

チオール化合物の主要な前駆体「ジスルフィド結合型チオール」の麦芽およびホップ中における発見

世界で25年間受け入れられて来た定説を覆す大きな発見である。ビールにおいてもワインにおいても原料由来のチオール化合物は発酵後に大幅に増加するため、発酵中に前駆体から生成することは知られていた。特にワインにおいては原料果汁中にチオールはほとんど含まれない。1998年に前駆体としてアミノ酸とチオール化合物との抱合体が報告され、酵母が持つβリアーゼの作用によってその前駆体からチオールが遊離されると考えられて来た。しかしビールにおいてもワインにおいても、この前駆体による寄与度(%)は、発酵中の全増加量のわずかに3~7%に過ぎないことが報告され、他の主要な前駆体が存在すると考えられて来た。著者は本研究において、世界で初めて主要な前駆体として「ジスルフィド結合型チオール」を麦芽およびホップ中にて発見し、その前駆体が発酵中に還元されて、チオールがビール中に遊離されるという仕組みを突き止めた。

岸 本 徹

1. はじめに

チオール化合物はng/Lの閾値を持ちビールやワインにその特徴的な香りを付与できることから、強い関心を持たれ多くの研究が進められてきた¹⁻⁸⁾。ビールやワイン中に含まれる4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) や3-mercaptohexan-1-ol (3MH) などのチオールに関する研究においては、揮発性の遊離型の化合物だけではなく、不揮発性の前駆体に関する研究も行われてきた。特にワイン製造においては、これらのチオールは果汁中からはほとんど検出されないことから⁹⁾、発酵工程における前駆体からの生成について強い関心を持たれてきた。これらのチオール化合物がそのシステイン抱合体からβ-リアーゼの作用によって遊離されて来ることが1998年に報告されて以降⁹⁾、この抱合体こそがチオールの主要な前駆体であると受け入れられて来た。ワインに関する研究を中心として、原料中に含有されるチオールのシステイン抱合体(Cys-3MH)やグルタチオン抱合体(Glu-3MH)の存在、β-リアーゼによる遊離メカニズムについて多くの研究がなされ、そしてビールについても同様の

研究が進められて来た¹⁰⁻²¹⁾。

しかしながら、ビールの原料中における前駆体のモル濃度はビール中のチオールの含有濃度に比べて極めて高く、前述のいずれの報告においても原料中の前駆体含有量とチオール含有量の間に関が見出されていない。ワイン中のチオール含有量に関する報告においても、前駆体含有量とチオール含有量に相関がないことが報告されている²²⁾。また発酵中の3MHの増加について、システイン抱合体からβ-リアーゼ作用による遊離の寄与は極めて小さいことが、ビールに関してもワインに関しても報されている^{23,24)}。具体的にはワイン製造において、発酵中に増加する3MHのうちCys-3MHによる寄与は、全増加量の3~7%に過ぎないことが報告されている²³⁾。これらのことから、別の主要なチオール前駆体と、遊離の仕組みが存在することが考えられており、本研究¹⁾では他の形態の主要な前駆体の探索を行った。

構造から、チオール(-SH)基の結合として一般的なジスルフィド結合の存在が考えられる。ジスルフィド結合は2つのチオール基間に生じる弱い共有結合であり、その解離エネルギーは60 kcal/molとC-Cお

Discovery of "disulfide bonded-thiols", the Major Precursors of Thiol Compounds in Malt and Hops
Toru KISHIMOTO (National Research Institute of Brewing)

よび C-H 結合よりも約 40% 低い²⁵⁾。生物学では、システイン残基のチオール基間のジスルフィド結合はタンパク質の二次構造および三次構造の重要な構成要素であり、多くの酵素が構造形成に関与しながら酸化的にシステイン間の結合を形成する²⁶⁾。

本研究¹⁾においては、チオールの前駆体として麦芽およびホップ中の「ジスルフィド結合型チオール」の存在を調べた。大麦中のタンパク質には多くのジスルフィド結合が含まれることが知られており、麦芽中にもジスルフィド結合型のタンパク質、ペプチド、アミノ酸が多く含まれると推察される。

4MMP のようにホップ中に特異的に存在するチオールが存在する一方で、3MH は麦芽にもホップにも存在する^{20,27)}。そこで本研究では、3MH を指標として麦芽およびホップ中のジスルフィド結合型チオールの存在と挙動を調べた。またホップ由来の 3MH、麦芽由来の 3MH の濃度のお互いの影響を避けるため、ホップ無添加の麦汁と発酵液、ホップ水溶液とその発酵液を作成し、分析に供した。

2. 試験方法

2-1. ホップ無添加ビール の作成

341 g の粉碎麦芽を 2 L の水に添加した。40 °C にて 30 分間タンパク質分解後、68 °C にて 30 分間糖化し、濾過をした。得られた麦汁（無ホップ麦汁と呼ぶ）を 60 分間煮沸したもの、または未煮沸の麦汁をのちに発酵させた。エキスを 12.0 % に調整後、4 °C へと冷却後、泥状下面酵母を 20×10^6 cells/mL の濃度で添加し、1000 rpm で攪拌させながら 15 °C で 7 日間発酵させた。発酵後 10,600 × g で 30 分間遠心し、上清を分析に供した。

2-2. ホップ水溶液の作成と発酵

10 g の Citra[®] (α 酸 13.0% ; USA) と Simcoe[®] (α 酸 12.5% ; USA) のホップペレットを 1 L の水に添加し、12 時間、1000 rpm にて室温で攪拌した。この溶液をホップ水溶液として 3MH および 4MMP の分析に供した。発酵を行うために、140 g のグルコースをこのホップ水溶液 1L に添加し、エキス 12.6% (w/w) の水溶液を作成した。ここに泥状下面酵母を 70×10^6 cells/mL の濃度で添加し 1000 rpm で攪拌しながら 7 日間、15 °C で発酵させ、アルコール濃度 5.5% (w/w)、エキ

ス 1.6% (w/w) の発酵液を作成した。10,600 × g で 30 分間遠心後、3MH および 4MMP の分析に供した。

2-3. エキス濃度とアルコール濃度の分析

サンプル中のエキス濃度 (% ; w/w) とアルコール濃度 (% ; w/w) は AlcoLyzer ME ; DMA5000M system (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) にて測定した。アミノ酸濃度は LA8080 AminoSAA YA (Hitachi High-Tech Corporation, Tokyo, Japan) にて分析した。

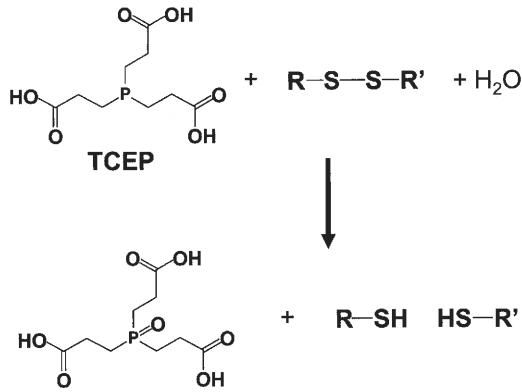
2-4. サンプル中の 3MH と 4MMP 濃度の分析

内部標準 (3MH-d₅, 4MMP-d₁₀) を含むサンプル 100 mL に 30 mL の酢酸エチルを添加し、エマルジョンを形成させないようにゆっくりと攪拌し香気成分を抽出した。上清の酢酸エチル層を回収し、MetaSEP IC-Ag カラムを用い、既報の方法²⁸⁾に従ってチオール化合物を抽出し GC/MS/MS システムにて分析した。香気成分の抽出濃縮液 2 μL を GC (Agilent 8890 GC system) に注入し、DB-WAX UI キャピラリーカラム (30 m 長さ × 0.25 mm 内径 ; 0.25 μm 膜厚) にて香気を分離した。MS Triple Quad system (Agilent 7000D) にて electron ionization (EI) イオン化法にてイオン化後、multiple reaction monitoring (MRM) モードにて検出した。

3. 実験結果

3-1. Tris (2-carboxyethyl) phosphin (TCEP) 添加量の検討

ジスルフィド結合の還元剤として Tris (2-carboxyethyl) phosphin (TCEP) 塩酸塩を用いた (第 1 図)。TCEP は常温にて水溶液中で安定で、ジスルフィド結合のみを特異的に還元し、他の官能基には反応しない^{29,30)}。また一般的に用いられる他の還元剤 1,4-dithiothreitol (DTT) はアルカリ側でのみ還元力を発揮するが、TCEP は低い pH の溶液中でも作用する³¹⁾ため、ビールのような低い pH の液体に対しても用いることができる。ジスルフィド結合型チオールを還元するために必要な最小の TCEP 濃度を検討した。第 2 図に示す通り、10 mM 以上の TCEP の添加によって無ホップ麦汁、ホップ水溶液中のジスルフィド結合型 3MH、4MMP がともに十分に還元されていることがわかる。ジスルフィド結合の総量が麦芽品種間やホップ品種間



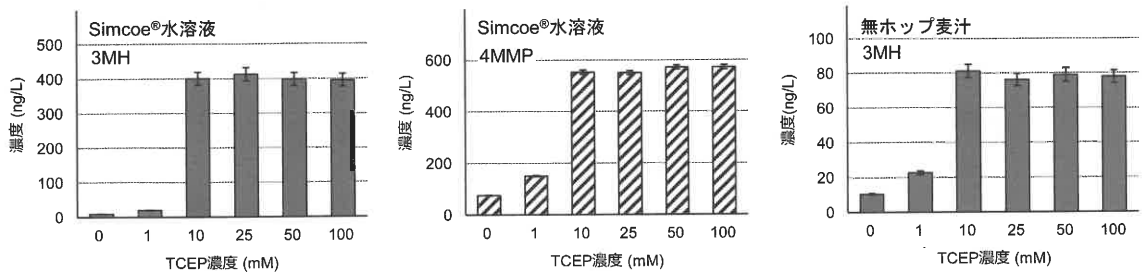
第1図 Tris(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP)によるジスルフィド結合の還元様式³²⁾

で異なり得ることも予想されたため、本研究では一般に使用される中での最大量^{29,30)}である50 mMのTCEPを、100 mLのサンプルに添加し20℃で3時間反応させた。

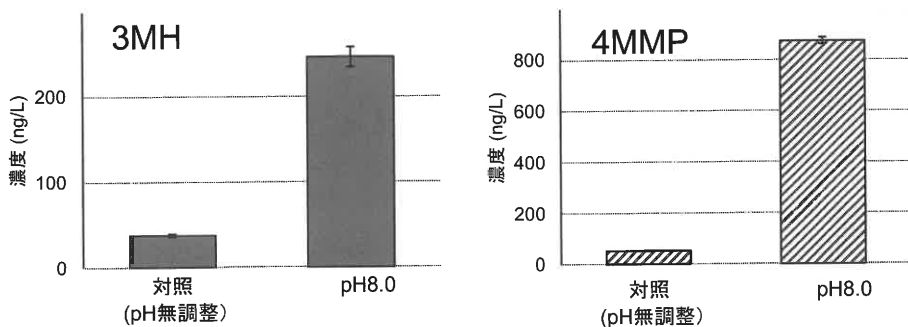
他の還元剤であるDTTの使用についても検討した。

しかしながらDTTはアルカリ条件下でのみ還元力を発揮する。第3図に示す通り、ホップ水溶液のpHを8に調整し、20℃で3時間インキュベートするだけで3MHと4MMPの濃度は著しく上昇した。この場合、3MHと4MMPの濃度の上昇はジスルフィド結合が解離したことに起因するのか、他の要因によるものかを特定することができない。またDTTおよびβ-mercaptoethanolをサンプル中に添加した場合、定量的なクロマトグラムが得られなかった。これらの還元剤はチオール基を含む。抽出工程においてMetaSEP IC-Agカラムへの3MHや4MMPの吸着を、高濃度の還元剤のチオール基が拮抗的に阻害したと考えられる。

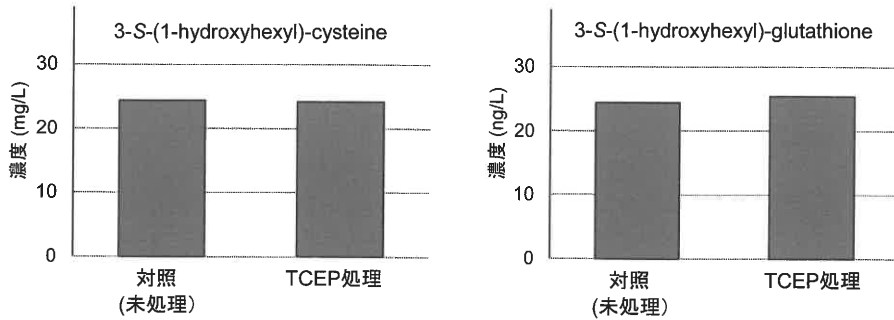
予備検討として、これまで前駆体と言われてきたアミノ酸抱合体3-S-(1-hydroxyhexyl)-cysteineおよび3-S-(1-hydroxyhexyl)-glutathioneがTCEPによる影響を受けるか確認した。これらのアミノ酸抱合体標準試薬24 ppmを含む水溶液に50 mM TCEPを添加し、20℃で3時間インキュベートしたところ、第4図に示すように、これらのアミノ酸抱合体はいずれもTCEP



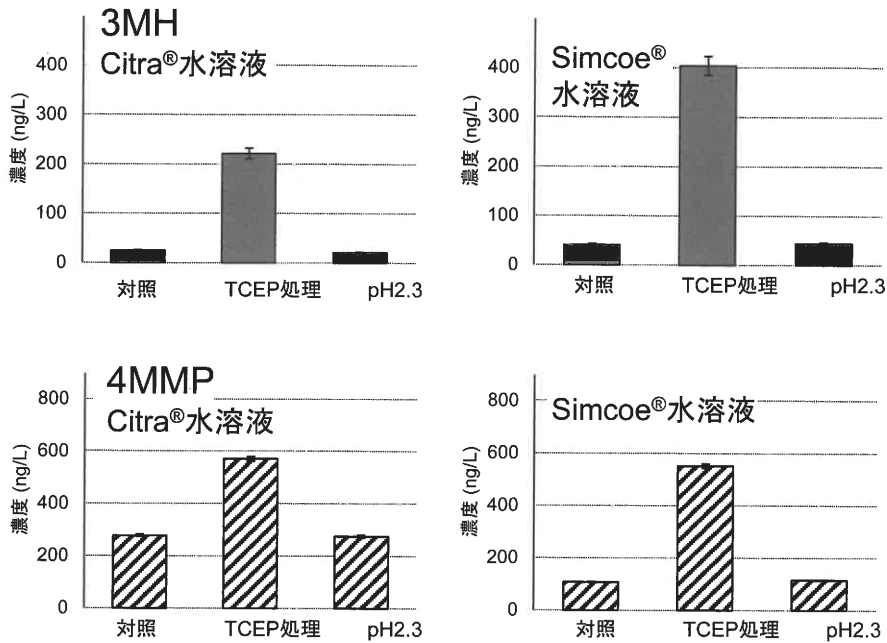
第2図 Simcoe® ホップ水溶液および無ホップ麦汁中のジスルフィド結合型3MHおよび4MMPを還元するために必要なTCEP最小濃度¹⁾



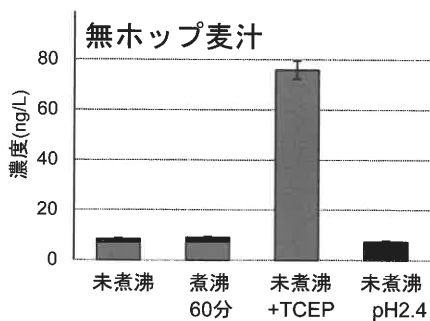
第3図 Simcoe® ホップ水溶液 pH を 8.0 に調整した際の3MHと4MMP濃度の変化¹⁾



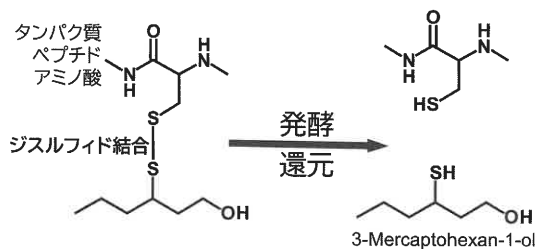
第4図 TCEP 処理した 3-S-(1-hydroxyhexyl)-cysteine, 3-S-(1-hydroxyhexyl)-glutathione の濃度変化¹⁾



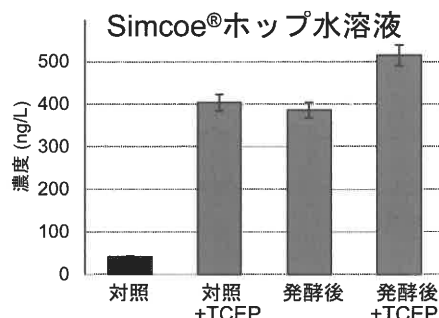
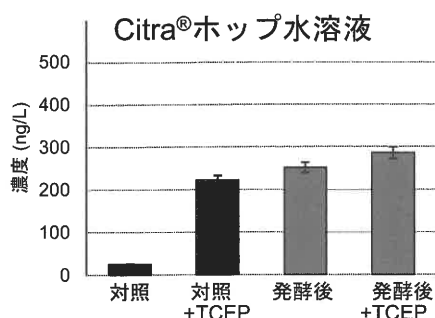
第5図 TCEP 処理, pH 調整による Citra®, Simcoe® ホップ水溶液中の 3-mercaptohexan-1-ol および 4-mercapto-4-methylpentan-2-one の濃度変化¹⁾



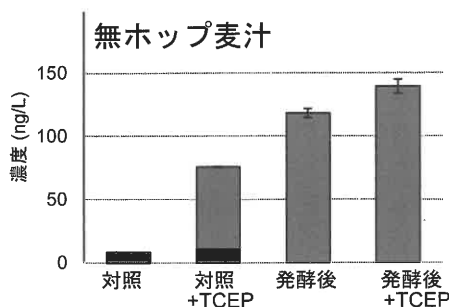
第6図 煮沸, TCEP 処理, pH 調整による無ホップ麦汁中の 3-mercaptohexan-1-ol の変化¹⁾



第7図 本研究で示唆されたチオール前駆体と遊離の仕組み¹⁾



第8図 TCEP処理後、発酵後、発酵+TCEP処理後のホップ水溶液中の3-mercaptohexan-1-ol濃度の変化¹⁾



第9図 TCEP処理後、発酵後、発酵+TCEP処理後の無ホップ麦汁中の3-mercaptohexan-1-ol濃度の変化¹⁾

の添加によって減少せず、影響を受けなかった。

3-2. Citra®, Simcoe®を溶解したホップ水溶液および無ホップ麦汁へのTCEP処理

ホップ品種Citra®とSimcoe®を水に溶解したホップ水溶液、および無ホップ麦汁をTCEPで処理したところ、第5図に示すように3MHは対照(処理前)に比べそれぞれ8.9倍、9.9倍上昇した。4MMPはそれぞれ2.1倍、5.1倍増加した。第6図に示すように無ホップ麦汁においては、3MHは煮沸前麦汁(TCEP処理前)に比べて8.5倍上昇した。第6図に示すように麦汁の煮沸後において3MHの増加は見られなかったことから、麦芽由来のジスルフィド結合型3MHは、煮沸によって影響を受けないと考えられる。

TCEPは通常添加前は塩酸塩であることから、添加によってホップ水溶液や無ホップ麦汁のpHは2.3~2.4に低下する。そのためHClを用いてpHを2.3~2.4に調整し20℃で3時間インキュベートしたホッ

プ水溶液、無ホップ麦汁も同時に作製した。第5図、第6図に示す通り、pHの低下によって3MH、4MMPの増加は見られなかった。そのことから、TCEP処理による3MH、4MMPの増加はpHの低下によるものではなく、ジスルフィド結合の還元によるものであることがわかる。

これらの結果から、ジスルフィド結合型3MHは麦芽とホップ中に存在し、またジスルフィド結合型4MMPはホップ中に存在するということが確認された。

3-3. 発酵中におけるジスルフィド結合の還元

発酵工程におけるジスルフィド結合型3MHの還元について調べた。Citra®およびSimcoe®を溶解したホップ水溶液の発酵を行うために、糖源としてグルコースを添加し7日間15℃にて、攪拌させながら発酵させた。発酵終了後、アルコール濃度5.5%(w/w)、pH3.4、真性エキス1.6%(w/w)の発酵液が得られ、発酵が完了していると確認できた。ジスルフィド結合の還元を、TCEPの添加と3MHの生成量を調べることによって確認した。第8図、第9図に示すように、Citra®, Simcoe®の発酵液では3MHの濃度は発酵前に比べて10.1倍、9.5倍に増加し、無ホップビールにおいては13.3倍に増加した。

この発酵液および無ホップビールにTCEP処理を行ったところ、図に示すようにわずかな増加しか確認できなかった。そのことから、発酵中に大部分のジスルフィド結合型3MHが既に還元されていると判断される。

第8図、第9図に示される3MHの濃度を第1表に示した。それらの結果から、発酵中に還元されたジス

第1表 各種サンプル中の3MH濃度とジスルフィド結合型3MHの還元率¹⁾

	単位	計算式	Citra [®]	Simcoe [®]	無ホップ麦汁
①ホップ水溶液および無ホップ麦汁中の遊離型3MH	ng/L		24.9(±1.2)	40.7(±1.9)	8.3(±0.4)
②TCEP処理後のホップ水溶液および無ホップ麦汁中の遊離型3MH	ng/L		222.0(±10.5)	404.1(±19.1)	75.8(±3.6)
③TCEP処理後にジスルフィド結合の還元により遊離した3MH	ng/L	②-①	197.1	363.5	67.5
④発酵液中の遊離型3MH	ng/L		252.4(±11.9)	386.3(±18.3)	118.2(±5.6)
⑤TCEP処理した後の発酵液中の遊離型3MH	ng/L		287.0(±13.6)	514.5(±24.3)	139.3(±6.6)
⑥発酵中にジスルフィド結合還元以外に由来して増加した3MH	ng/L	⑤-②	65.0	110.4	63.5
⑦ジスルフィド結合の還元によって発酵中に生成した3MH	ng/L	④-⑥-①	162.5	235.2	46.4
⑧発酵中のジスルフィド結合の還元率	%	⑦/③*100	82.4	64.7	68.7
⑨ジスルフィド結合の還元により遊離した3MHの発酵中の全増加3MH量に対する寄与度	%	⑦/(④-①)	71.4	68.0	42.2

ルフィド結合型3MHの割合を推定した。第1表の⑧で算出されるように、発酵後のCitra[®]およびSimcoe[®]を溶解したホップ水溶液および無ホップビールでは、ジスルフィド結合型3MHはそれぞれ82.4%、64.7%、68.7%還元されていたと推定される。ただしこの推定値は、発酵中に3MHが消失（沈殿、揮散または酵母表面層などへの吸着による）していた場合には変動することとなる。

これらの結果から、新たな前駆体型および遊離の仕組みとして、第7図のような様式が考えられる。チオール化合物がジスルフィド結合を形成する相手として様々なタンパク質、ペプチド、アミノ酸のチオール基、または他のチオール化合物が考えられる。このジスルフィド結合型前駆体からの遊離による寄与度は、第1表の⑨で算出されるように、発酵中の全増加3MH量に対して71%、68%、42%と大きく、従来より言われていたβ-リアーゼによる遊離の寄与度よりも著しく大きい。主要な前駆体を見出すことができたと考えられる。

3-4. 今後の発展

冒頭に述べたように、ジスルフィド結合とタンパク質を多く含む麦芽においては、ジスルフィド結合型チオールの存在が推察されたが、高濃度のタンパク質やアミノ酸の含有を想起させないホップという植物においても、ジスルフィド結合型3MHと4MMPの存在を確認した。ゆえに今後、ブドウ果汁や他の果汁中などでの存在も予想される。実際、麦汁、ブドウ果汁中にTCEPを添加し匂いを嗅いだ瞬間、様々なチオール化合物が放出されていることを官能評価でも容易に

確認できる。そのことから3MHや4MMP以外の様々なチオールのジスルフィド結合も還元によって遊離されると考えられる。本項で述べた理論に基づいた醸造技術開発も期待される。酵母種によるジスルフィド結合の還元能力の違いも興味深い。

〈独立行政法人 酒類総合研究所〉

参考文献

- 1) Kishimoto, T.; Hisatsune, Y.; Fujita, A.; Yamada, O. Presence of disulfide-bonded thiols in malt and hops as the precursors of thiols in beer. *J. Agric. Food Chem.* 2022, **70**, 13413–13418. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06099>
- 2) 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.* 2006, **54**, 8855–8861. <https://doi.org/10.1021/jf061342c>
- 3) 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.* 2008, **56**, 1051–1057. <https://doi.org/10.1021/jf072173e>
- 4) Steinhaus, M.; Wilhelm, W.; Schieberle, P. Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 2007, **226**, 45–55. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0507-6>

- 5) Takoi, K. ; Degueil, M. ; Shinkaruk, S. ; Thibon, C. ; Maeda, K. ; Ito, K. ; Bennetau, B. ; Dubourdieu, D. ; Tominaga, T. Identification and characteristics of new volatile thiols derived from the hop (*Humulus lupulus* L.) cultivar Nelson Sauvin. *J. Agric. Food Chem.* 2009, **57**, 2493–2502. <https://doi.org/10.1021/jf8034622>
- 6) Vermeulen, C. ; Lecocq, S. ; Collin, S. Polyfunctional thiols and drinkability of beer. In European Brewery Convention Proceedings ; Fachverlag Hans Carl : Nuremberg, 2003 ; Vol. **91**, pp 930–940.
- 7) Vermeulen, C. ; Lejeune, I. ; Tran, T. T. H. ; Collin, S. Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beer. *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**, 5061–5068. <https://doi.org/10.1021/jf060669a>
- 8) Kishimoto, T. ; Noba, S. ; Yako, N. ; Kobayashi, M. ; Watanabe, T. Simulation of pilsner-type beer aroma using 76 odor-active compounds. *J. Biosci. Bioeng.* 2018, **126**, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.015>
- 9) Tominaga, T. ; des Gachons, C. P. ; Dubourdieu, D. A New type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc : S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 1998, **46**, 5215–5219. <https://doi.org/10.1021/jf980481u>
- 10) Gros, J. ; Nizet, S. ; Collin, S. Occurrence of odorant polyfunctional thiols in the super alpha Tomahawk hop cultivar. Comparison with the thiol-rich Nelson Sauvin bitter variety. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 8853–8865. <https://doi.org/10.1021/jf201294e>
- 11) Chenot, C. ; Thibault de Chanvalon, E. ; Janssens, P. ; Collin, S. Modulation of the sulfanylalkyl acetate/alcohol ratio and free thiol release from cysteinylated and/or glutathionylated sulfanylalkyl alcohols in beer under different fermentation conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2021, **69**, 6005–6012. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01610>
- 12) Chenot, C. ; Collin, S. Ability of the Mandarin Bavaria hop variety to release free odorant polyfunctional thiols in late-hopped beers. *J. Inst. Brew.* 2021, **127**, 140–148. <https://doi.org/10.1002/jib.636>
- 13) Kankolongo Cibaka, M.-L. ; Decourrière, L. ; Lorenzo-Alonso, C.-J. ; Bodart, E. ; Robiette, R. ; Collin, S. 3-Sulfanyl-4-methylpentan-1-ol in dry-hopped beers : First evidence of glutathione S-conjugates in hop (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2016, **64**, 8572–8582. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03788>
- 14) Chenot, C. ; Robiette, R. ; Collin, S. First evidence of the cysteine and glutathione conjugates of 3-sulfanylpentan-1-ol in hop (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2019, **67**, 4002–4010. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00225>
- 15) Gros, J. ; Tran, T. T. H. ; Collin, S. Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop. *J. Inst. Brew.* 2013, **119**, 221–227. <https://doi.org/10.1002/jib.80>
- 16) Roland, A. ; Viel, C. ; Reillon, F. ; Delpech, S. ; Boivin, P. ; Schneider, R. ; Dagan, L. First identification and quantification of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one in hops (*Humulus lupulus*). *Flavour Fragr. J.* 2016, **31**, 445–463. <https://doi.org/10.1002/ffj.3337>
- 17) Gros, J. ; Peeters, F. ; Collin, S. Occurrence of odorant polyfunctional thiols in beers hopped with different cultivars. First evidence of an S-cysteine conjugate in hop (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2012, **60**, 7805–7816. <https://doi.org/10.1021/jf301478m>
- 18) Bonnaffoux, H. ; Roland, A. ; Schneider, R. ; Cavalier, F. Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages. *Food Chem.* 2021, **339**, 127628. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127628>
- 19) Swiegers, J. H. ; Bartowsky, E. J. ; Henschke, P. a. ; Pretorius, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. In Australian Journal of Grape and Wine Research ; Blair Francis, M.E., Pretorius, I.S., R. J., Ed. ; The Australian Wine Research Institute : Glen Osmond, Australia, 2005, Vol. **11**, pp 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

- 20) Chenot, C. ; Conck, W. ; Janssens P. ; Collin, S. Malt and hop as sources of thiol S-conjugates : Thiol-releasing property of lager yeast during fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 2022, **70**, 3272-3279. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07272>
- 21) 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*, 2007, **24**, 561-574. <https://doi.org/10.1002/yea.1493>
- 22) Capone, D. L. ; Sefton, M. a. ; Hayasaka, Y. ; Jeffery, D. W. Analysis of Precursors to Wine Odorant 3-Mercaptohexan-1-Ol Using HPLC-MS/MS : Resolution and Quantitation of Diastereomers of 3-S-Cysteinylhexan-1-Ol and 3-S-Glutathionylhexan-1-Ol. *J. Agric. Food Chem.* 2010, **58** (3), 1390-1395. <https://doi.org/10.1021/jf903720w>.
- 23) Subileau, M. ; Schneider, R. ; Salmon, J. M. ; Degryse, E. New Insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines : Cys-3MH and (E)-Hexen-2-Al Are Not the Major Precursors. *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**, 9230-9235. <https://doi.org/10.1021/jf801626f>.
- 24) Michel, M. ; Haslbeck, K. ; Ampenberger, F. ; Meier-Dörnberg, T. ; Stretz, D. ; Hutzler, M. ; Coelhan, M. ; Jacob, F. ; Liu, Y. Screening of brewing yeast β -lyase activity and release of hop volatile thiols from precursors during fermentation. *Brewing Science* 2019, **72**, 179-186.
- 25) Cremlyn, R. J. Structure and bonding in sulfur. In *An Introduction to Organosulfur Chemistry*, Chichester, John Wiley and Sons. 1996, pp 9-16.
- 26) Rajpal, G. ; Arvan, P. Disulfide bond formation. In *Handbook of Biologically Active Peptides*, 2nd Ed, 2013, pp 1721-1729. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00236-0>
- 27) Kishimoto, T. ; Morimoto, M. ; Kobayashi, M. ; Yako, N. ; Iida, A. ; Wanikawa, A. Behaviors of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate during brewing processes. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2008, **66**, 192-196. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2008-0702-01>
- 28) Takazumi, K. ; Takoi, K. ; Koie, K. ; Tuchiya, Y. Quantitation method for polyfunctional thiols in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer using specific extraction of thiols and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2017, **89**, 11598-11604. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02996>
- 29) Kirley, T.L. Reduction and fluorescent labeling of cyst (e) ine-containing proteins for subsequent structural analysis. *Anal. Biochem.* 1989, **180**, 231-236. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90422-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90422-3)
- 30) Burns, J.A. ; Butler, J. C. ; Moran, J. and Whitesides, G. M. Selective reduction of disulfides by tris-(2-carboxyethyl)-phosphine. *J. Org. Chem.* 1991, **56**, 2648-2650. <https://doi.org/10.1021/jo00008a014>
- 31) Han, J. C. ; Han, G. Y. A procedure for quantitative determination of tris (2-carboxyethyl) phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal. Biochem.* 1994, **220**, 5-10. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1290>
- 32) Reduction of disulfide bonds by TCEP, https://www.nacalai.co.jp/products/entry/img/TCEP_2.jpg