

# 食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	「柿渋」の特性解明と産業としての新たな展開の可能性
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	大門 弘幸（農学部・教授）研究代表者 尾形 凡生（農学部・教授）（2021年度より参加） 米森 敬三（食農研・客員研究員）（2020年度まで研究代表者） 岩本 将稔（岩本亀太郎本店・代表取締役） 西山 総一郎（京都大学農学研究科・助教）（2020年度まで参加）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究（新型コロナウイルス感染拡大による期間延長のため、実際の研究期間は4年）
キーワード	(1) 柿渋 (2) タンニン (3) 化学特性 (4) 発酵 (5) 機能性 (6)

## 1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

柿渋はカキ果実の渋味成分（タンニン）を高濃度で含む流動性に富む液体で、古くから漁網や酒造りの搾り袋、和紙などの耐水性加工などに幅広く利用されてきた。柿渋の生産は、渋ガキを幼果時に採取・搾汁した果汁を発酵・熟成させることによっている。この発酵・熟成過程が柿渋の特性を決める重要な要因であるとされているが、この過程でカキタンニンにどのような反応が起きているかは未解明の部分が多い。また、これまで柿渋は渋ガキ幼果を用いて作製されてきた。しかしながら、我々は、完全甘ガキが渋ガキと同等の強い渋味を呈する幼果期において、そのタンニンの化学的特性が渋ガキのそれとは異なることを明らかにしてきた。このことから、完全甘ガキ幼果から柿渋を作製した場合、柿渋の特性が渋ガキのそれとは異なり、新たな利用場面が考えられる可能性が大きく、新産業の創出に繋がるのではないかと考えるに至った。そこで、本研究では、完全甘ガキから作製した柿渋と渋ガキから作製した柿渋との化学的特性がどのように異なるかを明確にすることを主たる目的とし、それぞれの柿渋のカラムクロマトグラフィーでの分離パターンの調査と限外ろ過装置を用いた排除分子量の調査を実施した。さらに、この化学的特性の差異によって、完全甘ガキから作製した柿渋が渋ガキから作製した柿渋と比較して、機能性特性にどのような差異が生じるかを明らかにすることで、新たな利用場面の可能性を模索した。本研究では、機能性特性として、特に抗酸化作用と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性に着目して研究を実施した。

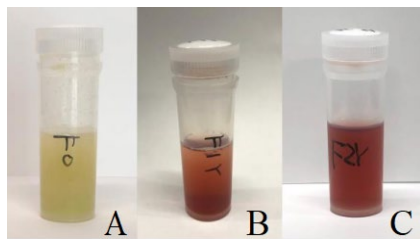
## 2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

本研究プロジェクトは、当初計画では2019年4月～2021年3月までの2年間のプロジェクトであったが、新型コロナウイルスの感染拡大により研究計画の見直しを迫られ、2023年3月まで2年間延長して実施した。以下がこの研究期間中に得られた研究成果の概要である。

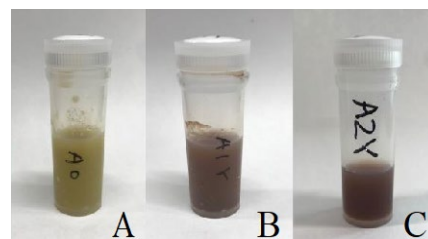
### 1. 完全甘ガキと渋ガキから作製した柿渋の化学的特性の差異

#### ① 完全甘ガキと渋ガキからの柿渋作製とカラムクロマトグラフィーでの分離パターン

完全甘ガキの‘富有’、渋ガキの‘愛宕’の幼果を粉砕・搾汁した果汁を2年間発酵・熟成させて柿渋を製造した。完全甘ガキの‘富有’は2017年7月6日に、完全渋ガキの‘愛宕’は2017年7月19日に幼果約1トンを粉砕・搾汁し、粉砕・搾汁後すぐ(0日目)、15日目、30日目、60日目、1年目、2年目の6回試料を採取し、分析時まで凍結して保存した。

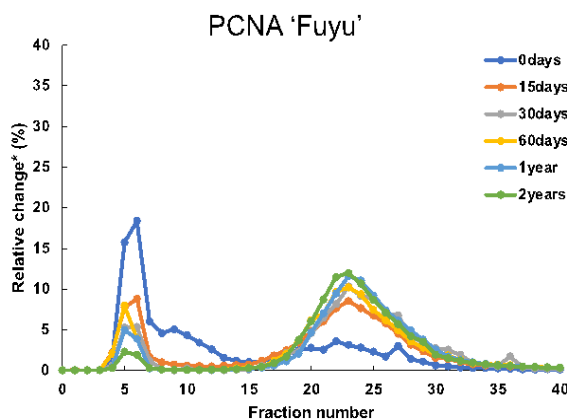


‘富有’から作製した柿渋  
A: 0日目、B: 1年目、C: 2年目

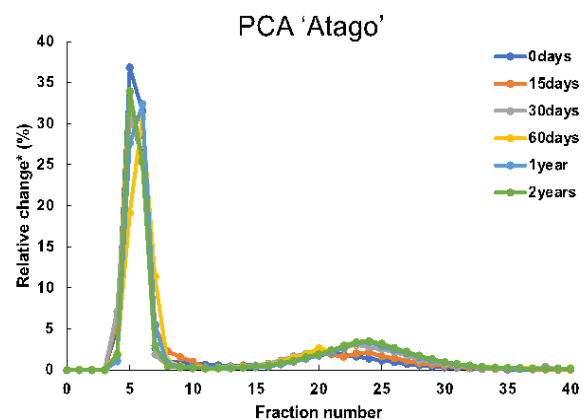


‘愛宕’から作製した柿渋  
A: 0日目、B: 1年目、C: 2年目

次に、採取した柿渋サンプルを高中圧分取精製装置 Purif-Rp1 (昭光サイエンティフィック)により、Purif-StarGel シリーズの *Sirius* (ポリスチレン合成吸着剤) カラムで分離し、その分離パターンを調査した。なお、移動相としてはエタノール 100%からエタノール：水が 50：50 までのグラジエント溶出を実施し、各分画 10ml ずつ 40 フラクションを分取後、それぞれの分画のフェノール含量を Folin-Ciocalteu 法で測定し、全溶出フェノール量に対する各分画の割合を示すことで柿渋試料のカラムでの分離パターンとし、その変化を両品種で経時的に調査した。また、分析に用いた柿渋試料は、‘富有’と‘愛宕’でタンニン濃度に差があったため、タンニン濃度が同程度になるように‘愛宕’の柿渋を希釈し、両品種とも 1ml をカラムに注入した。その結果、0日目では‘富有’と‘愛宕’の間で分離パターンに差異は認められず、最初の溶出分画 (フラクション 6 付近) で大きなピークが認められるのみであった。



‘富有’の *Sirius* カラムでの分離パターン

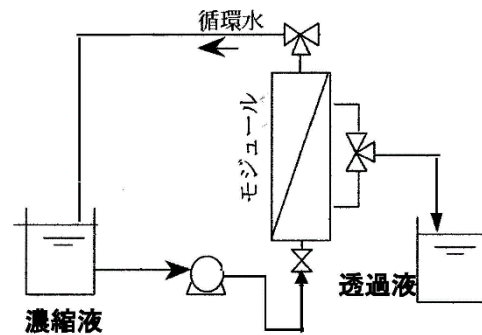
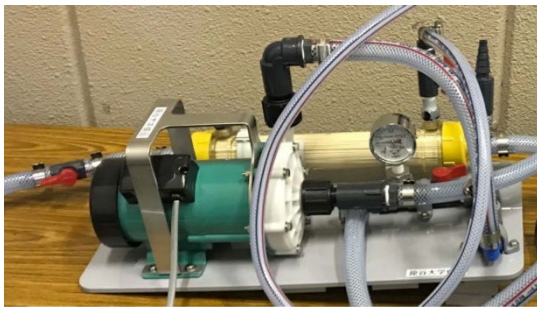


‘愛宕’の *Sirius* カラムでの分離パターン

しかしながら、2年間の熟成期間中、‘愛宕’では0日目の分離パターンとほとんど同様の分離を示したのに対し、‘富有’では熟成期間が長くなるにつれて、最初のフラクション（フラクション6付近）のピークが徐々に小さくなり、第2のピーク（フラクション23付近）が認められるようになった。熟成2年目のサンプルでは、‘愛宕’での分離パターンは0日目の分離パターンと比較してほとんど変化が認められなかったのに対して、‘富有’では最初のピーク（フラクション6付近）がかなり小さくなり、第2のピーク（フラクション23付近）が大きくなっていた。これらの結果から、渋ガキから作製した柿渋と完全甘ガキから作製したカキ渋では、その化学的特性が明らかに異なることが確認できた。

## ② 限外ろ過装置を用いた柿渋原液の分子量の推定

分析サンプルとして、完全甘ガキの‘富有’および渋ガキの‘愛宕’から作製した熟成2年8ヶ月の柿渋を用いた。両者の柿渋の分子量の差異を調査するため、両品種の柿渋のタンニン濃度を調整後、それぞれの柿渋を排除限界分子量3万および50万の限外ろ過膜（中空糸型UF膜モジュール；ダイセン・メンブレン・システムズ）を用いて分離し、各品種の濃縮液と透過液のタンニン含量を測定した。なお、限外ろ過装置では1Lの柿渋原液をポンプでモジュールを通して循環させることで、モジュール外へ排除される液（透過液）を集め、柿渋原液のほぼ半量（500ml）が透過液として回収できた時点でポンプを止めて循環を停止し、残った柿渋液（500ml）を濃縮液とした。



限外ろ過装置（左）と装置の模式図（右）

その結果、排除限界分子量が3万のろ過膜では、両品種とも透過液ではほとんどタンニン含量が検出できず、両品種の柿渋の分子量が3万以上であることが示唆された。一方、排除限界分子量が50万のろ過膜では、‘富有’ではほぼ半量が透過液で検出され、その分子量が50万程度であると推定できたのに対し、‘愛宕’の透過液ではタンニン含量がほとんど認められず、‘愛宕’の柿渋の分子量がかなり大きいことが示唆された。

## 2. 柿渋凍結乾燥粉末を用いた機能性特性の解析

### ① 柿渋の凍結乾燥粉末の作製

約1トンの幼果を2019年6月29日に粉砕・搾汁した完全甘ガキ‘富有’および2019年7月28日に粉砕・搾汁した渋ガキ‘愛宕’の果汁を、それぞれ1年間あるいは2年間熟成させて製造した柿渋を凍結乾燥し、得られた柿渋凍結乾燥粉末を用いて以下の実験を行った。



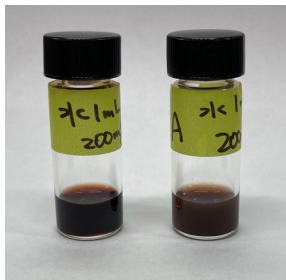
1年間熟成させた柿渋の凍結乾燥粉末  
（左：‘富有’、右：‘愛宕’）

② 凍結乾燥粉末の水溶性溶媒への溶解度

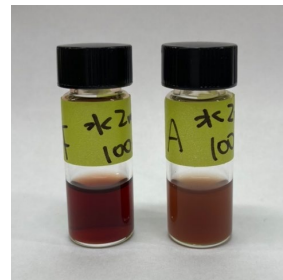
2年間熟成させた柿渋の凍結乾燥粉末を用い、脱イオン水または70%エタノール1 mLに対して凍結乾燥粉末200 mg、脱イオン水または70%エタノール2 mLに対して柿渋凍結乾燥粉末100 mgを加え溶解し、一晩静置後、上澄み100 μLを遠心機(プチチェンジ 8864、トミー工業株式会社)を用いて6200 rpmで12分間遠心分離し、得られた上澄みの総フェノール含量をFolin-Ciocalteu法で測定した。

その結果、脱イオン水に柿渋凍結乾燥粉末を溶解した場合には、‘富有’由来の柿渋凍結乾燥粉末と比較して、‘愛宕’由来の柿渋凍結乾燥粉末を溶解した柿渋液で、より懸濁が確認された。

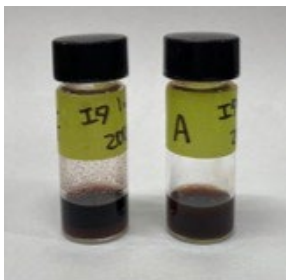
一方、70%エタノールに柿渋凍結乾燥粉末を溶解した結果、‘富有’由来の柿渋凍結乾燥粉末を溶解した液で不溶分の析出が確認された。



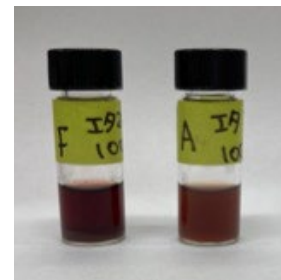
脱イオン水 1mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 200 mg を溶し、一晩静置した柿渋液 (左: ‘富有’、右: ‘愛宕’)



脱イオン水 2mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 100 mg を溶解し、一晩静置した柿渋液

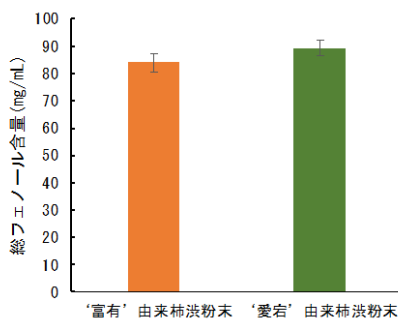


70%エタノール 1mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 200 mg を溶解し、一晩静置した柿渋液 (左: ‘富有’、右: ‘愛宕’)

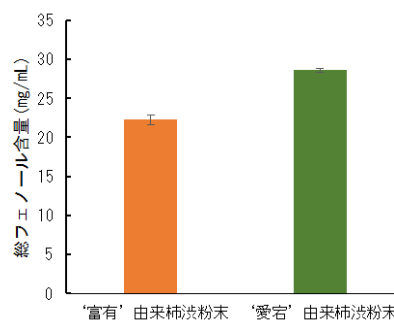


70%エタノール 2mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 100 mg を溶解し、一晩静置した柿渋液 (左: ‘富有’、右: ‘愛宕’)

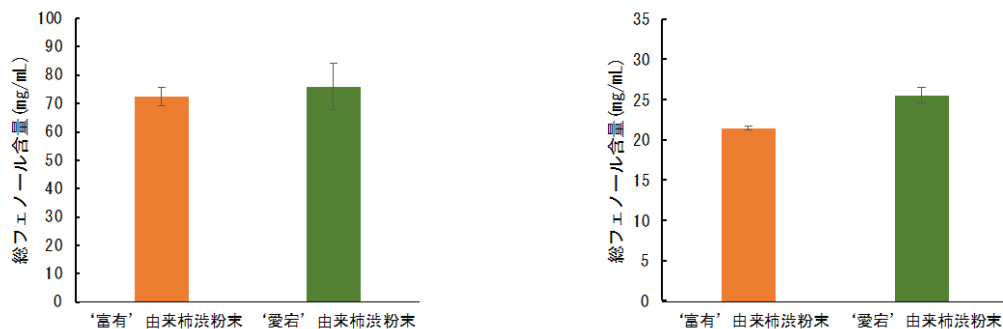
しかしながら、溶解後のフェノール含量を測定したところ、脱イオン水、70%エタノールどちらに溶解した場合も、品種間または溶媒による総フェノール含量に有意な差は確認されず、‘富有’および‘愛宕’由来の凍結乾燥粉末の溶解度には差異が認められなかった。



脱イオン水 1mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 200 mg を溶解した柿渋液のフェノール含量



脱イオン水 2mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 100 mg を溶解した柿渋液のフェノール含量



70%エタノール 1mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 200mg を溶解した柿渋液のフェノール含量

70%エタノール 2mL に対して柿渋凍結乾燥粉末 100 mg を溶解した柿渋液のフェノール含量

### ③ in vitro での抗酸化活性と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の測定

1年間熟成させた柿渋の凍結乾燥粉末を用い、まず、抗酸化反応を DPPH ラジカル捕捉活性試験により実施した。すなわち、柿渋凍結乾燥粉末を 0.2 mg/mL、0.1 mg/mL となるように調製した試料 0.1 mL と 0.1M MES buffer (富士フィルム和光純薬株式会社) 0.9 mL、0.13 mg/mL となるように 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radical (東京化成株式会社) をエタノールで溶解した DPPH 溶液を 1.0 mL 加え攪拌後、常温暗所で 30 分間反応させた。その後、微量分光光度計 (U-3900H Spectrophotometer、HITACHI) で 517 nm の吸光度を測定した。また同時に、Trolox (和光純薬工業株式会社) を 100% 反応液として 10 mM、検量線用には、0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL になるようにエタノールで溶解した溶液を用いて実験を行い、ラジカル消去率を Trolox 相当量に換算し示した。

その結果、完全甘ガキ '富有' 由来の凍結乾燥粉末と渋ガキ '愛宕' 由来の凍結乾燥粉末の間で大きな差異は確認されなかった。このことから、完全甘ガキ '富有' から作製した柿渋も、一般的な渋ガキから作製された柿渋と同程度の抗酸化能を持つと考えられた。

#### 柿渋の DPPH ラジカル消去活性試験

Kakishibu (0.1 mg/mL)		Kakishibu (0.2 mg/mL)	
Fuyu	Atago	Fuyu	Atago
14.5 ± 0.7	13.5 ± 0.2	23.1 ± 0.2	23.0 ± 0.8

(μmol-trolox eq.)

次に、血糖値上昇抑制作用の評価のための  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。このためには、ラット小腸由来  $\alpha$ -グルコシダーゼおよび合成基質である *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) を用いて試験を実施し、酵素反応の結果生じた *p*-nitrophenol (*p*-NP) の変化から柿渋の阻害率を求めた。

その結果、完全甘ガキ '富有' 由来の凍結乾燥粉末と渋ガキ '愛宕' 由来の凍結乾燥粉末の間で、抗酸化活性測定の場合と同様、同等の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が認められたことから、両品種ともに同等の血糖値上昇抑制活性が期待された。

以上の結果から、甘ガキ由来の柿渋も渋ガキ由来の柿渋と同等の機能性を有しており、健康機能に着目した利用の可能性が示唆された。

### 3. 研究成果の社会的還元について

本研究プロジェクトの研究成果について（１）社会的な意義や影響（２）社会にどのように発信したのか、を平易にご説明ください。

#### （１）社会的な意義や影響

柿渋はわが国では古くから漁網や酒造りの搾り袋への塗布、和紙などの耐水性加工、漆器の下地塗布剤などに幅広く利用されてきた。また、近年は柿渋染めなどの染色にも広く利用され、古くて新しい素材として利用されている。さらに、柿渋のポリフェノールには血圧低下作用や血糖値低下作用など多様な生物活性も明らかになっており、柿タンニンのノロウイルスや新型コロナウイルスに対する阻害効果などが報告され、新たな生理活性物質としても注目を集めている。

柿渋は元来、渋ガキ幼果を粉碎・搾汁後、発酵・熟成させることで製造されてきた。しかしながら、完全甘ガキ幼果も生育初期には渋ガキ同様、強い渋味を呈しており、また、これまで完全甘ガキと渋ガキのタンニンの化学的特性が異なっている可能性が示唆されているにもかかわらず、完全甘ガキから柿渋を製造するとの発想は皆無であった。

本研究から、完全甘ガキから作製した柿渋は、従来の渋ガキから作製した柿渋とは化学的特性が異なることが明らかとなり、その分子量も渋ガキから製造した柿渋と比較してかなり小さいことが明らかとなった。さらに、抗酸化反応などの生理活性も渋ガキから製造した柿渋と同様に有していることも明確となった。すなわち、完全甘ガキから作製した柿渋は、その化学的特性の差異を利用して、これまでの渋ガキから作製した柿渋とは異なる利用場面が創出できる可能性が明らかとなり、本研究成果の新産業創出の可能性に向けた社会的意義や影響は大きい。

#### （２）社会への発信

2021年9月20-26日にオンラインで開催された第7回国際カキシンプोजウムにおいて、「Session 8. Utilization」で本研究成果を発表し、完全甘ガキ‘富有’から作製した柿渋の化学的特性を世界に向けて発信すると同時に、そのシンポジウムに関して国際園芸学会から刊行された *Acta Horticulturae* に発表内容を論文として投稿した。また、2023年1月に龍谷大学瀬田キャンパスで開催された、第32回 龍谷大学 新春技術講演会においても本研究成果をポスターとして発信するとともに、ポスターセッションで実施された、オンラインでのライブ配信ポスター課題としても選ばれ、オンラインでも研究成果を発信した。さらに、2023年3月に龍谷大学瀬田キャンパスで開催された令和5年度園芸学会春季大会（全国大会）でも本研究成果を口頭発表する等、広く社会へ発信している。また、共同研究者である岩本氏は、本研究成果を同じ柿渋製造に関わる奈良県の業者と情報共有し、完全甘ガキから作製した柿渋の新たな利活用を模索するとともに、新産業創出の可能性を検討している。

#### 4. 収支報告

(非公開)

#### 5. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

学会発表・発表論文・著書・学外資金獲得状況 等

<学会発表等>

Sonoda, A., T. Ogata, K. Iwamoto, S. Nishiyama and K. Yonemori. 2021. Different behavior in column chromatography between two types of kaki-shibu made from immature fruits of PCNA 'Fuyu' and PCA 'Atago'. 7<sup>th</sup> international symposium on persimmon. Sep. 20-26, 2021.

Yamamoto, R., R. Genda, K. Fukuhara, T. Ogata, K. Yonemori. 2021. Distribution of tannin cells in persimmon tree and the basic chemical composition of tannins in calluses derived from persimmon leaflets. 7<sup>th</sup> international symposium on persimmon. Sep. 20-26, 2021.

Fujiwara, Y., S. Nishiyama, N. Onoue, R. Matsuzaki, K. Yonemori and R. Tao. 2021. Candidate gene analysis for *ASTRINGENCY* controlling fruit astringency in *Diospyros kaki* based on messenger RNA- and small RNA-sequencing analyses. 7<sup>th</sup> international symposium on persimmon. Sep. 20-26, 2021.

西山総一郎・田尾龍太郎・米森敬三. 2022. 三次元電子顕微鏡法と機械学習によるカキタンニン細胞の微細構造イメージング. 園芸学会令和4年度春季大会 3月17日～23日, 2022.

藤原陽介・西山総一郎・尾上典之・米森敬三・田尾龍太郎. 2022. タンニン細胞の発達と完全甘ガキの「渋残り」との関連性. 園芸学会令和4年度秋季大会 9月7日～13日, 2022.

米森敬三・園田明日香・山本涼平・岩本将稔・尾形凡生・大門弘幸. 2023. 完全渋ガキ「愛宕」と完全甘ガキ「富有」から生産した柿渋の特性解析 ―特にその分子量に着目して―. 第34回龍谷大学新春技術講演会 1月11日, 2023.

山本涼平・尾形凡生・岩本将稔・米森敬三. 2023. 完全甘ガキ「富有」から作製した柿渋の機能性評価. 2023. 園芸学会令和5年度春季大会 3月19日～20日, 2023.

<発表論文(査読有り)>

Sonoda, A., T. Ogata, K. Iwamoto, S. Nishiyama and K. Yonemori. 2022. Different behavior in column chromatography between two types of kaki-shibu made from immature fruits of PCNA 'Fuyu' and PCA 'Atago'. *Acta Horticulturae* 1338: 375-379.

Yamamoto, R., R. Genda, K. Fukuhara, T. Ogata, K. Yonemori. 2022. Distribution of tannin cells in persimmon tree and the basic chemical composition of tannins in calluses derived from persimmon leaflets. *Acta Horticulturae* 1338: 223-229.

Fujiwara, Y., S. Nishiyama, N. Onoue, R. Matsuzaki, K. Yonemori and R. Tao. 2022. Candidate gene analysis for *ASTRINGENCY* controlling fruit astringency in *Diospyros kaki* based on messenger RNA- and small RNA-sequencing analyses. *Acta Horticulturae* 1338: 269-275.

<学外資金獲得状況>

日本学術振興会科学研究費 基盤研究(C) (一般)、代表 米森敬三、「カキ果実のプロアントシアニン蓄積の組織学的解析とその分子生物学的制御機構の解明」、2022年度 700千円