

テウチグルミおよびオニグルミのタンニン成分

古内幸雄

Studies on Tannins of Walnuts, *Juglans regia* L. and
J. mandshurica Maxim. var. *Sieboldiana* Makino

Yukio FURUUCHI

Nagano Prefectural College, 49-7 Miwa 8-Chome, Nagano, 380, Japan

Abstract Composition of tannins was investigated on walnuts, *Teuchi-gurumi* (*Juglans regia* L.) and *Oni-gurumi* (*J. mandshurica* Maxim. var. *Sieboldiana* Makino). *Teuchi-gurumi* contained immobile and mobile associated tannins (A.T) which were detected on paperchromatograms, but these tannins were not detected in *Oni-gurumi*. Tannic acid, (–) gallocatechin and (–) epigallocatechin were detected on paperchromatograms in *Teuchi-gurumi*. Total phenol (T.P), flavanan tannin (F.T) and vanillin-positive phenol (V.P) were higher in *Teuchi-gurumi* than in *Oni-gurumi*. Polyphenols in *Teuchi-gurumi* were found to consist of V.P, and F.T in *Oni-gurumi*, as the major component.

タンニンは、本来、渋味を有しタン白質と結合沈殿し、皮革をなめす性質のある高分子のポリフェノール成分をさすが、このような性質をもたない低分子フェノール類もタンニンとして扱われることが多い。

タンニンは、苦渋味や黒色、褐色など変色の原因になるだけでなく、特にタン白質と結合しやすく、タン白質の栄養価の低下、消化酵素の作用阻害といった面でマイナス要因となることが多い。これまで、野菜・果物や穀類、豆類、イモ類などのタンニン成分については、かなり広汎に研究がなされている。

著者は、長野県農産物の特産の一つとして、東信地方で古くから栽培されているテウチグルミの用途拡大を目的として、主として、タン白質の特

性に着目して研究を進めてきた。しかし、クルミの食用部位である果仁には、容易に除去し難い渋皮が付着しているため、生食用にしても、又、搾潰してペースト状にした場合も、苦渋味や変色の原因となり、食品としての価値を大きく損なうことが多い。従って、この渋皮を剥皮することなく、効果的にタンニン成分を除去することができれば、クルミの食味改善に大きく寄与するものと思われる。しかしながら、クルミのタンニンに関する研究はほとんどみあたらない。そこで著者は、長野県産のテウチグルミ（“シナノグルミ”）と野生種のオニグルミのタンニン成分を定性的に比較検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

クルミは、栽培種のテウチグルミ (*Juglans regia* L.) (長野県更埴市, 平成2年10月産) と野生種のオニグルミ (*J. mandshurica* Maxim. var. *Sieboldiana* Makino) (宮城県小野田町, 昭和63年10月産) を使用した。

クルミのタンニンのは、クルミ果仁をコーヒーミルで粉砕し、ついでn-ヘキサンで十分に脱脂した残渣(クルミ脱脂粉末)から適当な溶媒を用いて抽出した。テウチグルミについては、渋皮を果仁より、できるだけ完全にとり除いて脱脂した試料(以下、渋皮除去テウチグルミ)のタンニン成分についても検討した。

2. タンニン成分の抽出溶媒の検討

抽出溶媒の種類によって、タンニンの抽出率が異なることはよく知られている。ここでは Laila Hussein らの方法¹⁾に準じ、以下の5種類の溶媒について検討した。

- ① 水 ② 1% HClメタノール溶液
③ 10% 酢酸 ④ 10% 酒石酸メタノール溶液
⑤ 70% アセトン

クルミ脱脂粉末からタンニンを抽出するには、クルミ脱脂粉末5gに20倍量の抽出溶媒を加え、振とう器(YAMATO, MODEL SA-31)で1時間、室温下で抽出し、濾過により抽出液を得た。残渣は同じ溶媒でよく洗浄し前記の抽出液に合せた後、定容した。この抽出液は、タンニンの定性反応および全フェノール、Flavanan tannin (Condensed tannin) および Vanillin-positive phenol の定量に使用した。

3. 分析方法

1) 定性反応 それぞれのタンニン抽出液について、ゼラチン液による沈殿、塩化第二鉄溶液による呈色、水酸化ナトリウム溶液による呈色、酢酸一酢酸鉛による沈殿、塩酸一ホルマリン試薬による沈殿の5種類の定性反応を試みた。

2) 全フェノールの定量

各種溶媒で抽出した抽出液について、Folin-Dennis²⁾法で定量した。

抽出液5.0mlにFolin試薬5.0mlを加え混合し、3分間静置した後、10%炭酸ナトリウム溶液5.0mlを加え混合した。そのまま1時間室温下に放置した後遠心分離し、その上澄液について760nmの吸光度を測定した(日本分光UVIDEC-5型を用いた。以下同じ)。

3) Flavanan tannin (縮合型タンニン) の定量

Hagerman と Butler のタン白質沈殿法³⁾で定量した。

クルミ脱脂粉末に約15倍量のメタノールを加え、振とう器で1時間、室温下で抽出した後、遠心分離で上澄液を得た。この上澄液を減圧濃縮(タイテック(株)製コンセントレーターTC-10Gを用いた)し、再び2.0mlのメタノールに溶解した。このメタノール溶液0.5mlに5.0mlの0.1% (w/v) 牛血清アルブミン(BSA)を加え10分間静置した後、遠心分離で沈殿物を得た。次いで、この沈殿物に1.0mlの水を加え懸濁し、さらに4.0mlの1% SDS-5% (v/v) トリエタノールアミン溶液および1.0mlの0.1N塩化第二鉄溶液を加え、よく混合した後30分間静置し、510nmの吸光度を測定した。検量線は、(+)カテキンを使用し、この際はBSAによる沈殿操作は行なわなかった。

4) Vanillin-positive phenol

カテキンのようなフラボノイド構造を有するフェノール類の定量に、バニリン-硫酸法⁴⁾を用いた。すなわち、検液3mlを氷水中で振とうしながらバニリン試薬(バニリン1gを70%(v/v)硫酸100mlに溶解)6mlをビュレットより10~15秒で添加、室温に15分放置後、500nmの吸光度を測定した。標準曲線は(+)カテキンを使用した。

5) ペーパークロマトグラフ法

20×20cmの東洋漏紙No.50を用い、1次元に2%酢酸、2次元にブタノール4、酢酸1、水2.2の混液で上昇展開した。

テウチグルミおよびオニグルミのタンニン成分

呈色試薬は、フェリシアン化カリ（赤血塩）—鉄ミューバン液（各300mg%液の等量混合液）及び、バニリン—塩酸試薬（10%のバニリンを含むエタノール液5容と濃塩酸3容を使用直前に混合）を用いた。

標準品は、三井農林（株）製の（-）エピカテキン、（-）エピカテキンガラート、（-）エピガロカテキン、（-）エピガロカテキンガラート、（+）カテキンと、Aldrich chemical Company製のクロロゲン酸および純正化学（株）製のタンニン酸を使用した。

6) 薄層クロマトグラフ法

Whatman SILICA GEL 60A (20×20cm, 250 μm layer) を用い、1次元にtert-ブタノール3, 酢酸1, 水1の混液 (TBA), 2次元に6%酢酸で上昇展開した。呈色試薬は、バニリン—塩酸試薬（エタノールと濃塩酸の4:1混液にバニリンを4%溶解）を用いた。

試験溶液の点着量は、10μlとした。

結果および考察

1. タンニン抽出液の定性反応

テウチグルミ、渋皮除去テウチグルミ、およびオニグルミの脱脂粉末から、5種類の溶媒を用いて、振とう法によって抽出した抽出液について各種の定性試薬について得られた定性反応の結果を、表1に示した。

予想された通り、渋皮を除去したテウチグルミの反応が最も弱く、クルミのタンニン成分が、渋皮に集中して多いことがわかった。

ゼラチン液の添加による沈殿物の生成は、3種類ともひじょうに微弱であり、オニグルミではほとんど沈でん物が認められなかった。

塩化第二鉄溶液に対しては、テウチグルミとオニグルミのいずれも、鋭敏に反応したが、沈殿の色調は、テウチグルミが黒紫色であるのに対し、オニグルミのそれは、黄色ないし褐色を呈し、タンニン成分が異種のものである可能性を示唆した。希カセイソーダ溶液および酢酸—酢酸鉛についても、テウチグルミの抽出液がかなり鋭敏に反応しているのに対し、オニグルミのそれは、それほど顕著な反応を示さなかった。これらの結果から、テウチグルミとオニグルミでは、タンニン成分の種類が異なると共に、また、タンニンの含量も、

表1 テウチグルミ、渋皮除去テウチグルミおよびオニグルミの抽出溶媒を異にするタンニン抽出液の定性反応

試料	タンニン抽出溶媒	定性試薬								
		ゼラチン液	塩化第二鉄液	希カセイソーダ液	酢酸-酢酸鉛	塩酸-ホルマリン				
テウチグルミ	水	淡黄色沈澱±	灰黒色沈澱	+	黄褐色沈澱	+	黄白色沈澱	+	無色透明	-
	10% 酢酸	淡赤橙色	黒紫色沈澱	+	赤褐色沈澱	+	黄白色沈澱	+	微紅色	-
	1% HCl-メタノール	微赤色沈澱±	灰黒色沈澱	+	黒褐色沈澱	+	褐黄色沈澱	+	紅色	-
	10% 酒石酸メタノール	淡黄色沈澱干	黒紫色沈澱	+	白色沈澱	+	白黄色沈澱	+	濃紅色	-
70% アセトン	微黄色沈澱±	黒紫色沈澱	+	濃赤褐色沈澱+	+	褐黄色沈澱	+	淡紅色	-	
渋皮除去テウチグルミ	水	無色透明	赤褐色沈澱	+	褐黄色濁り	干	白色沈澱	±	淡黄色透明	-
	10% 酢酸	無色透明	褐黄色沈澱	干	灰褐色沈澱	干	白色沈澱	干	淡黄色透明	-
	1% HCl-メタノール	白色沈澱	黄色濁り	干	白色沈澱	±	白色沈澱	+	黄白色沈澱	+
	10% 酒石酸メタノール	無色透明	黄白色沈澱	+	白色沈澱	+	白色沈澱	+	白色沈澱	±
70% アセトン	無色透明	褐黄色濁り	干	赤褐色透明	-	灰褐色沈澱	±	微紅色透明	-	
オニグルミ	水	無色透明	無色透明	-	黄色濁り	干	白黄色沈澱	干	黄色透明	-
	10% 酢酸	無色透明	赤褐色濁り	±	無色透明	-	無色透明	-	無色透明	-
	1% HCl-メタノール	無色透明	褐黄色沈澱	+	白黄色沈澱	干	白色沈澱	+	淡黄色透明	-
	10% 酒石酸メタノール	無色透明	黄褐色沈澱	+	白色沈澱	+	白色沈澱	+	無色透明	-
70% アセトン	無色透明	黄色濁り	干	褐黄色濁り	干	黄色沈澱	±	淡黄色透明	-	

表2 テウチグルミ, 渋皮除去テウチグルミおよびオニグルミの全ポリフェノール含量 (mg/100g)

抽出溶媒	試料	テウチグルミ	渋皮除去テウチグルミ	オニグルミ
水		359.3	64.5	156.5
10%酢酸		639.0	33.8	182.4
1% HCl・メタノール液		5489.3	150.8	712.4
10%酒石酸メタノール液		3743.0	183.5	764.7
70%アセトン		3994.5	645.5	1426.8

テウチグルミがオニグルミよりもかなり多いことが予測された。塩酸—ホルマリン液に対しては、渋皮除去テウチグルミの抽出液にわずか沈殿が認められた程度で他の2者では沈殿は生成しなかった。

2. 全ポリフェノール含量

タンニンの抽出に使用した5種類の溶媒について、抽出液の全ポリフェノール量を測定し、その結果を表2に示した。テウチグルミでは、1% HClメタノール液が最も高い値を示し、渋皮除去テウチグルミおよびオニグルミの両者は、70%アセトンによる抽出量が最高値を示した。量的には、テウチグルミが、オニグルミのおよそ4倍、渋皮除去クルミの約8.5倍とかなり多量のポリフェノール成分を含むことがわかった。このことは、タンニン抽出液の定性反応が、テウチグルミの抽出液が他の2者に比較して、かなり鋭敏な反応を示したことを裏づけるものと思われた。

3. Flavanan tannin と Vanillin-positive phenol の含量

この両者の定量に供した検液は、表2で全ポリフェノールの抽出値が最高を示した溶媒を用いて調製した。すなわち、テウチグルミについては1% HClメタノール溶液を、渋皮除去テウチグルミとオニグルミについては70%アセトン溶液を用いて検液を調製した。

表3にその定量結果を示した。この表から明らかのように、Flavanan tanninおよびVanillin-positive phenolのいずれも、テウチグルミが最

表3 テウチグルミ, 渋皮除去テウチグルミおよびオニグルミのFlavanan tanninと Vanillin-positive phenol の含量 (mg/100g)

試料	Flavanan tannin	Vanillin-positive phenol
テウチグルミ	1352.2	2946.9
渋皮除去テウチグルミ	310.0	223.0
オニグルミ	1022.5	422.6

も多量に含み、とくに Vanillin-positive phenol は、Flavanan tannin のおよそ2倍も含むことがわかった。

一方、オニグルミは Flavanan tannin が Vanillin-positive phenol の2.4倍も多く、テウチグルミとちょうど逆の関係がみられた。これらの結果からクルミのタンニン成分の含量と種類は、栽培種のテウチグルミと野生種のオニグルミでは、かなり相異し、このことがクルミの風味・食味に大きく影響しているのではないかと推察された。

4. ペーパークロマトグラフィ (PC) と薄層クロマトグラフィ (TLC)

タンニン成分の標準物質について、PCの二次元法によって得られたクロマトグラムを図1に、TLCの一次元法によるクロマトグラムを図2に示した。図3は、クルミとヒマワリのタンニン成分のTLC一次元クロマトグラムであるが、図2のポリフェノール標準物質の1~6のカテキン類のスポットはバニリン—塩酸試薬によって紅色を呈したが、図3のクルミのTLCには紅色のスポットは認められなかったことから、クルミにはカテキン類のポリフェノール成分が少ないと推察される。また、同じ図2の標準物質のスポットには、タンニン酸を除いて、テーリングは認められなかったが、テウチグルミ、オニグルミでは、2つのスポットにテーリングがみられ、それが原点付近から長く続き、分子量の大きいタンニン成分の存在が推察された。しかし、渋皮を除去したテウチグルミには、テーリングがみられず、また、スポットの呈色の程度もかなり弱かったことから果仁そ

テウチグルミおよびオニグルミのタンニン成分

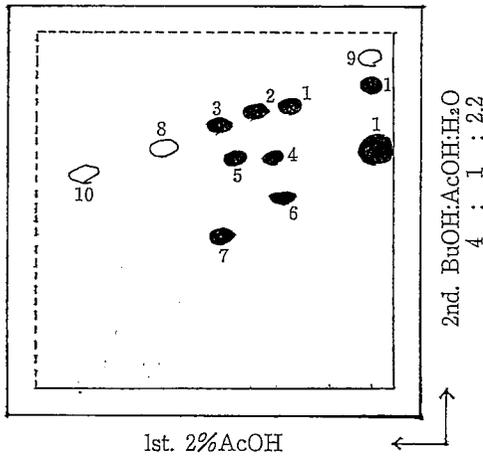


図1 標準ポリフェノール成分のペーパークロマトグラム

1. タンニン酸
2. (-)エピカテキンガレート
3. (+)カテキン
4. (-)エピガロカテキンガレート
5. (-)エピカテキン
6. (-)ガロカテキン
7. (-)エピガロカテキン
8. クロロゲン酸
9. イソクロロゲン酸
10. ネオクロロゲン酸

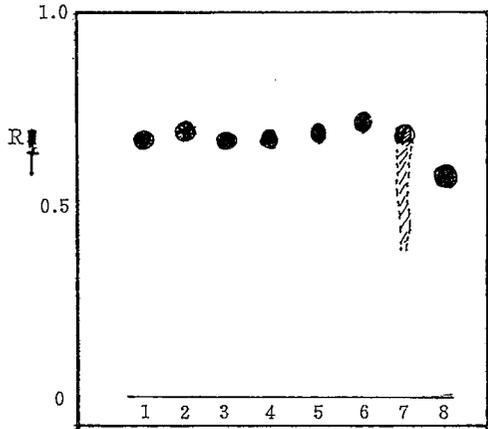


図2 標準ポリフェノール成分の薄層クロマトグラフィ（一次元法）

1. (-)エピカテキン
2. (-)エピカテキンガレート
3. (-)エピガロカテキン
4. (-)エピガロカテキンガレート
5. (+)カテキン
6. カテコール
7. タンニン酸
8. クロロゲン酸

薄層板: SILICA GEL 60A (20×20cm)
(Whatman)

展開剤: t-BuOH 3, 酢酸 1, 水 1 の混液

呈色試薬: バニリン塩酸試薬

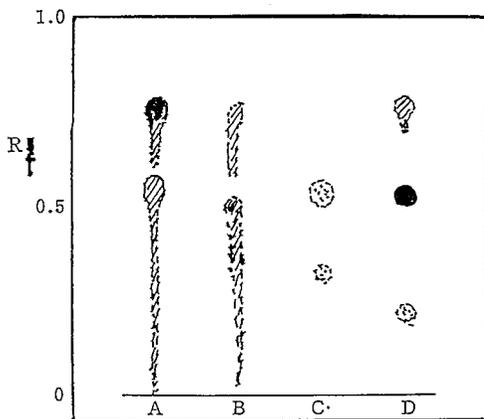


図3 テウチグルミ, オニグルミのタンニン成分の薄層クロマトグラフィ（一次元法）

試料A: テウチグルミ

〃 B: オニグルミ

〃 C: 渋皮除去テウチグルミ

〃 D: ヒマワリ

(薄層板, 展開剤, 呈色試薬は図2と同じ。)

長野県短期大学紀要第46号 (1991)

正 誤 表

ページ	誤	正
13	図2および図3の縦軸のR _f	R _f

のものにはタンニンは少なく、タンニン成分が渋皮に集中して含まれることが明らかに認められた。このことは、全ポリフェノールや Flavanan tannin, Vanillin-positive phenol の定量値が、渋皮除去テウチグルミでかなり低い値を示したこ

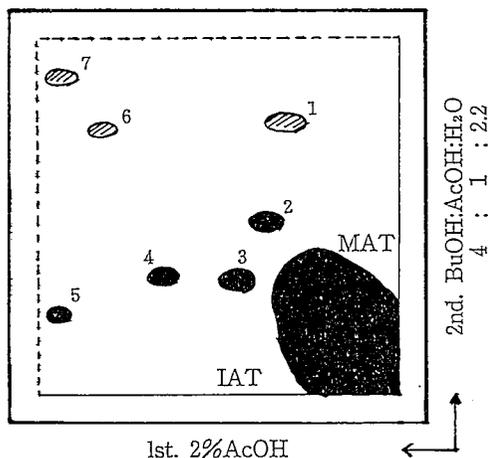


図4 テウチグルミポリフェノールのペーパークロマトグラム

1. タンニン酸
2. (-)ガロカテキン
3. (-)エピガロカテキン
4. 5. 6. 7. 不明

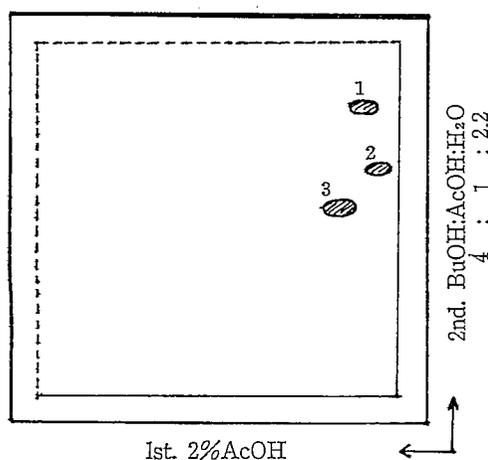


図5 渋皮除去テウチグルミのポリフェノールのペーパークロマトグラム

1. 2. タンニン酸
3. (-)ガロカテキン

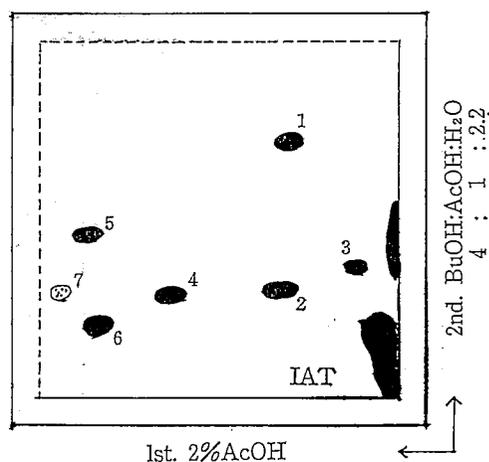


図6 テウチグルミの渋皮のポリフェノールのペーパークロマトグラム

1. タンニン酸
2. (-)エピガロカテキン
3. ~7. 不明

と一致する。図4, 図5, 図6は, PC の2次元クロマトグラムであるが, テウチグルミでは, 図4に示した通り, タンニン酸, (-)ガロカテキンおよび(-)エピガロカテキンと思われるスポットの他に数個が単独のスポットとして存在し, また原点付近から中央付近に広がった状態で存在する部分が認められた。これは, 会合度の大きい高分子のタンニン成分にみられるもので中林²⁾は, 中央付近まで移動するものを移動性会合型タンニン (MAT), 原点付近にとどまっているものを不動態会合型タンニン (IAT) と呼んで区別している。図6にテウチグルミから採取した渋皮だけのペーパークロマトグラムを示したが, 図4のテウチグルミのPC とよく一致し, 渋皮のタンニン成分の影響が大きいことがわかる。一方, なように, 渋皮を除去したテウチグルミでは, 図5で明らかMAT, IAT はもちろん, 他の単独のスポットもみられず, タンニン酸と思われるスポットがわずかに認められるだけで, クルミのタンニン成分が渋皮に集中して存在することが, このPC でも明らかにされた。一方, 図7に示したように, オニグ

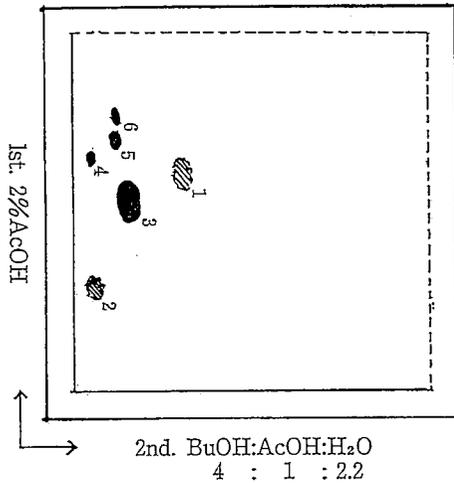


図7 オニグルミのポリフェノールのペーパークロマトグラム

1. (-)エピガロカテキン
- 2.~6. 不明

ルミでは、MAT, IATのいずれも認められず、また、カテキン類の比較的 low molecular weight のフェノール類の存在も認められず、テウチグルミとは、タンニン成分の組成が大きく異なることが確認された。

要 約

タンニン成分は、苦渋味や変色の原因となり、食品としての価値を低下させることが多い。テウチグルミ (*J. regia* L.) は、脂質、タンパク質を多量含み、栄養価の高い食品であるが、長期保存の間に食味が低下しがちである。その理由の一つにタンニンの存在が考えられたので、タンニン成分について、オニグルミ (*J. Sieboldiana*, Maxim.) と比較検討したところ、次のような結果が得られた。

(1) テウチグルミ、渋皮除去テウチグルミおよびオニグルミからタンニン成分を抽出し、その特

性を定性的に比較したところ、塩化第2鉄溶液、希カセイソーダ溶液、酢酸・酢酸鉛溶液に対する反応が、テウチグルミとオニグルミではかなり異なり、両者のタンニン成分に大きな違いのあることが推察された。

(2) 全ポリフェノール (Total polyphenol; T.P), Flavanan tannin; F.T) および (Vanillin positive phenol; V.P) の含量は、テウチグルミが最も高いが、渋皮を除去すると、T.Pは約1/9に、F.Tが約1/4に、V.Pは約1/13にそれぞれ急減した。オニグルミのT.P, F.TおよびV.Pはそれぞれテウチグルミのおよそ1/4, 1/1.5および1/7と少なかった。

(3) テウチグルミのF.TとV.Pの含量比はおよそ1:2でV.Pが多かったのに比べ、オニグルミでは2:1で逆にF.TがV.Pを上回った。

(4) ペーパークロマトグラフ法で、テウチグルミとオニグルミのタンニン成分の種類と組成を比較した結果、前者には移動性会合型タンニンと不動性会合型タンニンが認められたが、後者には認められなかった。

本実験を行うにあたり、カテキン類の試料を提供して下さった三井農林(株)食品総合研究所の原征彦先生に感謝します。

文献

- 1) Hussein, L., Fattah, M. A.; Salem, E.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 95-98 (1990)
- 2) 中村敏郎, 本村進, 加藤博道: 食品の変色と化学, 81 (1967), 光琳書院(東京)
- 3) HAGERMAN, A. E. and BUTLER, L. G.: *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1087 (1982)
- 4, 5) 中林敏郎: 日食工誌, 15, 73 (1968)