

## 学位論文要旨

氏名 中園 裕紀子

 題目 ユズ果実の有効利用に関する基礎的研究  
 (Studies on Utilization of Yuzu (*Citrus junos hort. ex Tanaka*) Fruit)

ユズ果実の長期貯蔵は水腐れやこはん症が多発してきわめて困難であり、新しい鮮度保持技術の確立が必要とされている。また、ユズ果実の生産量の約75%は加工品として用いられているが、果実重量の約10%を占める種子は加工副産物として大部分利用されず廃棄されている。本研究では、省エネルギーで環境負荷の小さい高圧電場処理による果実の長期貯蔵法の開発について研究した。さらに、産業廃棄物である種子の有効利用を目的として、種子の抗菌性物質やメラニン生成抑制作用についても調べた。

1) ユズ果実に高圧電場処理を行い、貯蔵中の果実重量、果実硬度、果皮色、果皮のクロロフィル含量、果汁のpH・糖度・酸度の経日変化を調べた。果実をポリエチレン袋に密封し、多種の青果物の鮮度保持に有効であった105kV/m-60分間、430kV/m-20分間、430kV/m-120分間の処理条件を用いて電場処理を行った後、5か月間、2、10および30℃の暗所で貯蔵した。高圧電場処理により、果実硬度は全温度区において、果皮色と果皮のクロロフィル含量は2℃および30℃区において、また果汁の酸度は全温度区において、それらの変化が顕著に抑制された。高圧電場処理後の2℃貯蔵は、従来の低温貯蔵に比較してユズ果実の硬度維持、緑色保持、酸度の保持にきわめて有効であり、長期貯蔵が可能であることを明らかにした。

2) ユズ種子のアルコール抽出物は、食中毒で問題となることが多い各種の細菌に対して強い抗菌活性を示した。抗菌性物質を80%メタノールで抽出した後、Amberlite XAD-2、シリカゲル、Toyopearl HW-40、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを順次行って精製した活性画分についてガスクロマトグラフ/質量分析を行った結果、抗菌性物質としてパラメトキシ桂皮酸が見いだされた。パラメトキシ桂皮酸の所在に関する報告はほとんどなく、種子における存在は初めての知見である。パラメトキシ桂皮酸の最小発育阻止濃度(MIC)は、*Micrococcus luteus*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* および *Salmonella enteritidis* に対してそれぞれ80、60、50、60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ であり、食品添加物として繁用されている合成抗菌性物質のパラヒドロキシ安息香酸ブチルの2~10倍強い抗菌力を示した。さらに、パラメトキシ桂皮酸はその化学構造から抗酸化活性を有することが考えられたので、抗酸化活性についても調べた。リノール酸を基質とし、ラジカル反応促進剤(AAPH)を加え、ロダン鉄法を用いて過酸化物を測定することにより抗酸化活性を評価した。その抗酸化力は、合成抗酸化剤であるBHA、BHTおよび天然抗酸化物質である $\alpha$ -トコフェロールの70~80%であった。

3) ユズ種子は昔から美白効果のある化粧水として利用されている。ユズ種子のブタノール抽出物は、メラニン生成の初発段階であるチロシンからドーパ、ドーパからドーパキノンへの2つの反応を触媒するチロシナーゼを阻害した。阻害形式は、チロシンを基質とした場合は拮抗阻害、ドーパを基質とした場合は不拮抗阻害であった。

本研究において、ユズ果実に高圧電場処理を行うことにより鮮度を保持して長期貯蔵できることを明らかにした。また廃棄物である種子には強い抗菌および抗酸化活性を併せ持つパラメトキシ桂皮酸やメラニン生成を阻害する化合物が存在することを見いだした。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Yukiko Nakazono
題 目	Studies on Utilization of Yuzu ( <i>Citrus junos</i> hort. ex Tanaka) Fruit (ユズ果実の有効利用に関する基礎的研究)

A long-term storage of yuzu fruits (*Citrus junos* hort. ex Tanaka) is extremely difficult, because it suffers from severe injuries during the long-term storage. A new technique is required for keeping their freshness. About 75% of harvested yuzu fruits is used for processing, and the seeds comprising about 10% of yuzu fruits in the fresh weight are mostly discarded as a by-product of their processing. In this study, the effects of high electric field treatment (HEF), which is characterized by the low environmental load and energy saving, on the quality of green yuzu fruits during the storage were investigated. As to the seeds, an antimicrobial substance and the activity against tyrosinase were investigated.

1) After fruits were packed in polyethylene bags, and exposed to HEF (105kV/m-60 min, 430kV/m-20 min or 430kV/m-120 min), they were stored in a dark room at 2, 10 and 30°C for 5 months. The weight and hardness of the fruits; the color and chlorophyll content of the peel; and the pH value, soluble solid and titratable acidity of the juice were measured during the storage. The HEF treatments depressed the change in the hardness of the fruits and the acidity of the juice in all storage temperatures, and retarded the degreening and chlorophyll content of the peel stored at 2°C and 30°C. The storage at 2°C after the HEF treatment was much more effective than the conventional low-temperature storage in maintaining the hardness, green color of the fruit and the acidity of the juice, and restricting of the injuries.

2) A methanol extract of yuzu seeds showed a potent antimicrobial activity against bacteria responsible for food poisoning. An antimicrobial substance was extracted with 80% methanol, and purified by Amberlite XAD-2, silica gel, Toyo pearl HW-40 and Sephadex LH-20 column chromatographies. The antimicrobial substance was identified as *p*-methoxycinnamic acid by GC-MS. It was first found in the plant seed. Minimum inhibitory concentrations of *p*-methoxycinnamic acid against *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* were 80, 60, 50 and 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The antimicrobial activity of *p*-methoxycinnamic acid was 2-10 times that of butyl *p*-hydroxybenzoate, a synthetic antimicrobial food-additive. *p*-Methoxycinnamic acid was inferred to have an antioxidative activity from its structure. The antioxidative activity, which was assayed by the thiocyanate method in the linoleic acid system, was about 70% ~ 80% that of BHA, BHT and  $\alpha$ -tocopherol.

3) A yuzu seeds extract has been used as a beauty lotion with a whitening effect. A butanol extract of yuzu seeds showed a high inhibitory effect on the mushroom tyrosinase catalyzing the first reaction of the melanine formation. The mode of the inhibition was the competitive inhibition in oxidation from tyrosine to L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), and the uncompetitive inhibition in oxidation from L-DOPA to DOPA-quinone.

In this study, the HEF treatment was found to be effective in keeping the freshness of yuzu fruits during the long-term storage. In addition, *p*-methoxycinnamic acid with the antimicrobial and antioxidative activities, and tyrosinase inhibitory compound(s) were found in yuzu seeds.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者氏名	中園裕紀子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 田寺謙次郎
	副査 鹿児島大学 助教授 南 雄二
	副査 佐賀大学 教授 藤田修二
	副査 宮崎大学 教授 辰巳保夫
	副査 鹿児島大学 教授 御木英昌
審査協力者	鹿児島女子短期大学教授・鹿児島大学名誉教授 橋永文男
題目	ユズ果実の有効利用に関する基礎的研究 (Studies on Utilization of Yuzu ( <i>Citrus junos hort. ex Tanaka</i> ) Fruit)
<p>ユズ果実は貯蔵中に鮮度が低下し水腐れなどの障害が多発するため、その長期貯蔵は極めて困難であり、新しい鮮度保持技術の開発が望まれている。一方、ユズ果実は生産量の約75%が果汁製品などに加工され、種子の大部分は利用されずに廃棄されている。本論文では、まず省エネルギーで環境負荷の小さな高压電場処理によるユズ果実の鮮度保持と長期貯蔵について、次に種子の有効利用を目的として種子の抗菌性物質とメラニン生成抑制作用について検討した。得られた成果の概要は以下のとおりである。</p> <p>1) 高压電場処理によるユズ果実の鮮度保持と長期貯蔵について</p> <p>予措処理したユズ果実をポリエチレン袋に密封し、一定時間高压電場に曝した後、2、10、30℃の暗所に5ヵ月間貯蔵し、ユズ果実の品質と鮮度に及ぼす高压電場の効果を一定期間ごとに調べた。高压電場処理を行っても10℃貯蔵では果皮の黄色化が進み、30℃貯蔵では腐敗が急速に進行し、高压電場処理は有効でなかった。しかし、2℃貯蔵においては、従来の低温貯蔵に比較して果実硬度の維持、果皮の緑色保持、果皮に</p>	

おけるクロロフィル分解の抑制、果汁の酸度の減少の抑制に効果的であり、実験期間中に障害も認められなかった。高圧電場処理後の2℃貯蔵は、ユズ果実の鮮度保持に有効で、その長期貯蔵が可能であることを明らかにした。

## 2) ユズ種子の抗菌性・抗酸化性物質について

ユズ種子の80%メタノール抽出物は、食中毒の原因となる各種細菌に対して強い抗菌活性を示した。各種クロマトグラフィーを用いて精製した後、GC/MS分析を行い、抗菌性物質をパラメトキシ桂皮酸と同定した。植物種子では初めての発見である。その抗菌力は、食品添加物として使用されている安息香酸や没食子酸などよりも強いことを明らかにした。さらに、パラメトキシ桂皮酸は、抗菌活性のみならず抗酸化活性も示すことを明らかにした。その活性は中程度の強さで、合成抗酸化物質のBHTとBHA、および $\alpha$ -トコフェロールのその70~80%であった。

## 3) ユズ種子のメラニン生成抑制作用について

ユズ果実の種子は、昔から化粧水として利用され、美白効果があると言われている。ユズ種子のアルコール抽出物、特にブタノール抽出物はメラニン生成の初発反応、即ちチロシンからドーパキノンの生成を強く阻害することを明らかにした。また、ブタノール抽出物は抗酸化活性とラジカル捕捉活性も有することを見出し、これらの結果から、ユズ種子抽出物によるメラニン色素の生成抑制の機構について考察した。

以上のように、本論文は、高圧電場処理後の2℃貯蔵はユズ果実の鮮度保持に有効で、その長期貯蔵が可能であることを明らかにするとともに、産業廃棄物であるユズ種子には、抗菌活性と抗酸化活性を併せ持つパラメトキシ桂皮酸やメラニン生成を阻害する物質が存在することを初めて見出したものである。以上の成果を評価し、本論文は学位論文として十分に価値あるものと判定した。

### 最終試験結果の要旨

学位申請者氏名	中園裕紀子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 田寺謙次郎
	副査 鹿児島大学 助教授 南 雄二
	副査 佐 賀大学 教授 藤田修二
	副査 宮 崎大学 教授 辰巳保夫
	副査 鹿児島大学 教授 御木英昌
審査協力者	鹿児島女子短期大学教授・鹿児島大学名誉教授 橋永文男
実施年月日	平成 18 年 1 月 12 日

試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)

口答・筆答

主査、副査および審査協力者の6名は、平成18年1月12日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要かつ十分な学力ならびに識見を有すると認めた。

学位申請者  
氏名

中園裕紀子

[質問1] 高圧電場処理により果皮からの水の蒸散が抑制されるメカニズムについて、どのように考えるか。

[回答1] 細胞最外部における自由水のクリスタル化によると考える。

[質問2] 高圧電場処理がユズ果実の鮮度保持に有効であるという結果を得ているが、その作用原理をどのように考えているか。高圧電場処理による水分活性の低下も関係があるのではないか。

[回答2] 高圧電場処理による水分活性の低下については報告がある。作用原理は、高圧電場処理による水のクラスター形成であると考ええる。クラスター形成はユズ果実内の酵素反応速度を低下させ、呼吸を含めて代謝を抑制すると考えられる。果皮からの水の蒸散の抑制とあいまって、鮮度保持に繋がったと考える。

[質問3] 高圧電場処理によりオゾンが発生し、ユズ果実の腐敗が抑えられたのではないか。

[回答3] オゾンは分析していない。高圧電場処理によりオゾンが発生することが知られているので、腐敗の抑制の一因として発生したオゾンの殺菌作用が考えられる。

[質問4] 高圧電場処理により、従来の低温貯蔵よりもどれくらい貯蔵期間を長くすることができるか。

[回答4] 1ないし2ヵ月延長することが可能と考える。

[質問5] 高圧電場処理が実用化されている例にどのようなものがあるか。

[回答5] 高圧電場装置を用いて冷凍食品を解凍するとドリップが少なく、変色が抑えられる。

[質問6] 抗菌性物質の最終精製段階において、280nmの吸収を指標にして分画しているが、どのような物質をターゲットにしたのか。

[回答6] ポリフェノールを標的とした。

[質問7] ユズ種子の抗菌性物質画分の抗菌力を没食子酸のそれと比較しているが、化学構造の面からすれば、比較物質としてクロロゲン酸を使用した方が良かったのではないか。

[回答7] 没食子酸はブドウ種子に見出されている。種子に存在する抗菌性物質間の抗菌力を比較するために没食子酸を比較物質に選んだ。

[質問8] 種子の抗菌性物質であるパラメトキシ桂皮酸は果皮に存在しないか。

[回答8] ユズ種子の有効利用を目的に研究を行ったので、果皮については分析していない。