

氏 名	松 本 雄 大		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (環境共生学)		
学位記番号	甲 第 866 号		
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 20 日		
学位論文題目	ローズマリー抽出液を活用した酒類リキュールの色安定性向上に関する研究		
論文審査委員	主査 教 授 ・ 博 士 (農芸化学)	田 中 尚 人	
	教 授 ・ 博 士 (農芸化学)	古 庄 律	
	教 授 ・ 博 士 (農芸化学)	山 内 淳	
	准 教 授 ・ 博 士 (応用生命科学)	谷 岡 由 梨	

論文内容の要旨

序 論

「持続可能な開発目標」を表す SDGs のなかでも、「食」は特に重要な役割を担っている。食品ロスは世界で深刻な問題となっており、食品ロス解決のため社会では賞味期限延長の動きが起きている。酒類の賞味期限の延長により食品ロスを防げれば、SDGs に貢献できる。酒類リキュールの品質で大切なものは、味、香り、褪色しないこと、沈殿が生成しないことである。なかでも、見た目の美しさを価値として提供するために、色素を配合して製品に仕上げているが、流通過程、保管期間の光や熱により褪色し、飲用時品質低下を招くことになる。褪色に関しては、経験値として保管中に光を当てないように管理すること、商品の開栓後にできるだけは早く消費すること、また色素の添加量を増やすことで対策が講じられてき、天然物由来の抽出物で色素の褪色を抑制できれば、鮮やかな色を有する状態で酒類製品を賞味期限内に維持することができ、飲用時品質向上につながる。賞味期限を向上させることで廃棄物を削減でき、持続可能な社会実現につながる。今回研究対象とするリキュールは、エタノールに果汁、浸漬酒、蒸留酒、糖類、酸類、色素、水を添加して製造される。これらのリキュールに炭酸を添加したものが一般で販売されている炭酸入アルコール RTD (Ready to drink) であり、リキュールに含まれている。ローズマリー (*Salvia rosmarinus*) は、地中海沿岸地方原産でアキギリ属シソ科に属する常緑性低木でハーブ植物の一つとして知られている。現在は、主にヨーロッパで生葉もしくは乾燥葉が香辛料として利用され、料理に用いられている。また、肉類のシェルフライフ向上にも効果があるとされている。ローズマリーは微生物に対する抗菌作用がある。また、リラックス作用・炎症抑制効果・血行改善効果・記憶力を改善する効果などが報告されている。ローズマリーは料理の際の油の酸化抑制がある。これらの効果の一部には、ローズマリーに含まれるポリフェノールの一つであるロスマリン酸が関与していることが知られている。

本研究では、様々な効果を有するローズマリーを酒類の飲用時品質として大切な色の安定性向上に活用することを目的とした。その結果、ローズマリー抽出液を有色模擬リキュール飲料に添加することでの色素の褪色抑制効果を明らかとなり、さらに、有色リキュールに対して、褪色防止効果を有しつつ、オフフレーバーが低く、リキュール上望ましい香味を有するローズマリー抽出液の抽出方法を見出すことができた。

第1章 ローズマリー抽出液の調製と酒類リキュールの色安定性評価

目的： 酒類リキュールの品質で大切なものは、味、香り、褪色しないこと、沈殿が生成しないことである。なかでも、酒類リキュールには見た目の美しさは、リキュールの価値としては非常に大切である。しかしながら、色は流通過程、保管期間の光や熱により褪色し、飲用時品質低下を招く。そこで本研究では料理の際の酸化抑制効果が知られているローズマリーを活用してリキュールの色安定性向上の可能性を明らかにすることを目的とした。

方法： リキュールの原料酒ではエタノール浸漬は通常、60 v/v %エタノール水溶液で行うため、まず、60 v/v %エタノール水溶液でのローズマリー抽出液の調製を行った。また、抽出時のエタノール濃度の影響を検討するため、エタノール濃度を下げて20 v/v %、40 v/v %の抽出液を60 v/v %エタノール水溶液の方法に準じて調製し、60 v/v %抽出液との比較を行った。有色模擬リキュール飲料中に添加するローズマリー抽出液および光照射による褪色試験の各有色模擬リキュール飲料中のロスマリン酸濃度を評価するため HPLC でロスマリン酸を定量した。ローズマリー抽出液に含まれる総ポリフェノール量は Folin-Denis 法で総ポリフェノール含量を測定した。酒類であるリキュールにおける色の安定性を評価するため、50℃、20,000lux の蛍光灯を48時間照射した前後の有色模擬リキュール飲料の極大吸収波長変化で評価した。

結果： ローズマリー抽出液を調製するためのエタノール濃度60、40、20 v/v %水溶液に抽出されたロスマリン酸濃度を調べた結果、いずれのエタノール濃度においても1,300 ppm以上の高いロスマリン酸濃度を有していることが明らかとなった。また、各エタノール濃度で抽出された総ポリフェノール量は4,000 ppm程度であり有意差はなく、総ポリフェノールに対するロスマリン酸濃度はおよそ30%程度とほぼ同様であった。各有色模擬リキュール飲料への光照射による褪色試験における各色素の色素残存率を調べた。赤色102号、黄色4号、青色1号、赤色40号、ベニバナ黄色色素、赤キャベツ赤色色素、赤ぶどう果汁赤色色素の色素残存率は、ローズマリー抽出液添加の場合、無添加に対していずれも有意に($p < 0.01$)色素残存率が上昇した。これらの中でも、青色1号に対しては約94%、赤色40号に対しては約84%、赤色102号に対しては約81%と著しく高い褪色抑制効果が認められた。一方、リキュールの褪色防止に通常使用されている1,000 ppm ビタミンC添加の場合、青色1号とベニバナ黄色色素に対しては、無添加の場合と有意な差がなく、褪色抑制効果は認

められなかった。また、その他の色素に対しても約 9~60%の褪色抑制効果にとどまった。ローズマリー抽出液添加とビタミン C 添加を比較すると、赤色 102 号では 2.8 倍程度、黄色 4 号では 5 倍程度、青色 1 号では 100 倍程度、赤色 40 号では 1.4 倍程度、ベニバナ黄色色素では 12 倍程度、赤キャベツ赤色色素では 3 倍程度、赤ぶどう果汁赤色色素では 1.7 倍程度の褪色防止効果があり、いずれもローズマリー抽出液添加が高い効果を示した。これは、有色模擬リキュール飲料中の色素の褪色抑制に対してビタミン C 添加量の 1/100 の低濃度でロスマリン酸が効果を発揮することを示すものである。

結論：ローズマリー抽出液添加の場合、無添加に対していずれも有意に($p < 0.01$)色素残存率が上昇した。これらの結果は、ローズマリー抽出液に含まれるロスマリン酸が有色模擬リキュール飲料中の色素の褪色抑制に強く作用したことを示唆した。ローズマリーのエタノール抽出液は、有色リキュール飲料に添加することで褪色抑制効果を示し、その効果はビタミン C を添加した場合よりも低濃度で強く発揮することが明らかとなったローズマリー抽出液に含まれる 10 ppm のロスマリン酸と同濃度のロスマリン酸標準品 10 ppm 溶液を添加した場合の影響を評価した場合にも、各色素の色素残存率は概ね差異がないことから、ローズマリー抽出液の褪色防止効果については、他のポリフェノール類の影響を除外することはできないにしても主たる要因がロスマリン酸に由来することが示唆された。

第 2 章 ローズマリー抽出液の香味特徴とオフフレーバー成分の解明

目的：ローズマリー抽出液には、有色リキュール飲料に添加することで褪色抑制効果を示したが、リキュールにローズマリー抽出液を使用するにあたって、リキュール品質に香味上に及ぼす影響を把握する必要がある。ローズマリー抽出液のリキュール使用時の香味影響を調べ、香味上望ましくない成分を明らかにし、エタノール抽出時のエタノール濃度変化時の成分変化を明らかにすることを目的とした。

方法：香気成分の含量は、GC-MS を用いて分析した。本研究では、官能評価を行うにあたり、社内基準を全て満たしていることを条件にパネル 10 名を選定した。なお、官能評価については、筆者が所属するサントリーホールディングス株式会社においてリキュールの官能評価は倫理委員会の対象外になっているため、社内規定による官能評価試験法に準じて実施した。

結果：ローズマリー抽出液の香味特徴の由来を調べるために、GC-MS 分析を行い、香気成分分析を行った。ローズマリー精油中に存在する香気成分分析に関しては、多数の先行研究論文が存在するが、今回行った 60 v/v %エタノールで抽出したローズマリー抽出液には、12 種類のモノテルペン類の存在が明らかとなった。ローズマリー抽出液中に存在した香気成分としては、ゲラニオール、ベルベノン、ボルネオール、 α -テルペニオール、カリオフィレン、テルピネン-4-オール、カンファー、リナロール、シネオール、リモネン、

カンフェン、 α -ピネンであった。これらの検出された香気成分中ではカンファーが 142 ppm、シネオールが 314 ppm と高濃度に含まれていた。40 v/v %エタノールを用いたローズマリー抽出液には 10 種類のモノテルペン類が検出され、カリオフィレンとカンフェンは検出されなかった。また、20 v/v %エタノールでのローズマリー抽出液には、9 種類のモノテルペン類が検出され、40 v/v %エタノールで検出されなかったカリオフィレンとカンフェンに加え、 α -ピネンが検出されなかった。また、20 v/v %エタノールで抽出したローズマリー抽出液には 60 v/v %エタノール濃度で高かったカンファーは約 50%、シネオールは約 40%程度に低下した。今回行ったエタノール 60 v/v %で抽出したローズマリー抽出液を有色模擬リキュール飲料に添加して官能評価を行ったところ、ローズマリー抽出液を添加すると後味の良さや酒のおいしさがあるものの、青臭い香味があり、総合評価を低下させたことから、香りの面で課題があることが明らかになった。ローズマリー抽出時のエタノール濃度を 40 および 20 v/v %に低減させた場合のローズマリー抽出液を添加した有色模擬リキュール飲料の官能評価をしたところ、香りの良さや後味、酒のおいしさの得点が高くなり、酒としての総合評価も高くなることが示された。ローズマリー抽出時のエタノール濃度 40 および 60 v/v %の香りの良さや酒の総合評価間以外の水準において、統計的にも各水準間の香りの良さ・酒のおいしさ・後味・酒の総合評価は、エタノール濃度が低減すると有意に ($p < 0.01$) 評価点が上昇している。ローズマリー抽出液無添加の場合の各評価項目の得点は 3 点である。

結論：ローズマリー抽出時のエタノール濃度を 40 および 20 v/v %に低減させた場合のローズマリー抽出液を添加した有色模擬リキュール飲料の官能評価をしたところ、香りの良さや後味、酒のおいしさの得点が高くなり、酒としての総合評価も高くなることが示された。ローズマリー抽出液中のオフフレーバー成分の特定するため、検出された 12 成分単品について有色模擬リキュール飲料への添加試験を実施し、官能評価を行った。その結果、オフフレーバーの成分は濃度の高かったカンファーとシネオールであると特定された。シネオールやカンファーは水に対する溶解性が低いため、ローズマリーから抽出する際のエタノール濃度を低下させることでエタノール抽出液中のこれらの物質の濃度が低下したと考えられる。その結果として、有色模擬リキュール飲料中の青臭さが解消され官能評価の結果の向上につながったものと推察される。また、エタノールにより抽出されるオフフレーバーの原因物質はモノテルペン類であるカンファーとシネオールであり、エタノール濃度を 20 v/v %程度にまで低減することで、これらの物質の抽出量が抑制され、有色リキュール飲料の品質が向上した。

第 3 章 有色リキュールの品質向上に有用なローズマリー抽出液の抽出方法に関する研究

目的: 第 1 章の研究において 60 v/v %エタノールで調製したローズマリー抽出液を添加する

と酒類リキュールの飲用時品質として大切な色の安定性向上に活用できることを明らかにした。しかし、第2章のようにこの抽出液を使用すると青臭いオフフレーバーをリキュールに付与してしまう問題があった。これは、ローズマリーを60 v/v %エタノールで抽出すると、オフフレーバーの原因物質となるモノテルペン類であるカンファーとシネオールが抽出されることによるものであり、エタノール濃度を20 v/v %程度にまで低減することで、これらの物質の抽出量が低減されることを明らかにした。この抽出液においても褪色抑制効果は60 v/v %エタノールと同等であったが、リキュール全体としての品質については官能評価の結果は不十分であった。酒類や食品においては、原料由来のオフフレーバーを低減する多くの研究がなされ、最適なバランスを見つける取り組みがなされている。そこで本研究では、ローズマリー抽出液の製造条件として、抽出時のエタノール濃度、抽出温度、抽出時間、抽出後の減圧濃縮効果を検討することで色素褪色効果を維持しつつ、ローズマリー抽出液特有の好ましくない臭い、または後味を抑制した酒類有色リキュール飲料の製造条件を確立することを目的とした。

方法：リキュールの原料酒ではエタノール浸漬は、60 v/v %水溶液で行うが、今回は抽出時のエタノール濃度を0, 5, 10, 20, 40, 60 v/v %エタノール水溶液で調製し、抽出される成分のエタノール濃度の影響を検討した。抽出エタノール濃度を0 v/v %、抽出時間を3時間とし、抽出温度を5°C, 20°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C, 95°Cとし、抽出される成分の抽出温度の影響を検討した。

抽出エタノール濃度を0 v/v %、抽出温度を50°Cとし、抽出時間を0.5hr, 1hr, 2hr, 3hrとし、抽出される成分の抽出時間の影響を検討した。抽出エタノール濃度を0 v/v %、抽出時間を2時間とし、抽出温度を50°Cで、ローズマリー抽出液を抽出した。その後、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧濃縮を行い、抽出される成分の濃縮による影響を検討した。減圧濃縮の条件は、昇温温度0~78°Cであり、減圧度は0.1 atmとした。この減圧操作によりローズマリー抽出液を14倍, 23倍し、未濃縮液との比較を行った。リキュールの色安定性評価、総ポリフェノール量分析、ロスマリン酸濃度分析、香気成分分析、官能評価の方法は第2章の方法に従った。

結果：抽出時のエタノール濃度、抽出温度、抽出時間、抽出液に対する減圧濃縮操作がローズマリー抽出液中のロスマリン酸、総ポリフェノール、シネオールおよびカンファーの各含有量に及ぼす影響について調べた。ロスマリン酸の含有量は抽出時のエタノール濃度に影響を受けず、0~60 v/v %で大きな差は見られなかった。また、総ポリフェノール含有量も抽出時のエタノール濃度に影響を受けず、大きな差は見られなかった。総ポリフェノール含量に対するロスマリン酸濃度は、第1章の研究結果と変わらずおよそ30%程度とほぼ一定であった。一方、青臭いオフフレーバー成分であるシネオール、カンファーは、抽出エタノール濃度が低減するにつれて減少した。第2章の20 v/v %エタノール抽出液に比べて、0 v/v %

の方がより青臭いオフフレーバー成分の抽出が抑制され、抽出液のフレーバーが改善されたことを示している。オフフレーバー成分の抑制する条件として、抽出エタノール濃度 5 v/v % 以下、抽出温度 20°C~60°C、抽出時間 2 時間、エタノール 0 v/v % 抽出液の濃縮操作で効果が高いことを明らかにできた。各抽出アルコール度数、抽出温度、抽出時間、濃縮で得られたローズマリー抽出液の食用赤色色素 102 号色素と食用黄色色素 4 号色素に対する色残存率を評価したところ、各条件により変化せず、高い褪色防止効果を有していた。各ローズマリー抽出液の食用赤色色素 102 号に対する色素残存率はおよそ 80%、食用黄色色素 4 号色素に対する色残存率はおよそ 40%と高い残存率を有していた。

結論：褪色防止効果を有しつつ、オフフレーバーが低く、リキュール上望ましい香味を有するローズマリー抽出液の抽出条件（抽出エタノール濃度、抽出温度、抽出時間、減圧常圧の効果）を決定できた。

第 4 章 オフフレーバーが最も少ない抽出条件でのリキュールへの影響とローズマリー抽出液の特徴

目的：第 3 章で検討したオフフレーバーが最も少ないローズマリー抽出条件を組み合わせた場合のリキュールへの香味影響や褪色防止効果を明らかにすることを目的とした。また、ローズマリー抽出液の特徴とその原因に関して考察することを目的とした。

方法：抽出エタノール濃度を 0 v/v %、抽出時間を 2 時間とし、抽出温度を 50°C で、ローズマリー抽出液を抽出した。その後、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧濃縮を行い、抽出される成分の濃縮による影響を検討した。減圧濃縮の条件は、昇温温度 0~78°C であり、減圧度は 0.1 atm とした。この減圧操作によりローズマリー抽出液を 23 倍し、未濃縮液との比較を行った。リキュールの色安定性評価、総ポリフェノール量分析、ロスマリン酸濃度分析、香氣成分分析、官能評価の方法は第 1、2 章の方法に従った。GC-MS の分析結果からローズマリー抽出液中の良後味成分として特定されたゲラニオール単品を有色模擬リキュール飲料に添加して官能評価を行い、後味改善の有無を検討した。

結果：ローズマリー抽出液の抽出条件としてもっとも効果があり、かつオフフレーバーが少ない抽出条件であるエタノール濃度 0 v/v %、抽出温度 50°C、抽出時間 2 時間、濃縮 23 倍の抽出液を用いた場合のリキュールへの香味品質への影響と褪色防止効果を調べた。その結果、香りの良さが、改良前の抽出条件（エタノール濃度 60 v/v %、抽出温度 50°C、抽出時間 2 時間、濃縮 1 倍）に比べて、香りの良さが改良前で 1 であったものが、今回の最良の条件では 4.6 と向上し、総合評価も 1 から 5 に向上することを明らかにすることができた。また、今回の改良した抽出液も食用赤色色素 102 号に対する色素残存率はおよそ 80%、食用黄色色素 4 号色素に対する色残存率はおよそ 40%と高い残存率を有しており、高い褪色防止効果を有していた。今回の研究で好ましくない臭い又は後味を抑制したローズマリー抽出の製

造条件を見出すことができた。

結論：ローズマリー抽出液の抽出条件としてもっとも効果があり、かつオフフレーバーが少ない抽出条件であるエタノール濃度 0 v/v %，抽出温度 50℃，抽出時間 2 時間，濃縮率 23 倍の抽出液を用いた場合のリキュールへの香味品質が著しく向上した理由を理論的に考察するために，ローズマリー抽出液の香味バランスの指標化を検討し，ロスマリン酸，シネオール，カンファー濃度から（シネオール：CI+カンファー：CA）/ロスマリン酸：R の濃度比を算出することを考案した。抽出条件としてエタノール濃度，抽出温度，抽出時間，減圧濃縮倍率を変化させた場合のロスマリン酸，シネオール，カンファー濃度を測定し，各抽出条件における（CI+CA）/R と香りの良さをまとめ，（CI+CA）/R 濃度比と官能評価の相関関係(n=37)を調べたところ，相関係数 $r=-0.843$ で負の相関があり，決定係数 $r^2=0.7108$ であり，ピアソンの相関関係検定で検定を行ったところ $p<0.01$ で有意差が認められた。得られた相関性から推定すると，官能評価の「香りの良さ」が目標値である 3 以上となるのは，（CI+CA）/R 濃度比が 0.1 以下であることが示唆された。成分によるおいしさ判別の事例としては，水ですすでに行われており，水の中の成分から水のおいしさを推定できている。清涼飲料水である水の分野で成分値により簡便においしさを評価できることは非常に有益で，工業的に水質評価で非常に役立っている。

ローズマリー抽出液の利用においては，理化学分析の結果からの成分指標を用いることで有色リキュール飲料の品質を事前に予測することが可能であり，この方法は，ローズマリー以外にも応用できると考えられる。今回の研究で新たに求められた判別式により，今後，抽出液中の成分値により褪色防止効果とおいしさを確保できることになり，工業的に非常に有益と考えている。改良されたローズマリー抽出液は，官能評価の結果から後味の良さが向上していることが判り，リキュールへの使用時のメリットと考えられる。そこで，ローズマリー抽出液中の後味成分を特定するため，抽出液から GC-MS 検出された成分のひとつであるゲラニオールについて有色模擬リキュール飲料への添加試験を実施し，官能評価を行った。その結果，良後味成分であると評価された。ゲラニオールは，イソプレン単位二つのモノテルペン的一种でバラ様の華やかな芳香を持ち，モモ，ラズベリー，柑橘類にも含まれることから，ローズマリー抽出液をリキュール飲料に添加したことでマイルドな後味，おいしさをリキュール飲料に付加したと考えられる。抽出時のエタノール濃度，抽出温度，抽出時間のゲラニオール抽出量の変化を調べたところ，ゲラニオールは，抽出条件により変化する。抽出時のエタノール濃度が 0 から 40 v/v %ではゲラニオール抽出量はほぼ変化しないが，60 v/v %では有意に増加した。抽出温度が 5~60℃ではゲラニオール抽出量はほぼ変化しないが，70℃および 95℃は有意な抽出量の増加が認められた。抽出時間が 0.5~2 時間ではゲラニオール抽出量は増加する傾向にあるが，2 時間と 3 時間の間では有意差はなかった。その後はほぼ横ばいであった。エタノール濃度 0v/v%抽出液を減圧濃縮した場合には，ゲラニオ

ールは濃縮され有意に増加した。減圧濃縮操作でゲラニオールの挙動と未検出となったシネオールとカンファーの挙動とが異なるのは、エタノール濃度 0 v/v %抽出液でゲラニオールは、シネオール、カンファーに比べて水に対する溶解性が低いため（ゲラニオール 0.1 mg/ml at 25°C, シネオール 3.5 mg/ml at 21°C, カンファー 1.2 mg/ml at 25°C）ゲラニオールの濃度はシネオールとカンファーに比べて低くなるが、減圧濃縮下では、各成分の有する沸点の違い（シネオール沸点 176-177°C, カンファー沸点 204°C, ゲラニオール沸点 229°C）に由来し、ゲラニオールはシネオールとカンファーに比べて沸点が高く、減圧濃縮操作で残存したものと考えられる。今回の試作した有色模擬リキュール飲料では、抽出液をロスマリン酸 10 ppm になるようにリキュールに添加しており、リキュール中のゲラニール濃度は 0.005 ~ 0.01 ppm 程度残存する。ゲラニオール単体の添加試験では濃度 0.01 ppm であったため、十分な良後味が確認できたものと思われる。天然物であるローズマリーにはいくつものフレーバーを含んでいることから抽出条件によっては好ましい抽出製品になると考えられる。天然物を用いた褪色防止剤の利点と言える。

第5章 総合討議

食品ロスは世界で深刻な問題となっており、日本国内でも「まだ食べられる食品」の廃棄が非常に多く発生している。食品ロス解決のため社会では賞味期限延長の動きが起きている。今回の研究では、酒類リキュールの色安定性を、天然物由来の抽出液を添加することにより向上することを検討し、植物であるローズマリーの抽出液を使用することでリキュールの褪色防止することを明らかにできた。これまで、酒類リキュールの褪色防止方法としては、保管方法を指定や色素添加量を増やすことで対応してきたが、天然抽出液で褪色防止効果ができることになり、賞味期限向上につなげることができ SDGs に貢献できる。

審査報告概要

本研究は、酒類有色リキュールに添加される着色色素が、流通過程、保管期間の光や熱により褪色して品質低下を招くことを強い抗酸化作用を持つローズマリーを利用して制御することを検討したものである。研究成果として、ローズマリー抽出液は合成および天然色素の褪色を抑制し、これはローズマリーに含まれるロスマリン酸の抗酸化性によることを明らかにした。また、ローズマリーのアルコール抽出液に含まれるオフフレーバー成分と良好な香味を付与する成分を明らかにし、抽出条件を検討することでオフフレーバー成分のみを除去し、色素の褪色抑制機能を維持し、かつ良香味を付与するローズマリー抽出液の開発に成功した。ローズマリー抽出液のような天然物由来の抗酸化性成分の有効利用は、食品産業界

における食品ロスを防ぐだけでなく、農業としてのローズマリーの栽培が開発途上国における持続可能な開発目標 (SDGs) にもつながると考えられる。よって審査委員一同は博士 (環境共生学) の学位を授与に値すると判断した。