

# ビールに特徴的な香りを付与する ホップ由来香気成分

ホップはビールに爽快な苦味と特有の香りを与える。ホップがその毬花中に苦味のもととなる樹脂成分や香りのもととなる精油成分をふんだんに含んでいることはよく知られているが、その主体が iso-humulone であることが古くから解明されている苦味成分に比べ、ホップ由来の香気成分に関しては、その多様性のため必ずしも十分に解明されてはいなかった。

著者らの研究は、最新の香気成分分析手法を駆使し、ワイン分野では先行して検討が進められていた低閾値のチオール類を含む種々のホップ由来香気成分のビール香気への寄与や、それらのビール醸造工程中での挙動を明らかにしたものである。

岸 本 徹

## 1. はじめに

ホップは「ビールの魂」と言われるほど、ビールを語るときにホップを欠かすことはできない。古くは紀元前6世紀頃にビールに用いられていた記録があるが、広く一般的に使われるようになったのは15世紀ごろからである。ホップはビールに爽快な苦味と特有の香りを与える。またホップは、ビールの醸造工程中で余分なタンパク質を沈殿させビールを清澄化する働きや、ビールの泡持ちを良くする働き、微生物に対する抗菌作用などの役割も担っている。

ホップ (*Humulus lupulus* L.) は、アサ科に属する宿根多年生のツル性植物で、ツルの高さは7~12メートルに及ぶ。雌株と雄株が存在し、ビール醸造には雌株になる「毬花」が用いられ、そのうち主に受精していない毬花が使われる。毬花に含まれる「ルプリン」と呼ばれる黄色い粒子には、精油(香気)成分、苦味成分が含まれる。原産地は西アジアから中央ヨーロッパにかけてとされており、現在の主栽培地はドイツ、アメリカ、イギリス、チェコ、中国などである。100種類以上もの品種が世界中で栽培されており、主なホップの栽培地と品種名を第1表に示す。

ビール醸造では、毬花そのもの、またはペレット状、

エキス状に加工されたものが用いられる。ビールの仕込み工程ではまず、粉碎した麦芽と副原料を湯に加えて糖化させる。その糖化液を濾過することで麦汁が得られ、麦汁はその後に煮沸される。ホップは麦汁の煮沸工程中、または煮沸後に加えられる。ルプリン粒子に含まれる humulone は煮沸の熱により異性化して iso-humulone となる。この iso-humulone がビールの苦味の主成分である。ゆえにビールに苦味を付与するためにはホップを煮沸工程の初期に添加し、異性化反応を十分に行わせる必要がある。一方、香気成分は煮沸することにより蒸散しやすいため、ホップ由来の香りをビールに残すためには、煮沸工程後半または工程後にホップを添加する必要がある。

醸造に携わる人間は、自分たちの経験から、ホップの品種や醸造工程中でのホップの添加方法を変えると異なった特徴のホップアロマをビールに付与できることを知っている。しかしビールの香り品質を設計するためには、香りに寄与する成分をコントロールしていくことが欠かせない。ビール中にはホップ以外の原料に由来する夾雑物質が多く含まれており、ビールから微量の香気成分を抽出し、ホップアロマに寄与する成分を解析することが難しい。そのため、これまでのビールの香気分析においても、工夫した抽出方法が用い

Hop-Derived Odorants Contributing to the Aroma Characteristics of Beer  
Toru KISHIMOTO (Research Laboratories of Brewing Technology, Asahi Breweries Ltd.)

第1表 世界各地で栽培されているのホップ品種<sup>2-6)</sup>

栽培地域	栽培されている品種名
アメリカ	Ahtanum, Amarillo <sup>®</sup> , Apollo, Aquila, Banner, Bitter Gold, Bravo, Brewers Gold, Cascade, Centennial, Chelan, Chinook, Cluster, Columbus, Comet, Crystal, Eroica, Fuggle, Galena, Glacier, Golding US, Hallertauer, Horizon, Liberty, Magnum, Millennium, Mt. Hood, Newport, Northern Brewer, Nugget, Olympic, Palisade <sup>®</sup> , Perle, Saazer, Santiam, Satus <sup>®</sup> , Simcoe <sup>®</sup> , Spalter, Sterling, Strissel Spalt, Summit, Sun, Super Galena, Talisman, Tettninger, Tillicum, Tomahawk <sup>®</sup> , Ultra, Vanguard, Warrior <sup>®</sup> , Willamette, Zeus
ドイツ	Brewers Gold, Columbus, Golden Princess, Hallertauer Magnum, Hallertauer Merkur, Hallertau Mittelfrüh, Hallertauer Taurus, Hallertauer Tradition, Herkules, Hersbrucker Pure, Hersbrucker Spät, Hüller Bitter, Northern Brewer, Nugget, Opal, Orion, Perle, Record, Relax, Saazer, Saphir, Smaragd, Spalter, Spalter Select, Tettninger, Wye Target, Zeus
イギリス	Admiral, Boadicea, Bramling Cross, Brewers Gold, Bullion, Cobbs, Diva, Early Bird, Early Choice, Eastwell Golding, First Gold, Fuggle, Herald, Mathon, Northern Brewer, Omega, Phoenix, Pilgrim, Pilot, Pioneer, Progress, Sovereign, Whitbreads Golding, Wye Challenger, Wye Northdown, Wye Target, Yeoman
南アフリカ	Outeniqua, Southern Promise, Southern Star, Southern Brewer
オーストラリア	Cascade, Cluster, Galaxy, Meteor, Millennium, Nova, Pride of Ringwood, Super Pride, Tasmanian Hallertau, Tasmanian Saazer, Topaz, Victoria, Willamette
ニュージーランド	Alpharoma, Green Bullet, Hallertau Aroma, Motueka, Nelson Sauvin, New Zealand Hallertauer, Pacifica, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacific Sunrise, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Sticklebract, Super Alpha
チェコ	Agnus, Bor, Harmonie, Premiant, Rubin, Saazer, Sladek
フランス	Brewers Gold, Columbus, Hallertauer Magnum, Hallertauer Tradition, Nugget, Strisselspalter, Wye Target,
ポーランド	Iunga, Izabella, Limbus, Lomik, Lubelski, Lublin, Marynka, Nadwiślański, Oktawia, Sybilla, Zbyszeko, Zula
スロベニア	Aurora (Super Styrian), Bobek, Hallertauer Magnum, Styrian Golding (Celeia)
スペイン	Columbus, Hallertauer Magnum, Nugget, Perle
セルビア	Aroma, Bačka, Robusta
中国	Tsingdao Flower, Marco Polo, Sapporo-1, Kirin Flower
日本	Eastern Gold, Eastern Green, Fukuyutaka, Furano 18, Furano 6, Furano Ace, Furano Beta, Furano Laura, Furano Special, Golden Star, Kaikogane, Kitamidori, Little Star, Nanbuwase, SA-1, Shinsyu Wase, Sorachi Ace, Toyomidori

られてきた<sup>1,7-10)</sup>。

本研究では様々な香気分析の手法を駆使し、ビール中でホップアロマを構成する成分を解析した。さらに商品開発へと応用していくため、それらの物質を増やす方法、抑制する方法について検討した。

## 2. 穂花ホップの香りとビールのホップアロマ

ホップ穂花から得られる精油成分の40~80%をテルペン系炭化水素類が占める。その大部分はモノテル

ペンとセスキテルペンである。実際、ホップ穂花から感じられる香りは、myrceneを中心とする炭化水素類の刺激的な香りである。しかし、ホップ中の主要なテルペン系炭化水素類は、煮沸中に蒸散しやすいだけでなく、極めて親水性に乏しいため、発酵中には他の不溶性物質とともに不溶化したり酵母表層に吸着し、ほとんどがビールにまで移行しない<sup>7-10)</sup>。ゆえに、ビールから感じられるホップアロマは、ホップ穂花から感じられる刺激的な香りとは全く異なる。一方、麦汁

第2表 ビールに含まれるの主要テルペノイドの濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )<sup>11)</sup>

使用ホップ品種	Saazer	Tettnang	Hersbrucker	弁別閾値 ( $\mu\text{g/L}$ )
Linalool	4.8	4.0	10.5	1.1
Geraniol	3.5	3.4	3.8	4.0
Myrcene	0.7	0.4	1.1	9.5
$\beta$ -caryophyllene	0.3	0.2	0.1	450
$\alpha$ -humulene	0.3	0.7	0.2	450
Humulenol II	4.1	3.5	6.5	2500
$\beta$ -eudesmol	0.6	0.6	17.5	> 10000
$\beta$ -farnesene	1.4	1.4	1.6	550

に溶解しやすいテルペン酸化物はビールにまで移行し、ホップアロマに寄与する可能性が示唆されてきた<sup>7-10)</sup>。

そこで本研究においてもまず、チェコ産、ドイツ産品種を用いてホップアロマを有するビールを作り、ビール中の主要なテルペノイドの濃度を分析した。分析方法には、微量のテルペノイド分析に適した Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) 法を用いた<sup>11,12)</sup>。結果を第2表に示す。linalool, geraniolを除いては、ビール中に含まれるテルペノイド、テルペン酸化物の濃度は閾値に比べて低かった。また、ここではデータを示していないが、第2表に示される成分以外にも調べたところ、テルペン酸化物の濃度は閾値に比べて極めて低く、ホップアロマへの寄与も低いと考えられた。

しかし、ビール中から閾値に近い濃度で検出された linalool や geraniol のみでは、様々なホップアロマの特徴を説明できない。テルペノイド以外にも、ホップアロマを構成する成分は多く存在しており、場合によっては微量の香気成分が複合して、ある1つの特徴を形成していることも考えられる。

それでは一体、どのような成分がホップからビールへと移行し、ビールのホップアロマを構成しているのだろうか。それを調べた取り組みについて次に紹介する。

### 3. ビール中に移行するホップ由来香気成分の解析

ホップアロマを構成する成分を調べるために、ホップ由来の物質で香気を有し、かつ発酵終了後にも残り得る、という条件を備えた全ての物質を、GC-匂い嗅ぎ装置 (GC-O) を用いて検出しようと試みた<sup>13)</sup>。

GC-O について簡単に紹介する。これまでの香気成分の研究ではガスクロマトグラフィー (GC) を用い、検出器として FID (水素炎イオン化検出器) や MS (質量分析計)、SCD (硫黄化合物化学発光検出器) などが用いられて来た。これらの検出器はいずれも物質の物理化学的特性を利用したもので、ここで得られる濃度値の大小に基づく議論が中心に行われてきた。しかし含有濃度が高ければ匂いが強いという訳ではない。物質には閾値が存在し、1 ng/L (ppt) で強烈な匂いを発するものがあれば、1000 mg/L (ppm) でも全く匂わない物質も存在する。GC-O においては GC によって分離されて Sniff-Port に届いた香気を、検出器として人間の鼻を用いて精査することで、抽出液中の香気物質を検出することができる。よく用いられる GC-O 装置として Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)<sup>14)</sup>、CharmAnalysis<sup>TM</sup><sup>15)</sup>があり、いずれも検出した匂いの強度を算出することができる。CharmAnalysis においては GC で分離された香気が 30 ml/min の空気流とともに Sniff-Port に届くため、香気が Sniff-Port に停滞せず、ビールのように多くの香気成分を含む場合でも、香りと香りの境界線を明確に見出すことができる。そこで本研究では CharmAnalysis を用いた。

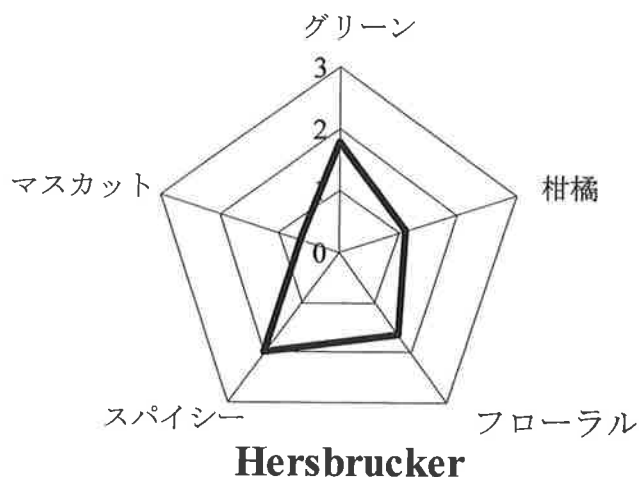
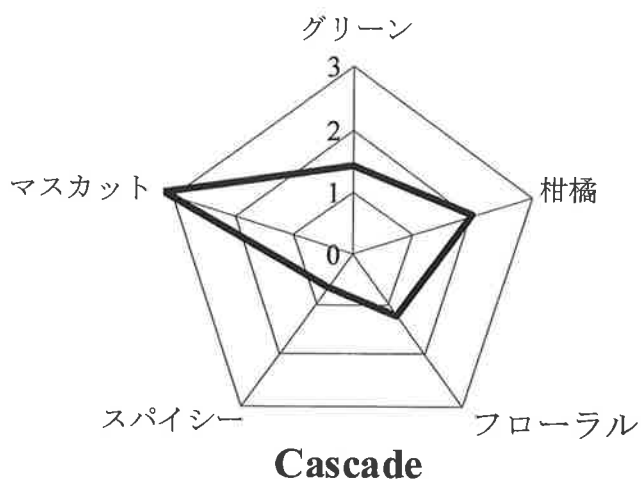
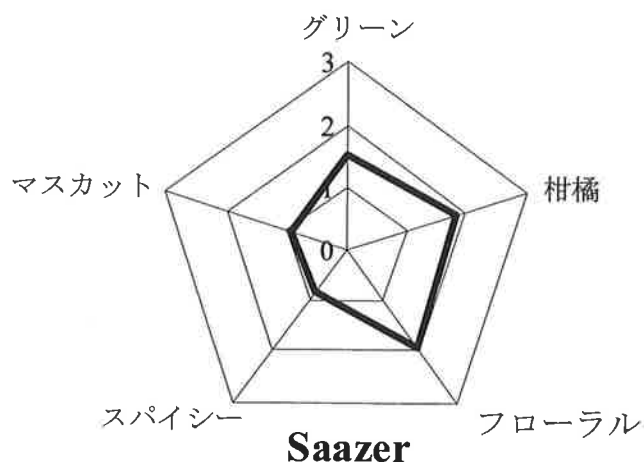
まず試料として、ホップを加えない無ホップビールとホップアロマを強く付与したビールを作製した<sup>13)</sup>。ホップ品種にはアメリカ産 Cascade, チェコ産 Saazer, ドイツ産 Hersbrucker を用いた。ビールに残り得る全てのホップ由来香気成分を検出するためには、十分な濃度の香気を、仕込工程中の熱による揮散を避けて付与し、GC-O 分析において無ホップビールとの差を明確に検出する必要がある。そのために、ホ

第3表 ホップ由来の27種の香気成分と得られた匂い強度 (Charm value)<sup>1)</sup>

RI on DB-WAX	GC-Oで 検出される香調	同定された物質	弁別閾値 ( $\mu\text{g/L}$ )	Charm value			
				無ホップ	Saazer	Hersbrucker	Cascade
1004	柑橘, パイナップル	ethyl 2-methylpropanoate	6.3	348	1125	1582	1252
1068	柑橘, りんご	(+/-)-ethyl 2-methylbutanoate	1.1	114	952	1370	968
1084	柑橘, りんご	ethyl 3-methylbutanoate	2.0	0	1601	765	564
1103	グリーン, 青葉	1-hexanal	350	0	493	568	712
1111	アーモンド, 焦げ	3-methyl-2-butene-1-thiol	0.002	88	426	490	410
1148	グリーン, 青葉	(Z)-3-hexenal	20.0	72	1081	1111	1002
1180	柑橘, パイナップル	ethyl 4-methylpentanoate	1.0	0	1286	646	647
1190	樹脂的, 青臭い	myrcene	9.5	0	247	618	205
1338	フルーティ, チオール様		43	241	486	302	
1363	マスカット様	4-mercapto-4-methylpentan-2-one	0.0015	0	612	479	1083
1373	グリーン, 金属	(Z)-1,5-octadien-3-one	0.0034	41	1016	1073	450
1383	グリーン, マスカット様	(Z)-3-hexen-1-ol + 未同定物質	884	133	566	415	1186
1548	柑橘, フローラル	(R/S)-linalool	1.0	28	1066	1329	1011
1571	グリーン, キュウリ	(E,Z)-2,6-nonadienal	0.5	0	178	370	237
1590	グリーン, メタリック			0	612	1304	871
1682	ファッティ			218	750	653	633
1825	フルーティ	3-mercaptohexan-1-ol	0.055	151	1165	1010	1226
1850	フローラル, パラ	geraniol	4.0	0	1046	820	1460
1915	フローラル, スミレ	$\beta$ -ionone	0.6	25	827	870	1003
1945	腐敗	(Z)-3-hexenoic acid	1300	195	741	322	514
1980	フローラル, ミント	2-phenylethyl 3-methylbutanoate	88.5	120	711	422	498
2114	チョコレート, 焦げた			292	794	909	776
2236	スパイシー			0	194	979	344
2380	スパイシー			0	0	1134	0
2648	スパイシー			0	0	1398	0
2970	柑橘, ベリー	4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone	21.2	96	1293	1309	1257

ップアロマを付与するビールの仕込では、通常の約5倍量のホップを麦汁冷却後に添加した。それぞれのビールからジクロロメタンを用いて香気成分を抽出し、低沸点物質を逃さないようクデルナダニッシュ濃縮装置を用いて溶媒層を濃縮した。その濃縮液中の香気をGC-Oを用いて比較した。

その結果、無ホップビールからは検出されない（または非常に弱い）が、ホップアロマの強いビールからは強く検出される、いわばホップ由来の香気成分が総計27種存在していた（第3表）。そのうち19成分を同定し、ビール中での閾値を求めた。検出された香気成分が官能上の特徴にどのように寄与しているかを調



第1図 Saazer, Cascade, Hersbrucker を用いて香りを付与したビールの官能評価結果<sup>13)</sup>

べることとした。

まず上に述べたビールサンプルの官能評価を行うため、定量的官能評価に取り組んだ<sup>13,16)</sup>。評価に用いる用語を選定するために、様々なビールを試飲しながら、パネリストからホップアロマの特徴を表す用語を数多く無作為に抽出した。それらの用語をいくつかの纏まりに整理し、用語が表す香りについて、標準サンプル(ビール, 香料, 果実, 草類など)を用いて議論を繰り返した。最終的に、ホップの特徴を表し、評価することが可能な5つの用語を選定した。それらの用語が意味する香調について認識を合わせ、定量的評価を実施した(第1図)。

この官能評価の結果、先に述べたチェコ産 Saazer を用いたビールは柑橘, フローラルな香りを, ドイツ産 Hersbrucker を用いたビールはスパイシー, フローラルな香りを, アメリカ産 Cascade を用いたビールはマスカット様, 柑橘な特徴を有していた。

検出された匂いの強度 (Charm value : 第3表), および同定した成分のビール中での弁別閾値 (第3表) から, 官能上の特徴に寄与する物質を考察した。Cascade ビールの特徴に寄与していると思われるマスカット様香気は, リテンションインデックス (RI) 1363 と 1383 に検出され, これらの物質の Charm value は Cascade ビールのみで高かった。RI 1383 の物質については同定に至っていないが, RI 1363 の物質はチオール的一种である 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4 MMP) と同定された。Hersbrucker ビールの特徴に寄与していると思われるスパイシーな香りは RI 2236, 2380, 2648 から検出されたが, いずれの化合物も同定には至っていない。これらのスパイシーな3成分は Saazer, Cascade ビールの GC-O 分析では検出されなかった。

フローラル, グリーン, 柑橘な特徴をもつ香気は, いずれの品種からも複数, 高い Charm value で検出

され、寄与成分を絞り込むことはできなかった。複数の香気成分が合わさることによって特徴に寄与していると想定された。ホップ由来のフローラルな特徴は linalool, geraniol,  $\beta$ -ionone, 2-phenylethyl-3-methylbutanoate などのテルペノイドやケトン類が構成していると考えられた。ホップ由来のグリーンな香りは 1-hexanal, (Z)-3-hexenal, (E,Z)-2,6-nonadienal, (Z)-1,5-octadien-3-one, myrcene, (Z)-3-hexen-1-ol などのアルデヒド, テルペノイド, アルコールが構成していると考えられた。柑橘な特徴は ethyl 2-methylpropanoate, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl 4-methylpentanoate, 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone, linalool などのエステルやテルペノイドと, チオールの 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) が構成していると考えられた。

ホップ品種が異なれば上に挙げた物質の濃度やバランスも当然異なる。また煮沸工程中には減少する物質もあれば増加する物質も存在する<sup>11,17)</sup>。linalool においては煮沸工程中に鏡像異性体 (R/S 比) も変化し, R/S 比率によって閾値が大きく異なると言われている<sup>18)</sup>。本研究において二次元 GC-MS (キラルカラム) を用いて R/S 比を測定したところ<sup>19,20)</sup>、品種に関わらずホップ穂花中の linalool の R 体比率は約 90% であったが、60 分の煮沸を経ると R 体比率は 50% に減少していた。今後、これらの化合物を用いて再構成液を作製し、それぞれの寄与を明確にしていく必要がある。

以下の章では、上記の特徴のうち特にマスカット様、柑橘な特徴に着目し、それらの特徴を安定的に付与するために寄与成分の挙動を調べた。

#### 4. ホップ由来のエステル類

前章において、ホップを添加したビールにおいては ethyl 2-methylpropanoate, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl 4-methylpentanoate などの分枝短鎖脂肪酸エステル類が検出されることを述べた。これらのエステル類は発酵前の麦汁中には極めて低い濃度で存在し、発酵後に大幅に増加することがわかった。そこで、なぜホップを添加した麦汁を発酵させた後に、これらの短鎖脂肪酸エステルが増加しているのかという点に着目した<sup>19)</sup>。

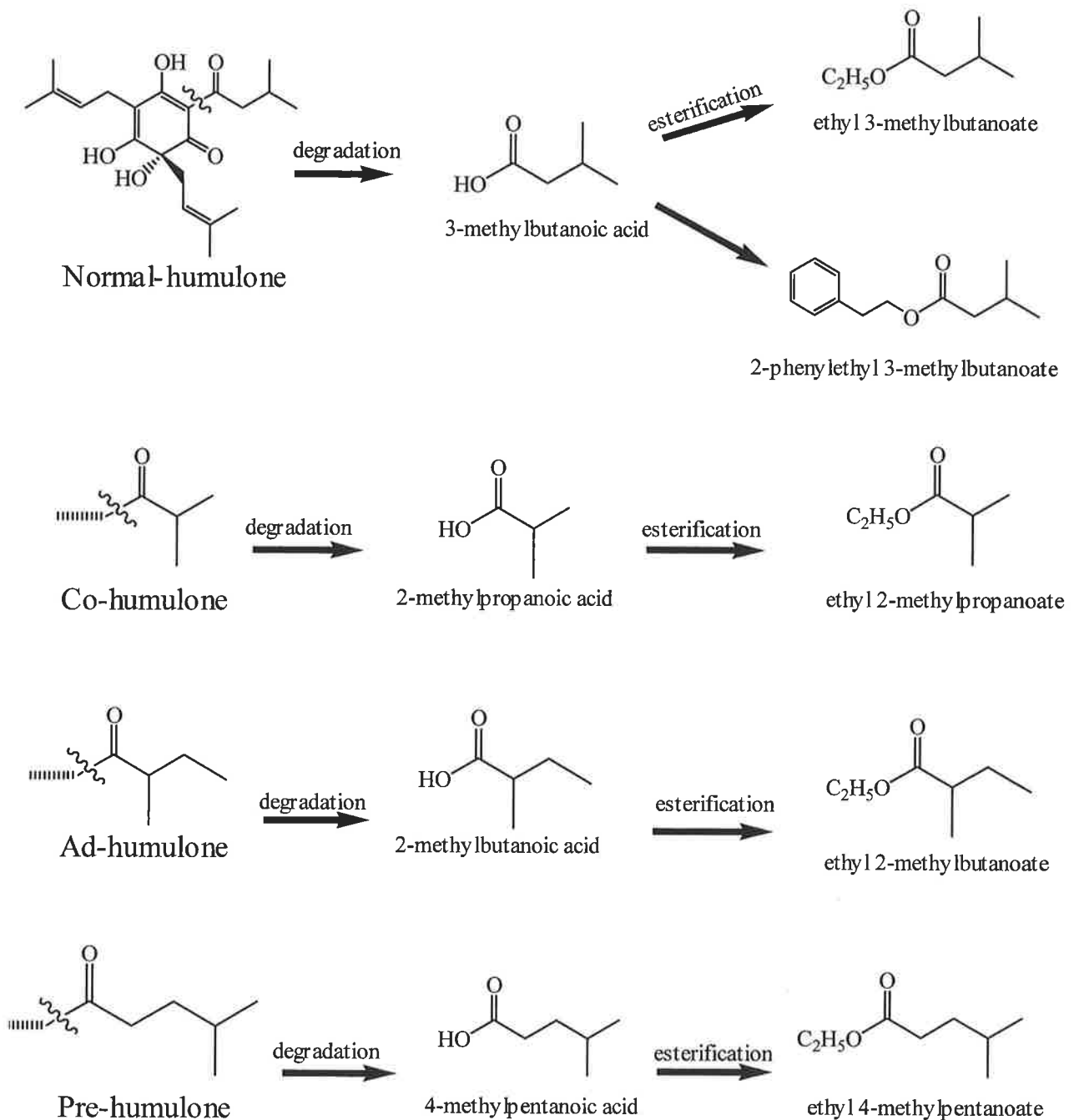
これらのエステル類を増強できれば、ビールの柑橘な香りを増強できる。

これらのエステル類はその構造から、苦味成分の前駆体である humulone に由来するものと考えられた。humulone には側鎖のみが異なる同族体が存在し、それぞれ Normal-humulone, Co-humulone, Ad-humulone, Pre-humulone と呼ばれる (第 2 図)。これらの側鎖が酸化により解裂して 3-methylbutanoic acid, 2-methylpropanoic acid, 2-methylbutanoic acid, 4-methylpentanoic acid をそれぞれ生成し、それらの短鎖脂肪酸が発酵中にエステル化反応を受けると考えられた (第 2 図)。

これを調べるために、ホップを 40°C で 30 日間熟成し humulone を酸化させ、その熟成ホップを用いて前章に述べた方法でビールを仕込んだ。まず官能評価において、熟成ホップを用いたビールは柑橘様の香りを有していた。一方、対照 (4°C 保存) ホップを用いたビールは、樹脂的でグリーンな香りを有していた。実際、ホップを 10~40°C で一定期間熟成させた後に用いるとフルーティで華やかな香りを付与できることが、ホップの使用方法の一つとして報告されている<sup>21)</sup>。

これらのビール中の香気成分濃度を分析した結果を第 4 表に示す。熟成ホップを用いることで、前章で述べた香気成分のうち、エステル類が増加しており、ethyl 3-methylbutanoate のように 4 倍に増加している物質もあった。同時に myrcene や (Z)-3-hexen-1-ol などのグリーン、樹脂的な香りの成分が減少しており、中でも myrcene は 80 分の 1 に減少していた。これらの化合物のバランス変化によりフルーティな香りが増強されたと考えられる。

また興味深いことに、ビールに日光を照射した際に生成する「日光臭」の原因物質 3-methyl-2-butene-1-thiol (MBT) も、熟成ホップを用いることで増加していた (第 4 表)。ビールを紫外線にさらすと、iso-humulone の 4-methyl-3-pentenoyl 側鎖が解裂して 2-methyl-2-butenyl 基を生成する。そこにタンパク質、アミノ酸由来の SH 基が付与されることで MBT が生成する。本研究において humulone, iso-humulone およびビールは紫外線にさらされていない。しかし humulone が酸化を受けることで、あらゆる側鎖部位が解裂しやすくなり、短鎖脂肪酸や MBT の前駆体を生成しやすくなったと考えられる。



第2図 humulone 同族体から短鎖脂肪酸エステルが生成するまでの経路 (仮説)<sup>19)</sup>

### 5. ホップ由来のマスカット様香気と 4 MMP 濃度

アメリカ産 Cascade を用いると、マスカット様の香気がビールに付与されることを第3章で述べた。そしてこの特徴への寄与成分の1つとして、SH 基を有する 4 MMP を同定した。本研究ではこの特徴と寄与成分の挙動に着目し、この香りを安定的に付与する方法について検討した。

チオール化合物は一般に極めて低い閾値を持ち、4 MMP のビール中での閾値は 1.5 ng/L であった (第3表)<sup>13)</sup>。4 MMP はワインや果実などでその寄与が報告されているが<sup>22,23)</sup>、ビール中から微量成分を検出し定量することは難しく、ビール中の 4 MMP 含有量については報告されていなかった。本研究においては、Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE)、*p*-hydroxymercuribenzoate、陰イオン交換樹脂カラムを用いてチオール類を抽出し、GC-O、二次元 GC-

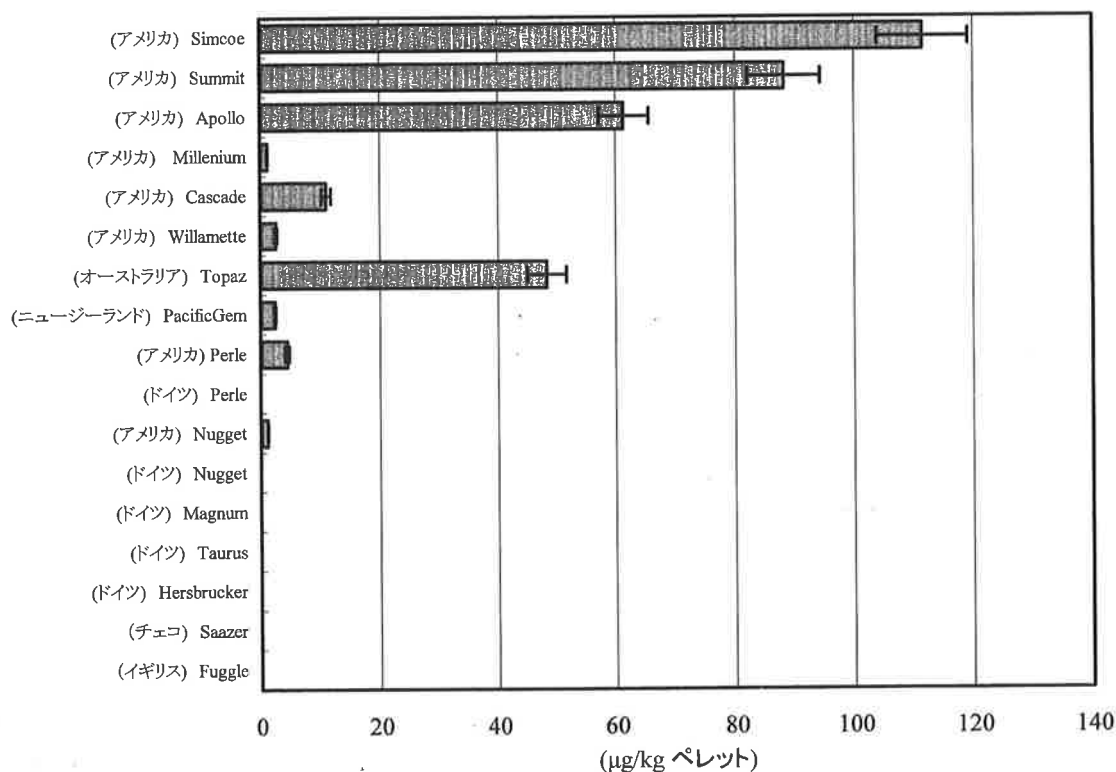
第4表 熟成ホップを用いたビール中の香気成分の濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )<sup>19)</sup>

	熟成ホップ を用いたビール	対照 (4°C保管) ホップ を用いたビール
ethyl 3-methylbutanoate	2.37	0.67
ethyl 2-methylpropanoate	1.96	1.95
ethyl 2-methylbutanoate	0.77	0.50
ethyl 4-methyl pentanoate	0.31	0.21
2-phenylethyl 3-methylbutanoate	0.56	0.18
4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone	19.3	3.4
$\beta$ ionone	0.15	0.07
myrcene	0.82	65.7
(Z)-3-hexen-1-ol	9.4	12.7
3-methyl-2-butene-1-thiol	0.0012	0.00036

MSを用いてチオール類の寄与と挙動を調べた<sup>20)</sup>。その結果、第3章の Cascade で香りを付与したビールには、約 15 ng/L の濃度で 4 MMP が含まれ、特徴香に寄与していることがわかった。

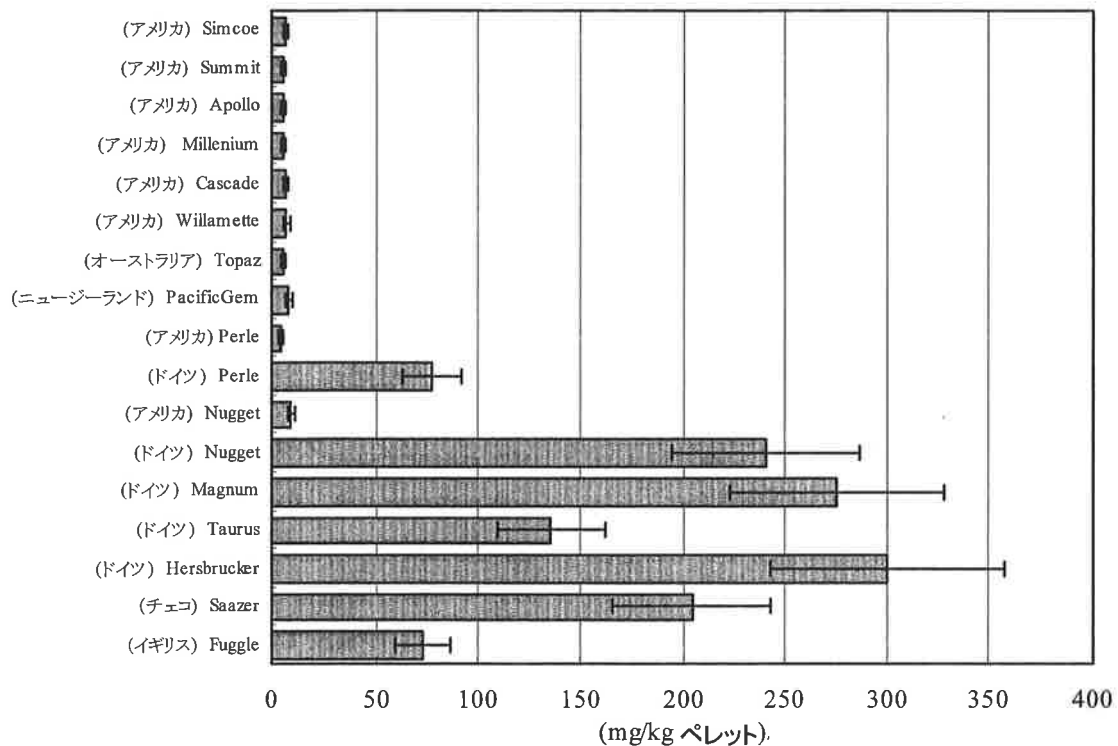
この特徴が Cascade だけの特徴であるのか、他のホップ品種ではこの特徴を付与できないのか、という点に着目した。数品種のホップを用いてビールに香りを付与し、官能評価を実施したところ、いくつかのアメリカ産品種で、強いマスカット様香気を付与できる

ことがわかった<sup>20)</sup>。そこでアメリカ、ドイツ、チェコ、ニュージーランド、オーストラリア産、計 17 品種のペレット中の 4 MMP 含有量 ( $\mu\text{g/kg}$ ) を測定した<sup>20)</sup>。第3図に示すように、ペレット中の 4 MMP 含有量はアメリカ産 Simcoe で最も高く、次いで Summit, Apollo, オーストラリア産 Topaz の順であった。興味深いことに、4 MMP はアメリカ産、オーストラリア産、ニュージーランド産品種には含まれていたが、ヨーロッパ産品種には含まれていなかった。また第3



第3図 各品種ペレットホップ中の 4 MMP 含有量 ( $\mu\text{g/kg}$  ペレット)<sup>20)</sup>

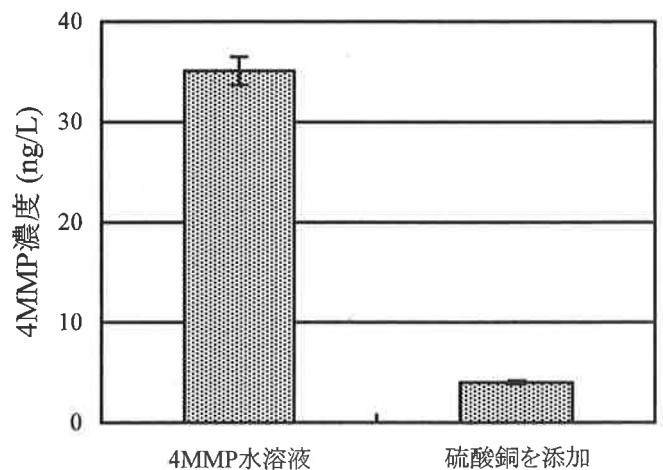




第4図 各品種ペレットホップ中の銅イオン含有量 (mg/kg ペレット)<sup>20)</sup>

図中の Perle や Nugget に見られるように、同一の品種であってもアメリカで栽培したホップからのみ 4-MMP が検出され、ドイツで栽培したものからは 4-MMP が検出されなかった。ではなぜヨーロッパ産品種に 4-MMP が含まれないのだろうか。

ヨーロッパではホップのべト病防止のため硫酸銅 (ボルドー液) が散布されているが、アメリカ、オーストラリアやニュージーランドでは使用されていない。4-MMP は銅イオンなどの 2 価金属イオンと結合しやすい性質をもつ。各ホップ品種中の銅イオン含有量 (mg/kg) を ICP-MS を用いて測定したところ、ヨーロッパ産ホップ中に高い濃度で銅イオンが含まれていた (第4図)。したがって、ヨーロッパ産品種では、散布された銅イオンと 4-MMP が結合し、その香気が失われているのではないかと推察された。そこで 4-MMP 水溶液 (35 ng/L) を作製し、そこに銅イオン濃度として 300 mg/L となるよう硫酸銅を添加してみた。その結果 (第5図)、4-MMP 濃度は 4 ng/L まで低下し、4-MMP 由来の香気は感じられなくなった。このことから、4-MMP は銅イオンと結合すると検出されなくなり、また銅イオンと結合するだけで香気を消失すると考えられる。



第5図 4-MMP 水溶液 (35 ng/L) に硫酸銅を溶解したときの 4-MMP 濃度変化 (ng/L)

硫酸銅散布の 4-MMP 含有量への影響を調べるため、圃場にて硫酸銅散布試験を行った<sup>24)</sup>。試験は通常硫酸銅を散布していないアメリカ北部の圃場で行った。Cascade を栽培している圃場の一区画に、硫酸銅をヨーロッパと同じ頻度 (5月と8月、合計 1.76 g copper/m<sup>2</sup>) で散布し、9月に収穫した。分析の結果、試験毬花 (硫酸銅散布を施した毬花) の銅イオン含有量は対照毬花 (硫酸銅未散布) に比べて確かに増加し

第5表 硫酸銅散布・未散布の毬花中の銅イオン含有量 (mg/kg 毬花)<sup>24)</sup>

	試験 硫酸銅を散布した区画	対照 硫酸銅散布なし
Field A	65	6
Field B	66	10
Field C	73	5

第6表 硫酸銅散布・未散布の毬花中の4 MMP含有量 (μg/kg 毬花)<sup>24)</sup>

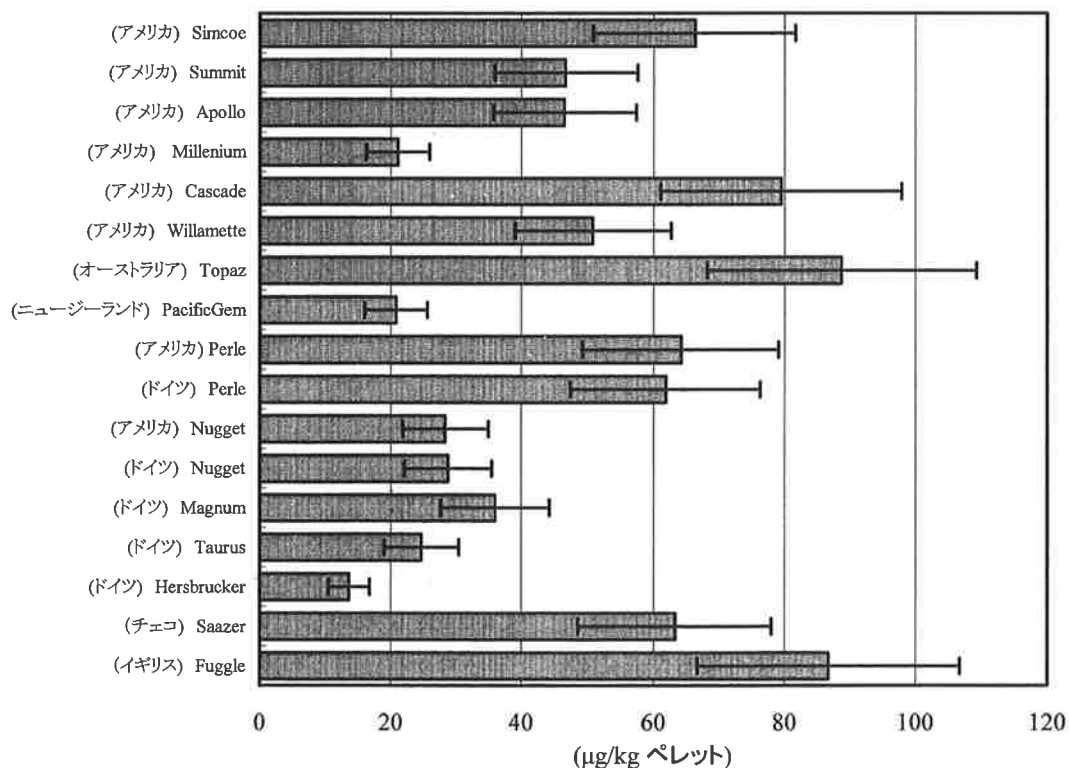
	試験 硫酸銅を散布した区画	対照 硫酸銅散布なし
Field A	12.6	17.7
Field B	11.5	14.8
Field C	10.1	12.8

(第5表), 4 MMP 含有量は低下していた (第6表)。しかし, 試験毬花の銅イオン含有量 (65~73 mg/kg) は, 第4図に示すヨーロッパ産ホップ中の値 (75~300 mg/kg) に比べて低い。また4 MMP も対照毬花に比べ20~30%減少している程度で, 第3図中のヨーロッパ産品種のように4 MMP が全く検出さ

れないということにはなかった。このことから一年度のみの散布では影響が小さく, 過去に土壤中に蓄積してきた銅イオンが大きく影響していると推察される。土壤中の銅イオンがホップ中に取り込まれ, ホップ毬花中の銅イオン濃度が高くなったと考えられる。そして取り込まれた銅イオンが4 MMP と結合した結果, 検出されなくなり, 4 MMP 由来の香気が失われたと考えられる。

## 6. 醸造工程中におけるホップ由来チオールの挙動

第3章において, 柑橘, フルーティなチオールとして, 4 MMP だけではなく3 MH も同定した。3 MH のビール中の閾値は55 ng/Lと低く, ビール中には20~60 ng/Lの濃度で含まれていた。4 MMP はヨーロッパ産品種からは検出されなかったが (第3図), 3 MH はヨーロッパ産品種からも検出された (第6図)<sup>17)</sup>。同じチオール類でありながら, なぜこのように挙動が異なるのだろうか。その理由を調べるため, 銅への感受性 (結合性) を検討した。アメリカ産 Simcoe と Apollo で香りを付与したビール 250 ml 中に, 銅粒子 50 g を添加した。その結果, 4 MMP の濃



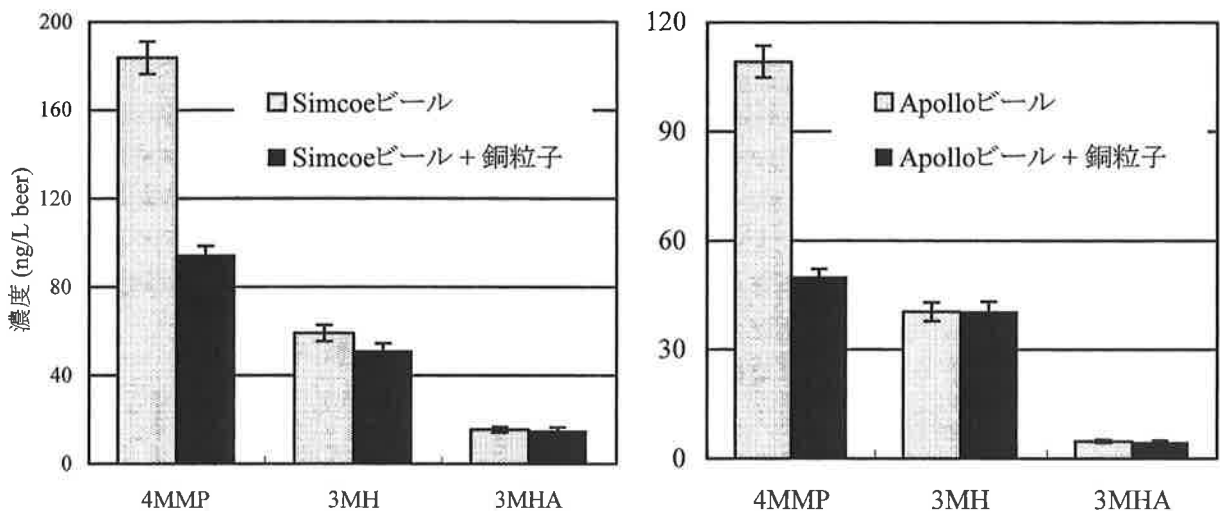
第6図 各品種ペレットホップ中の3 MH含有量 (μg/kg ペレット)<sup>17)</sup>

度は約 50 % 減少したにもかかわらず、3 MH の濃度は変化しなかった (第 7 図)。このことから、3 MH は同じチオール類でありながら 4 MMP に比べて銅イオンへの感受性が弱く、その結果、いずれの栽培地域の品種からも高い濃度の 3 MH が検出されたと推察される。

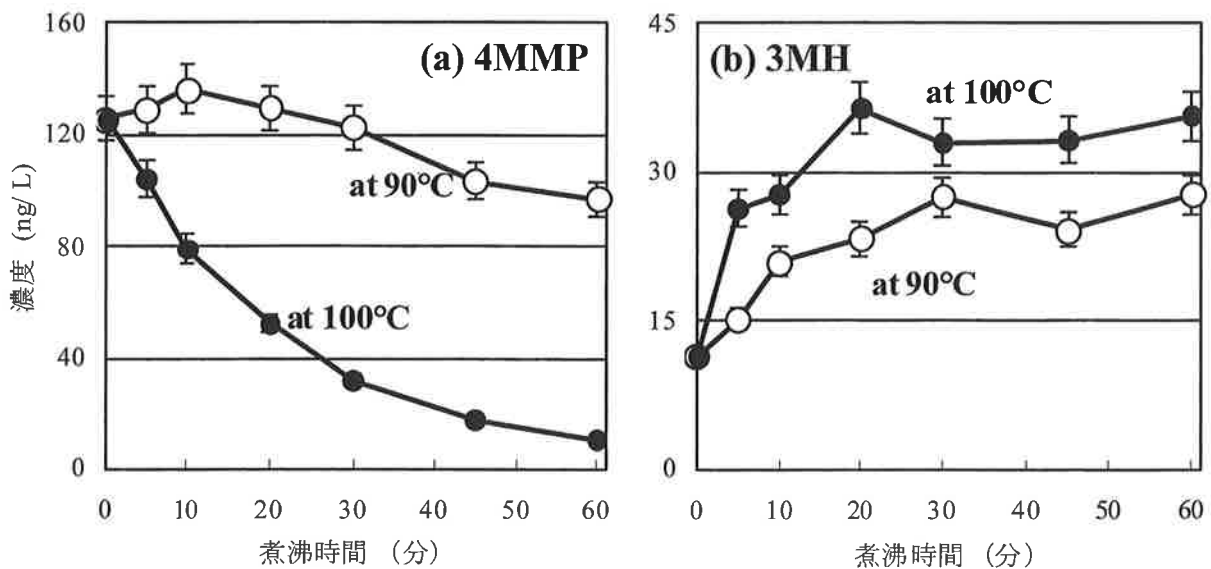
次に、麦汁煮沸工程中での 4 MMP と 3 MH の挙動を調べた (第 8 図)。4 MMP 濃度は煮沸工程中 100°C で大きく減少した。ゆえに、4 MMP 由来のマスカット様香気を安定的にビールに付与するためには、上に述べた 4 MMP を含む品種を、煮沸工程後に添加することが必要となる。4 MMP が煮沸工程中に大きく減少するのに対し、興味深いことに 3 MH は煮沸

工程中に増加し、その増加は 90°C よりも 100°C で大きいことがわかった。また、ここではデータを示していないが、無ホップビールから 4 MMP は検出されなかったが、3 MH は検出された<sup>17)</sup>。このことから、4 MMP はホップのみに由来するが、3 MH は麦芽にも由来していることがわかった。

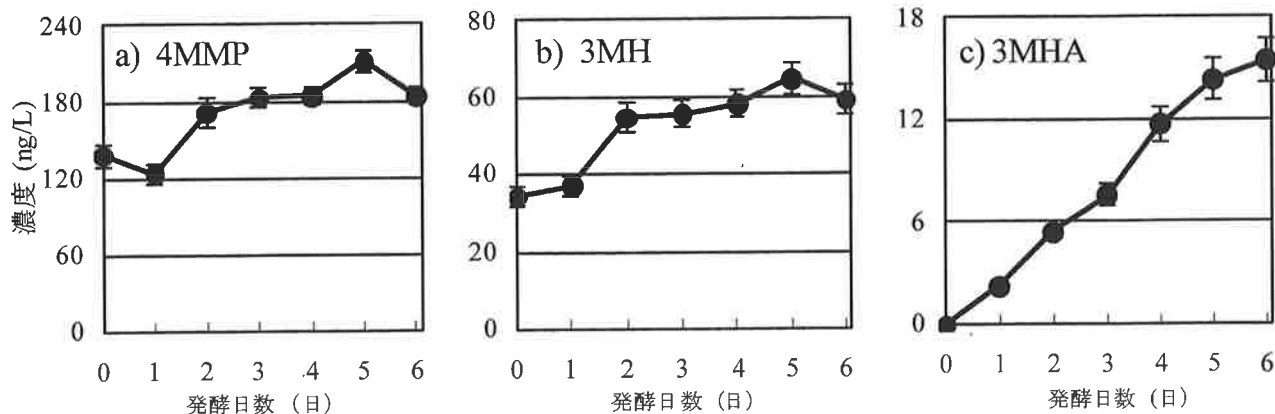
第 9 図に示すように、発酵中には 4 MMP および 3 MH とともに約 30 % 増加した。この理由についてホップに関しては報告されていないが、ワインにおいては発酵中に前駆体から遊離することが報告されている。ワイン原料のブドウ中では 4 MMP や 3 MH はシステイン結合体として存在し、発酵中に酵母のリアーゼ活性によって遊離すると報告されている<sup>22)</sup>。本試験に



第 7 図 銅粒子を添加したときのビール中の 4 MMP, 3 MH の挙動 (ng/L)<sup>17)</sup>



第 8 図 高温の麦汁中での 4 MMP と 3 MH の濃度変化 (ng/L)<sup>17)</sup>



第9図 発酵中の4MMP, 3MH, 3MHAの濃度変化 (ng/L)<sup>17,20)</sup>

においても、システイン結合体から遊離したことや、また3MHにおいてはグリコシド結合体から遊離した可能性も考えられる。このリアーゼ活性は、用いられる酵母種によって異なると報告されている<sup>25)</sup>。

さらに第9図に示すように、一部の3MHは発酵中に、同様にフルーティな香りをもつ3-mercaptohexyl acetate (3MHA)に変換される<sup>17)</sup>。3MHAのビール中での閾値は5.0 ng/Lであり、3MHの閾値(55 ng/L)よりも低く<sup>17)</sup>、この変換能もまた、酵母種によって異なると言われている<sup>25)</sup>。上記のリアーゼ活性、および3MHをより低閾値の3MHAへ変換する能力が高い酵母種を選択することによって、より強い香りをもつビールを作ることができると期待される。

## 7. おわりに

本研究においては、ビール中のホップアロマを構成する成分、およびそれらの挙動について調べ、それらの物質に由来する香気を付与する方法について検討した。香気成分の分析機器は、近年さらにめざましい発展を遂げており、これまでの分析機器では検出できなかった全ての味・匂い成分を定量できるようになるであろう。しかしビールに関わらず食品の香りにおいては、多くの成分が複合して特徴香を構成していることが多い。同定された成分を用いて再構成液を作製し、それぞれの寄与を調べるが必要であると同時に、ゲノムの「オーム研究」と同様、データマイニング(Data mining)が鍵になっていくと思われる。ここで得られた知見やコントロール手法は、今後、香り品質を設計するための有用な手段となり得る。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜りましたアサヒビール株式会社 鰐川彰氏、分析全般にご協力いただきました小林稔氏、八子奈々氏、飯田綾子氏、森本真仁氏に深く御礼申し上げます。学位の取得に際し温かくご指導いただきました京都大学農学研究科 故・内海成教授に深く御礼申し上げます。

<アサヒビール酒類技術研究所香味成分解析部>

## 参考文献

- 1) 岸本 徹：ビールに特徴的な香りを付与するホップ由来香気成分，博士論文，京都大学(2008)，(<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/66109>)
- 2) Barth-Haas group “Hop varieties”；([http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/hop\\_varieties.htm](http://www.barthhaasgroup.com/cmsdk/content/bhg/hop_varieties.htm))
- 3) Hopsteiner “Hop varieties”；(<http://www.hopsteiner.com/varieties.html>)
- 4) New Zealand Hops Limited. “Hop varieties”；(<http://nzhops.co.nz/varieties/index.html>)
- 5) Yakima Chief, Inc. “High quality hops from Yakima valley”；(<http://www.yakimachief.com/hopvarieties/hopvar.html>)
- 6) 宮地秀夫：ビール醸造技術，食品産業新聞社(1999)
- 7) 小若雅弘，島津 武，橋本直樹：ホップに由来する成分(2)，醸協，72，(1)，361-367 (2007)
- 8) Tressl, R., Friese, L., Fendesack, F., Koppler, H.: Gas chromatographic - mass spectro-

- metric investigation of hop aroma constituents in beer. *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1422-1426 (1978)
- 9) Peacock, V., Deinzer, M., McGill, L., Wrolstad, R. : Hop aroma in American beer. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 774-777 (1980)
  - 10) 醸造物の成分：日本醸造協会 (1999)
  - 11) Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kagami, N., Kawatsura, K. : Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4701-4707 (2005)
  - 12) Kishimoto, T. : Beer flavor analysis with a Twist. GERSTEL Solutions Worldwide, May 2007, p. 3-7, Gerstel, Mulheim a/d Ruhr, Germany.
  - 13) Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., Shibata, K. : Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8855-8861 (2006)
  - 14) Schieberle, P. : Recent developments in methods for analysis of flavor compounds and their precursors. In *Characterization of Food : Emerging Methods*. Gaonkar, A. G., Eds., p. 403-431, Elsevier Science, Amsterdam (1995)
  - 15) Acree, T. E., Barnard, J., Cunningham, D. G. : A procedure for the sensory analysis of gas chromatography effluents. *Food Chem.*, **14**, 273-286 (1984)
  - 16) 岸本 徹, 尾崎一隆, 鱈川 彰 : ビールの官能評価方法, におい・かおり環境学会誌, **38**, (5), 361-367 (2007)
  - 17) Kishimoto, T., Morimoto, M., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A. : Wanikawa, A. Behaviors of 3-mercaptohexan-1-ol, 3-mercaptohexyl acetate during brewing processes. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **66**, 192-196 (2008)
  - 18) Steinhaus, M., Fritsch, H. T., Schieberle, P. : Quantitation of (R)- and (S)-linalool in beer using solid phase microextraction (SPME) in combination with a stable isotope dilution assay (SIDA). *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7100-7105 (2003)
  - 19) Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., Aoki, K. : Odorants comprising hop aroma of beer : hop-derived odorants increased in the beer hopped with aged hops. *Proceedings of the 31 st European Brewery Convention Congress*, p. 226-235, Venice, Italy (2007)
  - 20) Kishimoto, T., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A. : Wanikawa, A. Comparison of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one content in hop cultivars from different growing regions. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1051-1057 (2008)
  - 21) Lam, K. C., Foster, R. T. : Deinzer, M. L. Aging of hops and their contribution to beer flavor. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 763-779 (1986)
  - 22) Tominaga, T., Masneuf, I., Dubourdieu, D. : A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **29**, 227-232 (1995)
  - 23) Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., and Dubourdieu, D. : Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragrance J.*, **13**, 159-162 (1998)
  - 24) Kishimoto, T. : Concentration of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one and 3-mercaptohexan-1-ol in hop cultivars and their behavior during brewing process. *Acta Horticulturae*, 2008, (in press)
  - 25) Swiegers J. H., Capone D. L., Pardon K. H., Elsey G. M., Sefton M. A., Francis I. L., Pretorius I. S. : Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast.*, **24**, 561-574 (2007)