

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 劉 晶樂

本論文では、NMR 法による日本柿の品種特徴づけの検討を目的とし、NMR 法による柿の成分分析のための新しい手法を確立し、取得した成分分析情報を用いて得た柿品種の特徴づけの基盤となる研究成果について述べている。本論文は、4章からなる。

第1章は序論として、これまでの柿成分分析と品種比較の研究現状及びNMR手法の食品成分分析における利点をまとめている。柿は古来より多様な機能性を持つ果物として知られ、1000を超える品種が存在する。柿は甘柿と渋柿に大別されるが、品種によってそれぞれの機能性が異なり、風味、食感も異なる。品種に関するこれまでの研究は、主に味、形態学および生理学的特徴、遺伝子解析などに基づいている。果実の機能性、食味などは成分に直結しているが、品種間の成分比較及び食味、機能性などの差異との関係についての研究は少ない。また、柿の成分分析は、主にHPLC、GC/MSなどの手法を用いて行われている。これらの手法では目的に応じて成分の分離と誘導などの前処理が必要であり、各成分は前処理過程で変質や損失する可能性があるため、前処理法が異なることで解析結果の比較が困難であるという欠点がある。一方、NMRはサンプルの前処理を最小限にできるため、成分の変質、損失を最小限に抑えることができ、測定の実現性がよい。さらに、NMRでの分析は網羅性があり、様々な成分を一回の¹H NMR測定で検出できる。近年では様々な果物（リンゴ、マンゴーなど）の成分分析に応用されているが、柿の成分分析に応用された報告はない。そのため、NMR法による成分分析情報を取得し、更に取得した情報を用いて、柿の品種特徴づけの基盤を構築することを目指したことが述べられている。

第2章では、NMRで最も高感度の¹H NMRで検出された少量成分を対象とし、定量的に柿の少量成分を観測する新しい方法として開発したBroad Band WET法について論じている。柿の一番多い成分は水と糖で、合わせて柿の成分の99%を占めている。他の少量成分は1%しかない。このような試料をNMRにより分析する際には、試料中の水と糖の信号が圧倒的に強いことに起因してダイナミックレンジが不足するため、少量成分を観測することが困難である。この問題を解決する手段として、強い信号を選択的に除去できるパルスシーケンスが使われている。しかし、従来法では広範囲の信号に応用する際に、定量性に欠けること、強い信号を完全に抑えられないことなど、さまざまな問題がある。したがって、定量的に少量成分を観測するために、従来法の改良が必要であった。具体的には、従来WET法の4つのシェーブトパルスの角度を全て90°にし、スペクトルの定量性の問題が解決された。さらに、漏洩磁場に由来するオフレゾナンス信号を抑えるため、WETシーケンスの後ろにNOESY一次元のシーケンスを導入し、mixing timeの間にz-filterの効能のあるシーケンスを加えることで、強い信号を抑える効果が得られた。このBroad Band WETシーケン

スを用いることで、多くの少量成分に由来する信号が検出された。柿果汁の成分分析に有用なツールとして応用できると期待される。

第3章では、確立した新しい手法を一次元と二次元 NMR に応用し、甘柿の一種である太秋の主要成分と少量成分の同定及び定量結果を示している。通常的一次元及び二次元 NMR で主要成分の糖類を同定し、グルコース、フルクトース、スクロースの各2種の異性体が太秋に含まれていることが示された。また、確立した Broad Band WET 法を二次元 NMR に応用して同種核の交差ピークを多く検出させるとともに、WET シーケンスを HMBC に取り入れて異種核の交差ピークも観測させることにより、12 種類のアミノ酸と 3 種類の有機酸を含む 20 種類の少量成分が同定された。少量成分の中で、グルタミンと γ アミノ酪酸は、甘柿に含まれていることが初めて同定された成分である。さらに、定量的な解析により、シトルリン、GABA、グルタミンは太秋において含量の多いアミノ酸であることを初めて示し、天然状態における機能性成分の定量情報を提供した。

第4章では、NMR による成分情報と多変量解析とを組み合わせ、柿の品種評価と品種を特徴づける成分について論じている。甘味が強く、食味や食感の異なる5種類の柿を対象として品種比較を行っている。3種類は甘柿の松本早生富有、前川次郎、太秋であり、2種類は渋柿の平核無と四つ溝である。 ^1H のスペクトルと Broad Band WET のスペクトルを用いた主成分分析 (PCA) の結果を比較することで、少量成分が品種による分類に最も寄与することが判明した。さらに、判別に寄与しているマーカー物質を探索するために、判別分析 OPLS モデルを構築し、品種の特徴に寄与するマーカー物質が、アミノ酸、有機酸、エタノールなどの少量成分であることを示した。これらの特徴成分が品種の風味、食感、また、軟化などの性質に関わっていることも考察した。本論文で構築された方法を用いることにより、柿の品種を特徴づける少量成分の情報を NMR で多く引き出すことができ、食味の良い優良品種、また機能性成分の多く含まれる品種の評価及び改良に貢献できると期待される。

以上のように、本研究は柿果汁の微量成分観測の手法を確立するとともに、柿の5種類の品種に適用して NMR を用い成分の同定、定量、品種識別が可能であることを示したものであり、応用例も興味深く、学術上・応用上の貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。