

甘ガキと渋ガキのタンニン物質の化学的特性,特に超遠心分離における挙動の差異について

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	米森, 敬三 松島, 二良
巻/号	53巻2号
掲載ページ	p. 121-126
発行年月	1984年9月

甘ガキと渋ガキのタンニン物質の化学的特性, 特に 超遠心分離における挙動の差異について¹

米森 敬三・松島 二良
三重大学農学部 514 津市上浜町

Chemical Characteristics of Tannins from Non-Astringent and Astringent Type Fruits of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki*) with Particular Reference to Ultracentrifugal Behavior

Keizo YONEMORI and Jiro MATSUSHIMA
Faculty of Agriculture, Mie University, Tsu, Mie 514

Summary

Schlieren pattern in analytical ultracentrifugation and reactivity to acetaldehyde of tannins of Japanese persimmon fruit (*Diospyros kaki*) were investigated using cvs. 'Fuyu', pollination constant non-astringent (PCNA) type, and 'Hiratanenashi', pollination variant astringent (PVA) type.

1) To study the schlieren pattern, tannins extracted from both cultivars with aqueous acetone were separated into two fractions (F-I and F-II) by size exclusion chromatography on CPG-10 2000 Å. After the tannin concentrations were equalised, these fractions were incubated at 40°C and subjected to ultracentrifugation at pre-incubation (0 day), 1 and 3 days of incubation. The schlieren patterns revealed that F-I and F-II fractions from both cultivars contained three or four tannin components, and that the sedimentation coefficient of each component from 'Hiratanenashi' was larger than the corresponding component from 'Fuyu'. Moreover, the components of the F-I fraction from 'Hiratanenashi' changed or shifted remarkably during incubation; two faster components (26 S and 23 S) disappeared and one slower component (6 S) appeared. Conversely, the components of both fractions (F-I and F-II) from 'Fuyu' and F-II fraction from 'Hiratanenashi' were stable.

2) To characterize the reactivity of tannins to acetaldehyde, coagulation times of the fruit juice bathed in acetaldehyde vapor were compared between 'Fuyu' and 'Hiratanenashi' at different tannin concentrations and pHs. A longer time was needed for coagulation as the tannin concentration became lower and when the pH value was between 3.0 and 5.0. The fruit juice from 'Fuyu' coagulated more slowly than that from 'Hiratanenashi'.

The present results suggest that tannin substances from 'Fuyu' distribute mainly in a lower molecular weight range and have a milder chemical property compared with those from 'Hiratanenashi'.

緒 言

前報(13)において筆者らは, pollination constant の甘ガキのタンニン物質とその他の品種群である pollination variant の甘ガキ及び渋ガキ, pollination constant の渋ガキのタンニン物質とでは明確な差異が存在することを明らかにした. 特にタンニン物質の分子量分布にお

いて, pollination constant の甘ガキはその他の3タイプのカキの品種群と比較して, 低分子領域のタンニン物質を主成分としていることを CPG-10 2000 Å を担体とした分子ふるいクロマトグラフィーにより示した.

そこで, この pollination constant の甘ガキとその他の3タイプのカキの品種群との間に存在したタンニン物質の分子量分布の差異を, 超遠心法によって明確に

¹ 1984年3月13日 受理

し、その化学的特性をさらに明らかにすることを目的として本研究を行った。また、このタンニン物質の質的差異が、アセトアルデヒドとの反応性とどのように関連しているかという点についてもあわせて検討した。

材料及び方法

実験はいずれも三重大学農学部附属農場植栽の pollination constant の甘ガキである‘富有’と、pollination variant の渋ガキである‘平核無’の成木の果実を用いて行った。

1. タンニン物質の超遠心分離による挙動

1982年7月1日に両品種の果実を採取し、前報(13)と同様に分子ふるいクロマトグラフィーでタンニン物質を分離した。すなわち、果肉 5g に 60% アセトンを加え乳鉢で磨砕し、遠心分離後 10 ml に定容し、担体として CPG-10 の pore size 2000 Å (Electro-Nucleonics, inc.) を充填した 1.5×120 cm のカラムにその一部を添加後 60% アセトンで溶出し、5 ml ずつの分画をとり、タンニン物質が検出される 22~27 番目の分画及び 37~42 番目の分画を集めた。そして、このタンニン物質の 2 つの分画を N₂ 気流中で減圧濃縮し、それぞれのタンニン含量がカテキン相当量としてはば 1.0 mg/ml となるように調整した。なお、カラムよりの各分画中のタンニン物質の検出及びタンニン含量の測定は、フェノール試薬を用いる Swain and Hillis の方法(12)によって行った。

次に、このようにして調整したタンニン分画を 3 日間 40°C で incubate し、incubate 前 (0 日目)、1 日目、3 日目にそれぞれの分画液の一部をとり、それらについて直接超遠心分離を行いシュリーレン光学系を用いて沈降係数を測定し、その特性及び変化の様相を調査した。超遠心分離機は MSE 社製 centriscan 75 を用い、10 °C、50,000 rpm の条件下で超遠心分離を行い、シュリーレン・パターンは 5 分間隔で測定した。

2. タンニン物質のアセトアルデヒドとの反応性

前記と同様、1982年7月1日に両品種の果実を採取し、ジュースナーによりその果汁を集めてガーゼでろ過した後、いったんそれを凍結させ、解凍後その果汁を用いてアセトアルデヒドとの反応性の差異を比較した。

まず、果汁中のタンニン濃度の違いとアセトアルデヒドとの反応性を調査する目的で、両品種の果汁中のタンニン濃度がそれぞれ 10, 20, 30, 40, 50 mg/ml となるように蒸留水で希釈し、それぞれ 5 ml ずつを小型シャーレにとり、0.15% のアセトアルデヒドを 50 ml 入れたデシケータ (口径 20 cm) 内に置いて密閉し、アセトア

ルデヒド蒸気中で incubate (30°C) して、果汁が凝固するまでの時間を測定した。なお、この場合のタンニン含量は Loewenthal 法(7)によって測定し、タンニン酸量として表した。また、両品種間の果汁の pH にはほとんど差異がなく、蒸留水で希釈した後の pH においても変化は認められなかった。

次に、果汁の pH とアセトアルデヒドとの反応性を調べるために、両品種の果汁のタンニン濃度を 50 mg/ml に調整した後、HCl と NaOH により pH を調節し、pH 2.0 から 0.5 間隔ごとに pH 7.0 までの果汁を用意し、さきと同様にそれぞれ 5 ml ずつを小型シャーレにとり、0.15% アセトアルデヒドを 50 ml 入れたデシケータ内におき、30°C で果汁が凝固するまでの時間を調べた。ここで、pH を調節した後の果汁中のタンニン濃度が問題となるが、多量の果汁をできる限り少量の HCl 及び NaOH を用いて pH の調節を行ったので、タンニン濃度の変化はほとんどみられなかった。

結果

1. タンニン物質の超遠心分離による挙動

まず、CPG-10 2000 Å によるカラムクロマトグラフィーでの‘富有’及び‘平核無’のタンニン物質の分離パターンをみると、両品種ともタンニン物質は 2 つのピークに分離され、それらの溶出位置は‘富有’、‘平核無’とも同じであった (第 1 図)。そこで、これらを溶出順に Fraction I (F-I) 及び Fraction II (F-II) としてそれぞれの分画を集め、一定量に濃縮した後 40°C で incubate した。この分画中のタンニン含量は第 1 表のとおりで、incubate した 3 日間ではいずれの分画においてもそのタンニン濃度はほぼ一定で、変化は認められなかった。

次に、この incubate した各分画について超遠心分離を行い、そのシュリーレン・パターンを調査し沈降係数

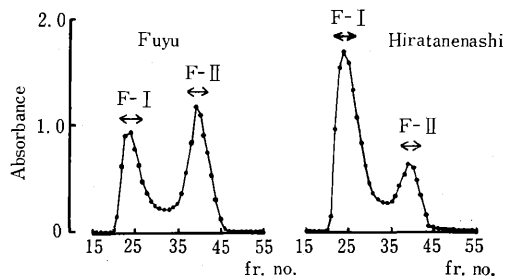


Fig.1. Separation pattern of aqueous acetone extracted tannins from ‘Fuyu’ and ‘Hiratanenashi’ cultivars by size exclusion chromatography on CPG-10 2000 Å.

Column, 1.5×120 cm; elution with 60% acetone.

Table 1. Tannin concentrations of F-I and F-II adjusted for ultracentrifugation.

days of incubation ^z	Fuyu		Hiratanenashi	
	F-I (mg/ml)	F-II (mg/ml)	F-I (mg/ml)	F-II (mg/ml)
0	0.903	0.942	1.014	0.863
1	0.880	0.927	1.067	0.866
3	0.872	0.927	1.033	0.863

^z Incubation was carried out at 40°C.

を求めたものが第2図である。まず、この図の見かたについて少しふれておくと、図中のMはメニスカス(液

面), Bはセル底を表しており、この間に試料溶液が入っている。そして、シュリーレン・パターンというのは、この溶液中の濃度勾配を測定した曲線のことであり、溶液を十分に高い一定の遠心力場におくと、溶質高分子は一定の速度で沈降してゆき、ある時間の後には回転中心に近い部分は溶媒だけになり溶液部分との間に境界面を形成するが、この界面の位置がシュリーレン・パターンではピークとして示される。この界面は溶質高分子と同じ速度で移動するので、一定時間ごとにシュリーレン・パターンをとり、ピークの位置の移動距離を測定することによって高分子の沈降速度が求められる。このピーク

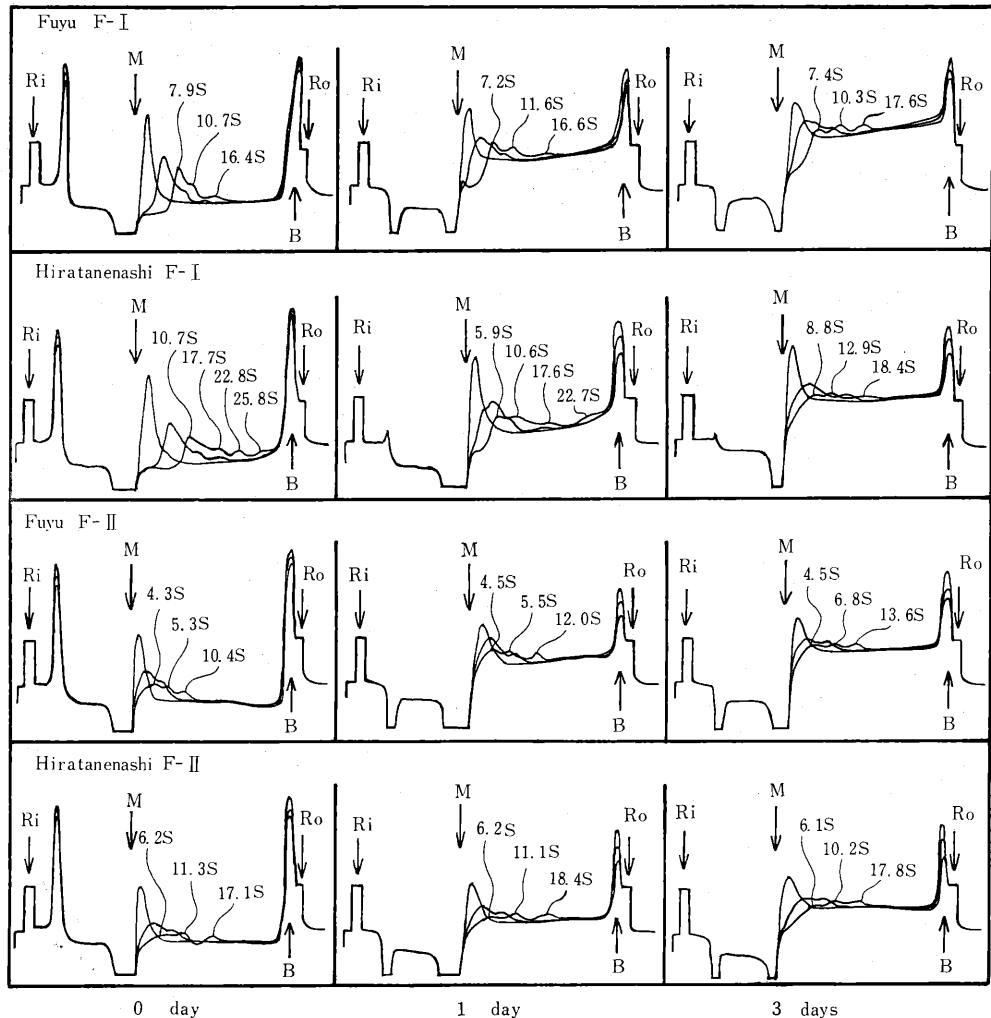


Fig.2. Changes in schlieren pattern and sedimentation coefficient of each tannin fraction separated from 'Fuyu' and 'Hiratanenashi' cultivars by size exclusion chromatography on CPG-10 2000Å.

Each fraction was incubated three days at 40°C; ultracentrifuge analysis was carried out at 10°C, and roter speed was 50,000 rpm; individual schlieren patterns were obtained at 10-minute intervals after attaining full speed; sedimentation coefficient of each component was shown in the third schlieren pattern.

M: meniscus, B: bottom of the cell, Ri: inner reference hole, Ro: outer reference hole.

の移動距離は、回転軸からの距離がわかっている基準位置 R_i , R_o ($R_i=5.70\text{cm}$, $R_o=7.30\text{cm}$) により測定できる。また、もし溶質高分子の成分が複数である場合には、時間とともに界面がその成分数だけ形成されてくるので、シュリーレン・パターンを測定すると、最初是一个のピークであったものが時間の経過とともに成分数だけピークが分離してゆくことになり、このそれぞれのピークの移動速度を測定することで各成分の沈降速度を求めることができる。図中の3番目のシュリーレン・パターン (50,000 rpm に到達してから20分後に測定したもの) の各ピークに示した数字は、このようにして求めた各成分の沈降係数であり、実際には 50,000 rpm に到達してから5分間隔で8回シュリーレン・パターンを測定して求めており、それらの数値はすべて Svedberg 単位 ($1\text{S}=10^{-13}\text{sec.}$) である。

そこで、最初に incubate 前 (0日目) の結果をみると、'富有' 及び '平核無' の両品種とも、F-I, F-II 分画は単一のタンニン成分で構成されているのではなく、3成分ないし4成分が混合していることが認められた。また、両品種とも F-II 分画の主たるタンニン成分の沈降係数は、F-I 分画のタンニン成分の沈降係数より小さく、F-II 分画は F-I 分画に比べて低分子領域のタンニン成分で構成されていることが確かめられたが、これはカラムクロマトグラムでの結果を裏づけるものである。さらに、'富有' と '平核無' の差異をみると、F-I 分画のタンニン成分の構成は '富有' に比べて '平核無' が複雑であり、また、その沈降係数もかなり大きかった。F-II 分画についても、'平核無' のタンニン成分は '富有' のそれに比べて沈降係数が大きく、'平核無' のタンニン物質は、'富有' のタンニン物質よりも高分子成分により構成されていることが確認された。

さらに、incubate 後1日目及び3日目における各分画のタンニン成分のシュリーレン・パターンについて、その変化の様相をみると (第2図)、F-I 分画において '富有' と '平核無' の間には大きな差異が認められた。すなわち、'富有' ではこの分画のタンニン成分はその沈降係数をみても明らかなように、incubate した3日間でほとんど変化していないのに対して、'平核無' では incubate 前には認められなかった沈降係数の小さい成分が生じたり、また逆に、incubate 前には存在していた沈降係数の大きな成分が認められなくなっており、この分画を構成しているタンニン成分が非常に複雑な変化をしていることがうかがわれた。なお、F-II 分画については、'富有' 及び '平核無' とも incubate 前に比べて大きな変化はなく、この分画は比較的安定な成分で

構成されているようであった。ただし、両品種とも双方の分画において、incubate 3日目になるとシュリーレン・パターンのベースラインがかなりあがっているのが認められたが、これはシュリーレン光学系による溶液中の濃度勾配の測定には、可視光の溶液による屈折率勾配の変化を測定しているのので、各分画中に生じてきたアントシアニンによって影響を及ぼされたためであると考えられた。このアントシアニンの生成は、いずれの分画あるいはいずれの品種においても同様にみられた。

2. タンニン物質のアセトアルデヒドとの反応性

アセトアルデヒドによる果汁の凝固速度に及ぼすタンニン濃度及び pH の影響を、それぞれ第3図、第4図に示した。まず、タンニン濃度についてみると、'富有'、'平核無' とも果汁中のタンニン含量が少なくなるほど凝固の速度は遅くなり、10mg/ml のタンニン濃度では、両品種とも測定期間中 (100時間) に凝固しなかった (第

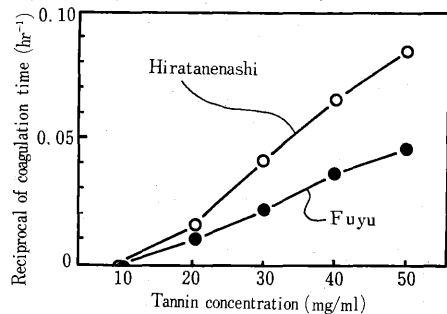


Fig. 3. Effect of tannin concentrations on coagulation time of the fruit juice from 'Fuyu' and 'Hiratanenashi' cultivars.

Each juice was incubated in acetaldehyde vapor at 30°C.

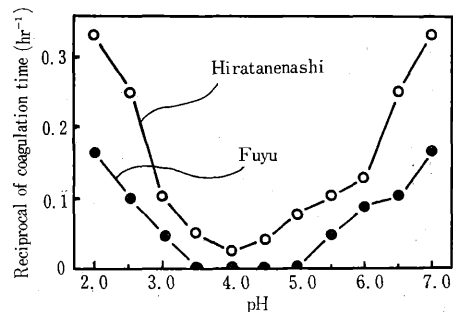


Fig. 4. Effect of pHs on coagulation time of the fruit juice from 'Fuyu' and 'Hiratanenashi' cultivars.

Each juice was incubated in acetaldehyde vapor at 30°C.

3 図). しかし, その他の濃度においては, '平核無' は '富有' に比べていずれもその凝固が早く, アセトアルデヒドとの反応性が大きいようであった.

次に, 第 4 図の果汁の pH との関係を見ると, 両品種とも pH 3.0 から pH 5.0 にかけてその凝固速度は最少となり, 特に '富有' においては pH 3.5 から pH 5.0 の間では測定期間中 (45 時間) に凝固が起こらなかった. しかし, この場合もさきと同様に, いずれの pH においても '平核無' は '富有' より早く凝固が起こっており, アセトアルデヒドとの反応性は大であった.

考 察

甘ガキの自然脱渋は, 果実の発育途上で生成蓄積するエタノールやアセトアルデヒドなどの揮発性物質により, タンニン物質が不溶化されるためである (1, 2, 5, 9) と定説的に考えられてきた. さらにこれに加えて, 中林 (8) は甘ガキのタンニン物質は, 渋ガキのそれよりも化学的な反応性が強い成分からなり, 縮合して不溶化しやすい性質をもっていると報告しており, このことも甘ガキの脱渋を考える上で広く受け入れられてきた.

しかしながら, これらの考え方は渋ガキの脱渋現象がエタノールやアセトアルデヒドと密接に関係している (2, 3, 4, 5, 6) というところからの類推であることが多く, また, pollination constant の甘ガキと pollination variant の甘ガキをひっくり返して論じていることが多い. ところが, pollination variant の甘ガキにおいては, 自然脱渋の進行とともに果実内に多量のエタノールやアセトアルデヒドの生成蓄積が認められるのは事実であるが, pollination constant の甘ガキにおいては, 果実内にはほとんどそれらの物質が蓄積せずに脱渋が進んでいくこと (10, 11), また, pollination constant の甘ガキ '富有' のまだ渋味の強い幼果期に, エタノール及びアセトアルデヒドの樹上処理を行っても脱渋できないこと (10) などが報告され, さらに筆者ら (13) は, 前報において pollination constant の甘ガキのタンニン物質は, その他の 3 タイプのカキよりも低分子領域のタンニン成分で構成されていることを明らかにしている. これらのことは, pollination constant の甘ガキのタンニン物質の生理化学的な反応性がいままでの考え方とは逆に, 渋ガキのそれよりも小さいのではないかと推察させる. そこで, この点を確かめるために本研究を行ったところ, 推察を裏づけるような結果が得られた.

すなわち, まず分子ふるい効果によって分離したタンニン物質の, F-I 及び F-II 分画の超遠心法によるシュリーレン・パターンにみられるように, '平核無' の F-I 分画のタンニン成分はかなり複雑な構成をもっており,

時間がたつにつれてその成分は変化した. これに対して, '富有' の F-I 分画のシュリーレン・パターンは, 調査期間を通じてほとんど変化が認められず, 比較的安定していた. また, F-II の分画においては, 両品種とも調査期間を通じてほとんど変化を受けていなかった. これらのことから, '富有' と '平核無' のタンニン成分の化学的特性を考えると, F-II の分画を構成するタンニン成分には両品種間で大差はなく, 比較的安定な成分であると思われるが, F-I の分画を構成するタンニン成分には大きな差異があり, '平核無' のタンニン成分は化学的な反応性が強く, '富有' のそれはむしろ弱いと結論づけられるように思われる. さらに, 前報 (13) において報告しているように, pollination constant の甘ガキのタンニン物質は, F-II 分画のタンニン成分の占める割合が高いが, その他の 3 タイプの品種群のカキでは, F-I 分画がタンニン物質のほとんどを占めている. この事実と本研究の結果を合わせて考えてみると, pollination constant の甘ガキは化学的な安定性が比較的大きいタンニン成分より構成されており, その他 3 タイプの品種群のタンニン物質は, 化学的な反応性に富んだ成分より主に構成されているといえる. そして, このことは '平核無' などの渋ガキは, 樹上でエタノールやアセトアルデヒドにより容易に脱渋できるが, pollination constant の甘ガキはこれらによって脱渋できないという事実 (10) ともうまく符合している.

さらに Kakesita (4) は, 渋ガキの果汁中のタンニンがアセトアルデヒドと反応し, そのために果汁が凝固することを報告しているが, この方法を用いてアセトアルデヒドとタンニン物質との反応性を直接的に調査した. その結果, '富有' は '平核無' に比べて果汁が凝固するまでに長い時間を必要としており, 超遠心法による結果と同様, '富有' のタンニン物質の化学的な反応性の弱さを明らかにした. ただし, この場合はタンニン物質を crude な果汁のままでも供試しているため, 正確にはタンニン物質とアセトアルデヒドとの純粋な化学的反応性を測定しているとはいえないが, その点を考慮しても, '富有' のタンニン物質の化学的反応性の弱さは歴然としていられる.

以上本研究において明確になったことは, いままで考えられていたこととは逆に, pollination constant の甘ガキのタンニン物質は, 渋ガキのタンニン物質よりもむしろ化学的に反応性の小さい安定なタンニン成分で構成されており, アセトアルデヒドによっても不溶化されにくい性質のものであるということである. このことは, pollination constant の甘ガキの樹上における自然脱渋

の機構を考える上で非常に興味深い事実である。すなわち、pollination constant の甘ガキの脱渋機構は、従来のエタノールやアセトアルデヒドなどの揮発性物質との関係やタンニン物質の化学的な反応性の面から説明がつかないので、今後はむしろ、タンニン物質の生成能力と果実発育との関係（例えば、タンニン物質の果実内での希釈効果による見かけ上の脱渋）や、タンニン細胞自身の構造上の変化というような点からの検討が必要であろう。

摘 要

Pollination constant の甘ガキ‘富有’及び pollination variant の渋ガキ‘平核無’の果実を用い、そのタンニン物質の特性を明確にするために、超遠心分離によるシュリーレン・パターン測定及びアセトアルデヒドとの反応性を調査した。

まず、タンニン物質のシュリーレン・パターンを測定するために、両品種の果肉の含水アセトン抽出物中のタンニン物質を分子ふるいクロマトグラフィー（担体 CPG-10 2000Å）により、F-I 及び F-II の 2 つの分画に分離した。この各分画のタンニン濃度を一定にした後、3日間 40°C で incubate し、incubate 前、1日目、3日目にそれぞれの分画液の一部をとって超遠心分離を行った。両品種とも、F-I 及び F-II 分画は単一のタンニン成分ではなく、3ないし4成分で構成されていることが認められたが、いずれの場合も‘平核無’の各タンニン成分の沈降係数は、それに対応する‘富有’のタンニン成分の沈降係数より大きかった。また、‘平核無’の F-I 分画のタンニン成分は、incubate 期間中に複雑な変化を示し、認められなくなる成分（26S 及び 23S）や新たに生じる成分（6S）があったが、‘富有’の F-I 及び F-II 分画、並びに‘平核無’の F-II 分画については、incubate 中に構成成分の変化はみられなかった。

次に、タンニン物質のアセトアルデヒドとの反応性を調べるために、タンニン濃度及び pH を数段階に変えた果汁を、0.15%のアセトアルデヒド溶液の入ったデンシケータ内（30°C）において密閉し、アセトアルデヒド蒸気中でそれぞれの果汁が凝固するまでの時間を測定した。果汁の凝固にはタンニン濃度が小さくなる程、また、pH 3.0から5.0の間で両品種とも長時間を要したが、いずれの濃度及び pH においても、‘富有’の果汁の凝固速度が遅かった。

以上のことより、‘富有’のタンニン物質は、‘平核無’のタンニン物質よりも低分子領域のタンニン成分で構成されており、化学的な反応性も小さいことが示唆された。

引用文献

1. 平田尚美. 1969. カキ果実の成熟促進に関するエチレンの利用と問題点. 園学シンポジウム要旨. 昭44秋: 24—34.
2. 伊藤三郎. 1962. カキタンニンの化学的研究. 園試報. B1: 1—16.
3. ITO, S. 1971. The persimmon. p. 281—301. In: A. C. HULME (ed.) The biochemistry of fruits and their products. Volume 2. Academic Press, London and New York.
4. KAKESITA, K. 1930. Preliminary report on the study of artificial removal of astringency in kaki. Proc. Japan Acad. 6: 397—398.
5. 掛下謹次郎. 1930. 二果実の貯蔵及び成熟過程に於けるアセトアルデヒド及びアルコール量の消長. 農及園. 5: 1151—1161.
6. 北川博敏. 1969. カキの脱渋および貯蔵に関する研究. 第5報. 湯湯脱渋中に生ずるアセトアルデヒドと渋味消失との関係. 園学雑. 37: 379—382.
7. 京都大学農学部農芸化学教室. 1957. 農芸化学実験書第3巻. p. 1092—1093. 産業図書. 東京.
8. 中林敏郎. 1971. 果実および野菜類のタンニン成分. 第7報. 甘柿と渋柿のタンニン組成の相違. 食品工誌. 18: 33—37.
9. 中村怜之輔. 1973. カキ果実の脱渋機構に関する一考察. II. カキ果実のアセトアルデヒド含量, エタノール含量およびアルコール脱水素酵素活性の品種間差異. 食品工誌. 20: 529—536.
10. 杉浦明・米森敬三・原田久・苦名孝. 1979. カキ果実のエタノールおよびアセトアルデヒド含量の消長と自然脱渋との関係について. 園芸学研究集録. 9: 41—47.
11. SUGIURA, A. and T. TOMANA. 1983. Relationships of ethanol production by seeds of different types of Japanese persimmons and their tannin content. Hortscience. 18: 319—321.
12. SWAIN, T. and W. E. HILLIS. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Fd Agric. 10: 63—68.
13. 米森敬三・松島二良・杉浦明. 1983. 甘ガキと渋ガキのタンニン物質の差異について. 園学雑. 52: 135—144.