

## 明 細 書

**発明の名称：** タンパク質含有組成物及びその製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、カカオ豆に由来するタンパク質を高含有率で含有するタンパク質含有組成物、及びその製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] チョコレートやココアは嗜好品としてだけでなく、生体に及ぼす有効な機能を有する食品素材として研究がなされている。また、カカオ豆から外皮を取り除いた後に磨砕して得られるカカオマスも、抗酸化物質、食物繊維等の機能性成分を含んでいることから、チョコレートやココアの原料としてだけでなく、栄養機能食品素材として研究がなされている（特許文献1、2）。

特に、抗酸化物質等の濃度を高めたカカオ抽出物は、様々な効果が期待されている（特許文献3～6）。

[0003] カカオ豆には抗酸化物質や食物繊維だけでなく、タンパク質も含まれている。しかし、カカオ豆中のタンパク質の含有率は、大豆等に比べると低い。このため、カカオ豆中のタンパク質の利用は、これまで着目されることがなかった。例えば、上記特許文献3～6には、未発酵または発酵の浅い未焙炒カカオ豆から、ポリフェノールを25重量%以上含む抽出物を得ることが記載されており、この抽出物中のタンパク質の含有率を高めることは、記載されていない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0004] 特許文献1：特開平7-213251号公報  
特許文献2：特開平6-321796号公報  
特許文献3：特表2010-524993号公報  
特許文献4：特表2010-524995号公報  
特許文献5：特表2010-526036号公報

特許文献6：特表2010-540670号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] カカオ豆中のタンパク質の含有率は、大豆等に比べると低い。このため、カカオ豆からの抽出物等を、カカオ豆に由来するタンパク質を含有する素材として用いて、食品等のタンパク質の含有率を高めるためには、カカオ豆からの抽出物等を大量に添加しなければならなかった。しかし、この場合、カカオ豆に由来する苦味や収斂味（持続する渋み）によって、食品等の味や風味が変化してしまう。このような事情により、種々の飲食品、医薬品、化成品等へのカカオ豆由来タンパク質含有素材の使用は、限定されていた。また、カカオ豆にはカフェインやテオブロミン等の生理活性物質が含まれていることから、単なるカカオ豆抽出物ではこれらも一緒に添加されてしまい、想定外の生理作用が出てしまう可能性があるため、飲食品、医薬品、化成品等に単なるカカオ豆抽出物を大量に添加することはできなかった。

[0006] また、カカオ豆やカカオマスにはカカオバターが高含有率で含まれており、カカオ豆やカカオマスからの抽出物等に、カカオ豆に由来する脂肪分が移行するため、温度の変化によって、上記抽出物等がオイル状に変化する現象などが見られた。このため、タンパク質を含有する素材としての上記抽出物等の取り扱いが、煩雑であった。また、上記抽出物等を、カカオ豆に由来するタンパク質を含有する素材として食品等に添加すると、カカオ豆に由来する脂肪分も、タンパク質と一緒に食品等に添加されてしまうという問題もあった。

さらに、カカオ豆に由来する抗酸化物質等の機能性成分を抽出した後の残渣の有効利用が望まれていた。

[0007] 本発明の目的は、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率を高めただけでなく、脂肪分、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノール類をほとんど含まず、さらに苦味及び収斂味（持続する渋み）を有しないタンパク質含有組成物、及びその製造方法を提供することである。

## 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは上記課題を解決するために研究した結果、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率を高めたタンパク質含有組成物が、上記課題を解決できることを見出した。また、焙炒を経たカカオ豆や、カカオ豆に由来する機能性成分を抽出した後の残渣も、カカオ豆に由来するタンパク質を含むため、材料として活用可能なことも見出した。
- [0009] すなわち、本発明は、カカオ豆に由来するタンパク質を、固形分中の重量割合で42～70%含有する、タンパク質含有組成物を提供する。このタンパク質含有組成物は、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率を高めたものであり、かつ、カカオ豆に由来する脂肪分をほとんど含まず、苦味及び収斂味をほとんど有しないため、種々の飲食品、医薬品、化成品等の素材として有用である。
- [0010] また、本発明は、カカオ豆に由来するタンパク質を高含有率で含有する上述のタンパク質含有組成物を製造するための方法であって、（a）カカオ豆に由来するタンパク質を含有する原料から、アルカリ性の条件下でタンパク質を抽出し、タンパク質を含有する抽出液を得る抽出工程と、（b）工程（a）で得た上記抽出液から、酸性の条件下でタンパク質を沈殿させ、上記タンパク質含有組成物を得る沈殿工程、を含むタンパク質含有組成物の製造方法を提供する。
- [0011] 本発明のタンパク質含有組成物の製造方法において、工程（a）の前、及び／又は、工程（b）の後に、（c）カカオ豆に由来する脂肪分を除去する脱脂工程、を含むことが好ましい。この場合、カカオ豆に由来する脂肪分をほとんど含まないタンパク質含有組成物を提供することができる。
- [0012] 工程（a）におけるタンパク質の抽出の好ましい条件は、次のとおりである。pHは、好ましくは8～13、より好ましくは10～12である。温度は、好ましくは20～100℃、より好ましくは30～100℃、さらに好ましくは40～100℃、特に好ましくは50～100℃である。これらの条件下でタンパク質を抽出することによって、タンパク質含有組成物中のタンパク質の含有率を高めることがで

きる。

[0013] 工程（b）におけるタンパク質の沈殿の好ましい条件は、次のとおりである。pHは、好ましくは2～6、より好ましくは2～5である。温度は、好ましくは0～40℃、より好ましくは0～20℃である。これらの条件下でタンパク質を沈殿させることによって、タンパク質含有組成物中のタンパク質の含有率を高めることができる。

[0014] 工程（c）における脂肪分の除去を、水を用いて行なう場合、pHは、好ましくは2～7、より好ましくは3～7、さらに好ましくは4～6であり、温度は、好ましくは30～90℃、より好ましくは40～70℃である。

工程（c）における脂肪分の除去を、有機溶媒を用いて行なう場合、有機溶媒の好ましい例として、エタノール、エタノール水溶液、ジエチルエーテル、ヘキサン等が挙げられる。これらの有機溶媒は、1種を単独でまたは2種以上を組み合わせ用いられる。

[0015] 本発明のタンパク質含有組成物中の、カカオ豆に由来するタンパク質の重量割合の下限值は、固形分中の重量割合で42%、好ましくは44%、より好ましくは46%、さらに好ましくは48%、さらに好ましくは50%、さらに好ましくは52%、さらに好ましくは54%、特に好ましくは56%である。該重量割合が大きいと、食品等に添加する場合に、少量の添加でも食品等のタンパク質の含有率を高めることができる。

該重量割合の上限値は、本発明の製造方法における各種の条件の設定の容易性を考慮すると、70%、より好ましくは65%、最も好ましくは60%である。

## 発明の効果

[0016] 本発明のタンパク質含有組成物（以下、本発明の組成物と略すことがある。）は、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率が高いので、食品等に添加する場合に、少量の添加でも食品等のタンパク質の含有率を高めることができる。

また、本発明の組成物は、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率が高い

だけでなく、カカオ豆に由来する苦味や収斂味（持続する渋み）をほとんど有さず、無味無臭である。また、当該組成物は、カカオ豆に由来する脂肪分をほとんど含まないため、温度の変化によってオイル状になること等がなく、取り扱いが非常に簡便である。そのため、本発明のタンパク質含有組成物は、種々の飲食品、医薬品、化成品等を構成するための、味、風味、脂肪分の量等を変化させないタンパク質含有素材として、有利に使用することができる。

[0017] また、本発明のタンパク質含有組成物の製造方法（以下、本発明の製造方法と略することがある。）によれば、タンパク質含有組成物中の、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率を高めただけでなく、カカオ豆に由来する脂肪分、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノール類をほとんど含まず、苦味及び収斂味をほとんど有しないタンパク質含有組成物を得ることができる。これにより、カカオ豆に由来する脂肪分、苦味及び収斂味を有するためにこれまで食品素材として利用できなかった、あるいはカフェイン、テオブロミン等の生理活性物質の含有率が高いためにこれまで大量に添加できなかった、カカオ豆に由来するタンパク質を含む組成物を広く利用することができる。さらに、当該組成物を得るにあたり、焙炒を経たカカオ豆や、カカオ豆に由来する抗酸化物質等の機能性成分の抽出後の残渣を有効活用することもできる。

### 発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0019] <工程（a）について>

本発明の製造方法の工程（a）で用いられる原料は、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するものであれば特に限定されない。該原料として、例えば、カカオ豆（焙炒の有無は問わない。）の他、カカオ豆から外皮を取り除いたカカオニブ（焙炒の有無は問わない。）や、カカオニブを磨砕したカカオマスや、カカオマスから圧搾によりカカオバターを除去したカカオパウダー（アルカリゼーションの有無は問わない。）や、カカオマスから温水、有

機溶媒等の脱脂手段を用いてカカオバターを除去した脱脂カカオマスや、以上の例示物から抗酸化物質等を抽出した後の残渣等（例えば、特開平7-213251号公報に記載の方法で抽出した後の残渣等）が挙げられる。これらは、1種を単独でまたは2種以上を組み合わせる用いられる。

[0020] 工程（a）において、カカオ豆に由来するタンパク質を含有する原料から、アルカリ性の条件下でタンパク質を抽出するためには、例えば、当該原料を水に懸濁させ、アルカリ（液性をアルカリ性にするための薬剤であり、アルカリ剤ともいう。）を添加すればよい。タンパク質の抽出条件は、アルカリ性であれば特に限定されないが、本発明の組成物中のタンパク質の含有率を高める観点から、好ましくはpH8～13、より好ましくはpH9～13、さらに好ましくはpH10～12、特に好ましくはpH10.5～12である。

ここで用いられるアルカリは、pH8～13に調整できるものであれば特に限定されず、固体と水溶液のいずれの形態で使用してもよい。アルカリの例としては、水酸化ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸三ナトリウム等が挙げられる。これらのアルカリは、1種を単独でまたは2種以上を組み合わせる用いられる。

[0021] タンパク質の抽出温度の下限値は、特に限定されないが、本発明の組成物中のタンパク質の含有率を高める観点から、好ましくは20℃、より好ましくは30℃、さらに好ましくは40℃、さらに好ましくは50℃、さらに好ましくは70℃、特に好ましくは80℃である。タンパク質の抽出温度の上限値は、特に限定されないが、温度が80℃を超えても、本発明の組成物中のタンパク質の含有率の増大が頭打ちになる観点から、好ましくは100℃、より好ましくは95℃、特に好ましくは90℃である。

タンパク質の抽出時間は、好ましくは30分～48時間、より好ましくは30分～24時間である。該抽出時間が30分以上であると、本発明の組成物中のタンパク質の含有率を十分に高めることができる。該抽出時間が48時間以下であると、抽出を効率的に行なうことができる。

[0022] タンパク質の抽出操作後に、例えば、ろ過等の固液分離を行なうことによ

り、カカオ豆に由来するタンパク質を含む上清を得ることができる。

なお、従来技術における通常のアルカリ性の条件下でのタンパク質の抽出は、抽出過程でのタンパク質のアルカリ変性及び熱変性を避けるため、弱アルカリ性で50℃未満で行われる。しかし、本発明の製造方法の好ましい態様は、pH8以上の強アルカリ性で、かつ50℃以上の高温で、タンパク質の抽出操作を行うものである。

[0023] <工程（b）について>

工程（b）において、酸性の条件下でタンパク質含有組成物を得るためには、工程（a）で得られたカカオ豆に由来するタンパク質を含む上清に酸を添加して、タンパク質を沈殿させればよい。タンパク質を沈殿させる条件は、酸性であれば特に限定されないが、本発明の組成物中のタンパク質の含有率を高める観点から、好ましくはpH2～6、より好ましくはpH2～5、さらに好ましくはpH2～4、特に好ましくはpH2～3.5である。

ここで用いられる酸は、pH2～6に調整できるものであれば特に限定されず、固体で使用と水溶液のいずれの形態で使用してもよい。酸の例としては、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸の他、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸等の有機酸が挙げられる。これらの酸は、1種を単独でまたは2種以上を組み合わせで用いられる。

タンパク質を沈殿させるときの温度は、沈殿の促進の観点から、好ましくは0～40℃、より好ましくは0～20℃、特に好ましくは0～10℃である。

タンパク質を沈殿させた後に、例えば、ろ過等による固液分離、水洗、乾燥等の操作を行うことにより、本発明のタンパク質含有組成物を得ることができる。

[0024] <工程（c）について>

工程（a）に用いられるカカオ豆に由来するタンパク質を含有する原料が、脂肪分を含む場合（例えば、カカオマスは約55%、カカオパウダーは約20%の脂肪分を含む。）、本発明の製造方法は、(A)工程（a）の前の時点のみ、(B)工程（b）の後の時点のみ、または、(C)工程（a）の前と工程（b）

の後の両方の時点（本明細書中、上記(A)～(C)を総称して、「工程（a）の前、及び／又は、工程（b）の後」ともいう。）で、工程（c）（脱脂工程）を含むことが好ましい。これにより、カカオ豆に由来する脂肪分をほとんど含まないタンパク質含有組成物を得ることができる。

工程（c）が工程（a）の前である場合、カカオ豆に由来するタンパク質を含有する原料から脂肪分を除去する。工程（c）が工程（b）の後である場合、工程（b）で得たタンパク質含有組成物から脂肪分を除去する。

工程（c）が工程（a）の前と工程（b）の後のいずれであっても、脂肪分を除去する方法は、脂肪分の除去の対象物が異なることを除いて、同じである。そこで、以下、工程（c）が工程（a）の前である場合を例にとり、工程（c）を説明する。

[0025] カカオ豆に由来するタンパク質を含有する原料から脂肪分を除去するためには、例えば、当該原料を水、有機溶媒等の脂肪分除去用溶媒に懸濁させ、脂肪分を抽出した後に、ろ過等の固液分離によって、脂肪分を含む上清を除去し、脂肪分が除去された固形分を得ればよい。

脱脂の条件は、特に限定されないが、例えば、水を用いる場合、好ましくはpH2～7、より好ましくはpH3～6である。ここで用いられる酸は、pH2～7に調整できるものであれば特に限定されず、固体と水溶液のいずれの形態で使用してもよい。酸の例としては、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸の他、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸等の有機酸が挙げられる。これらの酸は、1種を単独でまたは2種以上を組み合わせ用いられる。

[0026] また、有機溶媒を用いて脂肪分を除去する場合、有機溶媒の例として、エタノール、エタノール水溶液、ジエチルエーテル、ヘキサン等が挙げられる。これらの有機溶媒は、1種を単独でまたは2種以上を組み合わせ用いられる。本発明の組成物が食品素材等である場合、これらの有機溶媒の中でも、安全性の観点から、エタノール及びエタノール水溶液が好ましい。

水を用いた脱脂と、有機溶媒を用いた脱脂を組み合わせてもよい。また、水を用いた脱脂、及び／又は、有機溶媒を用いた脱脂、を繰り返してもよい。

。

脱脂の好ましい温度は、水を用いる場合は30～90℃、有機溶媒を用いる場合は20～90℃である。脱脂のより好ましい温度は、水を用いる場合と有機溶媒を用いる場合のいずれにおいても40～70℃である。脱脂時間は、好ましくは10分～24時間、より好ましくは30分～2時間である。

脱脂操作後に、例えば、ろ過等の固液分離によって、脂肪分を除去した原料を得ることができる。

[0027] 従来技術で得られる通常のカカオ抽出物には、カカオ豆由来のカフェイン、テオブロミン、ポリフェノール類等が含まれる。しかし、本発明のタンパク質含有組成物はカフェイン、テオブロミン、ポリフェノール類をほとんど含まない。

## 実施例

[0028] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例及び比較例中、特に記載のない限り、「%」は「w/v%」（100ml中の重量（単位：g））を表し、「重量%」は「w/w%」を表し、「容量%」は「v/v%」を表す。

[0029] 以下の実施例及び比較例に記載したタンパク質含有量は、公定法であるマクロ改良ケルダール法（窒素・タンパク質換算係数は6.25）によって得た。また、脂質含有量は、公定法である酸分解法によって得た。これらの方法の詳細は、「公定試験法・標準試験法詳解 食品衛生検査指針理化学編2005」（厚生労働省監修、出版：社団法人日本食品衛生協会）に記載されている。

### [0030] 1. 工程（a）の検討について

#### （1）pH

カカオパウダーに水を加えて懸濁液とし、塩酸を用いてpH4に調整した後、50℃で30分間攪拌し、遠心分離により脂肪分を含む上清を除去した。得られた沈殿に再び水を加えて懸濁液を調製し、上記脱脂操作を再度行った。

次いで、得られた沈殿に再び水を加えて懸濁液を調製し、水酸化ナトリウム水溶液を用いて、1)pH8（比較例1）、2)pH9（比較例2）、3)pH10（実施

例１）、４）pH10.5（実施例２）に調整し、50℃で１時間攪拌した後、遠心分離によりタンパク質を含む上清を得た。

得られた上清をろ過した後、ろ液を氷冷して、液温を4℃に調整し、次いで、塩酸を用いてpH3.5に調整した。遠心分離により上清を除去し、得られた沈殿を水洗後に凍結乾燥し、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

[0031] （２） pH及び温度

実施例２と同様に、酸性条件下で脱脂し、得られた沈殿に再び水を加えて懸濁液を調製した。

次いで、水酸化ナトリウム水溶液を用いて、１）pH11調整後に80℃で（実施例３）、２）pH11調整後に100℃で（実施例４）、３）pH12調整後に80℃で（実施例５）、４）pH12調整後に100℃で（実施例６）、５）pH13調整後に80℃で（比較例３）、または、６）pH13調整後に100℃で（比較例４）、それぞれ１時間攪拌した後、遠心分離によりタンパク質を含む上清を得た。

さらに、実施例１と同様に、酸性条件下でタンパク質を沈殿させ、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

以上により得られた組成物中のタンパク質の含有量を表１に示した。

[0032] [表1]

|      | タンパク質<br>含有量 |      | タンパク質<br>含有量 |      | タンパク質<br>含有量 |
|------|--------------|------|--------------|------|--------------|
| 実施例1 | 44           | 実施例4 | 57           | 比較例1 | 17           |
| 実施例2 | 56           | 実施例5 | 58           | 比較例2 | 26           |
| 実施例3 | 58           | 実施例6 | 59           | 比較例3 | 38           |
|      |              |      |              | 比較例4 | 37           |

表１中の数値は、組成物１００ｇ中のタンパク質の含有量（ｇ）である。

[0033] （３） 固形分の回収率

実施例２と同様に、酸性条件下で脱脂し、得られた沈殿に再び水を加えて懸濁液を調製した。

次いで、水酸化ナトリウム水溶液を用いて、１）pH11調整後に50℃で（実施

例 7)、2)pH11調整後に60℃で(実施例 8)、3)pH11調整後に70℃で(実施例 9)、または4)pH11.5調整後に50℃で(実施例 10)、5)pH11.5調整後に60℃で(実施例 11)、6)pH11.5調整後に70℃で(実施例 12)、あるいは7)pH12調整後に50℃で(実施例 13)、8)pH12調整後に60℃で(実施例 14)、9)pH12調整後に70℃で(実施例 15)、それぞれ1時間攪拌した後、遠心分離によりタンパク質を含む上清を得た。

さらに、実施例 1と同様に、酸性条件下でのタンパク質沈殿化を行い、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

以上により得られた組成物のタンパク質含有量、固形分回収率および分子量分布について、表 2 に示した。

[0034] なお、固形分回収率は、以下の方法で算出した(表 2)。

固形分回収率(重量%) = 凍結乾燥後のタンパク質含有組成物の重量(g) ÷ 原料の重量(g) × 100

また、分子量分布は、以下の方法で測定した。

まず、実施例で得た組成物を試料として0.25gを正確に量り取り、水30mLを加えてよく攪拌した。その後、1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH10.5とし、50℃で30分間攪拌した。さらに、1N塩酸を加えてpH7.0とした後、水を加えて50mLに定容し、試料を0.5%含む溶液を調製した。

試料を0.5%含む上記の溶液に0.1容量%トリフルオロ酢酸水および0.1容量%トリフルオロ酢酸含有アセトニトリルを加え、試料0.1%、アセトニトリル45容量%となるように調製した後、遠心分離(10,000×g)して上清を得た。得られた上清を孔径0.45μmのフィルターでろ過し、試料溶液とした。

上記試料溶液を用い、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で分析した。なお、市販の分子量マーカーを基準として、高分子画分(6.5kDa以上)または低分子画分(307Da以上6.5kDa未満)に分け、試験溶液の各画分の面積が全体の面積に占める割合(%)として、表 2 に示すように、分子量分布を算出した。

<測定条件>

- ・ 分析用カラム：東ソー，G4000PWL，  
7.8mm x 300mm（またはこれと同等のもの）
- ・ カラム温度：40℃、検出：UV-Vis 190～600nm
- ・ 移動層： 水：アセトニトリル（体積比）＝55：45（0.1容量%トリフロ  
オロ酢酸含有）
- ・ 移動層流量：0.5mL／分、注入量：0.1%試料溶液10 $\mu$ L

<分子量マーカー（各0.1%終濃度）>

Aprotinin（分子量：6500）

Glutathione（分子量：307）

[0035] [表2]

|       | タンパク質<br>含有量<br>(g/組成物100g) | 固形分回収率<br>(w/w%) | 分子量分布           |                 |
|-------|-----------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
|       |                             |                  | 高分子画分<br>面積率(%) | 低分子画分<br>面積率(%) |
| 実施例2  | 56                          | 11               | 67              | 23              |
| 実施例7  | 54                          | 9                | 63              | 37              |
| 実施例8  | 57                          | 18               | 70              | 30              |
| 実施例9  | 58                          | 22               | 74              | 26              |
| 実施例3  | 58                          | 22               | 74              | 26              |
| 実施例10 | 56                          | 13               | 71              | 29              |
| 実施例11 | 60                          | 22               | 72              | 28              |
| 実施例12 | 60                          | 25               | 72              | 28              |
| 実施例13 | 53                          | 17               | 57              | 43              |
| 実施例14 | 59                          | 26               | 74              | 26              |
| 実施例15 | 59                          | 29               | 72              | 28              |
| 実施例5  | 58                          | 28               | 69              | 31              |

低分子画分：307Da以上6.5kDa未満、高分子画分：6.5kDa以上

[0036] (4) 抽出時間

実施例2と同様に、酸性条件下で脱脂し、得られた沈殿に再び水を加えて懸濁液を調製した。

次いで、水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH12に調整した後に、70℃で、1)4時間（実施例16）、または2)8時間（実施例17）、それぞれ攪拌した後、遠心分離によりタンパク質を含む上清を得た。

さらに、実施例1と同様に、酸性条件下でのタンパク質の沈殿化を行い、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

以上により得られた組成物のタンパク質含有量、固形分回収率および分子

量分布について、表3に示した。

[0037] [表3]

|       | タンパク質<br>含有量<br>(g/組成物100g) | 固形分回収率<br>(w/w%) | 分子量分布           |                 |
|-------|-----------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
|       |                             |                  | 高分子画分<br>面積率(%) | 低分子画分<br>面積率(%) |
| 実施例15 | 59                          | 29               | 72              | 28              |
| 実施例16 | 53                          | 27               | 72              | 28              |
| 実施例17 | 50                          | 27               | 68              | 33              |

低分子画分:307Da以上6.5kDa未満、高分子画分:6.5kDa以上

[0038] 2. 工程(b)の検討について

(1) pH

実施例2と同様に、酸性条件下での脱脂操作、アルカリ性条件下でのタンパク質抽出操作を行った。

次いで、得られた上清をろ過した後、ろ液を氷冷して、液温を4℃に調整し、次いで、塩酸を用いて、1)pH4(実施例18)または2)pH5(実施例19)に調整、もしくは、硫酸を用いて、3)pH2(実施例20)に調整した。

そして、遠心分離により上清を除去し、得られた沈殿を水洗後に凍結乾燥し、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

[0039] (2) 酸の種類

実施例2と同様に、酸性条件下での脱脂操作、およびアルカリ性条件下でのタンパク質抽出操作を行った。

次いで、得られた上清をろ過した後、ろ液を氷冷して、液温を4℃に調整し、次いで、3)硫酸(実施例21)、4)リン酸(実施例22)、5)クエン酸(実施例23)、6)リンゴ酸(実施例24)、または7)酒石酸(実施例25)を用いて、それぞれpH3.5に調整した。そして、遠心分離により上清を除去し、得られた沈殿を水洗後に凍結乾燥し、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

以上により得られた組成物のタンパク質の含有量を、表4に示した。

[0040]

[表4]

|       | タンパク質<br>含有量 |       | タンパク質<br>含有量 |       | タンパク質<br>含有量 |
|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
| 実施例2  | 56           | 実施例20 | 56           | 実施例23 | 55           |
| 実施例18 | 54           | 実施例21 | 53           | 実施例24 | 57           |
| 実施例19 | 42           | 実施例22 | 54           | 実施例25 | 59           |

表4中の数値は、組成物100g中のタンパク質の含有量（g）である。

[0041] 3. 工程（c）の検討について

（1）脱脂条件

まず、1)脱脂操作なし（実施例26）については、カカオパウダーに水（液温：50℃）を加えて懸濁液（pH：6）とし、そのまま次のタンパク質抽出操作を行った。また、2)有機溶媒による脱脂（実施例27）については、カカオパウダーに95容量%エタノール水溶液を加えて懸濁液とし、50℃で1時間攪拌し、ろ過により脂肪分を含む上清をろ去した。得られた沈殿に再び95容量%エタノール水溶液を加えて懸濁液を調製し、上記脱脂操作をさらに二度行った。

次いで、実施例2と同様に、アルカリ性条件下でのタンパク質抽出、および酸性条件下でのタンパク質沈殿化を行った。そして、遠心分離により上清を除去し、得られた沈殿を水洗後に凍結乾燥し、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た。

[0042] （2）脱脂順序

実施例26と同様に、脱脂操作を行わずにアルカリ性の条件下でのタンパク質の抽出操作、及び、酸性の条件下でのタンパク質の沈殿化を行った後、遠心分離により上清を除去した。

次いで、実施例28では、得られた沈殿に95容量%エタノール水溶液を加えて懸濁液とし、実施例27と同様の脱脂操作を行った。それに対し、実施例29では、得られた沈殿を凍結乾燥した後、95容量%エタノール水溶液を加えて懸濁液とし、実施例27と同様の脱脂操作を行った。

そして、得られた沈殿を乾燥し、カカオ豆に由来するタンパク質を含有す

るタンパク質含有組成物を得た。

以上により得られた組成物のタンパク質及び脂質含有量を表5に示した。

[0043] [表5]

|       | タンパク質<br>含有量 | 脂質<br>含有量 |
|-------|--------------|-----------|
| 実施例2  | 56           | 1.5       |
| 実施例26 | 50           | 7.7       |
| 実施例27 | 46           | 0.7       |
| 実施例28 | 54           | 1.1       |
| 実施例29 | 50           | 3.8       |

表5中の数値は、組成物100g中のタンパク質及び脂質の各含有量（g）である。

[0044] 4. 原料の検討について

カカオパウダーから機能性成分を抽出した残渣について、実施例2と同様に、酸性条件下での脱脂操作、アルカリ性の条件下でのタンパク質の抽出、及び、酸性の条件下でのタンパク質の沈殿化を行い、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た（実施例30）。

また、未発酵カカオ豆を用いたカカオマスから機能性成分を抽出した後の残渣について、実施例2と同様に、酸性の条件下での脱脂操作、アルカリ性の条件下でのタンパク質の抽出、及び、酸性の条件下でのタンパク質の沈殿化を行い、カカオ豆に由来するタンパク質を含有するタンパク質含有組成物を得た（実施例31）。

以上により得られた組成物のタンパク質の含有量を表6に示した。

[0045] [表6]

|       | タンパク質<br>含有量 |
|-------|--------------|
| 実施例2  | 56           |
| 実施例30 | 49           |
| 実施例31 | 56           |

表6中の数値は、組成物100g中のタンパク質の含有量（g）である。

[0046] 5. カフェイン含有量及びテオブロミン含有量について

カフェイン含有量およびテオブロミン含有量は、AOAC Official Methods of Analysis(1990) 980.14「Theobromine and Caffeine in Cacao Products Liquid Chromatographic Method」に記載の方法を参照し、市販のカフェイン及びテオブロミンを標準品として、実施例で得た組成物の固形分について定量分析を行った。

まず、実施例2、26、27及び31で得た組成物を試料として、遠沈管に正確に量り取り、石油エーテル30mLを加えてよく攪拌した後、遠心分離して上清を捨てた。得られた沈殿、すなわち脱脂された試料を三角フラスコに移し入れ、水を加えて約100mLとした後、100℃の湯浴中で25分間加熱し、直ちに冷却した。そして、2重量%硫酸亜鉛水溶液10mLおよび1.8重量%水酸化バリウム10mLを加えて混合した後、静置し、水を加えて200mLに定容した。再度、100℃の湯浴中で10分間加熱し、加熱後の溶液をろ過し、試料溶液とした。

上記試料溶液を用い、高速液体クロマトグラフで分析した。また、市販のカフェイン及びテオブロミンを用い、同様の処理と分析を行って検量線を作成し、各試験溶液中のカフェイン含有量及びテオブロミン含有量を算出した。結果を表7に示す。

## &lt;測定条件&gt;

・分析用カラム：Waters,  $\mu$ -Bondapak C18, 10 $\mu$ m, 4mmID x 300mm (またはこれと同等のもの)

・移動層： 水：アセトニトリル (体積比) = 85 : 15

・移動層の流量：1.0mL/分、検出：UV 273nm

[0047] [表7]

|         | カフェイン<br>含有量(mg/g) | テオブロミン<br>含有量(mg/g) |
|---------|--------------------|---------------------|
| 実施例2    | 0.0                | 0.3                 |
| 実施例26   | 0.5                | 2.4                 |
| 実施例27   | 0.0                | 0.0                 |
| 実施例31   | 0.0                | 1.3                 |
| カカオパウダー | 3.7                | 23.6                |

表7中の数値は、組成物1g中のカフェイン及びテオブロミンの各含有量(mg)である。

6. 総ポリフェノール含有量について

総ポリフェノール含有量は、フルシアンブルー法によって測定した。Marti

n

L. Price and Larry G. Butler, J. Agric Food Chem., Vol. 25 No. 6, 1268-1273 (1977)に記載の方法を参照し、市販のエピカキンを標準品として、実施例2及び26で得た組成物の固形分について定量分析を行った。

まず、得られた組成物をn-ヘキサンで処理して脱脂した後、50重量%メタノール水溶液を用いて抽出し、試験溶液とした。次いで、蒸留水50mLに各試験溶液100μLを添加し、攪拌しながら0.1M硫酸鉄(III)アンモニウム-0.1N塩酸溶液3mLを加え、その20分後に8mMヘキサシアノ鉄(III)カリウム水溶液3mLを加え、さらに20分後に720nmの吸光度を測定した。

また、蒸留水50mLに各サンプル液の溶媒(50重量%メタノール)100μLを加えたもの、及び、市販の(一)ーエピカキンのメタノール溶液を用い、同様の処理を行って検量線を作成し、各試験溶液中の総ポリフェノール含有量を算出した。結果を表8に示す。

[表8] [0049]

|                   |      |       |         |
|-------------------|------|-------|---------|
| 総ポリフェノール含有量(w/w%) | 実施例2 | 実施例26 | カカオパウダー |
|                   | 1.4  | 2.7   | 7.4     |

表8中の数値は、組成物中の総ポリフェノール含有量(重量%)である。

<試験例> [0050]

1. マウスでの評価(便通の改善効果の確認)

6週令のBALB/c系雌性マウス(各群6匹)に水及び食餌を自由摂取させて14日間飼育した。コントロール群には標準飼料(AIN93G準拠、セルロース不含、コーンスターチ5重量%添加)を、タンパク質含有組成物添加群には、標

準飼料に実施例 2 で得たタンパク質含有組成物を 5 重量% 添加（コーンスターチ代替）した餌を、それぞれ摂取させた。

そして、飼育初日（0 日目）、7 日目、14 日目にマウスの体重（g）を測定した。また、飼育 6～7 日、13～14 日にかけての摂餌量（g/匹/day）を測定した。さらに、飼育 9～11 日目（3 日間）の糞便を採取し、凍結乾燥して糞便量（g/匹/day）を測定した。

以上により得られた値について、表 9 に示した。

[0051] [表 9]

|               | 平均体重(g)  |          |          | 摂餌量(g/匹/day) |       | 糞便量<br>(g/匹/day) |
|---------------|----------|----------|----------|--------------|-------|------------------|
|               | 0 日目     | 7 日目     | 14 日目    | 7 日目         | 14 日目 |                  |
| コントロール群       | 21.7±0.6 | 23.0±0.3 | 23.8±0.4 | 2.9          | 2.9   | 0.08             |
| タンパク質含有組成物添加群 | 21.6±0.4 | 22.4±0.4 | 23.4±0.5 | 2.8          | 3.0   | 0.23             |

[0052] 表 9 中、コントロール群と比較して、タンパク質含有組成物添加群では、平均体重及び摂餌量の増大または減少は見られなかったが、糞便量は約 3 倍に増加した。

[0053] 2. 得られたタンパク質含有組成物の評価

実施例 2 及び実施例 2 6 で得られたタンパク質含有組成物は、いずれもカカオパウダーに比べて、より黒味がかかった茶褐色の流動性粉末であった。

これらを試食して評価したところ（表 10）、カカオパウダーで感じられるカカオの香ばしさが感じられず、それ以外の香りも感じられなかった。また、カカオパウダーで感じられるカカオの苦味および収斂味（持続する渋み）も感じられず、それ以外の味（甘味・酸味・塩味・うま味等）も感じられなかった。

[0054]

[表10]

|          | 実施例2                      | 実施例26                     | カカオパウダー             |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| カカオの香ばしさ | —                         | —                         | ++                  |
| 苦味       | —                         | —                         | ++                  |
| 収斂味      | —                         | —                         | +                   |
| 色調       | 黒みがかった茶褐色<br>(ビターチョコレート色) | 黒みがかった茶褐色<br>(ビターチョコレート色) | 茶褐色<br>(ミルクチョコレート色) |

カカオの香ばしさ ; ++:強い、+:弱い、-:感じない

苦味 ; ++:強い、+:弱い、-:感じない

収斂味 ; ++:強い、+:弱い、-:感じない

[0055] 以上により、カカオ豆に由来する脂肪分、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノール類をほとんど含まずに、カカオ豆に由来するタンパク質の含有率を高めた組成物、及びその製造方法を確立することができた。また、このタンパク質含有組成物の製造方法によれば、抗酸化物質等の機能性成分を抽出した後のカカオ豆由来残渣を有効利用することも可能であった。

また、本発明の組成物による便通の改善の効果も確認することができた。

## 請求の範囲

- [請求項1] カカオ豆に由来するタンパク質を、固形分中の重量割合で42～70%含有する、タンパク質含有組成物。
- [請求項2] 請求項1に記載のタンパク質含有組成物の製造方法であって、  
(a) カカオ豆に由来するタンパク質を含有する原料から、アルカリ性の条件下でタンパク質を抽出し、タンパク質を含有する抽出液を得る抽出工程と、  
(b) 工程(a)で得た上記抽出液から、酸性の条件下でタンパク質を沈殿させ、上記タンパク質含有組成物を得る沈殿工程、を含むタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項3] 工程(a)が、pH8～13及び20～100℃の条件下で行なわれる請求項2に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項4] 工程(a)が、pH10～12及び50～100℃の条件下で行なわれる請求項3に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項5] 工程(b)が、pH2～6及び0～40℃の条件下で行なわれる請求項2～4のいずれか1項に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項6] 工程(b)が、pH2～5及び0～20℃の条件下で行なわれる請求項5に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項7] 工程(a)の前、及び／又は、工程(b)の後に、  
(c) カカオ豆に由来する脂肪分を除去する脱脂工程、を含む請求項2～6のいずれか1項に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項8] 工程(c)が、pH2～7及び30～90℃の条件下で、水を用いて行なわれる請求項7に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項9] 工程(c)が、エタノール、エタノール水溶液、ジエチルエーテル及びヘキサンからなる群より選ばれる1種以上の有機溶媒を用いて行なわれる請求項7又は8に記載のタンパク質含有組成物の製造方法。
- [請求項10] 請求項2～9のいずれか1項に記載のタンパク質含有組成物の製造

方法によって得られるタンパク質含有組成物。

[請求項11]      請求項1又は10に記載のタンパク質含有組成物を含む、便通の改善剤。