定

測定は既報⁶⁾と同様にして行った。糖含量はイオンクロマトグラフ法、灰分含量は直接灰化法⁷⁾、蛋白質含量はセミマイクロケルダール法⁸⁾、脂質含量はジェチルエーテルによるソックスレー抽出法⁷⁾によりそれぞれ定量した。また各試料の水分含量はカールフィッシャー法⁷⁾で測定した。なお水分以外の分析結果は全て乾燥重量当りの数値で示した。

(4) pH及び酸度、酢酸含量の測定

pH及び酸度の測定は既報⁶⁾と同様にして測定した。酢酸含量の測定はキャピラリー電気泳動(CE)を用いて行なった。精秤した試料をヘキサンで脱脂した後、蒸留水15 mlを加えて60℃で60分間抽出を行ない、濾過後蒸留水で20 mlに定容した。その抽出液をメンブレンフィルター(0.2 µm)で濾過し、試料液とした。CEの分析条件は以下の通りである。装置: HP^{3D}CE G1600A (Agilent社製)、カラム: フェーズDシリカ(0.25 µm×72 cm, Agilent社製)、泳動用バッファー: 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid, 0.5 mM cetyl trimethyl ammonium bromide, pH 3.5, 分離電圧: 25 kV, 検出器: ダイオードアレイ検出器, 350 nm

(5) カフェイン、テオブロミン含量の測定

カフェイン、テオブロミン含量の測定は関税法の定めるカフェイン、テオブロミン分析法⁹⁾に従って測定した。測定は高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製, LC

-9A)を用いて行った。分離カラムはTSK-GEL ODS-80TS(東ソー株式会社製)を用い、270 nmの吸光度を検出し、標準品(Research Biochemicals社製)より作成した検量線からカフェイン、テオブロミン含量を求めた。

(6) 色調の判定

カカオマスの表面色の測定は色差計(日本電色工業株式会社製, ZE-2000)を用いて行なった。ガラスセルに各試料を入れて、試料表面の反射光によるL, a, b値を測定した。

(7) 総ポリフェノール含量, (-)-エピカテキン含量及びDPPHラジカル消去能の測定

総ポリフェノール含量は既報⁶⁾と同様にして、全国チョコレート業公正取引協議会の定めるFolin-Chiocalteu法¹⁰⁾を用いて測定した。(-)-エピカテキン含量及びDPPHラジカル消去能の測定も既報⁶⁾と同様にして行なった。

(8) アルキルピラジン化合物の測定

アルキルピラジン化合物の抽出及び測定は既報⁶⁾と同様にして固相マイクロ抽出(SPME)法とガスクロマトグラフ(GC)を組み合わせて行なった。ピラジン化合物は発酵期間中のカカオ豆(未ロースト豆)の中に比較的多く存在する2-methyl, 2,3-, 2,5-, 2,6-dimethyl, 2,3,5-trimethyl, 及び2,3,5,6-tetramethyl pyrazineを測定した。結果は未発酵試料の6種類のピラジン化合物の合計のピーク面積値を100とした時の比率を示した。

尚、測定はアルキルピラジン化合物は3回、その他の項目は2回行ない、数値は各々の平均値を示した。

2. 実験結果

(1) 一般成分

発酵期間中の一般成分の変化をTable. 1に示した。糖組成については、未発酵試料(発酵前)ではスクロースの含有量が最も多く、グルコース、フルクトースは殆ど含まれていなかった。スクロースは発酵の4日目までに約9割が消失した。フルクトースは発酵期間中に若干増加する傾向を示した。蛋白質含量は発酵期間中に僅かに減少する傾向を示した。灰分含量は3日目から4日目にかけて約1/3程度減少し、脂質含量は3日目から4日目にかけて若干増加した。灰分、脂質共に4日目以降の値は変化しなかった。

(2) pH及び酸度

発酵期間中のpH及び酸度の変化をTable. 1に示した。pHは0~4日目の間に低下し、酸度は0~4日目の間に増加した。共に4日目以降の値は変化しなかった。

Table 1 Changes in proximate compositions, pH and acidity in Venezuelan cacao beans during the fermentation

Fermentation time (day)	Sugar contents (%)			Ash (%)	Protein (%)	Lipid (%)	pH	Acetic (%)	Acidity acid (%)
	Sucrose	Fructose	Glucose						
0	2.4	tr ^{*1}	0.2	3.2	14.2	50.8	6.4	0.6	0.3
1	1.9	0.2	0.4	3.2	13.9	50.1	5.9	0.9	0.8
2	1.2	0.5	0.5	3.2	13.7	51.4	5.4	1.2	1.1
3	0.8	0.6	0.4	2.9	13.5	51.5	5.1	1.4	1.5
4	0.2	0.7	0.3	2.0	13.2	54.8	4.8	1.7	1.5
5	0.1	0.6	0.3	1.9	12.8	55.5	4.7	1.7	1.7
6	0.2	0.7	0.3	2.0	12.8	55.0	4.7	1.8	1.6

Values described this table are shown as dry matter bases.

^{*1} tr : trace (<0.1).

Table 2 Changes of polyphenol, scavenging activity, alkaloid and color value in Venezuelan cacao beans during the fermentation

Fermentation time (day)	Total polyphenol (%)	(-)-Epicatechin (%)	Scavenging activity ^{*1} (%)	Caffeine (%)	Theobromine (%)	Color value		
						L	a	b
0	7.2	2.5	26.2	0.4	1.2	19.8	7.5	3.5
1	7.0	2.5	21.1	0.4	1.2	17.2	11.4	5.2
2	6.9	2.5	20.2	0.4	1.1	19.0	12.6	6.9
3	6.5	2.3	18.2	0.4	1.0	19.1	13.5	7.2
4	6.0	1.0	14.0	0.2	0.9	17.3	12.3	7.0
5	5.8	0.9	13.7	0.2	0.9	17.3	12.2	7.3
6	5.6	0.9	13.9	0.2	0.9	16.7	12.3	7.5

Values described this table are shown as dry matter bases.

^{*1} : DPPH radical scavenging activity ; Values are the scavenging effect of 0.1mg cacao beans in 1ml ethanolic solution of DPPH (0.5mM).

また酢酸含量は3日目までは増加し、3日目以降の値は大きく変化せず、酸度と類似した傾向を示した。既報⁶⁾のジャワ AA の値と比較した結果、ベネズエラ産カカオ豆は発酵速度は異なるが、発酵前後の pH と酸度の値はジャワ AA の値と同程度であった。

(3) カフェイン、テオブロミン含量

発酵期間中のカフェイン、テオブロミン含量を Table. 2 に示した。カフェインは3日目から4日目にかけて半減し、テオブロミンは0~4日目の間に徐々に減少する傾向を示した。両成分共に4日目以降の値は変化しなかった。

(4) 色 調

0~6日の各試料の L, a, b 値を Table. 2 に示した。未発酵試料が淡い紫色であるのに対して、発酵試料(1~6日目試料)は赤味を帯びた褐色であり、更に4日目ま

では発酵の経過と共に赤味が強くなる傾向を示した。また4日目以降の各試料の L, a, b 値は殆ど同じ値を示し、この期間に色調が変化していないことを示した。

(5) ポリフェノール成分及び DPPH ラジカル消去能
発酵期間中の総ポリフェノール含量、(-)-エピカテキン含量及び DPPH ラジカル消去能の結果を Table. 2 に示した。総ポリフェノール含量は発酵期間を通して約2割程度減少した。0~3日目にかけての値は、既報⁶⁾のジャワ AA の0~3日目の値と同程度であった。(-)-エピカテキン含量は3日目から4日目にかけて5割以上減少し、その他の期間は変化しなかった。DPPH ラジカル消去能は未発酵試料の値が最も高く、1日経過すると値が約20%程度減少し、3日目から4日目にかけて更に値が約20%程度減少し、4日目以降の値は変化しなかった。

Table 3 Changes in peak areas of six alkylpyrazine compounds in Venezuelan cacao beans during the fermentation

Alkylpyrazine compound	Fermentation time (day)						
	0	1	2	3	4	5	6
2-methylpyrazine	9.9	4.1	2.6	1.6	2.8	2.5	2.7
2,5-dimethylpyrazine	4.9	1.9	0.8	0.3	0.4	0.3	0.4
2,6-dimethylpyrazine	41.0	17.0	6.2	2.1	3.8	2.5	2.4
2,3-dimethylpyrazine	3.5	1.7	3.7	3.8	11.1	12.6	18.5
2,3,5-trimethylpyrazine	6.3	4.5	8.6	8.4	30.9	31.3	33.8
2,3,5,6-tetramethylpyrazine	34.4	19.8	27.3	46.6	430.8	619.3	710.4
total peak area	100	49.0	49.3	62.9	480	668.5	768.2

This table shows ratios when the total peak area of six alkylpyrazine compounds in 0 day of the fermentation process is taken as 100.

(6) アルキルピラジン化合物

発酵日数とアルキルピラジン化合物の関係を Table. 3 に示した。測定した 6 種類のピラジン化合物は未発酵試料の値は非常に低く、3 日目までは大きく変化しなかった。発酵の 3 日目から 4 日目にかけて 2,3,5,6-tetramethyl pyrazine が著しく増加し、更に 6 日目まで日毎に増加する傾向を示した。2,3,5-trimethyl pyrazine も発酵の 3 日目から 4 日目にかけて増加する傾向を示したが、4 日目以降は変化しなかった。2,3,5,6-tetramethyl pyrazine は発酵前と比較すると発酵後では約 8 倍に増加した。

3. 考 察

今回分析を行なったベネズエラ産カカオ豆の一般成分やテオブロミン、ポリフェノールといったカカオ豆の呈味性に関与する成分は、発酵期間の前半 (0~4 日目) で減少傾向 (酸度と脂質は増加傾向) を示し、発酵期間の後半 (4~6 日目) では変化しない傾向を示した。4 日目までにスクロースが殆ど消失し、酸度及び酢酸が増加していることから、発酵期間の前半で酢酸発酵が殆ど終了していることが推察される。一方 DPPH ラジカル消去能が発酵期間の前半に低下していることから、高い抗酸化能を有する (-)-エピカテキン¹¹⁾をはじめとする低分子ポリフェノール成分が、酸化重合や分解等の化学反応⁵⁾¹²⁾により減少していることを示している。ベネズエラ産カカオ豆の (-)-エピカテキンの減少傾向がジャワ AA とは異なっていることから、品種や産地によりポリフェノール成分の変化の過程が異なることが示唆された。カカオ豆の品種や産地とポリフェノール成分の変化の関係については興味深く、今後検討していきたい。なお灰分やカフェインといった化学的变化を受けにくい成

分も発酵期間の前半に減少する傾向を示したが、この理由は発酵期間中に多量の水分が発酵箱から排出される際に、水に溶け込んだ各種成分が流出したため考えられる。以上の結果から、発酵期間の前半で一般成分をはじめとする主な構成成分の変化は殆ど終了していると推察される。

また発酵期間の色調の変化は通常目視検査で行なわれ、紫色のカカオ豆は発酵不十分であり、赤味を帯びた褐色のカカオ豆は発酵が十分進行した豆と評価されている。この検査から発酵係数が計算され、数値が発酵の指標として用いられている¹²⁾。ベネズエラ産カカオ豆の色調の変化はアントシアニン色素の減少¹²⁾に伴う退色と、メイラード反応やポリフェノールの重合による褐変¹³⁾¹⁴⁾に起因するものと考えられる。メイラード反応はカカオ豆に特有の色を与え、カカオ香気の前駆物質や香気形成に重要な物質を生成する反応¹⁴⁾であり、生成された物質がカカオの香気に影響を与えていると考えられる。今回測定したピラジン化合物のなかで 2,3,5,6-tetramethyl pyrazine はカカオ香気の形成に重要な成分であり、またカカオ香気の前駆物質でもある。ベネズエラ産カカオ豆は、2,3,5,6-tetramethyl pyrazine がメイラード反応の進行により発酵の 3 日目から 4 日目にかけて著しく増加する傾向を示し、その後も増加する傾向にあった。この著しく増加する傾向は、既報⁹⁾でのジャワ AA でも見られ、また Hashim¹⁵⁾らが調査した 6 日間発酵したマレーシア産カカオ豆の傾向と一致しており、2,3,5,6-tetramethyl pyrazine が発酵期間の途中で著しく増加することが分かった。また各発酵日数のカカオマスで作ったチョコレートを比較したところ、0~3 日の間はチョコレートらしい香味の生成が認められなかったが、

4~6日の間では日毎に風味が豊かになり、チョコレートらしい香味の生成が認められた。以上の結果は、発酵工程が香りの豊かなチョコレートを製造するために必要であることを裏付けている。

今回測定したベネズエラ産カカオ豆では、ピラジン化合物が増加する期間にポリフェノールは僅かに減少したが、抗酸化能は低下していない。このことは4~6日の熟成期間を発酵期間中のより早い時期に移行するような発酵過程の制御が可能になれば、高い抗酸化能を維持しつつ風味豊かなカカオ豆を作り出せる可能性を示している。ポリフェノール等の抗酸化性を有する成分が多量に含まれると苦味や渋味等の原因となり、チョコレートの嗜好性が低下することも知られており、発酵条件について検討を進めて風味と機能性のバランスのとれた高品質なカカオ豆の生産を行ないたい。

今回のベネズエラ産カカオ豆では、発酵期間の後半で呈味や抗酸化性に関する成分が変化せず、香氣に関する成分のみが変化しており、発酵期間を6日間よりも長くしたときの風味や成分組成の変化についても興味深く、今後検討していきたい。また世界のカカオ豆の生産量の8割以上を占め、クリオロ (*criollo*) 種と比較して発酵期間が長いファラステロ (*farastero*) 種の発酵に関連する研究も進めていく予定である。

4. 要 約

ベネズエラ産カカオ豆の6日間の発酵期間における各種成分の変化について検討した。

(1) 一般成分やカフェイン、テオブロミン、ポリフェノール成分は、発酵期間の前半で減少傾向(酸度及び脂質は増加傾向)を示し、発酵期間の後半では変化しなかった。カカオ豆の呈味性に関与する主な成分は4日目までに変化が終了していることが推察される。

(2) カカオ豆の色調は発酵により、淡い紫色から発酵の経過と共に赤褐色が強くなる傾向を示したが、4日目以降の色調は変化しなかった。

(3) DPPH ラジカル消去能が発酵期間の前半で低下していることから、高い抗酸化能を有する(−)-エピカテキンをはじめとするポリフェノール成分が減少していることを示している。しかし4日目以降は(−)-エピカテキン含量、DPPH ラジカル消去能は変化しなかった。

(4) カカオ豆に比較的多く含まれる6種類のピラジン化合物は未発酵試料では僅かに含まれているが、3日目まで大きく変化しなかった。発酵の3日目から4日目にかけて2,3,5,6-tetramethyl pyrazineの値が著しく増加し、更に6日目まで日毎に増加し、発酵前と比較すると発酵後では約8倍に増加した。

ベネズエラ産カカオ豆の発酵期間の後半は、カカオ香氣の形成に重要な物質であるピラジン化合物を生成し、カカオの風味を豊かにするための重要な期間であると考えられる。

文 献

- 1) 石井龍一, 中世古公男, 高崎康夫, 「作物学各論」(朝倉書店, 東京), p133 (1999).
- 2) 上脇達也, 辻 啓介, 中川靖枝, 食科工, 46, 581 (1999).
- 3) Miura, Y., Chiba, T., Miura, S., Tomita, I., Umegaki, K., Ikeda, M. and Tomita, T., *J. Nutr. Biochem.*, 11, 216 (2000).
- 4) 中村哲夫, *New Food Ind.*, 42, 9 (2000).
- 5) Wollgast, J. and Anklam, E., *Food Res. Int.*, 33, 423 (2000).
- 6) 後藤泰信, 奥山知子, 鶴澤昌好, 相原武志, 上脇達也, 食科工, 48, 848 (2001).
- 7) 日本食品科学工学会編, 「新・食品分析法」(光琳, 東京) (1996).
- 8) 科学技術庁資源調査会編, 「五訂・日本食品標準成分表」(大蔵省印刷局, 東京) (1997).
- 9) 日本関税協会編: 関税週報, 第2271号, p21 (1996).
- 10) Tiitto, R.J., *J. Agric. Food Chem.*, 33, 213 (1985).
- 11) Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S. and Osawa, T., *J. Agric. Food Chem.*, 46, 454 (1998).
- 12) Pettipher, G.L., *J. Sci. Food Agric.*, 37, 289 (1986).
- 13) 桜井光寛, 鈍寶敬之, 香料, 199 (9), 85 (1998).
- 14) 上脇達也, 伊藤雅範, 高木雅博, 食品工業, 43 (1), 76 (2000).
- 15) Hashim, P., Selamat, J., Ali, A. and Kharidah, S., *J. Food. Sci. Technol.*, 34, 483 (1997).

(平成14年4月18日受付, 平成14年8月20日受理)