



助教
寺田祐子

共同研究者名
准教授 伊藤圭祐
大学院生 小川真依
大学院生 鈴木知依

経歴

2014年4月 ミシガン州立大学 医学部
産婦人生殖生物部門 留学
2015年3月 静岡県立大学大学院 薬食生
命科学総合学府 博士課程修了
2015年9月 久留米大学 分子生命科学研
究所 助教
2018年4月 静岡県立大学 食品栄養科学
部 助教 現在に至る

光に着目した海底熟成ワインの フレーバー変化メカニズムの解明

1. 背景、目的

海底熟成ワインとは、海底に一定期間沈めたワインのことである。2010年、ヨーロッパのバルト海において、沈没船から約170年前のワインが発見された[1]。引き揚げられたワインは飲用可能であることが判明し、1本あたり約400万円で落札された[2]。このニュースは世界的な注目を集め、以降、世界各地で海底熟成ワインが作られるようになった。しかしながら、海底熟成によるワインのフレーバー変化については、国内外の研究グループが精力的に検討してきたものの、十分な科学的エビデンスは示されていない。

申請者は3年前より海底熟成ワインのフレーバー研究に着手し、海底熟成中に1,1-ジエトキシエタン（以下、エトキシエタン）が生成し、香りが甘くフルーティーに変化することを明らかにした。エトキシエタンは一般的なワインには含まれない香気成分であることから、海底熟成により地上保管とは異なるおいしさを付与できることが示唆された。また、色の異なる瓶を用いてエトキシエタンの生成量を比較したところ、遮光瓶では透明瓶に比べてその生成量が60%減少したことから、海底熟成庫に到達する光がエトキシエタンの生成反応に重要であると考えた。

そこで本研究では、ワインの新たなおいしさを創出する加工技術の開発を目指し、光に着目した独自のアプローチにより、海底熟成中にエトキシエタンが生成するメカニズムの解明を目的とした。具体的には、①エトキシエタン生成反応に重要なワイン成分の特定、②海底熟成庫の光によるエトキシエタン生成反応促進の検証、を実施した。

2. 方法

2.1. 海底熟成サンプルの作製

海底熟成サンプルは、静岡県賀茂郡南伊豆町中木沖の海底熟成庫（水深12m）に沈めることで作製した（Fig. 1a）。瓶は海水の侵入を防ぐため、瓶口部を専用のロウで封止した

後、熟成庫ケージ内に垂直に配置した。熟成期間は3か月および6か月とした。コントロールとして、同期間、16°Cの冷蔵庫内で遮光保管した地上保管サンプルを作製した (Fig. 1b)。上記条件で保管後、海底熟成サンプルおよび地上保管サンプルは4°Cの冷蔵庫で遮光保管し、直ちに分析に用いた。

ワインモデル溶液は、エタノール濃度および有機酸組成の異なる複数条件で調製した。エタノールと蒸留水を混合し、エタノール濃度を0、15、30、50、70、100%とした。各エタノール濃度の溶液に、ワイン中の主要有機酸6種(酢酸、乳酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸)をそれぞれ30 mMとなるよう添加した。モデル溶液は、NaOHを用いて一般的なワインのpHであるpH 3.0に調整し、フィルターろ過後、250 mL メディウム瓶に200 mL ずつ分注した。

2.2. GC-MS 分析

ワインモデル溶液およびワイン中のアセトアルデヒドとエトキシエタンの定量は、GC-MS

分析により行なった。分析には、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (6890N Network GC System, 5975 inert Mass Selective Detector, Agilent Technologies) を用いた。

2.3. 海底熟成庫における光スペクトルの測定

海底熟成庫の光スペクトルの測定には、特注光ファイバー (コア径 400 μm、長さ 20 m、Ocean Photonics)、VIS コサインコレクタ (CC-3, Ocean Photonics)、ファイバマルチチャンネル分光器 (FLAME-S, Ocean Photonics)、および専用ソフトウェア (OPwave+, Ocean Photonics) を用いた (Fig. 2)。晴天条件下で、ダイバーがコサインコレクタを取り付けた光ファイバーを保持し、海底熟成庫付近において光スペクトルを測定した。屋外環境下でも同様に測定を行った。測定波長範囲は334~1034 nmとした。

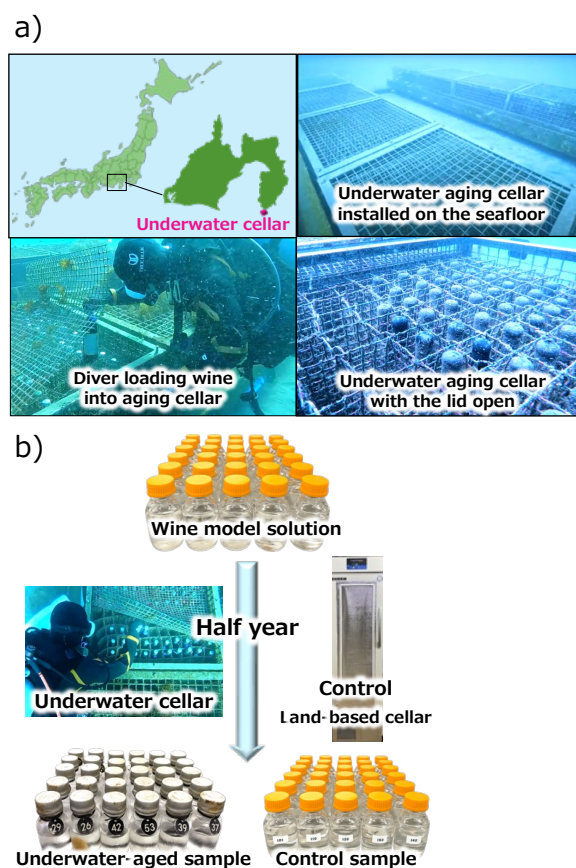


Fig. 1 海底熟成サンプルの作製

a) 海底熟成庫、b) 海底熟成サンプルと地上保管サンプルの作製手順

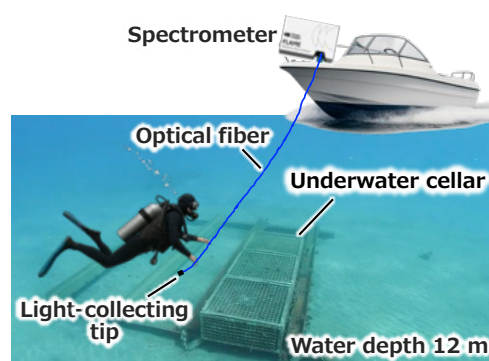


Fig. 2 海底熟成庫における光スペクトルの測定

2.4. ワインモデル溶液およびワインへの光照射
LED パネル (GL1C, NEEWER) を用いて海底熟成庫の光を再現し、ワインモデル溶液およびワインに照射した (Fig. 3)。ワインモデル溶液 1.2 mL を 1.5 mL バイアルに、ワイン 7.5 mL を 10 mL バイアルに分注し、クリンプキャップで密封した。海底熟成庫の青色光 (460 nm) のほか、比較対照として赤色光 (620 nm) および遮光条件を設定した。各サンプルは、海水温と同じ 16°C の冷蔵庫で最大 18 週間反応させ、経時的に GC-MS 分析を実施した。

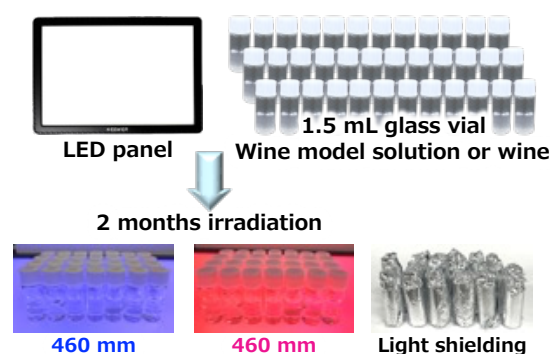


Fig. 3 ワインモデル溶液およびワインへの光照射

2.5. OH ラジカルの測定

OH ラジカルの測定は、クマリン蛍光プローブ法により行った[3]。ワインモデル溶液 (70% エタノール+30 mM 酒石酸+50 μ M Fe) 600 μ L とクマリン溶液 600 μ L を混合し、1.5 mL バイアルに封入後、青色光照射または遮光下で 16°C、43 日間反応させた。約 1 週間ごとに蛍光測定を行い、7-ヒドロキシクマリンの生成量から OH ラジカルの生成量を算出した。蛍光測定には、マルチモードマイクロプレートリーダー (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices) を用い、励起波長 320 nm、蛍光波長 487 nm で測定した。

2.6. 官能評価

官能評価は三点識別法により実施し、被験者は一般社団法人日本ソムリエ協会所属のソムリエ 8 名とした。黒色のテイスティンググラス 3 脚に、ランダムな 3 桁の番号を付し、光照射ワインまたは遮光ワインをそれぞれ 5 mL ずつ注いで、被験者に同時に提示した。被験者には、1 つだけ香りが異なるグラスの番号を回答してもらい、さらに香りの違いについて自由記述してもらった。

3. 結果、考察

3.1. 海底熟成中に進行するエトキシエタン生成反応の解析

化学合成においてエトキシエタンは、エタノールを出発物質とし、まずエタノールを酸化してアセトアルデヒド (中間体) を生成し、続いてアセトアルデヒドにエタノール 2 分子を縮合させて生成される。そこで、海底熟成中にも同様の反応が進行すると仮説を立てた (Fig. 4a)。

この仮説を検証するため、ワインモデル溶液 (0~70%エタノール+有機酸 6 種) におけるアセトアルデヒドおよびエトキシエタンの生成量を、地上保管サンプルと海底熟成サンプルにおいて比較した。その結果、アセトアルデヒドおよびエトキシエタンの濃度は、海底熟成期間と、海底熟成サンプル中のエタノール濃度に依存して増加した。一方で、地上保管サンプルからはほとんど検出されなかった (Fig. 4b)。これらの結果から、エトキシエタンは海底熟成中に、エタノールからアセトアルデヒドを経て生成されることが示唆された。

続いて、エトキシエタンの生成に重要な要素を明らかにするため、さまざまな組成のワイ

ンモデル溶液を海底熟成し、アセトアルデヒドおよびエトキシエタンの生成量を比較した。0~100%エタノール水溶液では、両化合物は生成しなかったことから、生成反応には有機酸が必要であることが示唆された (Fig. 4c)。さらに、有機酸6種 (酢酸、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸) のうち1種類のみを含むワインモデル溶液において両成分の生成量を比較したところ、酒石酸を含む条件でのみ生成が認められた (Fig. 4d)。また、瓶内ヘッドスペースを窒素置換すると、両成分はほとんど生成しなかった (Fig. 4e)。さらに、遮光瓶では透明瓶に比べて両成分の生成量が60%減少した。以上より、海底熟成中に進行するエトキシエタンの生成反応には、酒石酸、酸素、および光が重要であることが示唆された。

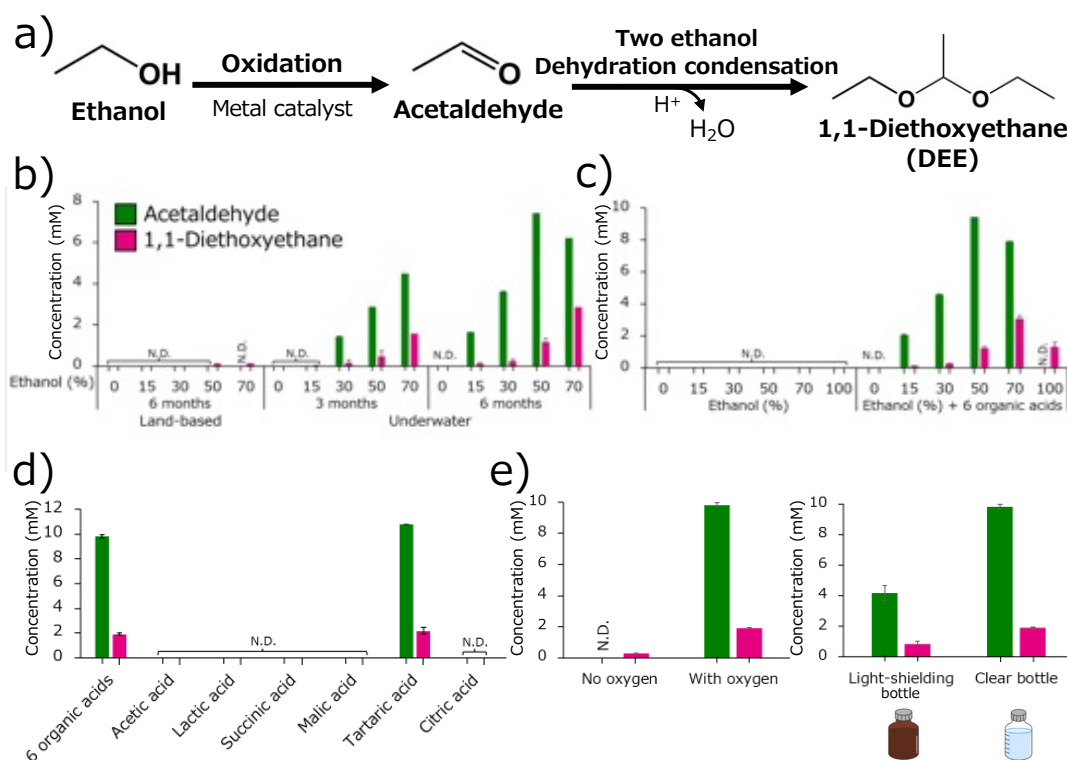


Fig. 4 海底熟成中に進行するエトキシエタン生成反応の解析
 a) エトキシエタンの化学合成法。b) 海底熟成サンプルと地上保管サンプル、c) 有機酸の有無、d) 有機酸種類ずつ、e) 酸素の有無、遮光瓶と透明瓶 におけるアセトアルデヒドおよびエトキシエタンの生成量の比較。

3-2. 海底熟成庫の光スペクトル測定とLEDライトの設定

3.1. において、エトキシエタンの生成反応には光が重要であることが示唆されたため、海底熟成庫における光スペクトルの測定を実施した。その結果、屋外では紫外から可視光、赤外まで幅広い波長の光が到達していた一方、海底熟成庫には460 nmをピークとする青色可視光が選択的に到達していることが明らかとなった (Fig. 5a)。

続いて、LEDライトを用いて海底熟成庫の光 (ピーク波長460 nm、照度0.7) を再現し、ワインモデル溶液への照射実験を行った (Fig. 5b)。青色光で進行する代表的な反応として光フェントン反応が知られていることから[4]、比較対照として遮光条件のほか、光フェントン反応が進行しにくい赤色光 (625 nm) の照射も実施した。

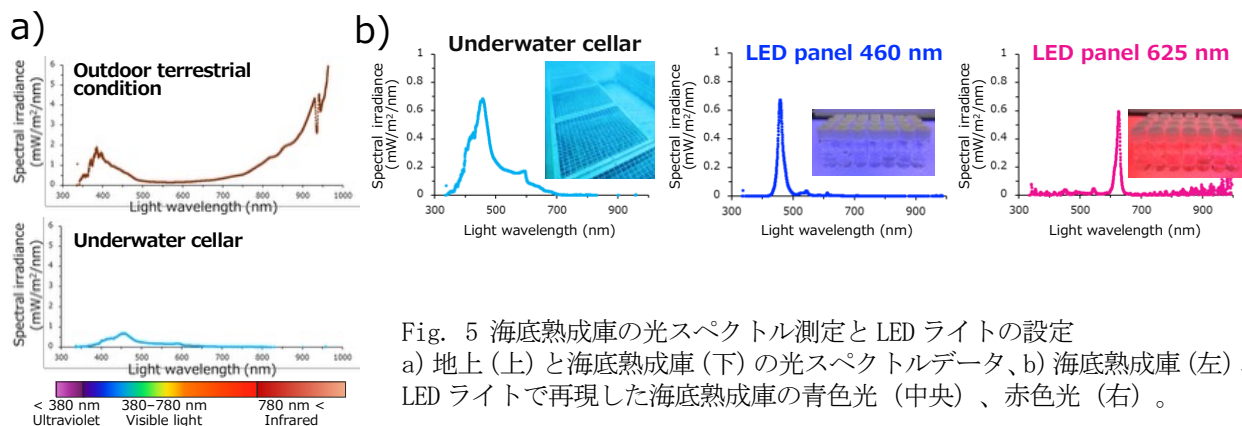


Fig. 5 海底熱成庫の光スペクトル測定とLEDライトの設定
 a) 地上(上)と海底熱成庫(下)の光スペクトルデータ、b) 海底熱成庫(左)、LEDライトで再現した海底熱成庫の青色光(中央)、赤色光(右)。

3.3. 青色光照射によるエトキシエタン生成と、その生成反応の解析

ワインモデル溶液(70%エタノール+有機酸6種)において、遮光条件および赤色光照射条件ではエトキシエタンは生成しなかった。一方、青色光照射条件では照射2週間後から生成が認められ、12週間の照射で海底熱成6か月に匹敵する濃度のエトキシエタンが生成した。これらの結果から、青色光照射により海底熱成におけるエトキシエタン生成を再現できることが示された(Fig. 6a)。

光フェントン反応は青色光で進行する代表的な反応であり、有機酸と鉄が重要な要素である[4]。そこで続いて、これらの要素がエトキシエタン生成に与える影響を解析した。有機酸6種(酢酸、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸)のうち、1種類のみを含むワインモデル溶液に青色光を照射したところ、酒石酸を含む条件でのみエトキシエタンの生成が認められた(Fig. 6b)。さらに、鉄の影響を解析するために、酒石酸+鉄、酒石酸のみ、鉄のみの各条件でエトキシエタンの生成量を比較したところ、酒石酸+鉄の条件で生成が最も促進された(Fig. 6c)。以上より、酒石酸と鉄が青色光によるエトキシエタン生成を促進することが示された。

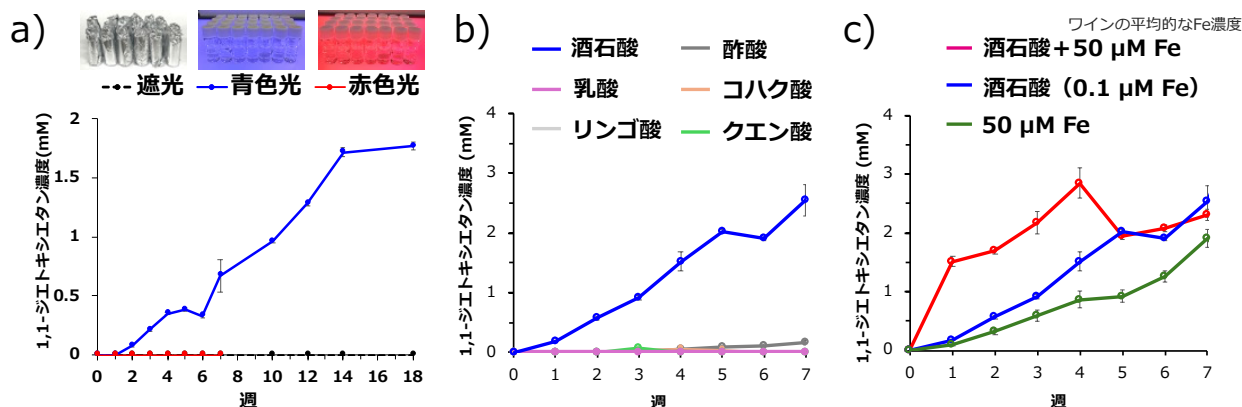


Fig. 6 青色光照射によるエトキシエタン生成と、生成反応の解析
 a) 遮光、青色光、赤色光照射におけるエトキシエタン生成量の比較。b) 有機酸、c) 鉄がエトキシエタン生成に与える影響。

3.4. OH ラジカルの検出

光フェントン反応では、鉄の還元に伴い、高い酸化力をもつOH ラジカルが生成する[5]。そこで、エトキシエタン生成における光フェントン反応の進行を検証するため、OH ラジカルの検出を行った。ワインモデル溶液(70%エタノール+有機酸6種+鉄)

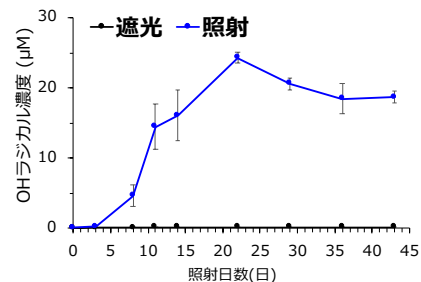
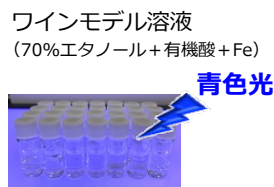
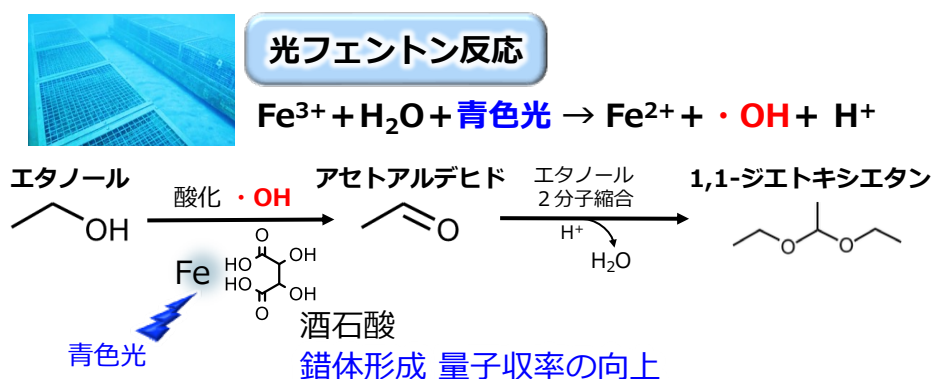


Fig. 7 OH ラジカルの検出

に青色光を照射したところ、照射7日後からOH ラジカルの明確な生成が認められた (Fig. 7)。一方、遮光条件では検出されなかった。以上より、青色光による光フェントン反応進行の直接的な証拠が得られた。

3.5. 海底熟成中に進行するエトキシエタン生成反応の考察

以上の解析により、エトキシエタン生成に重要な要素として、エタノール、酸素、青色光、酒石酸、および鉄を明らかにした。すなわち、海底熟成庫に到達する青色光が光フェントン反応を誘導し、OH ラジカルを生成させ、それによりエタノールが酸化されてアセトアルデヒドが生じ、続いてアセトアルデヒドにエタノールが縮合してエトキシエタンが生成されると考えられた (Fig. 8)。また、酒石酸は鉄と錯体を形成することで、光反応の量子収率を向上させると考えられた[6]。



青色光が光フェントン反応を介して1,1-ジエトキシエタンを生成

Fig. 8 海底熟成中に進行するエトキシエタンの生成反応

3.6. ワインへの青色光照射によるエトキシエタンの生成とソムリエによる官能評価

白ワイン3品種および赤ワイン4品種に対し、LED パネルを用いて青色光を照射した。照射前および遮光条件のワインでは、いずれもエトキシエタンは検出されなかった。一方で、青色光照射ワインではすべての品種においてエトキシエタンの生成が認められた (Fig. 9a)。

さらに、酒精強化白ワインであるポートワインを用いて、ソムリエを被験者とした三点比較法による官能評価を実施した。その結果、遮光ワインと青色光照射ワインの香りの違いを明確に識別できることが示された (Fig. 9b)。青色光照射ワインの香り特性として、「甘い」「フルーティー」「酸化熟成香」「ドライハーブ」といったコメントが得られ、エトキシエタンの寄与が示唆された。

以上より、青色光の照射により、海底熟成ワインに特有の香り成分であるエトキシエタンを付与することに成功した。さらに、本研究成果に基づき、酒類の新規熟成技術を発明し、特許出願を行った（発明の名称：飲料の製造方法、飲料、呈味向上用飲料の適否判定方法および飲料の製造システム、特願 2025-257222）。

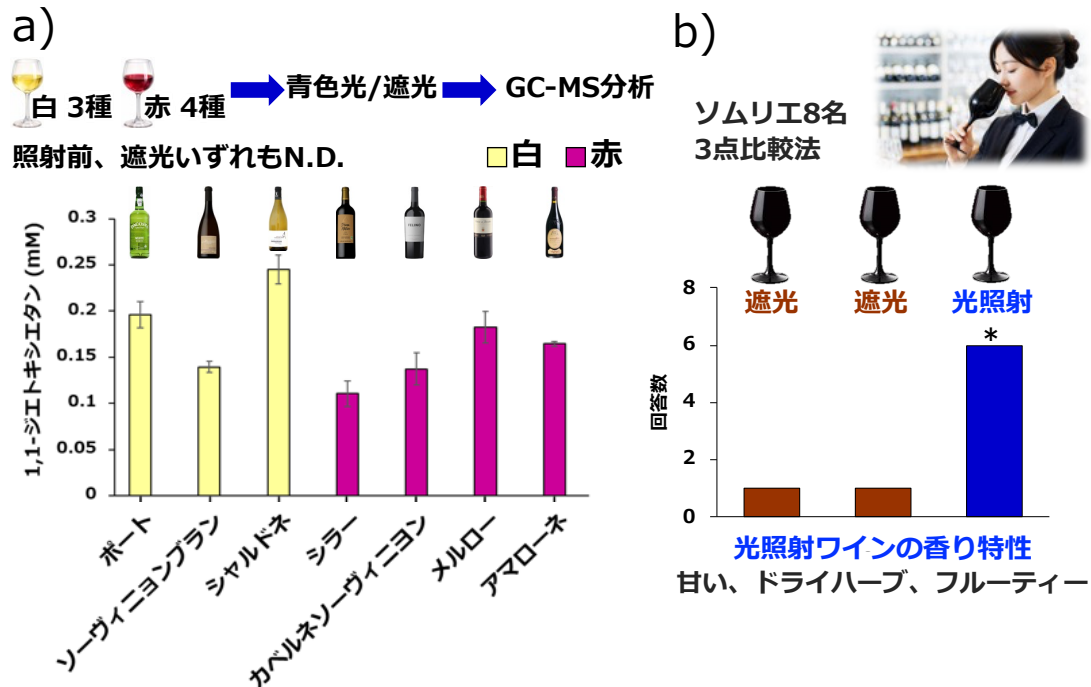


Fig. 9 青色光照射ワインの解析

a) 青色光照射ワインにおけるエトキシエタンの生成量、b) ソムリエによる官能評価。

4. まとめ

本研究では、海底熟成サンプルに特有のフルーティー香を示すエトキシエタンに着目し、その生成メカニズムを解析した。さまざまなワインモデル溶液を用いた検討により、エトキシエタンの生成に重要な要素として、青色光、エタノール、酸素、酒石酸、および鉄を明らかにした。これらの要素が引き起こす光フェントン反応によって、エタノールからエトキシエタンが生成されるメカニズムを提案した。さらに、LED パネルを用いて海底熟成庫の青色光を再現し、ワインに照射することで、エトキシエタンを付与することに成功した。

本研究成果に基づき、海底熟成庫の光を応用した酒類の新規熟成技術として特許出願を行った。本研究において我々は、海底熟成ワインから着想を得て、従来法では生み出せなかったフレーバーを酒類に付与する技術の創出に成功した。今後、ワインの熟成技術としての実用化が期待される。

5. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団ならびに関係者の皆様に、心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Jeandet, P.; Heinzmann, S.S.; Roullier-Gall, C.; Cilindre, C.; Aron, A.; Deville, M.A.; Moritz, F.; Karbowiak, T.; Demarville, D.; Brun, C.; et al. Chemical messages in 170-year-old champagne bottles from the Baltic Sea: Revealing tastes from the past. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 5893-5898, doi:10.1073/pnas.1500783112.
2. Champagne sells for \$156,000 after 170 years under water. Available online: <https://www.foxnews.com/food-drink/champagne-sells-for-156000-after-170-years-under-water> (accessed on April 23).
3. Baba, Y.; Yatagai, T.; Harada, T.; Kawase, Y. Hydroxyl radical generation in the photo-Fenton process: Effects of carboxylic acids on iron redox cycling. *Chem. Eng. J.* **2015**, *277*, 229–241, doi:10.1016/j.cej.2015.04.103.
4. Rodriguez, M.; Malato, S.; Pulgarin, C.; Contreras, S.; Curc6, D.; Gim6nez, J.; Esplugas, S. Optimizing the solar photo-Fenton process in the treatment of contaminated water. Determination of intrinsic kinetic constants for scale-up. *Sol. Energy* **2005**, *79*, 360-368, doi:<https://doi.org/10.1016/j.solener.2005.02.024>.
5. Maezono, T.; Tokumura, M.; Sekine, M.; Kawase, Y. Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. *Chemosphere* **2011**, *82*, 1422-1430, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.052.
6. Ortega-G6mez, E.; Esteban Garc6a, B.; Ballesteros Mart6n, M.M.; Fern6ndez Ib6ñez, P.; S6nchez P6rez J.A. Inactivation of natural enteric bacteria in real municipal wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH. *Water Res.* **2014**, *63*, 316-324, doi:doi:10.1016/j.watres.2014.05.034.