

インドネシア産カカオ豆とチョコレートのオクラトキシン AとBの汚染調査

誌名	香川大学農学部学術報告
ISSN	03685128
著者名	Baasithu,A. 川村,理
発行元	香川大学農学部
巻/号	73号
巻号補足	
掲載ページ	p. 29-31
発行年月	2021年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



インドネシア産カカオ豆とチョコレートのオクラトキシンAとBの汚染調査

Arum Baasithu・川村 理

Occurrence of ochratoxin A and B in Indonesian cocoa beans and chocolate

Arum Baasithu and Osamu Kawamura

Abstract

Ochratoxins A (OTA) and B (OTB), mycotoxins with nephrotoxicity, were contaminated wheat, cocoa beans, these products, and others. Indonesia is the third largest producer of cocoa beans in the world, but since there are no reports of occurrence of OTA and OTB in Indonesian cocoa beans and chocolate, we analyzed OTA and OTB by immunoaffinity column-HPLC method. As the results, 7 cocoa beans (21.9%) were contaminated with 0.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTA in average and 16 cocoa beans (50.0%) were contaminated with 0.95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTB in average. 7 chocolates (29.2%) were contaminated with 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTA in average and 14 chocolates (58.3%) were contaminated with 0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ OTB in average. The concentrations of OTA and OTB were low enough that it was not considered to have a significant impact on human health. This is the first report of OTA and OTB contamination in Indonesian cocoa beans and chocolate.

Key words : ochratoxin A, ochratoxin B, cocoa beans, chocolate, Indonesia, immunoaffinity column

緒 言

オクラトキシンA (ochratoxin A, OTA, 図1) は, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* や *Penicillium verrucosum* などのカビが産生するマイコトキシンで, 麦類を中心とした穀物やその加工品, コーヒー, ココア, ビール, ワインなどを汚染する腎毒性や腎発がん性を有する⁽¹⁾. オクラトキシンB (ochratoxin B, OTB) は, OTAの脱クロル体であり(図1). OTAよりは毒性が弱いながら同様に肝臓・腎臓障害などの毒性を有している^(2, 3). インドネシアはカカオ豆の主要な生産国で, 2018年は世界第3位で約59万トンを生産した⁽⁴⁾. 一般的に, カカオ豆は収穫後, 生産国で発酵と乾燥され, この状態のカカオ豆が輸出される⁽⁵⁾. 輸入されたカカオ豆は, 主に消費国で焙煎後, 磨砕, 混合, 微粒化, 精練, 調温, 充填, 冷却などの工程を経てチョコレートへ加工される. カカオ豆は主に高温多湿な熱帯地方で発酵と乾燥が行われるために, カビが増殖しマイコトキシン汚染がしばしば起きている⁽⁶⁾. インドネシア産のカカオ豆やチョコレートのオクラトキシン汚染に関する報告はほとんどないの

で, 我々が確立したイムノアフィニティーカラム (immunoaffinity column, IAC)-HPLC法⁽⁷⁾ でインドネシア産カカオ豆のオクラトキシン汚染を調査した.

方 法

試験試料

Indonesian Coffee and Cacao Research Instituteに依頼して収集した発酵後乾燥したインドネシア産(2015-16年産)のカカオ豆を32検体を実験に用いた. また, インドネシア国内で販売されていたチョコレート24検体を収集し実験に用いた.

カカオ豆からのOTAとBの抽出と前処理

DesmarchelierらのQuEChERS法⁽⁸⁾を参考にして行った. まず, 粉砕機(Absolute Vita-Mix Blender, 大阪ケミカル(株))で粉砕したカカオ豆5gに蒸留水25 mLを加え, ワーリング ボトルブレンダー 7011HBC型(大阪ケミカル(株))14,000 rpmで1分間ホモジナイズを行った. この泥漿12 mLを取り, 10 mLのアセトニトリル: 酢酸

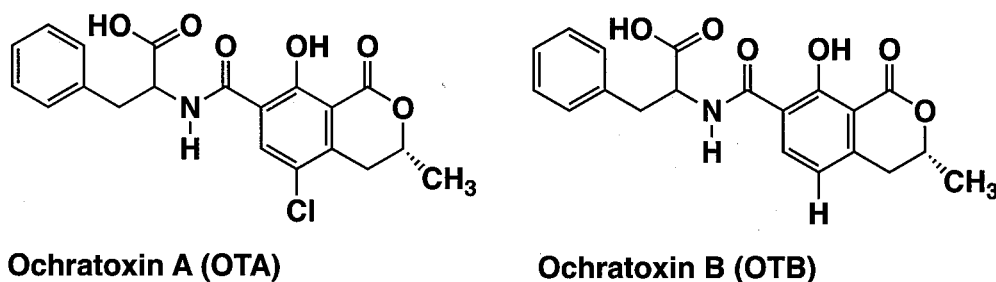


図1 オクラトキシンAとBの構造式

(995 : 5, v/v) を加え, 200 rpm で30分間振とう抽出した. この溶液に4 gの硫酸マグネシウムと1 gの塩化ナトリウムを加え, 1分間激しく振とうした. 3,000 rpmで20分間遠心した上清のアセトニトリル層を2 mL取り, 23 mL のPBSで希釈した (最終アセトニトリル濃度8%). この希釈液をガラス繊維ろ紙 GS-25でろ過し, このろ液10 mL をIAC に負荷した.

IAC-HPLC法

川村らの方法⁽⁴⁾に準拠して行った. すなわち, OTB.2抗体を結合させたゲル0.3 mLを詰めたムロマックミニカラムS (室町ケミカル (株)) に, PBSを10 mL流して平衡化を行った. 次にサンプルを10 mL負荷した. PBS 10 mLでカラムを洗浄後, メタノール3 mLでOTAを溶出し, 通気させて溶出液を完全にカラムから除去し, 試験管に分取した. 溶出液は, 減圧乾固後, 1 mLのアセトニトリル:水 (40:60, v/v) に再溶解し, HPLC分析を行った. HPLCはいずれも (株) 島津製作所のシステムコントローラー (SCL-10A_{sp}), 送液ユニット (LC-20AD), オートインジェクター (SIL-20A_{HT}), カラムオープン (CTO-10A), 蛍光検出器 (RF-20A_{xs}) とカラム (Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm i.d.×100 mm) を用い, 移動相には, アセトニトリル:水:酢酸 (40:58:2, v/v/v) を使用し, 注入量は10 μL, 流速は0.5 mL/min, カラム温度は50℃, 波長は335 nm (励起), 465 nm (蛍光) で行った.

チョコレートからのOTAとBの抽出と前処理

板チョコレートなどは, 乳鉢でできるだけ細かく砕いた. このチョコレート細片10 g に40 mLのメタノール:1% 炭酸水素ナトリウム (7:3, v/v) を加え, ワーリング ボトルブレンダー 7011HBC型で14,300 rpm で3分間ホモジナイズし抽出した. 抽出液をAdvantec 5Cのろ紙でろ過し, このろ液10 mL に50 mLの 0.5% Tween 20を含むPBSで希釈した. 希釈液をガラス繊維ろ紙Advantec GS-25でろ過した. このろ液10 mL をIACに負荷した. 上記を同様にクリーンアップ後, HPCL分析を行った.

表1 カカオ豆とチョコレートでの添加回収実験 (n=3)

検体	OTAとOTBの 添加量 (μg/kg)	回収率±SD (%)	
		OTA	OTB
カカオ豆	1	115.1±4.4	105.2±9.0
	5	88.6±8.7	82.5±9.3
チョコレート	1	94.9±0.6	104.0±1.4
	2	96.5±2.3	101.8±3.1
	4	99.8±1.6	102.7±4.4

添加回収実験

カカオ豆では, 粉碎したカカオ豆にOTAとBがそれぞれ1と5μg/kgとなるように添加した. また, 砕いたチョコレート片OTAとBがそれぞれ1, 2, 4 μg/kgとなるように添加した. それぞれを上記の方法で分析しOTAとBの添加回収実験を行った.

結果および考察

添加回収実験

添加回収実験の結果を表1に示した. カカオ豆の場合, OTAとBの回収率は82.5~115.1%でバラツキも大きかったが概ね良好であった. また, カカオ豆の場合の回収率は, 94.6~104.0%で標準偏差も5%以下で良好であった.

インドネシアのカカオ豆と市販チョコレートのOTAとBの汚染

インドネシアのカカオ豆と市販チョコレートのOTAとBの汚染の結果を表2に示した. カカオ豆の場合は, 7検体 (21.9%) から0.98±1.29 μg/kg (平均±SD) のOTAが検出され, 16検体 (50.0%) から0.95±0.79 μg/kg (平均±SD) のOTBが検出された. OTAとBの最大値はそれぞれ3.66と3.12 μg/kgであった. また, チョコレートの場合は, 7検体 (29.2%) から0.15±0.16 μg/kg (平均±SD) のOTAが検出され, 14検体 (58.3%) から0.13 ±0.10 μg/kg (平均±SD) のOTBが検出された. OTAとBの最大値はそれぞれ0.27と0.38 μg/kgであった. Turcotteらは, カ

表2 インドネシアのカカオ豆と市販チョコレートのOTAとBの汚染

検体	検体数	トキシン	陽性数	陽性率	平均値±SD (µg/kg)	最小-最大 (µg/kg)
カカオ豆	32	OTA	7	21.9%	0.98±1.29	0.33-3.66
		OTB	16	50.0%	0.95±0.79	0.33-3.12
チョコレート	24	OTA	7	29.2%	0.15±0.16	0.12-0.27
		OTB	14	58.3%	0.13±0.10	0.13-0.38

ナダで収集したダークチョコレート20検体全てがOTA陽性で、平均値は0.39 µg/kg (最小0.17,最大0.65 µg/kg) であり、ミルクチョコレート10検体7検体がOTA陽性で、平均値は0.19 µg/kg (最小0.10,最大0.33 µg/kg) と報告⁽⁸⁾した。この論文ではOTBの分析は行っていなかった。我々の実験ではダークチョコレートとミルクチョコレートの区別はしていないが、OTAの検出率はTurcotteらの報告よりかなり低い29.2%であり、平均汚染濃度や汚染範囲は、ミルクチョコレートと概ね同程度であった。

カカオ豆からチョコレートを製造中にOTAは93.6%減少するのと報告がある⁽⁹⁾。本報告の結果もほぼ同様であった。

摘 要

オクラトキシンA (OTA) とB (OTB) は、麦類、カ

カオ豆やこららの加工品などを汚染する腎毒性を有するマイコトキシンである。インドネシアはカカオ豆の世界第3位の生産国であるが、インドネシア産のカカオ豆やチョコレートのOTAとBの汚染に関する報告はないので、我々が確立したイムノアフィニティーカラム-HPLC法でインドネシア産カカオ豆のオクラトキシン汚染を調査行った。その結果、カカオ豆の場合は、7検体(21.9%)から0.98±1.29 µg/kg (平均±SD)のOTAが検出され、16検体(50.0%)から0.95±0.79 µg/kg (平均±SD)のOTBが検出された。また、チョコレートの場合は、7検体(29.2%)から0.15±0.16 µg/kg (平均±SD)のOTAが検出され、14検体(58.3%)から0.13±0.10 µg/kg (平均±SD)のOTBが検出された。これらの汚染濃度は十分に低く、ほぼ安全なレベルであると考えられた。インドネシア産のカカオ豆やチョコレートにOTAとBの汚染があることの初めての報告である。

引 用 文 献

- (1) 本山聖子, 小山典子: オクラトキシンAのリスク評価, *JSM Mycotoxins*, 66 (1), 31-35 (2016).
- (2) Heussner, A.H., Dietrich, D.R., O'Brien, E.: In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells, *Toxicology In Vitro*, 20, 332-341 (2006).
- (3) Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Volkel, W., Hard, G. C., and Dekant, W., Biotransformation and nephrotoxicity of Ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, 43-53 (2005).
- (4) グローバルノート-国際統計・国別統計専門サイト: 世界のカカオ生産量 国別ランキング・推移, <https://www.globalnote.jp/post-5654.html>, 2020年10月30日閲覧
- (5) 日本チョコレートココア協会: カカオ豆のはなし> 結実から出荷まで, <http://www.chocolate-cocoa.com/dictionary/cacao/flow.html> 2020年10月30日閲覧
- (6) Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D., Martínez-Culebras, P.V.: Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 336-340 (2008).
- (7) 川村理, 鈴木祐介, 佐々木絢子: イムノアフィニティーカラム-HPLC法による国内市販コーヒー製品のオクラトキシンAとBの汚染調査, *香川大学農学部学術報告*, 67, 47-53 (2015).
- (8) Turcotte, A.-M., Peter M. Scott, P. M., and Tague, B.: Analysis of cocoa products for ochratoxin A and aflatoxins, *Mycotoxin Res.*, 29, 93-201 (2013).
- (9) Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Nester, M. A., Efraim, P., Taniwaki, M. H.: Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture, *Food Chemistry*, 136, 100-104 (2013).