

博士論文

ビールのタマネギ様オフフレーバーの原因成分と
その生成機構に関する研究

野場 重都

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 ビールのタマネギ様オフフレーバーの原因成分の探索とその要因調査	
2.1. 緒言	22
2.2. 材料および方法	22
2.3. 結果と考察	26
2.4. 結論	47
第 3 章 ビールのタマネギ様オフフレーバーである 2-mercapto-3-methyl-1-butanol (2M3MB) の前駆体の同定	
3.1. 緒言	48
3.2. 材料および方法	48
3.3. 結果と考察	53
3.4. 結論	70
第 4 章 ビール中の 2M3MB 生成機構の解明 part I : 発酵中の重要成分の同定	
4.1. 緒言	71
4.2. 材料および方法	71
4.3. 結果と考察	77
4.4. 結論	89
第 5 章 ビール中の 2M3MB 生成機構の解明 part II : 酵母の重要酵素の同定	
5.1. 緒言	91
5.2. 材料および方法	91
5.3. 結果と考察	98
5.4. 結論	118

第 6 章 総括および今後の展望	119
参考文献	125
原著論文	138
謝辞	139

第 1 章

序論

1.1. ビールの歴史

ビールという言葉はゲルマン語のベオレ、つまり穀物からきたといわれている。ビールの起源は紀元前 8000 年から 4000 年に遡るといわれ、人類最初の文明であるシュメール文明では、シュメールの人々が粘土板に楔形文字で描いたビールづくりの様子が記録に残っている（濱口, 1988）。当時のビールは、娯楽や余暇で楽しむ嗜好品というよりは、不衛生な飲料水の代用品、重要なビタミンの補給源、あるいは宗教上の神聖な飲み物、また、労働の賃金として取り扱われていた（橋本, 1998）。また、紀元前 3000 年頃にはすでにエジプトでも多く飲まれており、高い醸造技術を有していたといわれている（都島, 1996）。その後、ビールの製造方法は各地へ伝播し、地中海を経て欧州へ伝わったとされ、すでに 1 世紀頃にはドイツで本格的にビール醸造が行われていたと伝えられている。中世になると修道院でビールが作られるようになり、さまざまな薬草や香草をつかってビールが作られていたが、11 世紀後半ごろから、ビールの苦味、香りづけとして、殺菌効果の高いホップが使われるようになった。1516 年、ドイツ、バイエルン地方では、「ビール純粹令」が出され、大麦、ホップ、水だけを使ってビールが作られるようになった。これによりホップを使用したビールが主流となっていった。その後、パスツールによる低温殺菌法や、アンモニア冷凍機、酵母の純粹培養法が開発され、我々が普段口にしている品質の高いビールが作られるようになった。

1.2. ビール造り

ビールの製造方法には大きく分けて 4 個の工程がある。まず大麦の種子を発芽させ、乾燥させて麦芽を製造する製麦工程、続いて、麦芽を粉碎して湯を加え、麦芽に含まれる酵素を使って、糖やタンパク質を分解した後、ホップを加えて煮沸する仕込み工程、仕込み工程でできた麦汁に酵母を加えて発酵させる発酵工程、最後に、0 °C 程度の低温で貯蔵する貯酒工程である（Fig. 1-1）。原料に大麦ではなく麦芽を使う理由として、大麦の状態では種子は休眠しており酵素が少ないが、ビール造りにおいては発芽以降につくられる酵

素がビールの様々な呈味、香気の生成に重要な働きをしていることが挙げられる。こうしてデンプンやタンパク質を分解し、酵母が資化できる状態にすることで酵母が増殖し、それに伴いアルコールを含むさまざまな成分が作られ、ビールの香味が形成される。これがビール醸造の概略であるが、日本ではこれらの原料の他に、とうもろこしや米といったさまざまな副原料が使用されており、使用する原料の違いによってもさまざまな香味のビールが出来る。

1.3. ホップ

ビールの原料のうち、ホップはビール特有の原料である。ホップ (*Humulus lupulus* L.) は、アサ科の多年草で、つる性の植物である。雌株に作られる毬花は葉が重なって松かさのような形をしており、2-3cm の大きさである。この毬花の部分を 8 月から 9 月ごろ収穫し、乾燥させたものを一般的にホップと呼び、ビールに用いられる。ホップに含まれる主要成分は、樹脂、芳香成分を含む精油、ポリフェノール類である。ホップ樹脂はエーテル、冷メタノールに可溶な画分で、そのうちさらにヘキサンに可溶かつ鉛塩を形成する画分をアルファ酸と呼ぶ。アルファ酸はホップ重量の 2-12% を占めるとされる (日本醸造協会, 1999)。ホップの役割としては、①ビールに特徴的な香りとう苦味を与える。②過剰なタンパク質を凝固、沈殿させてビールを清澄にする。③グラム陽性菌の繁殖を抑える。④ビールの泡立ち、泡持ちをよくする。の 4 つが挙げられている。このうち、①の特徴的な香りとう苦味について詳しく述べる。アルファ酸の溶解度は一般的なビールの pH である、4 付近では低く、0 °C では約 5 mg/L しか溶解しない。ホップはビールの仕込み工程の煮沸中に添加され、加熱によって、アルファ酸が異性化 (イソ化) し、溶解度が 10 倍以上向上する。このイソアルファ酸がビールの苦味の主成分であり (Fig. 1-2、イソアルファ酸は側鎖が異なる複数成分の総称)、ビールに数十 mg/L 含まれ、キレのよい苦味を与えることができる。ただし、このイソアルファ酸は光に弱く、光に当たると異臭を生成する。このため、海外では、反応部位を還元したイソアルファ酸が販売され、ビール醸造に用いられている (オフフレーバーの項目で詳述)。特徴的な香りを有するのはホップの精油であり、ホップ重量の 0.5-5% を占めている。ホップの精油の中で、主要成分はテルペン類であり、たとえばリナロールはラベンダー様の香りを有し、精油成分中の 1% を占めることもある重要な香りである。それ以外にアルコール類、エステル類、アルデヒド類、脂肪酸類など多くの成分が報告されている。

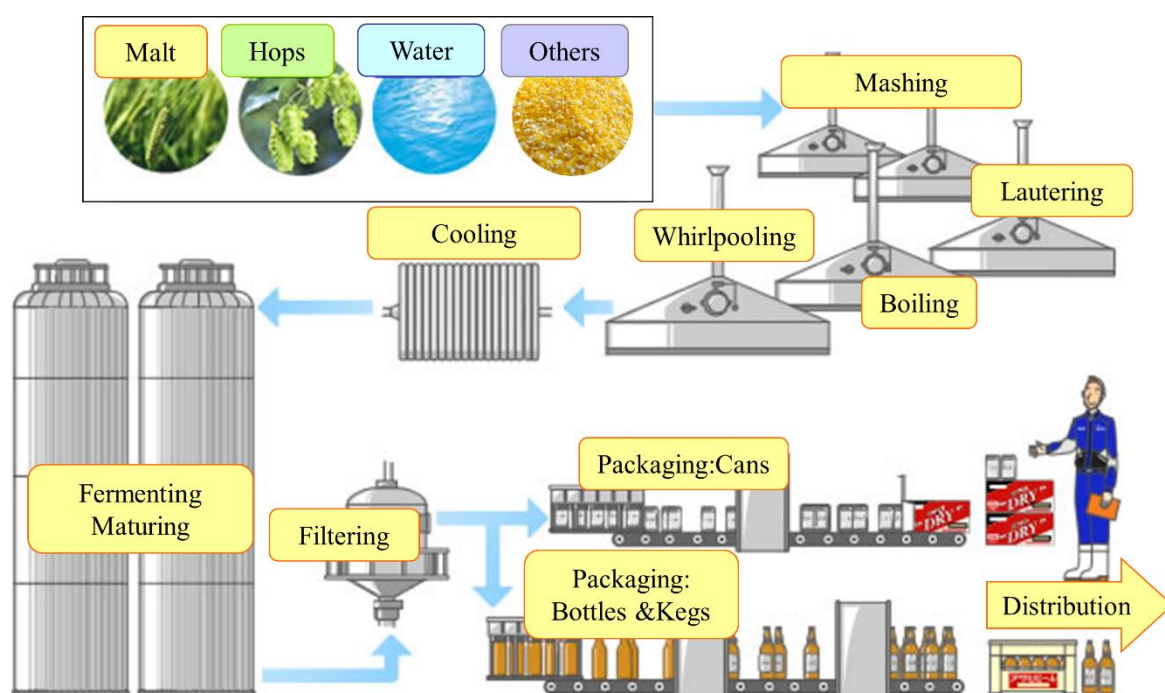
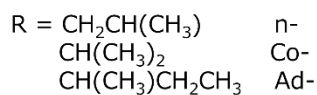
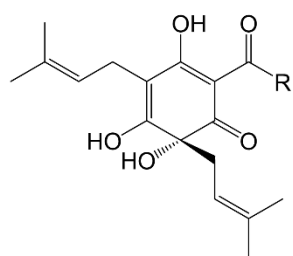


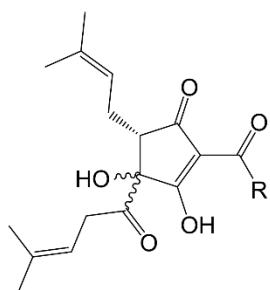
Fig. 1-1. ビールの醸造工程概要

(edited from <http://www.asahibeer.co.jp>)

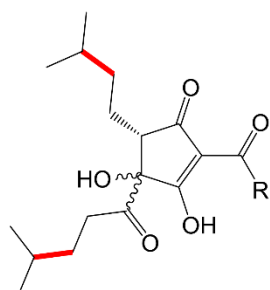
ビール工場におけるビールの製造方法として、麦芽を粉碎して湯を加え、ホップを加えて煮沸する仕込み工程で麦汁を作成し、冷却後、酵母を加えて発酵させる発酵工程を経て、最後に、0 °C 程度の低温で貯蔵する貯酒工程という流れである。最後にパッケージングされて、出荷される。



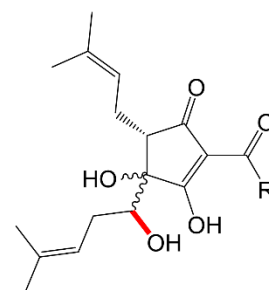
Alpha acids



Iso-alpha acids



Rho-iso-alpha acids



Tetrahydro-iso-alpha acids

Fig. 1-2. アルファ酸、イソアルファ酸、還元型イソアルファ酸の化学構造

ビールの仕込み工程の煮沸中にホップは添加され、ホップ重量の 2-12% を占めるアルファ酸が、煮沸中の熱によって異性化（イソ化）し、溶解度が 10 倍以上向上する。このイソアルファ酸がビールの苦味の主成分である。イソアルファ酸は側鎖が異なる複数成分の総称であり、ビールにトータル数十 mg/L 含まれ、キレのよい苦味を与える。イソアルファ酸は光により劣化するため、その耐性のある還元型のイソアルファ酸が市販されている（赤色で示した箇所が還元された部分）。

1.4. ビールの官能評価

近年、クラフトビールの人気に伴い、ビールのおいしさの定義は多様化してきているが、一般的においしいビールとは、「外観」：琥珀色で清澄であること、きめ細やかな白い泡があること、「香味」：爽快な苦みがあること、特有の爽快感、清涼感のあること、コクがあり飲み飽きないこと、を満たすとされている（ビール酒造組合, 1999）。おいしいビールを継続的に醸造するためには、香味のコントロールが欠かせない。このため古くから、人間の感覚を用いて製品を判定する官能評価に基づくビール品質の安定化や向上が行われてきた。

ビールを飲んだ時に感じる香味をどのように分類、評価し、どのように検出するのかというのは非常に難しい問題である。たとえばビールの香気成分は少なくとも 800 成分以上とされている（Meilgaard, 1986）が、官能閾値を超えて存在している成分は数十成分程度であり、残りの多くは閾値以下の成分で構成されている。しかし、閾値を超える成分だけでビールらしい香りを実現できるかと言うとそうではなく、閾値以下の様々な香りの相互作用や相乗効果によって全体的なビールらしさは成り立っていると考えられている（Kishimoto, 2018）。さまざまな分析機器が発達している現在においても、人による官能評価は重要な役割を担っている。再現性よくビールの香りを評価するために、訓練された専門の評価者により、一定の温度や環境が整えられた専用の評価室で、分析型官能評価が行われている。分析型官能評価はサンプル間の差異の有無を判断する識別法とサンプルの香味特徴を詳細に評価する記述法の 2 種類に代表される。最初は識別法が普及したが、続いて感じた差異の内容を知るために記述法が用いられるようになってきた（古庄, 2020）。この記述法においてビールの味や香りの官能評価用語を共通化し、評価結果に関するコミュニケーションを正確かつ円滑に行なう必要性が国際的にクローズアップされ、American Society of Brewing Chemists (ASBC) 及び European Brewery Convention (EBC) といった国際団体により、香味用語体系を中心としたビール官能評価の国際標準法が作成された（American Society of Brewing Chemists, 1992, European Brewery Convention, 1998）。香味用語体系については、全部で、122 種類からなる香味用語が選定されたが、ビールのフレーバーホイール（Fig. 1-3）はそれらの官能評価用語のうち、主要な用語をわかりやすく図示したものであり、たとえば、フルーティ、ホッピー（ホップ様）、カラメルといったようにビールの香りが 30 個、たとえば苦味、酸味、ボディといったビールの味が 14 個に分類されて円形（ホイール）状に示されている。ビールの専門評価者はこれらの評価用語を用いて、ビールの特徴を点数化し、得ら

れたデータは主成分分析などの統計的な手法により解析され、複数のサンプルの香味特徴の把握に用いられる。この国際標準法に基づき、国内のビール会社によって構成されている、ビール酒造組合国際技術委員会（Brewery Convention of Japan: BCOJ）が中心となって、BCOJ 官能評価法が作られた（ビール酒造組合国際技術委員会（分析委員会），2002）。作成に当たっては JIS を始めとする官能評価に関する情報を参考に、国内での使用に際し実用的となるように留意されている。また、官能評価では香味用語が重要な意味を持つため、その翻訳に際しては日本と欧米の言葉や文化的背景の違いについても考慮されている。

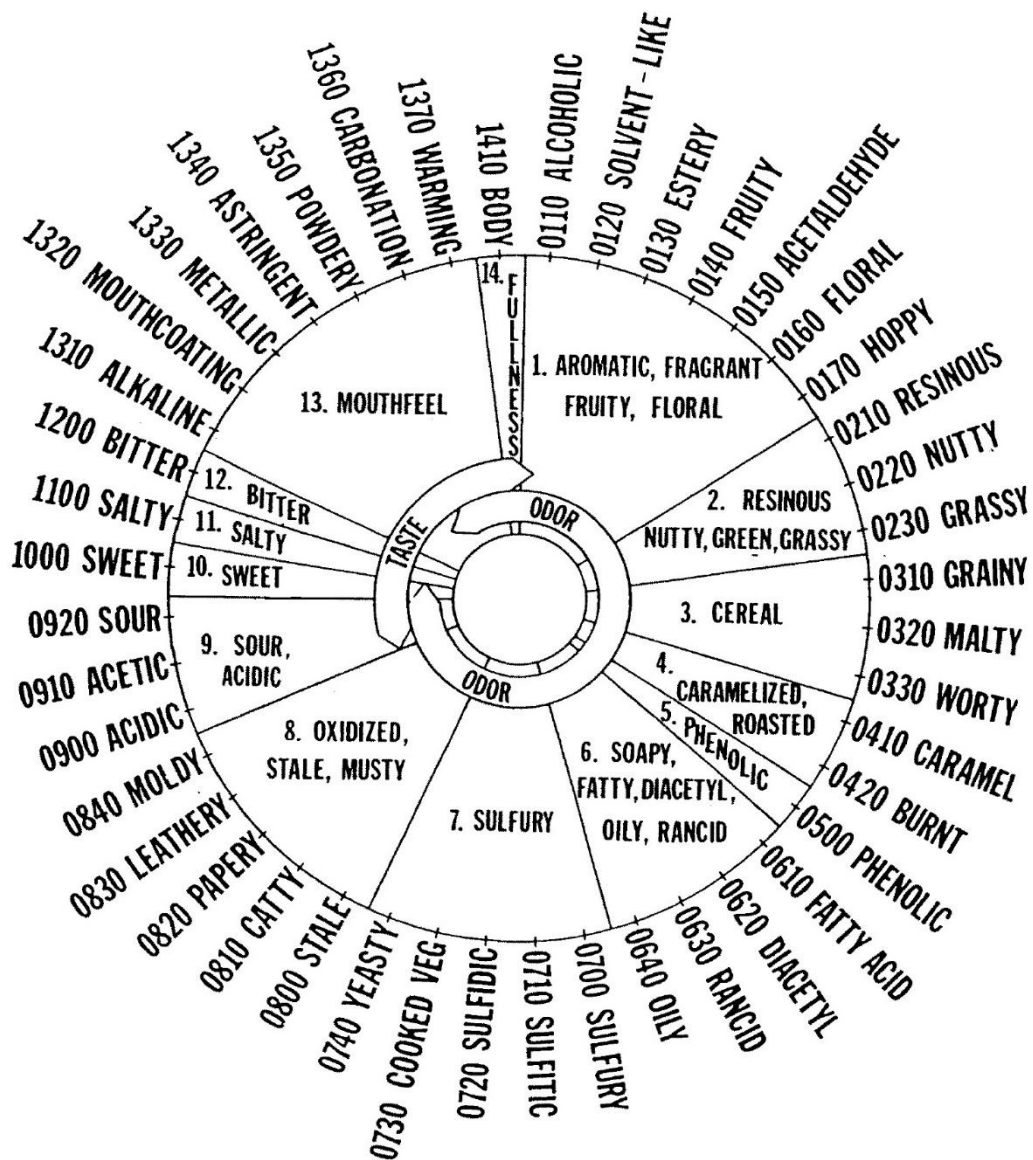


Fig. 1-3. ビールのフレーバーホイール

香味用語体系については、全部で、122 種類からなる香味用語が選定されたが、ビールのフレーバーホイールはそれらの官能評価用語のうち、主要な用語をわかりやすく図示したものであり、たとえば、フルーティ、ホッピー（ホップ様）、カラメルといったようにビールの香りが 30 個、たとえば苦味、酸味、ボディといったビールの味が 14 個に分類されてホイール状に示されている（古庄, 2020）。ビールの専門評価者はこれらの評価用語を用いて、ビールの特徴を点数化する。

1.5. ビールの香味を数値化する取り組み

ビールの官能評価については、もちろん訓練された専門家が評価を行うが、人間である以上、体調の変化や繰り返し飲用による感覚の麻痺は避けられないため、多くの製品を官能評価のみで比較するのは現実的ではない。そこで、分析機器の発展に伴い、ビールの香味を数値化する取り組みが行われてきた。分析結果と官能評価結果を紐づけ、寄与度の高い成分を見出し、その成分を官能評価に代わる分析指標とすることで、製品の改良や製造条件の変更に伴う、効果の検証の精度やスピードは格段に向上した。特定の香味に寄与する重要香味成分を同定するにはいくつかのステップが必要となる。まずは、ターゲットとする成分が鼻で感じる香気成分か、舌で感じる呈味成分かによって探索方法が大きく分類される。もちろんビールの渋味に寄与する成分として同定された Hordatine 類 (Kageyama, 2011) のように、呈味成分の例もあるが、ここでは、一般的に食品の“味”を決める要素の約 8 割を占めると言われている、香気成分の探索と同定について述べる。香気成分は揮発性成分であり、ガスクロマトグラフ (gas chromatograph; GC) により分析が行われる。

GC 分析では、注入口に試料が導入されると、気化室内で加熱されて気化し、キャリアガス (ヘリウム、窒素、水素など) によってカラム中を気化した試料が移動する。試料に含まれる様々な香気成分がカラム内部の固定相と吸着・分配等の相互作用を繰り返すことによって検出器までの到達時間に差が生まれ、最終的に様々な検出器 (例えば、水素炎イオン化検出器 (flame ionization detector; FID) や質量分析計 (mass spectrometer; MS) で検出される。一方で、数多くの香気成分のうち、実際に官能閾値を超える重要香気成分を探索するには、人の嗅覚を用いて香気成分を探索する方法が最も直接的である。効率的に人の嗅覚を用いて、香気成分を探索する手段としては、カラムの出口を匂い嗅ぎポートに接続し、人間が GC により分離された香りを嗅ぐ、匂い嗅ぎ GC (gas chromatography-olfactometry; GC-olfactometry) がある (Fig. 1-4)。MS では検出されないような微量成分も GC-olfactometry で検出されることがあり、重要香気成分を探索する最初のステップとしてなくてはならない手法である。GC-olfactometry による、香気成分のスクリーニング方法として CharmAnalysis (Acree, 1984) や、aroma extract dilution analysis (AEDA) が開発された (Grosch, 1994)。どちらの方法においても、香気抽出物を段階的に希釈し、それらの希釈液について GC-olfactometry を行う。CharmAnalysis では、希釈レベルと匂いが検出されている時間の双方に基づいて、チャームバリューが算出され、チャームバリューが高いほど香気寄

与度の高い成分として選定される。AEDA では、GC-olfactometry で検出される各匂い画分が希釈によってなくなるまで分析を繰り返し、匂いを検出できる最大の希釈率を flavor dilution factor (FD factor) と定義する。FD factor が高いほど、香気寄与度が高い成分として選定される。

GC-olfactometry によって、匂いの質および、匂いの強度に基づいて選定された香気画分は、主として GC-MS による分析を行い、成分の特定を試みる。GC-MS の MS スペクトルデータベースには豊富な化合物ライブラリが収録されており、たとえば NIST20 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, 2020 Edition) では、30 万化合物の MS スペクトルが収録されている。データベース検索によって成分の候補が明らかになった後は、標準物質と比較し、MS スペクトルの一致、GC の保持指標 (retention index ; RI) の一致、匂いの質の一致の 3 点をもって、匂い成分の同定となる。ただし、重要香気成分の中には、ビール中に極微量しか存在せず、かつ官能閾値の低い成分が存在する。つまり、GC-olfactometry では確かに匂いを感じられるが、GC-MS では検出されない成分については、同定することが困難である。しかしながら、閾値の低い成分は、極微量でビールの香味に大きく影響するため、その同定は非常に重要な課題である。このような成分を同定するためには、蒸留やカラムクロマトグラフィーといった各種前処理によって GC-MS で検出可能なレベルまで濃縮度や精製度を上げ、当該画分の MS スペクトルを得た後に、化合物ライブラリや文献情報から化合物を推定する。一方、MS スペクトルだけでは構造を推定できない未知化合物の場合は、高分解能質量分析 (high resolution mass spectrometry; HR-MS) により精密質量を算出して分子式を推定する。さらに、核磁気共鳴分光法 (nuclear magnetic resonance; NMR) により化合物に含まれる官能基の種類や原子核同士のつながりといった構造情報を得て、構造を推定することになる。ただし、一般的に NMR を用いた構造解析には数 mg の純度の高い試料が必要であり、1L のビール中に数 ng~ μg しか存在していない微量揮発性成分については、NMR 分析に必要な量を得られないことも多いため、分子式に加え、その部分構造情報も得られる HR-MS/MS による解析が有効と考えられる。

成分の特定がなされた後、ビール中に含まれるその香気成分の濃度を測定する。ターゲット成分を濃縮し、多量に存在する夾雑成分と分離するために、様々な前処理や GC への試料導入法が用いられている。ヘキサン、ジエチルエーテル、ジクロロメタンなどの低沸点有機溶媒により抽出し、溶媒を溜去して濃縮する溶媒抽出法が一般的に使われているが、この方法には、使用した有機溶媒より沸点の低い成分の抽出はできないという欠点がある。

また、疎水度の高い不揮発性の夾雑成分も一緒に濃縮されてしまう。不揮発性成分が GC の注入口に入ると、その高温によって熱分解やポリマー化などを起こし、分析の妨げとなる恐れがある。その場合は、試料をバイアル等の密閉容器にいれ、容器の気相部分（ヘッドスペース部分）に漂う揮発性成分を分析する手法が用いられる。揮発性成分の濃度が濃い場合は、ガスタイトシリンジを用いて直接気体を導入するが、濃縮が必要な場合は、揮発性成分を容器や吸着材に捕集する。容器として、テドラーバック等の樹脂製のバックや内部を真空にした金属やガラス性のものが、吸着材としては活性炭や Tenax と呼ばれる 2,6-diphenyl-p-phenylene oxide 樹脂、ポリジメチルシロキサン (PDMS)、ポリエチレングリコール (PEG) などの樹脂が用いられる。さらに検出感度を上げる方法として、誘導体化して測定する手法や、特異的吸着を利用したカラム抽出法がある。この様に、様々な方法を利用して安定的に濃度測定できる分析法が構築されている。

官能閾値が低く、微量しか含まれないにもかかわらず、食品の特徴を作り出す重要香気寄与成分の代表としてチオール類が知られている。チオール類は反応性が高く不安定であり、非常に繊細な分析法が求められる。富永らは、ワインで用いられるブドウ品種であるソービニオンブランの特徴香気を探すために、水銀を含有したトラップ試薬 (p-ヒドロキシ水銀安息香酸、p-HMB) を使用した前処理を行っている (Tominaga, 1998a)。ポルドー液を多く使用したブドウ畑においては、ソービニオンブランの特徴香気が乏しいワインしかできないという経験則に基づき、ソービニオンブランの特徴香気は、ポルドー液の硫化銅に吸着するチオール類であると考えられた。チオール類の検出には様々な方法が知られているが、その中でも p-HMB はチオール類と高い特異性を持ちつつ可逆的な結合が可能であることが報告されている (Jocelyn, 1987)。富永らは、ワインへ p-HMB を添加してチオール類をトラップした後、陰イオン交換カラムで p-HMB とチオールの複合体を保持し、システイン溶液でチオール類のみを溶出することで、チオール類を 1000 倍以上に濃縮することに成功した。この方法の利点は、操作が簡便で多検体を同時に処理できること、また、高純度にチオール類を含むため、GC-MS 等で容易に検出できることに加え、抽出された溶液中に求めている香りが存在しているかを、人が嗅いで判断できる点にある。

濃度の定量がなされた成分に対して、ビールの重要香気成分であるかどうかを確かめるため、odor activity value (OAV) を算出する。OAV は香気成分の食品中の濃度とその官能閾値の比であり、OAV 値を元にその成分の食品中の重要度を推定できると提唱されている (Patton, 1957)。OAV が 1 を超えていれば、その香気成分が人の官能閾値以上に含まれるということの意味し、その食品の香味に寄与している重要香気成分と言え

る。ただし、前述したように、実際には食品中の多様な成分との相互作用や相加、相乗効果により、OAV が 1 より小さくても食品の香気として必要な成分も存在する。その場合は、非常に手間がかかるが、香気の再構築やオMISSION（一つの成分あるいは成分群を除いたサンプルを作成する）を行い、その香味を評価することで、検討している成分の重要度を判断することができる。このように、官能評価でしかなかったビールの特徴を成分で表す検出系を構築することにより、製品の改良や工程の改善に加えて、製品中に狙った濃度の香味成分が含まれているかを確認できるため、定常的な最終製品の品質保証にも有効である。

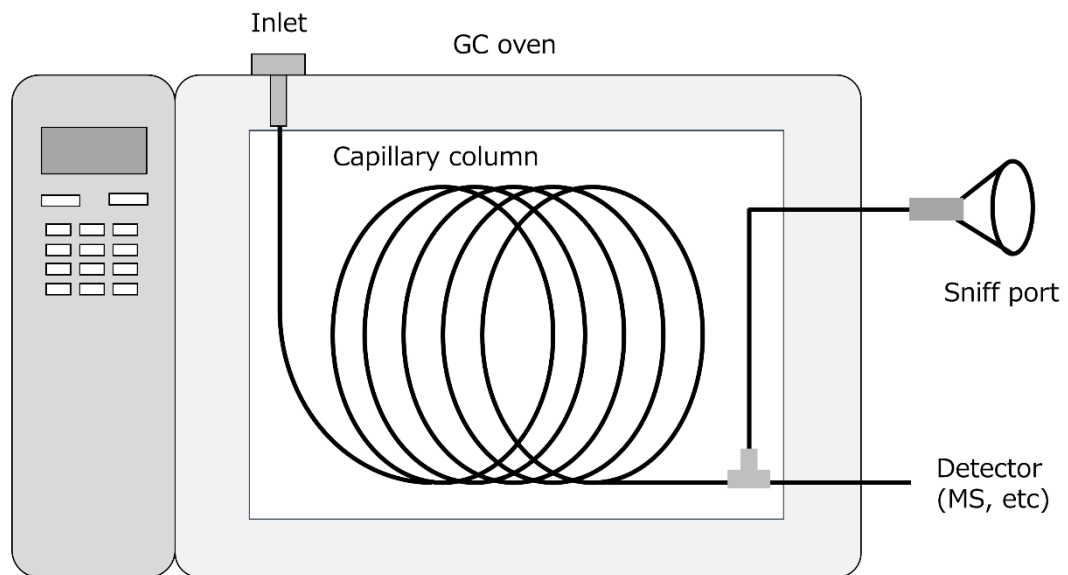


Fig. 1-4. GC-olfactometry システムの概略図と GC-olfactometry による香気評価
 効率的に人の嗅覚を用いて、香気成分を探索する手段として GC の検出器として人間の鼻を使用する。MS では検出されないような微量成分も検出されることがあり、重要香気成分を探索する最初のステップとして非常に重要である。

1.6. ビールにおける代表的なオフフレーバーとその対策について

オフフレーバーとは、その食品の本来のおいしさを損なう不快な香りや味として考えられている（岸本, 2013）。しかしながらすべての食品において共通のオフフレーバーとなる化合物があるわけではない。たとえば後に述べるダイアセチルは、発酵不順が原因で生成することからも、多くのビールではオフフレーバーとして考えられている一方で、バターや赤ワインの香気を構成する重要香り成分の一つである（Clark, 2015、Bartowsky, 2004、Mallia, 2008）。同様に酪酸やイソ吉草酸などは腐敗を想起させる香りであるが、納豆やチーズなどの発酵食品では逆に重要な特徴香である（Curioni, 2002、Tanaka, 1998）。このように、食品によって求められる香味品質は大きく異なり、オフフレーバーとされる成分も大きく変わる。ここでは、日本でもっとも飲用されているピルスナービールを対象に、これまでビール業界で注目されてきたオフフレーバーについて述べる。もちろん、ピルスナービールにおいても、その味は大きく異なり、すっきりとした味感のビールのほうがオフフレーバーが問題となりにやすい。

1.6.1. カビ臭

水や原料に由来するオフフレーバーであり、原因物質としては 2-methyl-isoborneol、geosmin、2, 4, 6-trichloroanisole（TCA）などである。これらの成分はカビや墨汁様の匂いとして知られ、水中での官能閾値は個人差が大きいものの数 ppt とされている（Young, 1996）。水源の藻類や放線菌が 2-methyl-isoborneol、geosmin を産生すると言われている（Gerber, 1965）。TCA の生成経路についてはいくつかの報告が存在するが、カビなどが 2, 4, 6-trichlorophenol をメチル化して TCA を生成すると言われている（Nyström, 1992）。カビ臭が原料用水に含まれていた場合、オゾンによって酸化し分解することで、取り除くことができる。しかしオゾン処理のような高度処理等を経て、塩素が除去されると、逆にカビなどの菌類が増殖しやすくなるため、高度処理後の水の管理や設備に残った水には注意が必要である。また湿気の多い場所に、麦芽、コーンスターチや米といったビールの原料、珪藻土などの濾過助剤を保管した場合、カビが発生し、ビール中へカビ臭が移行する可能性がある。このため、これらの保管管理も重要である。

1.6.2. ジアセチル

バター様の匂いを呈するオフフレーバーであり、原因物質としては、ジアセチルと呼ばれている 2, 3-butanedione である。同様の香調を有する 2,3-pentandione と合わせて、

vicinal diketone (VDK) とも呼ばれるが、2, 3-butanedione のビール中の官能閾値が 0.15 ppm に対し、2, 3-pentandione の閾値は 1.0 ppm (Meilgaard, 1975) と約 7 倍の差があり、2, 3-butanedione がオフフレーバーの主要成分である。日本の伝統的な生活の中で典型的なジアセチルの匂いを感じるのは、炊いたお米が腐りはじめたときであり、したがって、日本ではジアセチルは食品の品質低下の典型的な匂いとして認識されている (井上, 2004)。ビール中のジアセチルに関しては生成経路や、関与する酵素が特定されている。発酵中のビールでは、前駆体のアセト乳酸が、酵母によるアミノ酸合成の副産物として生成され (Strassman, 1958、Suomalainen, 1968、Inoue, 1969)、そのアセト乳酸が非酵素的な脱炭酸により自動分解されてジアセチルへ変化する。生成したジアセチルは酵母の還元酵素活性により、2, 3-butanediol に変換されて無臭となるが、ジアセチルの濃度が官能閾値よりも低下するためには、主発酵の後に熟成工程が必要とされる。しかしながら、酵母の還元力が不十分な状態 (発酵不順) の場合、ジアセチル濃度が発酵後も高くなり、それが製品まで移行するため問題となる。これらの知見に基づいて、アセト乳酸の生成酵素、アセト乳酸脱炭酸酵素によるアセトインへの変換、ジアセチルの還元酵素をターゲットに数多くの検討がなされており、ビール醸造におけるジアセチル臭の制御ポイントとして、酵母の活性、発酵条件、熟成工程の温度などが挙げられている (Gale, 2007)。また、遺伝子組換え酵母株の取得も行われているが、商業利用はされていない (Krogerus, 2013)。

1.6.3. 酸化劣化臭

ビールの保存中に増加してくる匂いであり、複数の成分が関与していると考えられるが、もっとも代表的な酸化劣化臭はカードボード臭である。カードボード臭は湿った段ボール様の匂いで、原因物質は Trans-2-nonenal (T2N) である。ビール中の官能閾値は 0.1 ppb という報告 (Palamand, 1969) や、軽快なピルスナービールでは 35 ppt でも感じられるという報告がある (Meilgaard, 1993)。T2N の生成機構については諸説あり、完全に解明されているわけではないが、麦芽の酵素による脂質の酸化が主な原因だと考えられている。麦汁を作る工程において、麦芽に含まれる酵素のリポキシゲナーゼ (LOX-1) により、リノール酸から 9-ヒドロペルオキシドが生成し、T2N へと分解される (Visser, 1971、Drost, 1990、Kobayashi, 1994、Yang, 1993、Yang, 1995、Walker, 1996)。そのため、T2N の低減法としては、主に仕込み工程で LOX-1 活性の至適温度帯を避け、脂質酸化を抑制する方法等が考えられている (Kobayashi, 1993)。し

かしながら、LOX-1 を持たない LOX レス大麦の麦芽でビールを醸造しても、37 °C 1 週間後の T2N 濃度は、対照の 1/3 程度にしか減少しなかった (Hirota, 2006) 。このことから、2/3 は LOX-1 による脂質酸化、残りの 1/3 は LOX-1 が関与しない T2N 生成経路が存在していると考えられる。近年、我々は、官能閾値を超えて存在しているビール香氣成分として、Cis-2-nonenal (C2N) を新たに見出した。C2N は T2N の構造異性体であるが、その香調はカードボード臭とは異なり、グリーン、ファッティ、プラスチック様で、ビールの劣化臭としての寄与はなかった。しかしながら、C2N をビールに添加して、保存すると T2N が未添加の製品と比較して有意に増加するため、T2N の新たな生成経路の 1 つとして考えられる (Noba, 2018) 。その他、ビールの保存中に T2N 由来の劣化臭が増加してくる理由として、発酵中にアミノ酸 (ペプチドやたんぱく質を含む) (Lermusieau, 1999) やシステイン (Baert, 2012) が T2N と無臭の付加体を形成した後、保存中に T2N が遊離して劣化臭が増すことが考えられている。

1.6.4. 微生物汚染によるオフフレーバー

ホップのイソアルファ酸はグラム陽性菌に対して、細胞膜内外のプロトン勾配を消失させることにより抗菌活性を示すと報告されている (Simpson, 1993) 。ビールは、イソアルファ酸の抗菌作用の他にも、pH が 4 前後と低いこと、数%のアルコールを含むこと、溶存酸素が低く、炭酸ガス圧が高いこと、酵母による発酵後のため栄養分が少ないことなどから、微生物的に安定な食品とされている。しかしながら、一部の微生物種はこのような過酷な条件でも生育することができ、ビールに混濁やオフフレーバーを引き起こすことが知られ、ビール混濁性微生物と呼ばれている (Suzuki, 2008) 。野生酵母のうち、*Saccharomyces diastaticus* は、沈殿、混濁の原因に加え、強いフェノール臭 (phenolic off-flavor, POF) を引き起こす (Meier-Dörnberg, 2018) 。同様に、*Brettanomyces* 属の酵母は 4-ethylphenol や 4-ethylguaiacol といったフェノール臭を産生する (Lentz, 2018) 。また、乳酸菌の中でも *Lactobacillus* 属菌および *Pediococcus* 属菌は、ドイツでのビールの微生物汚染事故の 80% 超で検出されている (Back, 2003) 。特に、*Pediococcus* 属菌はホップ耐性と低温における生育性が強く、発酵・熟成工程で乳酸とジアセチルを産生し、オフフレーバー発生の原因となることが多い (Sakamoto, 2003) 。また、近年のビール醸造技術の進歩によりビール中の溶存酸素量が劇的に減少したことで、偏性嫌気性細菌による微生物汚染が問題となり、*Pectinatus* 属菌と *Megasphaera* 属菌による汚染事故例が報告されるようになった (Jespersen, 1996) 。*Pectinatus*

属菌に汚染されたビールは著しく混濁し、硫化水素、methanthiolといった腐敗臭を想起させるオフフレーバーを発生させる。*Megasphaera cerevisiae* はアルコール 5.5% (w/v) 、pH 4.3 まで耐性がある偏性嫌気性菌であるとされ、アルコール度数の低いビールに著しい混濁を引き起こし、硫化水素、酢酸や酪酸、吉草酸といった匂いの強い短鎖脂肪酸類を産生することから、*Pectinatus* 同様、大きな被害を与える菌種である (Chelack, 1987) 。また、偏性嫌気性細菌の *Zymophilus* 属が醸造工程で使用した酵母液から単離されており、ビール醸造中に、酢酸とプロピオン酸を産生するという報告がある (Haikara, 2006) 。これらの菌の汚染については、ビールの製造工程のみならず、居酒屋等でのビール樽が汚染されてオフフレーバーが発生することもあり、ビール中の様々な微生物を迅速に検出する方法が開発され、衛生管理の現場で活用されている (Asano, 2009) 。

1.6.5. 含硫化合物

含硫化合物は閾値が低い成分が多く、濃度のコントロールが難しい場合が多い。発酵中に生成する、硫化水素は、腐卵臭を呈し、ビール業界では古くからその対応に取り組んできた。硫化水素は、システインやメチオニン等の含硫アミノ酸の代謝中間物であり、酵母の菌体外の硫酸イオンから、亜硫酸を経て生成する (Yoshida, 2008) 。たとえば窒素源が枯渇するとアミノ酸生合成経路が活性化し、その結果、硫化水素生成量が増加する (Giudici, 1994) 。近年、日本において多く販売されている発泡酒や第 3 のビールは麦芽使用比率が低く、その結果、麦汁に含まれる窒素源が低い場合が多い。その状態で酵母が増殖しようとする、硫化水素が過剰に生成しやすくなってしまふ。発酵温度やエアレーション量の制御などによって酵母の増殖スピードを制御しながら発酵させる施策が行われている。

日光臭 (lightstruck flavor) は、ビールに日光や、蛍光灯などによる光があたることにより生成するオフフレーバーで、3-methyl-2-butene-1-thiol (MBT) が原因物質である (Kuroiwa, 1963) 。匂いの質としては、スカンクやキツネの尿のようなケモノ臭と言われている。匂いの官能閾値は極めて低く、2 ppt という報告がある (Masuda, 2000) 。MBT はビールの苦味成分であるイソアルファ酸 (Fig. 1-2) に由来し、その生成機構は以下のように考えられている。350~500 nm の紫外~青色の光がビールにあたると、光増感剤であるリボフラビン等が励起し、イソアルファ酸類の側鎖へエネルギーを受け渡すことで開裂してアリルラジカルが生成する。アリルラジカルとシステイン等の硫黄を含むアミノ酸類が反

応して、MBT が生成する (De Keukeleire, 2008)。瓶ビールを光から守るため、多くのビール瓶には 500nm 付近の青色光の透過率が低い茶色の瓶が使われている (Sakuma, 1991)。また、日本では食品衛生法上許可されていないため使用されていないが、海外では、反応部位であるカルボニル基を還元した Rho-イソアルファ酸や、二重結合を水素化した Tetrahydro-イソアルファ酸 (Fig. 1-2) を用いることで、MBT が生成しないビールが販売されている。余談ではあるが、日本人にとって、MBT はビール飲用時以外には経験のない匂いであり、嫌悪感を示さない人が多い。それを逆手にとり、あえて MBT を添加することで、ビールらしいと消費者が感じるノンアルコールビールが販売されている (Ito, 2017)。

タマネギ、汗様のオフフレーバーについても日光臭同様、古くからその存在が知られてきた。タマネギ様オフフレーバーの発生に関連するいくつかの要因として麦汁中の沈殿物の量 (Ahvenainen, 1979) および麦汁の空気酸化 (Liebenow, 1967, Bärwald, 1971) などが報告されている。遠心ポンプや高圧ホモジナイザーによる麦汁の機械的な攪拌についても、タマネギ様オフフレーバーに寄与すると考えられている (Narziss, 1978)。過去の研究によると、タマネギ様オフフレーバーは発酵中に生成され、硫酸銅をビールに加えることで消失することが示されている (Liebenow, 1967)。この事実は、前述したソービニヨブランの特徴香と同様、チオール類が原因物質と考えられる。しかしながらその原因物質としては、複数の候補が報告されており、Olsen らはタマネギ様オフフレーバーを持つビールから、2-mercapto-3-methyl-1-butanol (2M3MB) を検出した (Olsen, 1988)。その後、2M3MB の 2 つの構造異性体、3-mercapto-3-methyl-1-butanol (3M3MB) および 3-mercapto-2-methyl-1-butanol (3M2MB) も、タマネギ様オフフレーバーを持つビールで検出された (Kishimoto, 2006, Vermeulen, 2006)。これらの成分はどれもチオール類であり、いずれの官能閾値も非常に低いことが予想される。

1.7. タマネギ様オフフレーバーの生成機構について

タマネギ様オフフレーバーについては、その他のオフフレーバーと異なり、原因物質、その生成機構ともに不明な点が多い。前述したとおり、ビール中から、タマネギ様の匂いを呈する複数の構造異性体のチオール類 (2M3MB, 3M3MB, 3M2MB) が報告されているが、それらのチオール類の官能閾値やビール中の OAV 値は報告されておらず、どれが実際の寄与成分か不明であった。また、経験則に基づき、ビールの醸造工程中において麦汁中の沈殿物、空気酸化、攪拌等の影響が報告されているが、それらの要因と匂いの原因となるチオー

ル類の濃度が紐づけられておらず、実際にタマネギ様オフフレーバーを引き起こす要因が定かではない。オフフレーバーを制御するためには、その生成機構の解明が不可欠であるため、様々な研究と推測がなされてきた。Olsenらはタマネギ様オフフレーバーが酵母による発酵中に生成し、ホップを含まない麦汁の発酵液からは検出されないことから、2M3MBはホップ由来の成分であり、3-methyl-2-buten-1-olから生成したと推測している（Olsen, 1988）。硫化水素と3-methyl-2-buten-1-olを反応させると2M3MBが生成し（Vermeulen, 2006）、さらに、パイロットプラント規模でのビール製造において、10 µg/mLの3-methyl-2-buten-1-olを添加した麦汁を発酵させると、無添加の場合と比較して2M3MBと3M3MBがそれぞれ0.2から1.8 ng/mL、1.6から7 ng/mLに増加したと報告されている（Gros, 2008）。その結果、3-methyl-2-buten-1-olが2M3MBと3M3MBの両方の前駆体であると推測されているが、麦汁中にどの程度の3-methyl-2-buten-1-olが含まれているかは明らかにされていない。

2M3MBと3M2MBはビールからの検出例があるのみだが、3M3MBについては、さまざまな食品や動物からの報告例が知られている。コーヒー、ワイン、パッションフルーツジュースからの検出事例（Holscher, 1992、Tominaga, 1998b、Tominaga, 2000a）に加え、興味深いことにネコの尿中からも検出されている（Mattina, 1991）。

コーヒー：3M3MBとそのギ酸エステルが検出されており、ギ酸エステルは、カシス様香気、コーヒーのロースト感に寄与している（Czerny, 1999）。また、コーヒー中の重要揮発性成分としてプレニルアルコール（前述の3-methyl-2-buten-1-ol）が知られており、焙煎前のコーヒー豆中には0.5 mg/kg存在している。ロースト中の加熱と圧力により、含硫アミノ酸から硫化水素が生成し、硫化水素と3-methyl-2-buten-1-olがMarkovnikov則に基づいて反応することで、3M3MBが生成すると考えられている（Holscher, 1992）。

ワイン：ソービニオンブラン種のワインから3M3MBが検出され、その官能閾値は1.5 ng/mLであると報告されている（Tominaga, 1998b）。しかしながら、OAVは常に1以下で、最も濃度が高いゲヴェルトラミネール種のワイン中で、1.3 ng/mLであった（Tominaga, 2000b）。このため、3M3MBの生成機構については詳細が調べられていないが、同時に検出されワインの特徴香に寄与しているチオール類である、マスカット様の香気を持つ4-mercapto-4-methylpentan-2-one（4MMP）およびパッションフルーツ様の香気を持つ3-mercaptohexanol（3MH）については、その生成機構が解析されている。いずれも、含硫アミノ酸のシステインとの抱合体（Cysteine S-conjugate）も

しくはシステインを含むペプチドであるグルタチオンとの抱合体 (Glutathione S-conjugate) としてブドウ果汁中に存在し、C-S 結合を切断する酵素であるβリアーゼによって、チオールが遊離すると考えられている。実際、ブドウの抽出液に、βリアーゼ活性を持つ腸内細菌 (*Eubacterium limosum*) の抽出液を反応させると、遊離のチオール類が検出される。また、酵母による発酵中に 4MMP の濃度は数十倍、3MH の濃度は数百倍に増加した (Tominaga, 1998c)。ワイン同様に、ビールにおいてホップ由来のチオールとしても 4MMP や 3MH は報告されている (Kishimoto, 2006)。さらに、ワインのブドウ果汁と同様、ホップ中のチオールのシステイン抱合体について報告があり、ホップにβリアーゼを作用させると、チオール類が増加すると報告されている (Gros, 2013)。このことから、ビールのチオール類の中には、抱合体から遊離して生成する成分も存在していると考えられる。

パッションフルーツ：3M3MB とその酢酸エステルが検出されており、酢酸エステルはグレープフルーツの皮を想起させる匂いと言われている。パッションフルーツの抽出液に対し、βリアーゼ活性を持つ腸内細菌 (*Eubacterium limosum*) の抽出液を反応させると 3M3MB が検出されたことから、3M3MB-Cys S-conjugate が存在していると推察された (Tominaga, 2000a)。

ネコ：ネコの尿特有の匂いの探索の結果、3M3MB およびそのギ酸エステルが尿中から検出されている (Miyazaki, 2006)。さらにネコ特有の現象として、尿中にタンパク質が含まれることが知られている。通常、腎臓で老廃物とともに血液中のタンパク質はろ過されるが、その後吸収されて再利用されるため、健康な動物の尿にはタンパク質はほとんど検出されない。しかし、ネコは腎臓の機能が正常でも尿に大量のタンパク質を排泄するユニークな生理現象を持っている。尿中に含まれるタンパク質はカルボキシルエステラーゼ類似酵素であり、「好奇心」という言葉からコーキシン (cauxin) と名付けられた (Miyazaki, 2003)。cauxin の機能解析により、ネコの尿に含まれている化合物として古くから知られていた felinine (3M3MB-Cys S-conjugate) は、cauxin によって、3M3MB-CysGly (グルタチオン抱合体からγグルタミル基が外れたジペプチド) から生成していることが明らかとなった (Miyazaki, 2006)。felinine からβリアーゼ等により、酵素的に分解されて 3M3MB が生成した可能性に加え、合成した felinine は保存中に猫の尿と似た匂いへと変化したと報告されている (Hendriks, 1995)。このことから猫の尿中においても、felinine が 3M3MB へと非酵素的に分解した可能性もある。felinine および cauxin は

オス猫に特異的に多く、3M3MB はネコの性識別のフェロモンとして機能していると考えられている。

1.8. 本論文の目的と構成

以上、これまで述べてきたような過去の報告をまとめると、ビールのタマネギ様オフフレーバーの生成機構については、Fig. 1-5 のように、システインもしくはシステインを含むペプチドと抱合したチオールの前駆体が存在し、それが発酵中に酵母によって切断され遊離してくる可能性と、もしくは 3-methyl-2-buten-1-ol のような 2 重結合を持つアルコール類に硫化水素由来の SH ラジカルが付加してチオールが生成する可能性が考えられる。これらの先行研究に基づき、ビール中のタマネギ様オフフレーバーをなくすために、①オフフレーバーの寄与成分を明らかとし、②その寄与成分の生成に必要な因子を特定し、③関与している成分を定量可能な状態とし、④最後に、生成機構の全体像を把握することで、もっとも効果的な対策を打つことができる状態を目指して研究を行った。

本論文は 6 章より成り立っている。第 1 章では、緒言としてビールのオフフレーバー全般と本研究の背景について述べた。第 2 章において、私は官能評価と匂い嗅ぎ GC を組み合わせ、タマネギ様オフフレーバーの寄与成分の推定を行った。また、チオール類の定量系を構築し、市販ビール類中のチオール類の定量を行った。官能閾値と定量結果より、OAV を算出し、ビール中に閾値以上含まれている成分の特定を行った。さらにその成分に対して、これまでに報告されてきたビール醸造工程中の生成要因について、どれが実際にタマネギ様オフフレーバーの生成に関与しているのかを明らかにするため、再現試験を行った。続いて、第 3 章においては、これまでに考えられてきたチオールの前駆体について、添加試験を行った。さらに、蒸留やカラムクロマトグラフィーを用いて、ホップに含まれる新規前駆体の探索と同定を行った。第 4 章では、チオールの新規前駆体がビールの醸造工程中においていかに最終生成物であるチオールへと変換されるのか、その反応機構について反応中間体の観点から調査し、ビール発酵中の成分挙動とモデル試験系とを組み合わせることで生成経路を推定した。第 5 章では、チオール生成に関与している酵母の酵素について調査した。酵母から酵素を抽出し、分取カラムクロマトグラフィーにより精製し、酵素の同定を行った。さらに遺伝子破壊株および大腸菌の過剰発現株を作成し、同定した酵素の機能を解析した。第 6 章では、第 2 章から第 5 章までの結果を総括した。

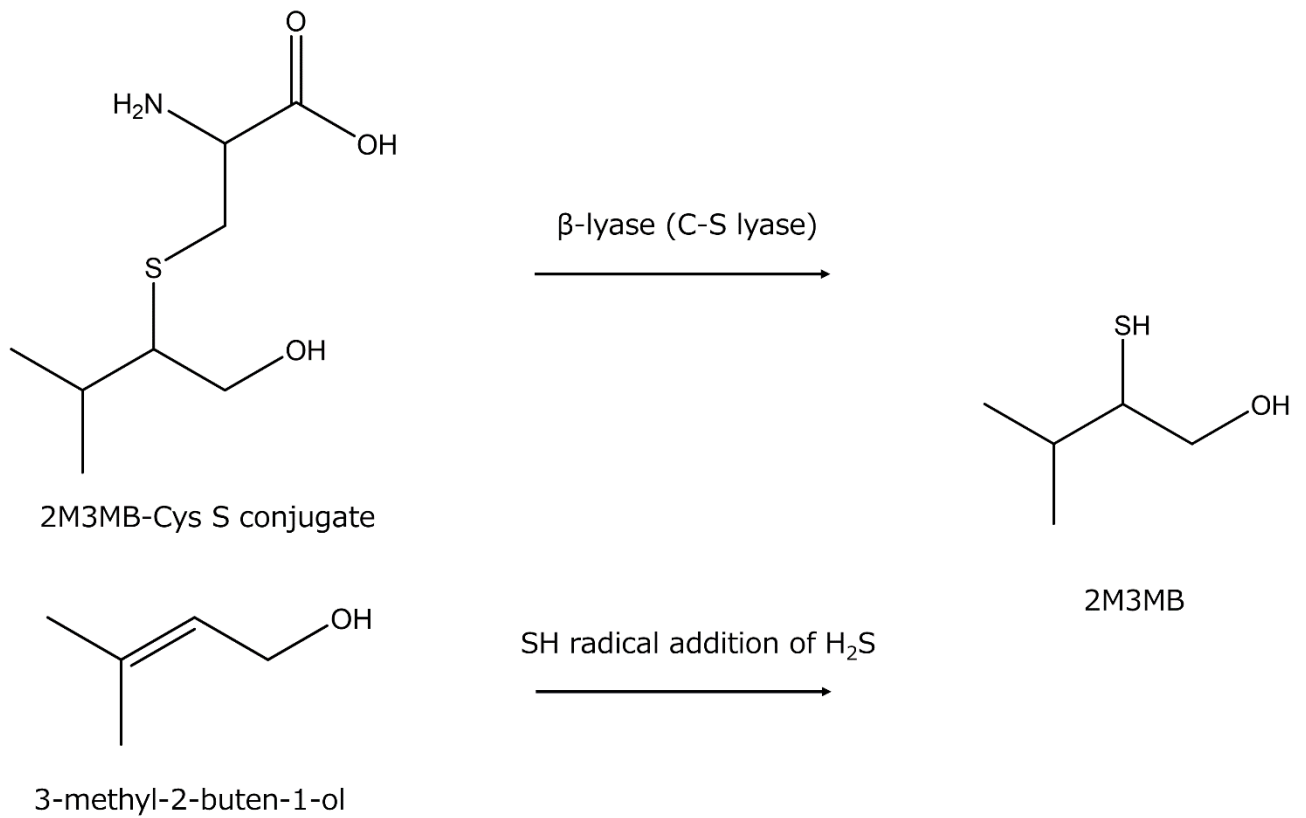


Fig. 1-5. チオール類生成機構仮説

システインもしくはシステインを含むペプチドと抱合したチオールの前駆体が存在し、発酵中に酵母によって切断され遊離してくる機構と 2 重結合を持つアルコール類に硫化水素由来の SH ラジカルが付加してチオールが生成する機構が考えられていた。

第 2 章

ビールのタマネギ様オフフレーバーの原因成分の探索と その要因調査

2.1. 緒言

揮発性のチオールは、牛乳、コーヒー、ワイン、ビールなど、さまざまな食品や飲料の香りに寄与する強力な匂い成分である (Roy, 2000)。それぞれの化合物は、食品中において低濃度であっても、官能閾値が低いいため、高い OAV を持つ (Blank, 2002)。第 1 章で述べたように、古くから知られているビールのオフフレーバーの一つである、タマネギ様オフフレーバーについてはいくつかのチオール類が検出されているものの、その寄与成分については不明のままであった。本章は、官能評価によりタマネギ様オフフレーバーを有するビールを用いて、GC-olfactometry によりビールのタマネギ様オフフレーバーの原因成分を探索した。官能評価とチャームバリューの相関から成分の絞り込みを行い、重要成分と思われたチオール類の官能閾値および定量系を構築した後、市販のビール類製品中の定量値と官能閾値に基づいて、OAV を算出した。さらに、同定された化合物の濃度と、過去にビール醸造の経験に基づいて報告されてきたタマネギ様オフフレーバーの要因との、関係を検証した。最後に、タマネギ様オフフレーバーの前駆体の起源について、過去の報告にある 3-mercapto-2-methyl-1-butanol の定量系を構築し、その麦汁中濃度とタマネギ様オフフレーバー量との相関性について調べた。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 試薬

2M3MB (95.0%) と D₈-2M3MB (95.0%) はナード研究所 (Hyogo, Japan) の合成品を用いた。3M2MB (95.0%) は三栄源 FFI (Osaka, Japan) より分けていただいた。3M3MB (98.0%)、3-methoxy-1-butanol (98.0%) および 3-methyl-2-buten-1-ol (3MBol, 98.0%) は 東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。ジクロロメタン (残農分析用)、硫酸アンモニウム (99.5%)、無水硫酸ナトリウム (残農分析用) は関東化学 (Tokyo, Japan) より購入した。

2.2.2. ビールサンプル

日本で市販されているピルスナータイプのビール、発泡酒、第 3 のビール、ノンアルコールビールの合計 32 サンプルを購入した。発泡酒は麦芽含有量が 67%未満のアルコール飲料であり、第 3 のビールは麦芽不使用または発泡酒に蒸留酒を加えたアルコール飲料である。これらの飲料はすべて、日本の酒税法で定義されている。これらのサンプルのアルコール含有量は、0%から 5%の範囲であった。

2.2.3. GC-olfactometry

同じブランドで、異なる醸造所で製造された 7 個のピルスナータイプのビールを使用し、タマネギ様オフフレーバーを持つ成分を探索した。以下のように、これらのサンプルから揮発性成分を抽出した。300 mL のサンプルに 100 mL のジクロロメタンを加え 4 °C で 1 時間、エマルジョンを作らないよう穏やかに攪拌しながら抽出した。分液漏斗を使用してジクロロメタンおよび水層を分離し、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで 30 分間乾燥させた。ロータリーエバポレーター (N-1210BV, EYELA, Tokyo, Japan) を使用し、400 mmHg で 1 mL まで濃縮した。

GC-olfactometry は、DATU, Inc. (NY, USA) による匂い嗅ぎ装置つき Agilent 6890 ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用した。GC のカラムは、DB-Wax キャピラリーカラム (Agilent Technologies; 長さ = 15 m; 内径 = 0.32 mm; 膜厚 = 0.25 μ m) を使用し、キャリアガスとしてヘリウム (1 mL/min) を一定流量流して分離を行った。匂い嗅ぎポートへの加湿空気の流量は 60 °C、30 mL/min に設定した。1 μ L のサンプルをスプリットレスモードで注入し、注入口の温度は 225 °C、オーブンの温度は 6 °C / 分の速度で 40 °C から 230 °C (20 分間保持) に上昇するように設定した。各ビールサンプルのジクロロメタン抽出物に対しジクロロメタンを加えて段階的に 3ⁿ 倍に希釈した (n = 0-2)。Charmware (DATU, Inc.) を使用して、溶出する成分に対する定量的な強度、チャームバリューを算出した。一連のアルカン (C10-C32) を水素炎イオン化検出器 (FID) により分析し、リテンションインデックス (RI) を算出した。

2.2.4. 2M3MB および 3M3MB の定量

ビールおよび麦汁サンプル中の 2M3MB および 3M3MB の定量のために、サンプルを p-

ヒドロキシ水銀安息香酸ナトリウム (p-HMB) で抽出し、岸本らの方法に従って、多次元 GC で分離した (Kishimoto, 2008)。2M3MB および 3M3MB の定量的ために以下のように修正し、記載されていない部分に関しては文献に従った。エタノールで希釈した 100 μL の D₈-2M3MB (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ メチル基とメチレン基が選択的に重水素化された D₈-L-バリンから合成) を 100 mL のビールまたは麦汁サンプルに内部標準物質として添加した。オープン温度は、50 °C (1 分間保持) から 10 °C/min の速度で 150 °C (16 分間保持)、その後 300 °C まで 10 °C/min の速度で上昇するよう設定した。キャリアガス (ヘリウム) は流量 1 mL/min で流した。ハートカット領域は 4.9~7.8 分に設定し、2 次元目のカラムに注入した。2 個目のオープン温度は、50 °C (10 分間保持) から 5 °C/min の速度で 150 °C まで上昇し、その後 10 °C/min の速度で 230 °C (5 分間保持) まで上昇するよう設定した。ヘリウムキャリアガスは一定流量 (1 mL/min) で流した。質量分析装置は 70 eV の電子衝撃イオン化 (EI) 法でイオン化し、選択イオン (SIM) モードで 2M3MB の場合は m/z 89 および 120、3M3MB は m/z 86、69、120、D₈-2M3MB は m/z 128、97 を検出した。標準添加法にて標準試薬を 0~2.0 ng/mL の範囲の濃度で添加したビールおよび麦汁サンプルから検量線を作成した。サンプル中の 2M3MB または 3M3MB の濃度が 2.0 ng/mL を超えた場合、サンプルを希釈して再分析した。

2.2.5. 官能評価

ピルスナータイプのビールのタマネギ様オフフレーバーの強さは、5 人訓練されたパネルを使用して評価した。事前のオリエンテーションとしてディスカッションを通じ、臭気強度が最も強いサンプルと最も弱いサンプルを選択した。続いてビールサンプルを 8 °C、無提示で提供し、パネリスト間で異なる順序で評価した。パネリストには、各サンプルの全体的なタマネギ様オフフレーバー強度を評価するように教示した。臭気強度は、次のスケールで評価した (0.5 間隔 : 0 = 知覚できない。1 = 弱い; 2 = 平均的 ; 3 = 強い)。2M3MB および 3M3MB の官能閾値は、American Society of Brewing Chemists (ASBC) の方法 (American Society of Brewing Chemists, 1980、Brown, 1978) に従って、8 人の訓練されたパネルを使用し、官能評価により算出した。2M3MB の場合は 0.1 から 1.6 ng/mL、3M3MB の場合は 1.0 から 64 ng/mL の範囲の濃度で、タマネギ様オフフレーバー (Table 2-1、サンプル 4 を参照) が検出されなかったビールに対してそれらの化合物を添加した。パネリストは、6 水準、1 水準あたり 3 個のビールを含むセットを受け

取り、3点識別（ラベルのない2つのコントロールサンプルと1つのテストサンプルで構成される）を実施した。評価用のサンプルは、2倍希釈系列で作成され、もっとも濃度の低い水準から順に評価した。

2.2.6. ビールの醸造

麦汁は二条大麦麦芽を使用し、麦汁のエキスの初期比重が 12.0 °P となるように調製した。ナゲット種のホップ（11.6%アルファ酸、John I. Haas, Inc. WA, USA）を1時間の煮沸工程の開始時に 2 g/L 添加した。無ホップ麦汁は、通常の麦汁と同じ方法で作成し、ホップの添加と煮沸のプロセスは除外した。200 mL の麦汁に 20×10^6 cells/mL の酵母を加え、15.0 °C で6日間発酵させた。発酵液を $9000 \times g$ で15分間遠心分離し、2M3MB および 3M3MB または 3MBol を定量した。

2.2.7. 麦汁のホットエアレーション

500 mL の麦汁を 20~90 °C の水浴を使用して加熱し、ガラス管を通して 2 L/min で1~20分間エアレーションし、その後、氷水した。対照として空気の代わりに窒素ガスを使用し、麦汁に対するエアレーションの物理的影響を相殺した。ホットエアレーション以外の工程は上記と同様に実施し、得られた麦汁と発酵後のビール中の 2M3MB、3M3MB、3MBol の濃度を測定した。

2.2.8. 3MBol 添加試験

0、1、10、100、および 1000 µg/mL の水準で 3MBol を添加した無ホップ麦汁サンプルを使用した。100 および 1000 µg/mL の濃度水準においては 3MBol 標準液を直接添加し、それ以外のサンプルについては、3MBol のエタノール希釈液を添加した。3MBol の添加以外は上記と同様に実施し、得られた麦汁と発酵後のビール中の 2M3MB、3M3MB、3MBol の濃度を測定した。

2.2.9. 3MBol の定量

30 g の麦汁サンプルに 5 µg の 3-methoxy-1-butanol（内部標準）と 6 g の硫酸アンモニウムを添加した。続いて 5 mL のジクロロメタンで 25 °C、15分間振とう抽出した。ジクロロメタン層を分離し、無水硫酸ナトリウムで 30分間乾燥させ、窒素ガス下 100 µL に濃縮した。GC-MS 分析は、Agilent 7890 ガスクロマトグラフに接続された

MSD5975C 四重極質量分析計 (Agilent Technologies) にて実施し、DB-WAX キャピラリーカラム (Agilent Technologies、長さ= 30 m、id = 0.25 mm、膜厚= 0.25 μm にて分離した。キャリアガスとしてヘリウムを一定流量 (1 mL/min) で流し、1 μL のサンプルをパルススプリットレス法で注入した。注入口の温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、オーブンの温度を 40 $^{\circ}\text{C}$ (5 分間保持) から 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で 240 $^{\circ}\text{C}$ (5 分間保持) に上昇するように設定した。70 eV の EI 法でイオン化し、3-methoxy-1-butanol は m/z 59、89、71、および 3MBol は m/z 86 and 71 を検出した。0~60 ng/mL の範囲の 3MBol を添加した麦汁を使用して、検量線を作成した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. GC-olfactometry

試験に供した 7 個のビール中のタマネギ様オフフレーバーの強度は、官能評価によって事前に決定した (Table 2-1)。次に、それらのサンプルの溶媒抽出液を用いて、GC-olfactometry を行った。Charmware を使用して、各画分のタマネギ様オフフレーバーのチャームバリューを算出した (Acree, 1993)。タマネギ様オフフレーバーは Table 2-2 に示すように RI 1645 と RI 1715 の 2 つの異なる画分に検出され、RI 1645 の画分はほとんどのサンプルで最大のチャームバリューを示した。RI 1645 のチャームバリューと香気強度の間の相関係数は 0.97 であり、RI 1715 のチャームバリューと香気強度の間の相関係数は 0.46 であった。この結果から RI 1645 の画分が、タマネギ様オフフレーバーの主要成分であると推定された。RI 1645 の画分に含まれる成分を、GC-MS にて探索したところ、2 つの化合物 2M3MB と 3M3MB が含まれていると推定された。それぞれの化合物は RI 値、香調がほぼ同じであり、実際にこれら 2 つの化合物を同時にビールに添加し、GC-olfactometry を行ったところ、RI 1645 と同様な評価が得られたことから、RI 1645 の画分に 2 成分が重複して存在すると結論した。RI 1715 の画分についても、同様な RI 値、標準化合物の香調、および標準化合物を添加したビールの GC-olfactometry の結果から、同画分に含まれるオフフレーバーとして 3M2MB を同定した (Fig. 2-1)。タマネギ様オフフレーバーの官能強度と相関の高かった RI 1645 の画分には 2 種類の成分が含まれているため、2 成分のどちらがビール中のタマネギ様オフフレーバーに寄与しているか GC-olfactometry だけでは決定することができなかった。このため、2M3MB と 3M3MB の官能閾値の測定とビール中の濃度分析を行うことにした。

Table 2-1. ビール中のタマネギ様オフフレーバーの平均強度

Sample	Odor intensity	Standard deviation
1	2.2	0.8
2	3.0	0.0
3	0.4	0.2
4	0.0	0.0
5	0.2	0.3
6	2.8	0.4
7	2.8	0.4

7 個のビール中のタマネギ様オフフレーバーの強度は、官能評価によって決定した (Noba, 2017)。

Table 2-2. RI 1645 および RI 1715 のチャームバリュー

RI	Odor property	Compound	Charm value						
			Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7
1645	onion	2M3MB & 3M3MB	488	483	154	44	11	513	433
1715	onion	3M2MB	93	144	19	9	41	29	4

タマネギ様オフフレーバーは RI 1645 と RI 1715 の 2 つの異なる画分に検出され、RI 1645 の画分はほとんどのサンプルで最大のチャームバリューを示した。RI 1645 のチャームバリューと香気強度の間の相関係数は 0.97 であり、RI 1715 のチャームバリューと香気強度の間の相関係数は 0.46 であった。この結果から RI 1645 のピークが、タマネギ様オフフレーバーの主要成分であると推定された (Noba, 2017)。

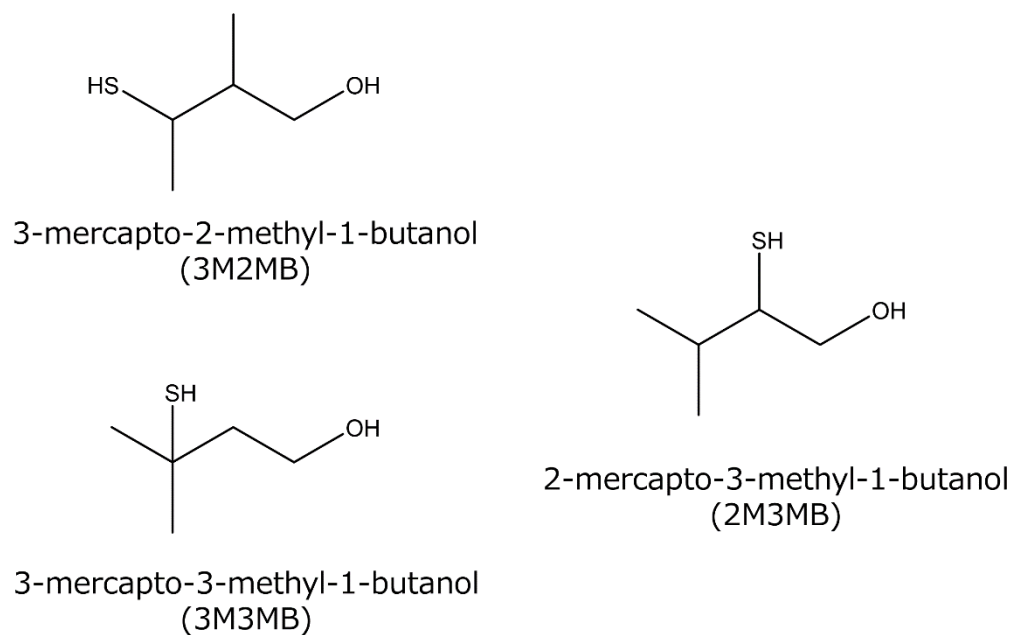


Fig. 2-1 3M2MB、3M3MB、2M3MB の構造

RI 1645 の画分および、RI 1715 の画分に含まれる成分を、GC-MS にて探索したところ、2M3MB、3M3MB および 3M2MB が含まれていると推定された。これらの標準化合物の RI 値、標準化合物の香調、および標準化合物を添加したビールの GC-olfactometry の結果から、同画分に含まれる成分として同定した。

2.3.2. ビールの 2M3MB および 3M3MB の香りの官能閾値

ピルスナータイプのビールの 2M3MB および 3M3MB の官能閾値は、ASBC 法に従って測定した。その結果、2M3MB および 3M3MB の官能閾値は、それぞれ 0.13 および 17.5 ng/mL であることが明らかとなった。ビール中の 3M3MB の官能閾値は、富永ら (Tominaga, 1998a) が報告した、水で 1.3 ng/mL、アルコール水溶液で 1.5 ng/mL (12 v/v%) の約 10 倍だった。この結果はビールに含まれる複雑なマトリックスに起因する可能性が考えられる。一方、ビールの 2M3MB の官能閾値は、3M3MB の官能閾値の 100 倍以上も低かった。構造異性体の官能閾値の大きな差として、3-メルカプト-2-メチル-ペンタノールの構造異性体の官能閾値はジアステレオマーの官能閾値の 1000 倍低いことが示されている (Lüntzel, 2000) 。このように、香気の官能閾値はその立体構造に強く依存していると考えられる。

2.3.3. 2M3MB および 3M3MB の定量

ビール中のこれらのチオール類の OAV を算出するため、2M3MB および 3M3MB の定量法を開発した。分析の前処理は富永らによって開発されたチオールの定量法を改良した (Tominaga, 2006) 。2M3MB と 3M3MB は 1 個のカラムでは十分に分離されなかったため、多次元 GC-MS を使用した。分析法の日内併行精度 (RSD%) は 10% 未満であり、日間併行精度 (RSD%) は 20% 未満であった (Table 2-3) 。S/N 比に基づく定量限界は、官能閾値より十分低かった。2M3MB (S/N = 28) または 3M3MB (S/N = 19) の典型的なクロマトグラムを Fig. 2-2 に示した。これらの結果から、開発した方法は両成分とも官能閾値の 1/10 まで高感度に測定できることが分かった。

2.3.4. ビール中の 2M3MB および 3M3MB の濃度

合計 32 個のピルスナータイプのビール類中の 2M3MB および 3M3MB の濃度を測定し、各サンプルの OAV を算出した (Table 2-4) 。OAV は、サンプル中の成分の濃度と官能閾値の比として計算した。2M3MB の OAV はほとんどのサンプルで 1.0 を超えていたが、3M3MB の OAV はすべてのサンプルで 0.1 未満であった。この結果から、2M3MB だけがビールのタマネギ様オフフレーバーに寄与していると示された。解析対象としたビールの 90% 以上で、2M3MB の OAV が 1.0 を超えていた。対照的に、発泡酒と第 3 のビールの約 50% が 2M3MB の OAV が 1.0 を超えていた。ビールと他の 2 つのカテゴリの主な違

いは麦芽使用率であるため、これらの結果は、麦芽の特定の成分が 2M3MB の濃度に影響したことを示唆する。さらに、ノンアルコールビールでは 2M3MB も 3M3MB も検出されなかった。ノンアルコールビールの製造では酵母が使用されていないことを考えると、これらのチオールは酵母によってビール醸造過程に生成することが示唆された。

Table 2-3. 2M3MB および 3M3MB 定量法のバリデーション試験結果

	2M3MB	3M3MB	
Linearity (0.0-2.0 ng/mL)	0.999	0.998	
Limit of detection (S/N = 3)	1.5	3.5	pg/mL
Limit of quantification (S/N = 10)	5.2	11.8	pg/mL
Repeatability ^a (RSD%, <i>n</i> = 6)	8.6	8.1	%
Intermediate precision ^a (RSD%, <i>n</i> = 6, 3 days)	9.9	10.8	%

^a ビールサンプル (*n* = 6) 中の 2M3MB と 3M3MB の平均値は、それぞれ 0.21 と 0.30 ng/mL であった (Noba, 2017)。

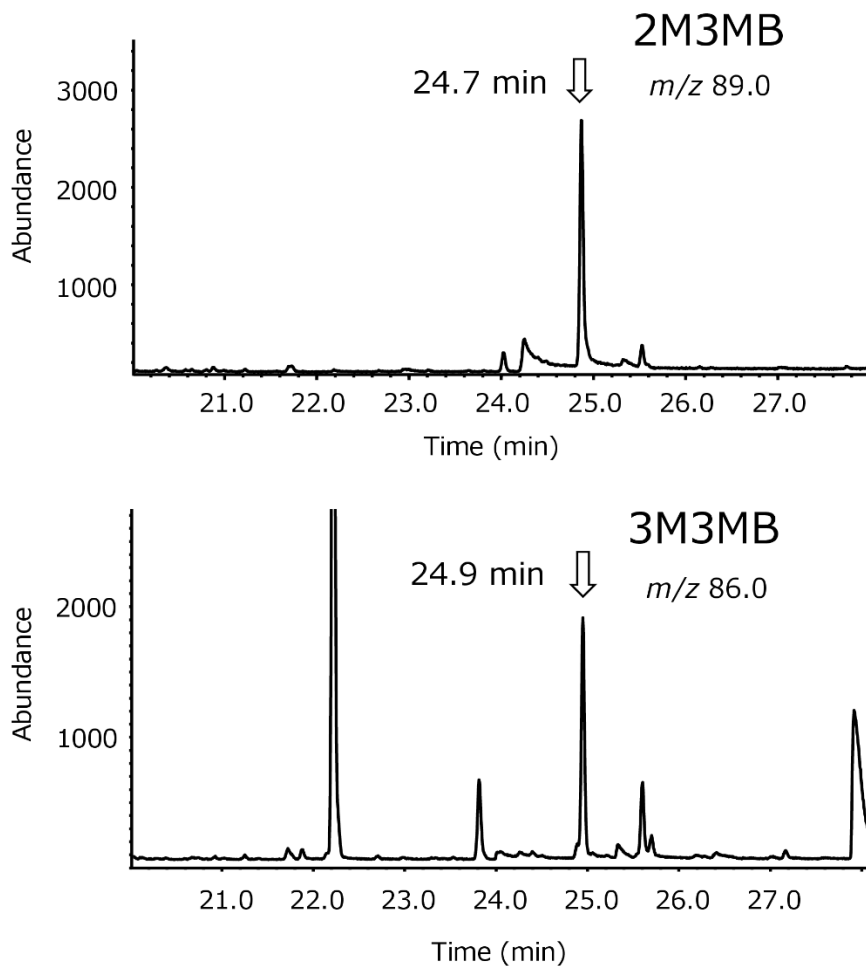


Fig. 2-2 ビール中の 2M3MB および 3M3MB の典型的な GC クロマトグラム

2M3MB ($S/N = 28$) と 3M3MB ($S/N = 19$) は 1 個のカラムでは十分に分離されなかったため、多次元 GC-MS を使用し、0.2 分異なるリテンションタイムで溶出させた (Noba, 2017)。

Table 2-4. ビール、発泡酒、第3のビール、およびノンアルコールビール中の2M3MBおよび3M3MBの濃度とOAV

	Sample type	2M3MB	3M3MB	2M3MB	3M3MB
		ng/mL	ng/mL	OAV	
1	Beer	0.69	0.22	5.3	< 0.1
2	Beer	0.80	0.39	6.1	< 0.1
3	Beer	0.23	0.33	1.8	< 0.1
4	Beer	0.10	0.59	0.7	< 0.1
5	Beer	0.17	0.19	1.3	< 0.1
6	Beer	0.72	0.36	5.6	< 0.1
7	Beer	0.72	0.40	5.5	< 0.1
8	Beer	0.38	0.33	2.9	< 0.1
9	Beer	0.34	0.55	2.6	< 0.1
10	Beer	0.13	0.23	1.0	< 0.1
11	Beer	0.17	0.33	1.3	< 0.1
12	Beer	0.43	0.96	3.3	< 0.1
13	Beer	0.58	0.29	4.5	< 0.1
14	Beer	0.22	0.13	1.7	< 0.1
15	Beer	0.09	0.18	0.7	< 0.1
16	Beer	0.27	0.16	2.1	< 0.1
17	Beer	0.53	0.30	4.1	< 0.1
18	Beer	0.21	0.30	1.6	< 0.1
19	Happoshu	0.18	0.14	1.4	< 0.1
20	Happoshu	0.06	0.21	0.5	< 0.1
21	Happoshu	0.08	0.18	0.6	< 0.1
22	Happoshu	0.39	0.36	3.0	< 0.1
23	Happoshu	0.03	0.09	0.3	< 0.1
24	Third-category	0.26	0.38	2.0	< 0.1
25	Third-category	0.01	0.03	0.1	< 0.1

26	Third-category	0.03	0.04	0.2	< 0.1
27	Third-category	0.09	0.26	0.7	< 0.1
28	Third-category	0.16	0.09	1.2	< 0.1
29	Third-category	0.00	0.03	< 0.1	< 0.1
30	Third-category	0.21	0.27	1.6	< 0.1
31	Non alcoholic	0.00	0.00	< 0.1	< 0.1
32	Non alcoholic	0.00	0.02	< 0.1	< 0.1

合計 32 個のピルスナータイプのビール類中の 2M3MB および 3M3MB の濃度を測定し、各サンプルの OAV を算出した。OAV は、サンプル中の成分の濃度と官能閾値の比として計算した。2M3MB の OAV はほとんどのサンプルで 1.0 を超えていたが、3M3MB の OAV はすべてのサンプルで 0.1 未満であった (Noba, 2017)。

2.3.5. 麦汁のホットエアレーション

麦汁のホットエアレーションがタマネギ様オフフレーバーに寄与する可能性が報告されている (Bärwald, 1971, Liebenow, 1967)。また、遠心ポンプや高圧ホモジナイザーによる麦汁の機械的な攪拌も、タマネギ様オフフレーバーに寄与すると考えられている

(Narziss, 1978)。まず、麦汁のホットエアレーション後にビール中の 2M3MB の濃度が増加するかどうかを調べるためのモデル実験を行った。まず、ホップ入り麦汁を用い、発酵の前後の 2M3MB および 3M3MB 濃度を測定した (Fig. 2-3)。麦汁からは、2M3MB は検出限界以下であり、低い濃度の 3M3MB (<0.02 ng/mL) のみが検出された。一方、発酵後の 2M3MB の濃度は 0.44 ng/mL、3M3MB の濃度は 0.46 ng/mL であった。この結果は、両化合物が主に発酵中に生成されたことを意味している。麦汁を 90°C で $0\sim 20$ 分間エアレーションし、発酵後の 2M3MB および 3M3MB の濃度を測定した (Fig. 2-4)。3M3MB の濃度はホットエアレーション後も変化しなかったが、2M3MB の濃度はエアレーション時間依存的に増加し、麦汁のホットエアレーションが 2M3MB の生成に関与していることが明らかとなった。これは私の知る限り、麦汁のホットエアレーションがビールのタマネギ様オフフレーバーの一つの原因であることを、定量的に示した初めての実験結果である。また、麦汁からは 2M3MB が検出されないにもかかわらず、麦汁のホットエアレーションによって発酵後に 2M3MB が増加したことから、麦汁中には前駆体が存在していると考えられる。

Fig. 2-5 は、 $20\sim 90^{\circ}\text{C}$ と温度を変えて麦汁に 5 分間のエアレーションをして、発酵させたビール中の 2M3MB および 3M3MB の濃度を示す。2M3MB の濃度は、エアレーション時の麦汁温度に依存して増加した。Fig. 2-3 で示したように、Fig. 2-4 および Fig. 2-5 のサンプルにおいても麦汁からは 2M3MB は検出されなかった。過去の研究 (Olsen, 1988) によると、ホップを使わずに製造されたビールからはタマネギ様オフフレーバーは検出されなかった。この点についてさらに調べるため、ホップ入り、ホップ無し麦汁それぞれを、ホットエアレーションし、発酵後の 2M3MB および 3M3MB を測定した (Fig. 2-6A および 2-5B)。2M3MB は無ホップ麦汁から検出されなかったが、3M3MB はすべてのサンプルから検出された。この結果から 2M3MB はホップに由来する成分であり、3M3MB は主に麦芽に由来する成分であると考えられた。前述と同様、ホップ入り麦汁をホットエアレーションすると、発酵後の 2M3MB の濃度が増加した。さらに対照としてエアレーションの代わりに窒素バブリングを行ったが、窒素バブリングでは、Fig. 2-3、Fig. 2-4 で示したホットエアレーション無しの発酵液中の 2M3MB 濃度と変わらなかったことから、麦汁のホットエアレーションの効

果は、麦汁の物理的攪拌ではなく、麦汁中の成分の酸化であることがわかった。一方、麦汁をホットエアレーションした場合でも、発酵後のビール中の 3M3MB 濃度は変化しなかった。ただし、麦芽由来と考えられる 3M3MB の濃度は、ホップを入れた場合に減少した。ホップ入り麦汁では、ホップ添加後に煮沸しているため、麦芽由来の揮発性成分が減少し、結果的に発酵後の 3M3MB が減少したのではないかと推察される。つまり、3M3MB の前駆体は揮発性成分であることが示唆された。過去の研究 (Cibaka, 2015) では、3M3MB の S-システイン結合体の一部のホップ品種 (アマリロ、モザイク) で検出されていたが、本研究で使用したナゲット種では 3M3MB の S-システイン結合体は検出されておらず、今回の結果と矛盾していない。

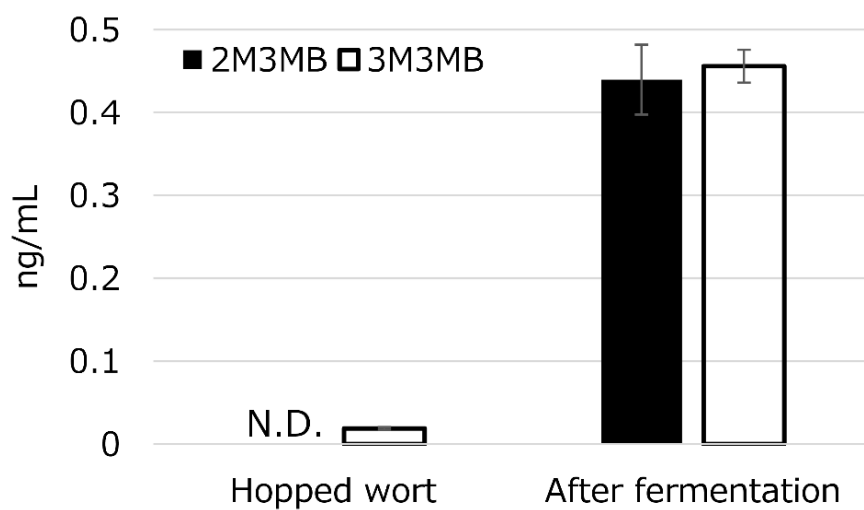


Fig. 2-3. ホップを添加した麦汁の発酵前後の 2M3MB および 3M3MB の濃度

ホップ入り麦汁からは、2M3MB は検出限界以下であり、低濃度の 3M3MB (<0.02 ng/mL) のみが検出された。一方、発酵後のビールからは 2M3MB、3M3MB 両方検出され、この結果は、両化合物が主に発酵中に生成されたことを意味する (Noba, 2017)。

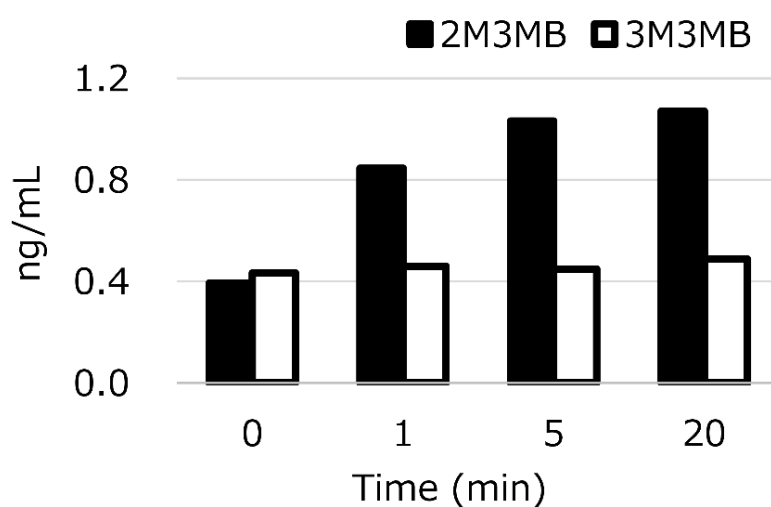


Fig. 2-4. 発酵中の 2M3MB および 3M3MB の生成に対するホップを添加した麦汁へのホットエアレーション (90 °C、2 L/min) の影響。

3M3MB の濃度はホットエアレーション後も変化しなかったが、2M3MB の濃度はエアレーション時間依存的に増加し、麦汁のホットエアレーションが 2M3MB の生成に関与していることが明らかとなった。これは私の知る限り、麦汁のホットエアレーションがビールのタマネギ様オフフレーバーの一つの原因であることを、定量的に示した初めての実験結果である (Noba, 2017) 。

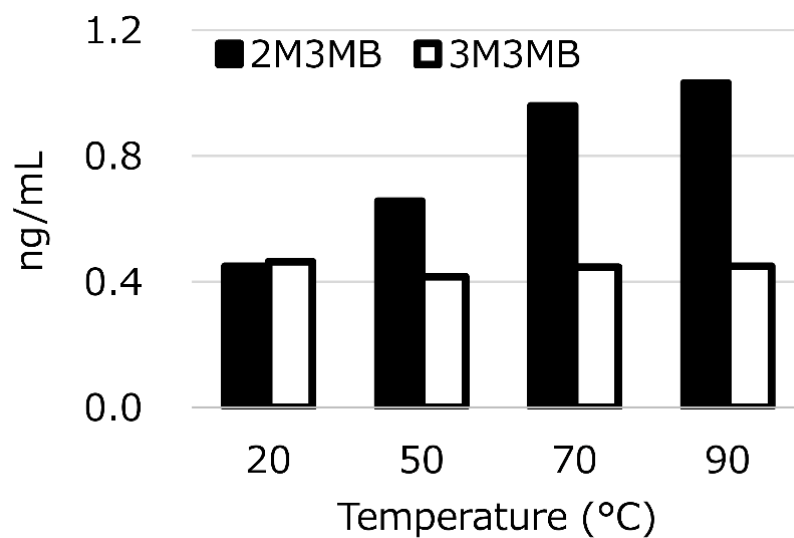


Fig. 2-5. 発酵中の 2M3MB および 3M3MB の生成に対するホップを添加した麦汁へのホットエアレーション温度(5 min, 2 L/min)の影響

20~90 °Cと温度を変えて麦汁に5分間のエアレーションをして、発酵させたビール中の2M3MB および 3M3MB の濃度を測定したところ、3M3MB に変化はなく、2M3MB の濃度は、エアレーション時の麦汁温度に依存して増加した。このサンプルについても麦汁からは2M3MB は検出されなかった (Noba, 2017)。

2.3.6. 3MBol の定量と添加試験

Olsen らは 2M3MB が 3MBol から生成したと推測している (Olsen, 1988)。さらに、Gros らは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3MBol を添加した麦汁を発酵させると 2M3MB と 3M3MB がそれぞれ 0.2 から 1.8 ng/mL 、1.6 から 7 ng/mL の濃度に増加したと報告した (Gros, 2009)。その研究結果に基づいて、Gros らは 3MBol が 2M3MB と 3M3MB の両方の前駆体であると推測した。一方で、本研究の試験結果では、2M3MB と 3M3MB の前駆体はそれぞれ、ホップ由来と麦芽由来と異なる成分であると考えられた。これらの矛盾について考察するために、麦汁中の 3MBol の定量法を開発した。分析法の妥当性試験の結果を Table 2-5 に示した。また、無ホップ麦汁へ 3MBol を添加して、発酵後の 2M3MB および 3M3MB を定量した。その結果を Fig. 2-7 に示す。2M3MB および 3M3MB の濃度は、3MBol の濃度と比例した。2M3MB と 3M3MB の濃度と 3MBol の濃度との間の相関係数は両方とも 0.99 を超え、3MBol からの 3M3MB の生成は 2M3MB の 4 倍だった。これらの結果は、3MBol 添加試験で 3M3MB の濃度は 2M3MB の濃度の 3.4 倍であると報告した Gros らの結果とよく似ていた (Gros, 2009)。今回の添加試験においては 1.0 mg の 3MBol から 4.4 ng の 2M3MB と 17.4 ng の 3M3MB が生成した (つまり変換率はそれぞれ 0.0004% と 0.0017% であった)。次に Fig. 2-6 の麦汁のホットエアレーション試験で使用した麦汁中の 3MBol 濃度を測定した (Fig. 2-8)。無ホップ麦汁中の 3MBol の濃度は非常に低く (<0.5 ng/mL 、Trace レベル)、麦汁中の 3MBol の濃度は、ホップの添加により増加したが、ホットエアレーションの有無では変化しなかった。さらに、3M3MB の濃度は、ホップ入り麦汁よりも無ホップ麦汁から生成した量が多かった (Fig. 2-6)。一方で、これらの麦汁中の 3MBol 濃度の大小関係はその逆であった。3MBol 添加試験の結果に基づき、ホップ入り麦汁中の 3MBol の濃度に変換率を掛けると、発酵後の 2M3MB の約 0.1 pg/mL 分、3M3MB の約 0.3 pg/mL 分に相当した。一方で実際の 2M3MB および 3M3MB の濃度は Fig. 2-6 にあるようにホットエアレーションなしの場合は、それぞれ約 0.6 ng/mL 、ホットエアレーションした麦汁から生成した 2M3MB は約 1 ng/mL であった。これらの結果は、3MBol は 2M3MB および 3M3MB の前駆体ではあるが、その寄与度としては 1/1000 以下であり実質的な前駆体としての寄与はほとんどないことを示している。加えて、3M3MB は無ホップ麦汁からも生成したが、無ホップ麦汁中に 3MBol はほとんど含まれていなかった。このため本研究で明らかにした、2M3MB の由来はホップであり、3M3MB の由来は麦芽であるという結果と矛盾しないことが明らかとなった。つまり、総合して考える

と、2M3MB、3M3MB どちらのチオールについても、3MBol 以外の前駆体がホップ入り麦汁(以下、単に麦汁と記す)中に存在していると考えられた。

2.3.7. ビールの 2M3MB 生成機構についての考察

3MBol は 2M3MB の生成にほぼ寄与していない前駆体であり、麦汁中に 3MBol とは別の 2M3MB 前駆体が存在していると考えられた。これまでの試験の結果、2M3MB の前駆体はホップ由来で、麦汁の酸化によって生成することが明らかとなった。さらに、麦汁中の 2M3MB 前駆体の生成は、高温でより急速に起こると考えられた。たとえば、実際のビール製造工程において、麦汁煮沸時からワールプール静置、麦汁冷却までの工程において麦汁が高温となる。さらに、タマネギ様オフフレーバーの生成に寄与すると報告された麦汁の遠心ポンプや高圧ホモジナイザーによる麦汁の機械的攪拌も、酸素を巻き込む可能性があり、麦汁の酸化と関連があるかもしれない。2M3MB 前駆体生成のメカニズムはいまだ不明であるが、麦汁中に 2M3MB は存在せず、発酵後に検出されることから、ホップ由来の成分が麦汁中で前駆体となり、前駆体が酵母代謝によって 2M3MB に変換されていると推察された。同様に、酵母の代謝を改変することで、麦汁の凝固物（トループ）の量もタマネギ様オフフレーバーの原因となることが報告されている（Ahvenainen, 1979）。しかし、本研究では、遠心分離による麦汁トループの除去は、2M3MB の濃度に影響しなかった（data not shown）。トループ量が発酵に影響を与える可能性を考慮すると、発酵条件や酵母種等の複合要因が 2M3MB の生成に影響を与えている可能性がある。

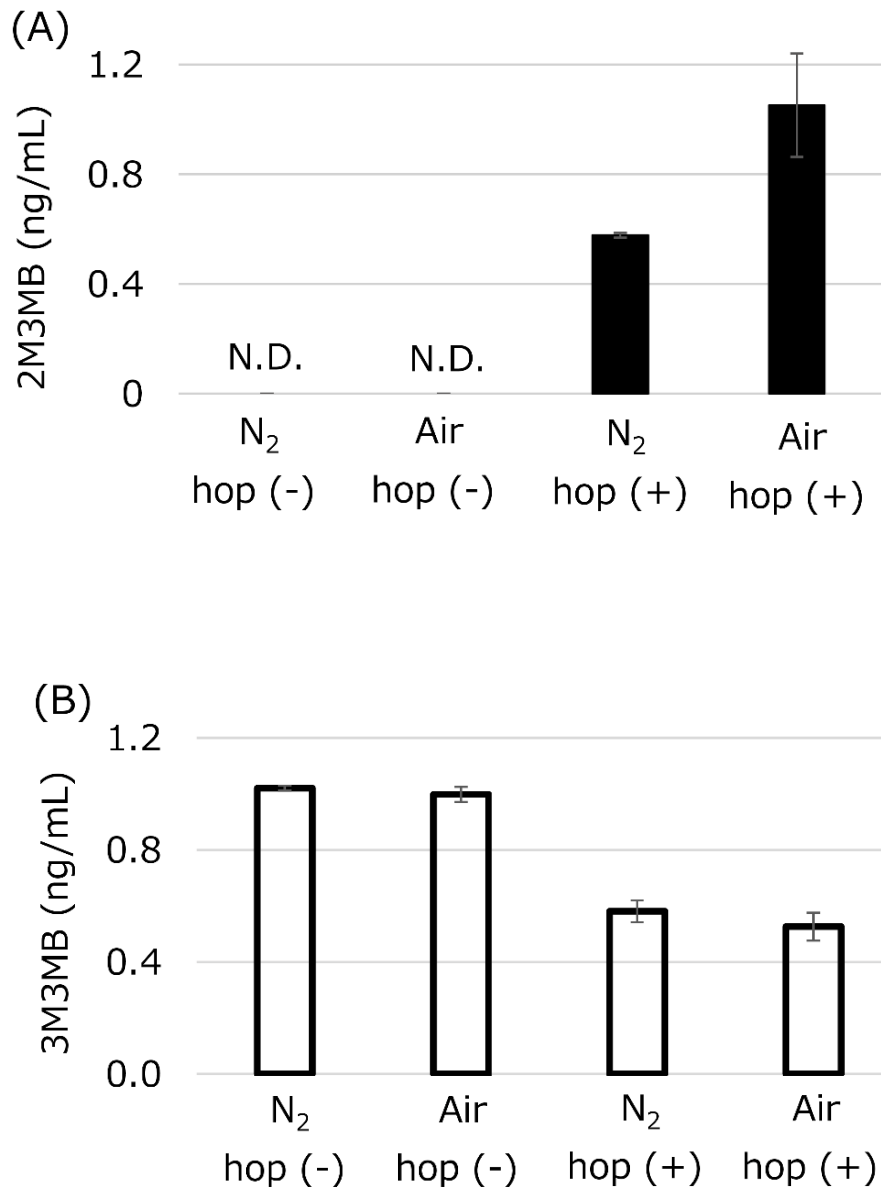


Fig. 2-6. 発酵中の 2M3MB (A) および 3M3MB (B) の生成に対するホップおよびホットエアレーション（対照は窒素バブリング）の影響

2M3MB は無ホップ麦汁から検出されなかったが、3M3MB はすべてのサンプルから検出された。2M3MB はホップに由来する成分であり、3M3MB は主に麦芽に由来する成分であると考えられた。ホップ入り麦汁をホットエアレーションすると、発酵後の 2M3MB の濃度が増加した (Noba, 2017)。

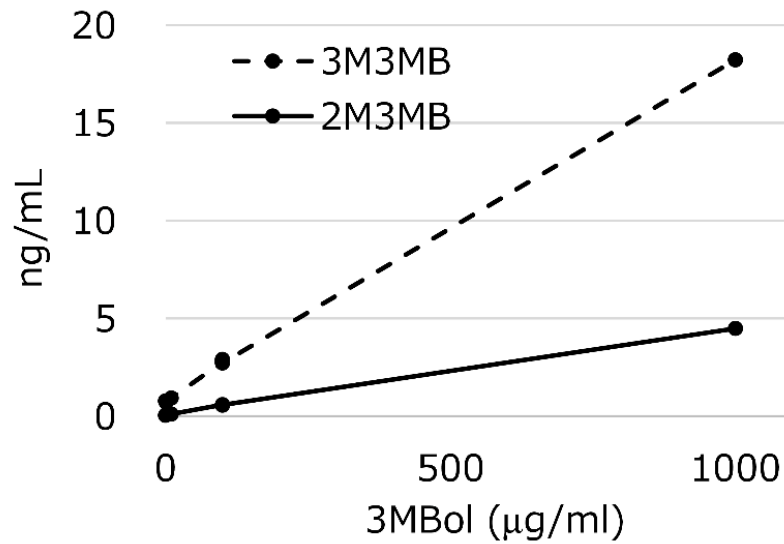


Fig. 2-7. 3MBol を添加した無ホップ麦汁を発酵させたビール中の 2M3MB および 3M3MB の濃度

2M3MB および 3M3MB の濃度は、3MBol の濃度と比例した。2M3MB と 3M3MB の濃度と 3MBol の濃度との間の相関係数は両方とも 0.99 を超え、3MBol からの 3M3MB の生成は 2M3MB の 4 倍だった (Noba, 2017)。

Table 2-5. 麦汁中の 3MBol の定量法のバリデーション試験結果

	3MBol
Linearity (0-40 ng/mL)	0.999
Limit of detection (ng/mL, S/N = 3)	0.1
Limit of quantification (ng/mL, S/N = 10)	0.5
Repeatability ^a (RSD%, <i>n</i> = 6)	1.7
Intermediate precision ^a (RSD%, <i>n</i> = 6, 3 days)	2.8

^a 使用した麦汁(*n* = 6)中の平均 3MBol 濃度は 9.8 ng/mL (10 ng/mL 3MBol を無ホップ麦汁へ添加)であった (Noba, 2017)。

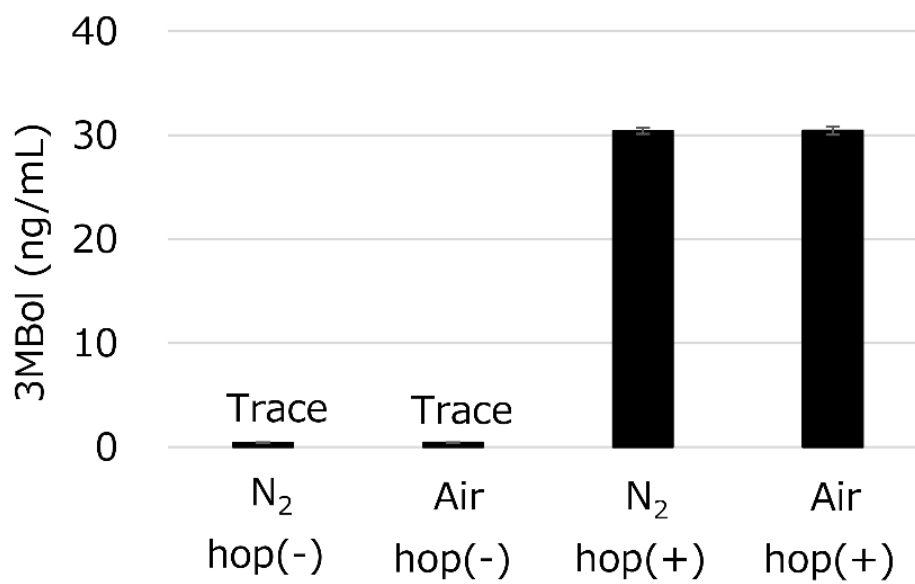


Fig. 2-8. ホップ入り麦汁とホップ無し麦汁中の 3MBol の濃度

無ホップ麦汁中の 3MBol の濃度は非常に低く (<0.5 ng/mL、Trace レベル)、麦汁中の 3MBol の濃度は、ホップの添加により増加したが、ホットエアレーションの有無では変化しなかった (Noba, 2017)。

2.4. 結論

本章では、タマネギ様オフフレーバー強度の異なるビールから、その原因成分を GC-olfactometry を用いて探索した。その結果、タマネギ様オフフレーバーの強度と相関する画分に 2-mercapto-3-methyl-1-butanol (2M3MB) および 3-mercapto-3-methyl-1-butanol (3M3MB) の 2 成分が含まれていることを確認した。GC-olfactometry のみでは、どちらの成分がタマネギ様オフフレーバーの寄与成分かを特定できなかったため、さまざまなビール中の 2M3MB および 3M3MB の定量結果およびその官能閾値 (ビール中の 2M3MB の官能閾値は 0.13 ng/mL、3M3MB の官能閾値は 17.5 ng/mL) から odor activity values (OAV) を算出した。その結果、2M3MB がタマネギ様オフフレーバーの寄与成分であることを明らかにした。2M3MB は麦汁には存在せず、発酵で生成した。また、麦汁のホットエアレーションで 2M3MB の生成量が増加した。このことから、麦汁には 2M3MB の前駆体が存在していること、さらに無ホップ麦汁からは 2M3MB が生成しないことから、2M3MB の前駆体はホップ由来であると考えられた。これまでに 3-methyl-2-buten-1-ol (3MBol) が 2M3MB および 3M3MB の前駆体として報告されている。しかしながら、麦汁中の 3MBol の分析結果および麦汁への 3MBol の添加試験により、3MBol から 2M3MB および 3M3MB への変換は、実際にビール中に含まれるそれらのチオール類の濃度の 1/1000 以下であり、前駆体としての寄与はなかった。このことから、麦汁中には 2M3MB および 3M3MB の生成に関わる未知の前駆体が存在していると推察された。

近年、日本酒の熟成に伴うオフフレーバーとして dimethyl-trisulfide (DMTS) の前駆体が磯谷らによって同定された (Isogai, 2009)。その化合物は 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-one (DMTS-P1) であり、前駆体の同定によって DMTS 生成メカニズムの理解が深まった。前駆体の化学構造に基づいて、著者らは、酵母のメチオニンサルベージ経路が DMTS の形成に関与していると推測した。同様に 2M3MB の前駆体を特定することは、2M3MB 形成のメカニズムの解明を促進すると期待される。

第 3 章

ビールのタマネギ様オフフレーバーである 2M3MB の前駆体の同定

3.1. 緒言

第 2 章で述べたように、ビールのタマネギ様オフフレーバーの寄与成分は 2M3MB であることを明らかとした。また、定量的な調査により、2M3MB の前駆体として提唱されてきた、3MBoI はビール中の 2M3MB の主要な前駆体ではないことを確認した。麦汁に 3MBoI を添加して発酵させると、確かに 2M3MB が生成したが、その変換率は非常に低く、麦汁中の 3MBoI 濃度から推定される 2M3MB 生成量は実際の 2M3MB 濃度の 1/1000 以下であった。また、麦汁のホットエアレーションにより発酵後の 2M3MB 濃度は増加したが、麦汁中の 3MBoI 濃度は増加しなかった。これらのことから、3MBoI は 2M3MB の生成にほとんど寄与しないと言える。2M3MB の由来について調べたところ、無ホップ麦汁を発酵させても 2M3MB は検出されなかったことから 2M3MB はホップ由来であると考えられた。

そこで本章では、ホップエキスから 2M3MB の主要な前駆体を探索した。前駆体は揮発性が高いと予想されたため、蒸留や、順相カラムクロマトグラフィー、分取 GC といった各種技術を駆使して、2M3MB 生成に関与している成分を高純度に精製した。NMR に供与できるだけの濃度が得られなかったため、高分解能 GC-MS/MS により構造を推定した。推定された成分について合成し、ホップエキスより単離した成分と比べることで同定を行った。同定した前駆体を麦汁に添加し、酵母による 2M3MB への変換率を調査した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 試薬

メタノール（残留農薬分析用）、アンモニア水（28.0%）、アセトニトリル（LC/MS 用）、ジクロロメタン（残留農薬分析用）、ジエチルエーテル（残留農薬分析用）、*n*-ペンタン（鹿特級）、ギ酸（98.0%）、硫酸アンモニウム（99.5%）および D-グルコース（98.0%）は関東化学株式会社（Tokyo, Japan）から購入した。シリカゲル 60（球状、中性）は、ナカライテスク（Kyoto, Japan）から購入した。酵母エキスとペプトンは

BD Japan (Tokyo, Japan) から購入した。S-benzyl-L-cysteine (benzyl-cys, 95.0%) は東京化成工業 (Tokyo, Japan) から購入した。S-2- (3-methyl-1-butanol) -L-cysteine (2M3MB-cys) (95%)、2,3-epoxy-3-methylbutanal (95%) はナード研究所 (Hyogo, Japan) の合成品を使用した。イソ化ホップエキス (30%) は Hopsteiner, Inc. (NY, USA) より購入した

3.2.2. 2M3MB-Cys の定量

麦汁の前処理は以下のように行った。メタノール (10 mL) と 2%ギ酸水溶液 (10 mL) を Waters MCX カラム (500 mg/6 cc) に順次負荷し、その後、400 μ L のギ酸および 100 μ L の内部標準 (IS, benzyl cysteine, 1 μ g/mL) を加えた 10 mL の麦汁を負荷した。カラムを 2%ギ酸水溶液 (5 mL) で洗浄した後、メタノール (4 mL) で洗浄した。最後に、28%アンモニア水/メタノール (5/95, 5 mL) で溶出した。溶出液を窒素ガス流下、乾固させ、0.1%ギ酸水溶液 (1 mL) で再溶解した。LC/MS/MS 分析の前に、各サンプルを 0.45 μ m ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) フィルターでろ過した。2M3MB-Cys 分析は、タンデム四重極型質量分析計 (API4000、SCIEX, MA, USA) に接続された Nexera HPLC (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) を用いて行った。分離は sunshell RP-AQUA (3 mm i.d. \times 150mm, 2.6 μ m; ChromaNik Technologies, Osaka, Japan) をオープン温度 40 $^{\circ}$ C で用いて行った。移動相は (A) 0.1%ギ酸水、(B) 0.1%ギ酸アセトニトリルを使用し、流速 0.3 mL/min で次のグラジエントを適用した: [t (min), % B]: (0, 0), (1, 0), (11, 60), (11.1, 95) (15, 95)。10 μ L のサンプルを注入し、カラムの初期条件へのコンディショニングを含む総分析時間は 25 分とした。MS/MS による定量は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法でイオン化し、ポジティブイオンモード、カーテンガスは 50 psi、イオンソースガス 1 および 2 は 80 psi、イオンスプレー電圧は +4500 V、コリジョンガスは 8 (任意単位)、デクラスタリングポテンシャルは 51 V、イオン源の温度は 500 $^{\circ}$ C の条件にて、multiple reaction monitoring (MRM) モードで実施した。トランジション (m/z)、コリジョンエネルギー (CE (V))、およびコリジョンセルの出口ポテンシャル (CXP (V)) は次のとおり: m/z 208 \rightarrow 87、CE 25 V、CXP 6 V (2M3MB-Cys、定量用)、 m/z 208 \rightarrow 69、CE 15 V、CXP 8 V (2M3MB-Cys、確認用)、 m/z 212 \rightarrow 91、CE 21 V、CXP 4 V (IS)。定量のための検量線は、標準添加法により作成した。具体的には、麦汁へ 2M3MB-cys を 0~20 ng/mL となるように添加し、

2M3MB-cys と IS のピークエリアの比から作成した。

3.2.3. ビールの醸造

麦汁の調製は Analytica-EBC の方法 (European Brewery Convention, 2007) に基づき、発酵は既報と同様に実施した (Noba, 2017)。ホップはナゲット種 (アルファ酸濃度 11.6%, John I. Haas, Inc., WA, USA) を使用した。無ホップ麦汁をつくる際はホップ添加と煮沸を省略した。ビール中の 2M3MB 濃度についても既報と同様に分析した (Noba, 2017)。2M3MB-cys 添加試験については、エタノールに溶解した 2M3MB-cys を麦汁へ、20, 200 ($n = 3$), 2000 ng/mL の濃度となるように添加した。

3.2.4. Yeast Extract–Peptone–Dextrose (YPD) 培地を用いた 2M3MB 生成ポテンシャルの測定法

YPD 培地は、酵母エキス (2%)、ペプトン (4%)、およびグルコース (4%) (すべて w/v) となるように、ミリ Q 水へ溶解し、オートクレーブにて 121 °C、15 分滅菌し、2 倍濃縮液を作成した。200 mL のプラスチック製のトールチューブを用いて 100mL の 2 倍濃縮培地、精製した画分を合わせ、滅菌水で 200mL にメスアップした。そこへ 20×10^6 cells/mL となるように、醸造用酵母を添加し、15 °C、3 日間静置発酵させた。9000 × *g* で 15 分間遠心分離し上清を回収し、2M3MB 濃度を、ビール中の 2M3MB 分析と同様に既報 (Noba, 2017) に従って測定した。得られた 2M3MB 濃度を精製した画分の 2M3MB 生成ポテンシャルとして用いた。

3.2.5. 2M3MB 前駆体の精製方法

2M3MB 前駆体は、イソ化ホップエキス (30%, Hopsteiner, Inc., New York, NY) から次のステップで精製を行った：ホットエアレーションによるホップ抽出物の酸化処理 → 常圧蒸留 → 順相カラムクロマトグラフィーによる分画 → 分取 GC による分画。

3.2.6. ホットエアレーション

イソ化ホップエキス (20 g) にミリ Q 水を加えて 500 mL とし、ホットエアレーションを行った。ホットエアレーションの方法は既報の通り実施した (Noba, 2017)。ホットエアレーション後蒸発した分、ミリ Q 水を加えた。

3.2.7. 常圧蒸留

ホットエアレーションしたイソ化ホップエキス溶液（500 mL）および 2 g の沸騰石をグラハム冷却器付の 1000 mL 丸底フラスコに加え、常圧蒸留を行った。丸型フラスコは、ステンレス製マントルヒーター（SH-1, 桐山ガラス, Tokyo, Japan）にて加熱した。マントルヒーターの設定温度は 105 °C とした。出てきた溜液を 100 mL ずつ採取した。蒸留して得られた分画液（10 mL）を、YPD 培地へ添加し、2M3MB 生成ポテンシャルを測定した。

3.2.8. 順相クロマトグラフィー

硫酸アンモニウム（20 g）を常圧蒸留液の最初の画分（90 mL）に加え、次にジエチルエーテル（30 mL）を加え、200 rpm で 10 分間振とうすることで抽出した。ジエチルエーテル層を回収し、25 °C、窒素気流下、穏やかに 4 mL まで濃縮した。ジエチルエーテルで洗浄したシリカゲルをガラスカラム（直径 2 cm、長さ 15 cm）に充填し、100 mL の *n*-ペンタンにて平衡化した。そこへ濃縮液を負荷し、ジエチルエーテル/ *n*-ペンタン = 0、0.1、0.2、0.5、および 1.0 と混合した 100 mL の溶媒を用いて順次分画した。2M3MB 生成ポテンシャルを測定するために、各画分を窒素気流下、穏やかに 1 mL まで濃縮し、1 mL のエタノールと混合し、濃縮溶液を YPD 培地に加えて発酵させた。

3.2.9. preparative fraction collector 付 GC (GC-PFC) による分取

順相カラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3 を窒素ガス気流下、200 μ L まで穏やかに濃縮し、水素炎イオン化検出器（FID）および PFC（Gerstel, Mühlheim an der Ruhr, Germany）を備えた分取 GC（Agilent 7890 ガスクロマトグラフ（Agilent Technologies, Santa Clara, CA））を用いて分画した。分離は DB-WAX キャピラリーカラム（Agilent Technologies、長さ = 15 m、内径 = 0.53 mm、膜厚 = 0.25 μ m）を用い、キャリアガスとしてヘリウムを一定流量（5.2 mL/min）流した。4 μ L のサンプルをパルスドスプリットレスモードで注入し、注入口の温度を 230 °C に設定した。オープン温度は、40 °C（3 分間保持）から 10 °C/min の速度で 230 °C（10 分間保持）に上昇するよう設定した。FID および PFC のスプリット比は 1:99 とした。保持時間 6.0~6.8 分の溶出液を、-80 °C のガラスチューブに入れた 200 μ L のエタノールにトラップした。同じサンプルを用いて、30 回繰り返した。

3.2.10. 順相カラムクロマトグラフィーおよび GC-PFC 分画液の GC-MS による分析

GC-MS 分析は、四重極質量分析計 (MSD5975C, Agilent Technologies) に接続されたガスクロマトグラフ (Agilent 7890) を使用して実施した。分離は DB-WAX キャピラリーカラム (Agilent Technologies、長さ= 60 m、内径= 0.25 mm、膜厚= 0.25 μm) を使用し、キャリアガスとしてヘリウムを一定流量 (1.0 mL/min) 流した。リテンションインデックス (RI) の算出のため DB-17 カラム (Agilent Technologies、長さ= 30 m、内径= 0.25 mm、膜厚= 0.25 μm) も使用した。1.0 μL のサンプルをパルススプリットレスモードで注入し、注入口の温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。オープン温度は、40 $^{\circ}\text{C}$ (5 分間保持) から 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で 230 $^{\circ}\text{C}$ (30 分間保持) に上昇するように設定した。70 eV の電子イオン化 (EI) モードを使用して、 m/z 29~350 の範囲でマススペクトルを収集した。得られた GC-MS クロマトグラムを文献 (Wang, 2014) に従ってデータを処理することにより、順相カラムクロマトグラフィーの分画液のクロマトグラムから 2M3MB 前駆体ピークの特特定を試みた。GC-MS クロマトグラムから NIST Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software (AMDIS) パッケージを使用して、同一の溶出時間と類似の MS スペクトルデータを持つイオンが、保持時間、ピーク強度、および m/z によって特徴付けられる entity (デコンボリューション後のピーク) として抽出された。各サンプル分析の結果、得られたクロマトグラムに対し、AMDIS によって作成された ELU ファイルを Mass Profiler Professional ソフトウェアパッケージ (バージョン 12.6, Agilent Technologies) にて解析した。化合物の同定は Mass Spectral Library 14 (National Institute of Standards and Technology (NIST), MD, USA) を使用した。

3.2.11. 高分解能 GC-MS による分析

高分解能 GC-MS 分析は、四重極飛行時間型質量分析計 Agilent QTOF 7200B, Agilent Technologies) に接続されたガスクロマトグラフ (Agilent 7890B GC, Agilent Technologies) (GC-QTOF) を使用して実施した。分離は DB-5ms キャピラリーカラム (Agilent Technologies、長さ= 30 m、内径= 0.25 mm、膜厚= 0.25 μm) を使用し、キャリアガスとしてヘリウムを一定流量 (1.0 mL/min) 流した。0.1 μL のサンプルを、パルススプリットレスモードで注入し、注入口の温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。オープン温度は、35 $^{\circ}\text{C}$ (5 分間保持) から 20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で 230 $^{\circ}\text{C}$ (7 分間保持) に上昇するように設定した。EI モードを使用して、ターゲット化合物の保持時

間を特定し、分子量と分子構造の推定には、メタン（メタンガス、1 mL/min）とメチルアミン（0.2%メチルアミン/メタンガス、0.5 mL/min）を使用した陽イオン化学イオン化法（PICI）を使用した。PICIのイオン源温度は200 °C、EIのイオン源温度は230 °C、四重極温度は150 °Cに設定した。コリジョンガスとして窒素を流量1.5 mL/minで使用した。プロダクトイオンスキャンのコリジョンエネルギーは5 Vに設定した。

3.3. 結果と考察

3.3.1. 麦汁中の2M3MB-Cys 定量と添加試験

ワインの重要な香気成分の一つである4MMPなどのチオール化合物は、発酵中にシステイン抱合体から生成することが知られている。2M3MBは発酵中に生成するため、システイン抱合体である2M3MB-Cysが麦汁中に存在しているかについて検証した。陽イオン交換カラムを用いて麦汁を前処理し、麦汁中の2M3MB-CysをLC/MS/MSで定量した。分析法のバリデーション試験結果をTable 3-1に示す。日内併行精度と日間併行精度のrelative standard deviation (RSD) (%)は10%を超えず、検出限界は約0.3 ng/mLだった。Fig. 3-1に示すように、麦汁を発酵させると、約0.5 ng/mLの2M3MBが検出され、もし2M3MB-Cysが2M3MBの生成に寄与しているのであれば測定可能であることが示された。続いて麦汁中の2M3MB-Cys濃度を測定した ($n = 3$)。その結果、麦汁から2M3MB-Cysは検出されなかった（検出限界である0.3 ng/mL以下）。一方で、その麦汁に酵母を加えて発酵させたところ、上述した通り、ビール中の2M3MB濃度は約0.5 ng/mLとなった。ビール中の2M3MB濃度が2M3MB-Cysの濃度より高かったことから、2M3MB-Cysが2M3MBの主たる前駆体ではないと考えられた。さらに、2M3MB-Cysが発酵中に2M3MBへと変換されるかについて調べた。2M3MB-Cysの構造異性体である3M3MB-Cysは特定のホップ品種のみにその存在が報告されており、その報告では、ホップ中の最大濃度は127 ng/gホップであった（Cibaka, 2015）。このため、仮に2M3MB-Cysが存在するホップ品種があった場合に、2M3MB生成に与える影響を調べるため、最大2000 ng/mL（ホップ中に2M3MB-Cysが0.1%存在し、全量が、ホップから麦汁に移行すると仮定したときの濃度）の2M3MB-Cysを麦汁へ添加し発酵させた。しかしながら、添加量を変えても2M3MBは全く増加しなかった（Fig. 3-1）。これらの結果を総合すると、2M3MB-Cysは2M3MBの主要な前駆体ではなく、仮に麦汁中に2M3MB-Cysが存在したとしても、2M3MB-Cysが2M3MBの生成へ与える影響は無視できると思われる。

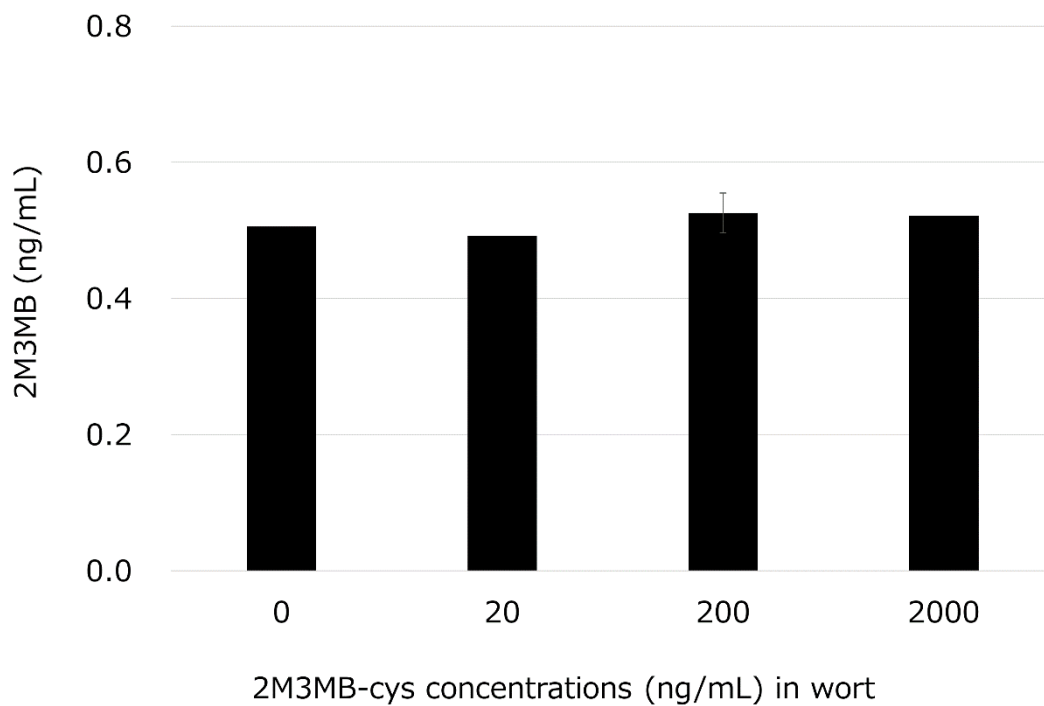


Fig. 3-1. 2M3MB-cys (0、20、200 ($n = 3$)、2000 ng/mL) を添加した麦汁を発酵させた後の 2M3MB 濃度

2M3MB-cys の添加量を変えても 2M3MB は全く増加しなかった。このため 2M3MB-Cys は 2M3MB の主要な前駆体ではなく、2M3MB-Cys が 2M3MB の生成へ与える影響は無視できると思われる (Noba, 2018)。

Table 3-1. 麦汁中 2M3MB-cys 分析法のバリデーション試験結果

	2M3MB-cys
Linearity (0.0-20.0 ng/mL)	0.999
Limit of detection ^a (ng/mL, S/N = 3)	0.29
Limit of quantification ^a (ng/mL, S/N = 10)	0.95
Repeatability ^a (RSD%, <i>n</i> = 6)	2.2
Intermediate precision ^a (RSD%, <i>n</i> = 6, 3 days)	9.4

^a 麦汁から 2M3MB-cys が検出されなかったため、麦汁へ 5 ng/mL の 2M3MB-cys を添加した (Noba, 2018)。

3.3.2. 2M3MB 前駆体の精製

上記の結果から、麦汁中には 2M3MB-cys 以外の主要な 2M3MB 前駆体が存在する可能性が高いと考えられたため、2M3MB 前駆体の探索を試みた。2M3MB 前駆体を探索する際、より簡単に精製を進めるため、ホップの粗精製エキスであるイソ化ホップエキスを使用した。また麦汁の代わりに、YPD 培地で 2M3MB の生成ポテンシャルを測定することにより、ホップ抽出物の分画サンプルを評価した。Fig. 3-2 は、麦汁中と YPD 培地中のイソアルファ酸量を揃え、ホットエアレーション有り/無しの麦汁での発酵後の 2M3MB 濃度と、ホットエアレーション有り/無しのイソ化ホップエキスを添加した YPD 培地での発酵後の 2M3MB 濃度を示す。イソ化ホップエキスを含む YPD 培地から得られた発酵液においても 2M3MB が検出された。さらに、麦汁と同様に、イソ化ホップエキスをホットエアレーションすることで、YPD 培地を発酵させた後の 2M3MB の濃度が増加した。この結果は、イソ化ホップエキス中の成分と空気が反応することにより 2M3MB 前駆体が形成されたことを示している。このため、ホットエアレーションしたイソ化ホップエキスを使用して 2M3MB 前駆体の精製を行い、YPD 培地を用いて、その精製物の 2M3MB 生成ポテンシャルを評価した。

まず空気酸化させたイソ化ホップエキス希釈液を常圧蒸留にて蒸留し、4 フラクションを採取した。各フラクションの溶液を YPD 培地中で発酵させ 2M3MB 生成ポテンシャルを測定した (Fig. 3-3 (A))。その結果、フラクション 1 の 2M3MB 生成ポテンシャルが最も高いことがわかった。また、蒸留液に 2M3MB 生成ポテンシャルがあることから、2M3MB 前駆体は揮発性成分であることがわかった。続いて、フラクション 1 の蒸留液を順相カラムクロマトグラフィーにより分画した。濃縮した分画液の 2M3MB 生成ポテンシャルを測定した (Fig. 3-3 (B))。その結果、ジエチルエーテルの濃度が 20%以上の画分に 2M3MB 前駆体が存在していることがわかった。順相カラムクロマトグラフィーの分画液について GC-MS で分析し、得られたスキャンデータを AMDIS にてデコンボリューションし、ピークを抽出した。各サンプルのピークデータは MPP ソフトウェアを使用して統合され、合計 609 の entity を取得できた。順相カラムクロマトグラフィーの 5 個の分画液の 2M3MB 生成ポテンシャルと 609 エンティティのピーク面積の相関係数を算出したところ、0.99 より大きい相関係数を持つ entity は 1 個だけ検出された。上記のイソ化ホップエキスからの精製手順を 10 回繰り返し、順相カラムクロマトグラフィーからの画分 3 サンプルをまとめて 200 μ L に濃縮した。得られた濃縮液を分取 GC により分画し、見出した entity の溶出時間付近を回収した。Fig. 3-4 は、分取 GC で得られた画分の GC-MS クロマトグラムとスペクトルを示す。1 個の大きなピークのみが検出され、分取 GC による選択的な精製が成功したことがわかった。この画

分を最終精製画分と呼び、その 2M3MB 生成ポテンシャルは 2.6 ng/mL であった。最終精製画分に含まれる成分を 2M3MB 前駆体候補成分 (2M3MB-P) と呼ぶ。NIST の化合物ライブラリにて検索したところ、2M3MB-P のマススペクトルと一致する化合物は存在していなかった。DB-WAX カラムを使用した 2M3MB-P の RI は 1179 で、DB-17 カラムを使用した RI は 902 であった。

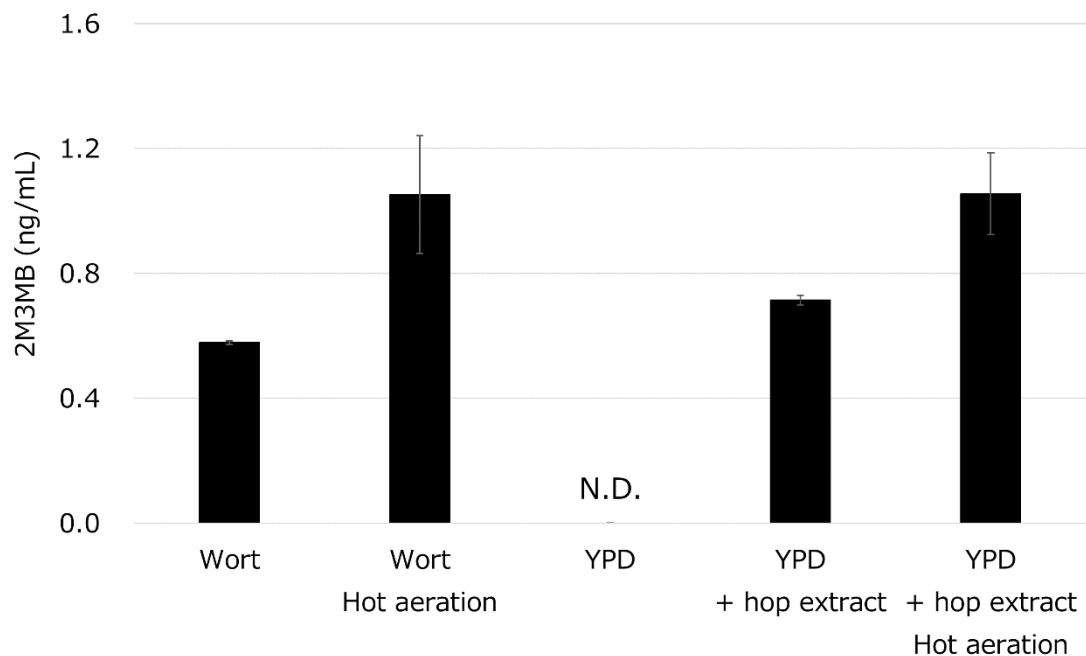


Fig. 3-2. 麦汁および YPD 培地を発酵させた後の 2M3MB 濃度

麦汁中と YPD 培地中のイソアルファ酸量を揃え、ホットエアレーション有り/無しの麦汁と、ホットエアレーション有り/無しのイソ化ホップエキスを添加した YPD 培地を発酵させた。麦汁同様、イソ化ホップエキスを含む YPD 培地から得られた発酵液においても 2M3MB が検出された。さらに、麦汁と同様に、イソ化ホップエキスをホットエアレーションすることで、YPD 培地を発酵させた後の 2M3MB の濃度が増加した。この結果は、イソ化ホップエキス中の成分と空気が反応することにより 2M3MB 前駆体が形成されたことを示している (Noba, 2018)。

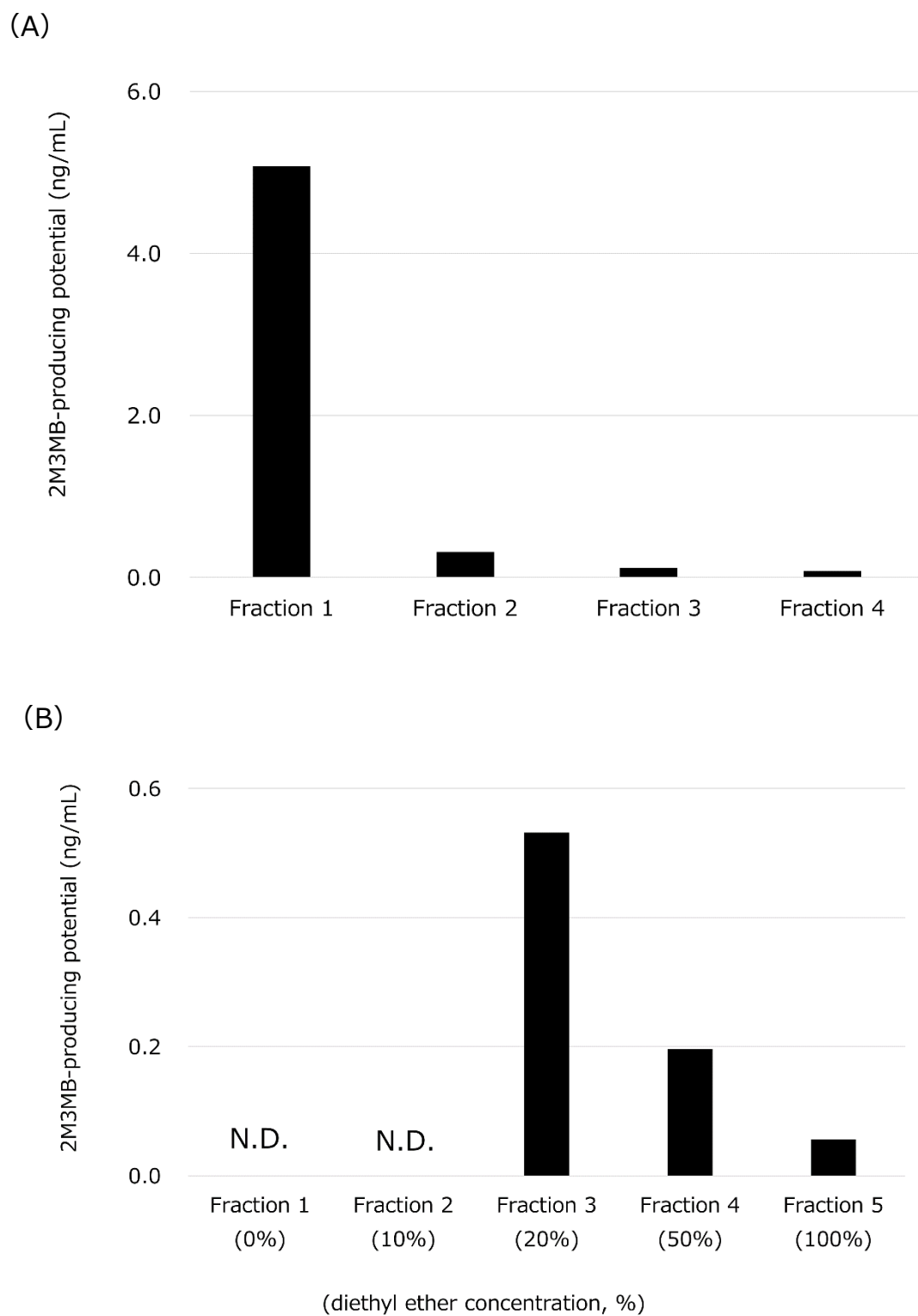


Fig. 3-3. 蒸留画分 (A) および順相カラムクロマトグラフィーの画分 (B) の 2M3MB 生成ポテンシャル

フラクション 1 の 2M3MB 生成ポテンシャルが最も高く、蒸留液に 2M3MB 生成ポテンシ

ヤルがあることから、2M3MB 前駆体は揮発性成分であることがわかった。順相カラムクロマトグラフィーの分画液の中からジエチルエーテルの濃度が 20%以上の画分に 2M3MB 前駆体が存在していることがわかった (Noba, 2018)。

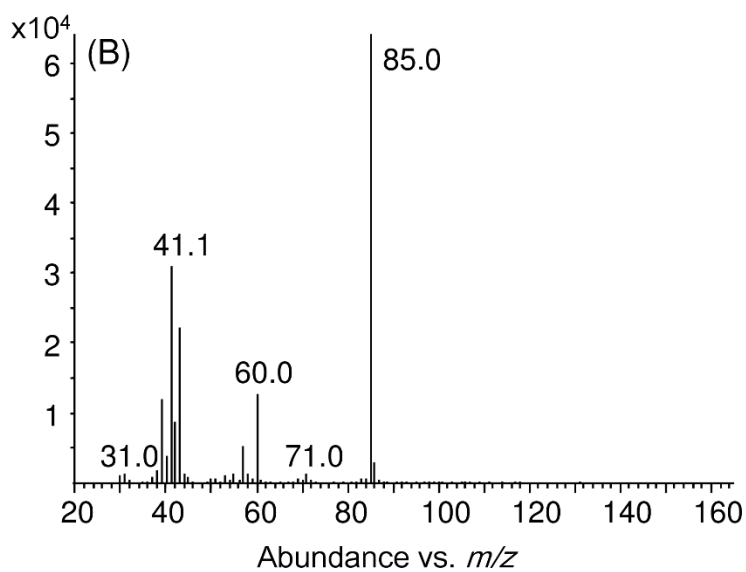
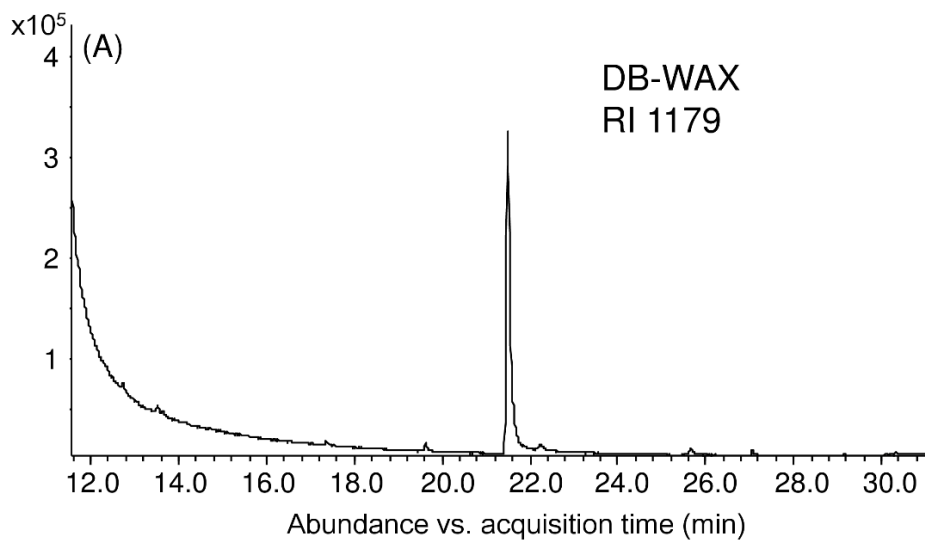


Fig. 3-4. 分取 GC で得られた最終分画液の GC-MS クロマトグラム (A) と RI1179 の画分の MS スペクトル (B)

1 個の大きなピークのみが検出され、分取 GC による選択的な精製が成功した。この画分の 2M3MB 生成ポテンシャルは 2.6 ng/mL であり、NIST の化合物ライブラリにはこのマススペクトルと一致する化合物は存在していなかった (Noba, 2018)。

3.3.3. 2M3MB-P の構造決定

2M3MB-P はマススペクトライブラリに存在しない未知化合物であったため、高分解能 GC-MS による解析を行った。Fig. 3-5 (A) に示すように、メタン PICI により $[M+H]^+$ 、 $[M+C_2H_5]^+$ 、 $[M+C_3H_5]^+$ 、メチルアミン PICI により $[M+H]^+$ 、 $[M+CH_3NH_3]^+$ と推定されるカチオン付加分子が検出された。 $[M+H]^+$ は m/z 101.0597 ($\Delta +0.14$ mDa) であり、2M3MB-P の分子式を $C_5H_8O_2$ と決定した。2M3MB-P は揮発性化合物であるため、NMR 分析に必要な濃度を得るためにサンプルを十分に濃縮することができなかった。そこで、GC-QTOF 分析で得られたフラグメントイオンから構造を推定し、2M3MB-P の GC-MS データと合成品の GC-MS データを比較して構造を決定した。メタン PICI モードで検出された主イオンを親イオンとして使用し、プロダクトイオンスキャンを実施した。Fig. 3-5 (B) は、 $[M+H]^+$ および $C_5H_9O^+$ を親イオンとして得られたプロダクトイオンスペクトルを示す。 $C_5H_9O^+$ から $C_5H_7^+$ のフラグメントイオンが検出されたことから、2M3MB-P は炭素が 5 個つながった骨格を持つと予想された。2M3MB の分子式は $C_5H_{12}OS$ であり、2M3MB-P も末端にメチル基を持つ、特徴的なイソプレン骨格が保存されている可能性が高いと考えられた。続いて、分子イオンである $[M+H]^+$ から、 $C_4H_9O^+$ のフラグメントイオンが検出された。CO が脱離したことから、2M3MB-P の 1 個の酸素原子が炭素骨格の末端に存在していること、2 つの酸素原子が同一炭素原子上に存在しないと予想された。最後に、2M3MB ($C_5H_{12}OS$) と 2M3MB-P ($C_5H_8O_2$) の分子式を比較することにより、2M3MB-P の酸素 1 原子が硫黄原子に置換されて 2M3MB が生成すると予想された。2M3MB-P 分子は 2M3MB 分子よりも水素原子が 4 つ少ないため、2 個の二重結合、もしくは 2 個の環、もしくは 1 個の二重結合と 1 個の環があると推定された。これらを合わせて考えることにより、2M3MB-P の構造を 2,3-epoxy-3-methylbutanal (EMB) であると推定した (Fig. 3-6)。EMB の標準品を文献 (Wang, 2008) に従って合成し、GC-MS で分析した結果 (Fig. 3-6)、イソ化ホップエキスの最終分画液中に含まれていた 2M3MB-P とリテンションタイムおよびマススペクトルが完全に一致したことから、2M3MB-P は EMB であると結論付けた。私が知る限り、EMB はこれまで食品中で報告されたことがない成分であった。

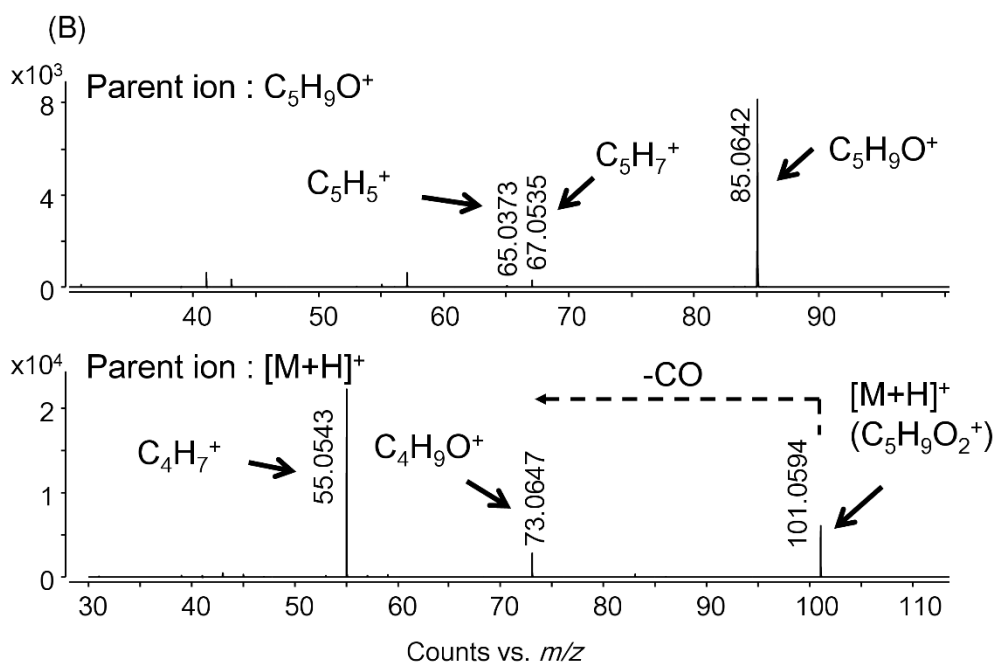
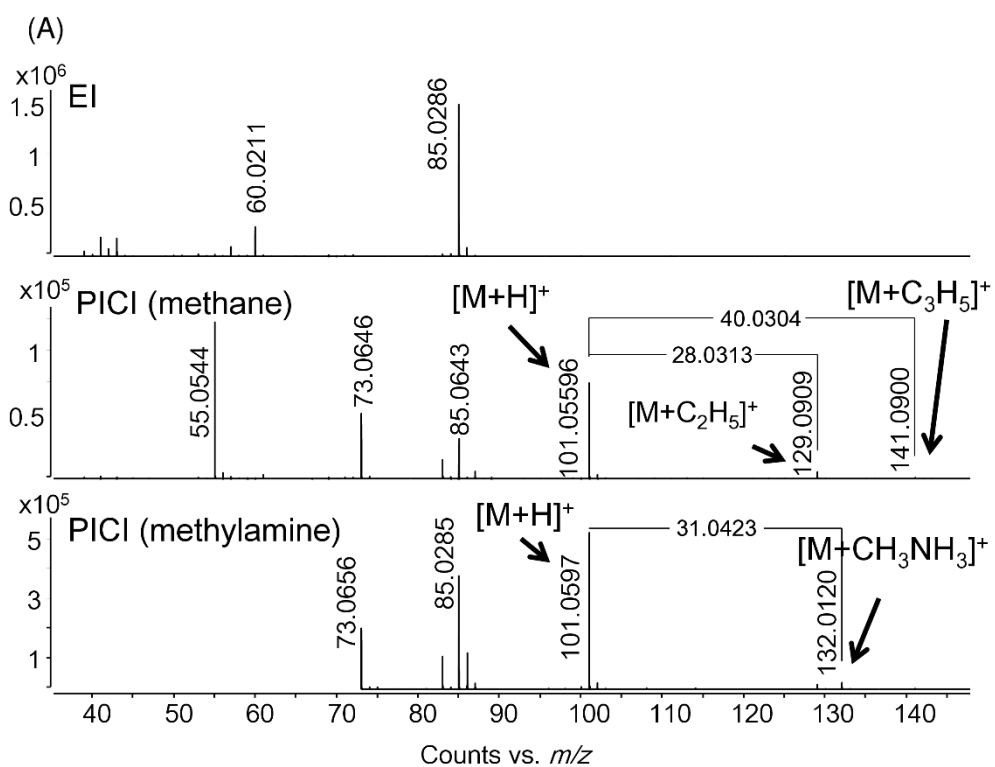


Fig. 3-5. GC-QTOF による 2M3MB-P のマススペクトル (A) と、 $C_5H_9O^+$ を親イオンとしたプロダクトイオンスペクトル (B)

メタン PICI により $[M+H]^+$ 、 $[M+C_2H_5]^+$ 、 $[M+C_3H_5]^+$ 、メチルアミン PICI により

$[M+H]^+$ 、 $[M+CH_3NH_3]^+$ と推定されるカチオン付加分子が検出された。 $[M+H]^+$ は m/z 101.0597 ($\Delta +0.14$ mDa) であり、2M3MB-P の分子式を $C_5H_8O_2$ と決定した。メタン PICI モードで検出された $[M+H]^+$ および $C_5H_9O^+$ を親イオンとしてプロダクトイオンスペクトルを得た。 $C_5H_9O^+$ から $C_5H_7^+$ のフラグメントイオンが検出されたことから、2M3MB-P は炭素が 5 個つながった骨格を持つと予想された (Noba, 2018)。

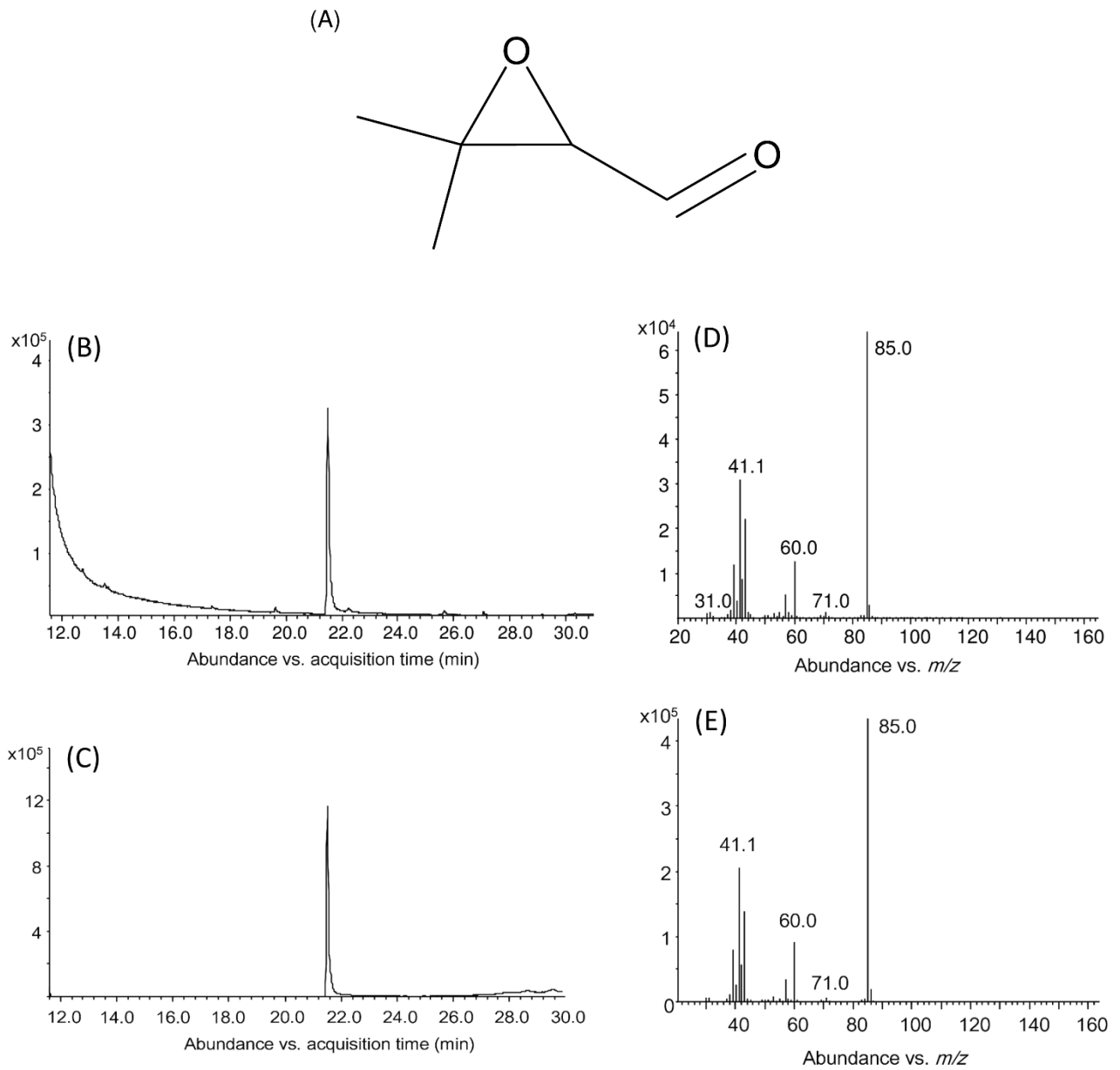


Fig. 3-6. 2,3-epoxy-3-methylbutanal (EMB)の構造 (A) と2M3MB-PのGC クロマトグラム (B) および合成した EMB のGC クロマトグラム (C) 、2M3MB-Pのマススペクトル (D) および合成した EMB のマススペクトル (E)

EMB の標準品を合成し、GC-MS で分析した結果、イソ化ホップエキスの最終分画液中に含まれていた 2M3MB-P とリテンションタイムおよびマススペクトルが完全に一致した (Noba, 2018) 。

3.3.4. EMB の添加発酵試験

EMB および酵母を無ホップ麦汁へ添加し、発酵後の 2M3MB 濃度を測定した (Fig. 3-7)。無ホップ麦汁を発酵させた場合、2M3MB は生成しなかったが、EMB を添加すると、添加濃度に応じて、2M3MB が生成した。一連のイソ化ホップエキス抽出物の解析およびこの EMB 添加試験の結果から、EMB は 2M3MB 前駆体であることが明らかとなった。EMB から 2M3MB への変換率は約 3%であった。過去に、前駆体候補として報告されていた 3MBoI については、その 2M3MB への変換率が 0.001%以下であり、2M3MB 生成へ寄与していないことが示されている (Noba, 2017)。それと比較して EMB から 2M3MB への変換率は非常に高いことがわかった。

3.3.5. ビールにおける 2M3MB 生成機構仮説

2M3MB はホップに由来し、EMB はイソ化ホップエキスから精製できたため、EMB はイソアルファ酸から生成すると予想される。ホットエアレーションによる麦汁の酸化が発酵後のビール中の 2M3MB の濃度を増加させるため、イソアルファ酸が酸化すると EMB が形成されると推定される。ビールの製造工程において、ホップの添加後の麦汁煮沸工程中またはそれに続く工程で EMB が生成すると考えられる。EMB と 2M3MB の構造を比較すると、EMB のエポキシ基が SH 基に置き換わり、末端アルデヒド基がアルコール基に置き換わっている。エポキシアルデヒドと硫化水素は容易に反応することが知られている (Sullivan, 1960)。麦汁中のアルデヒドが酵母の還元酵素によって還元されることも知られている (Debourg, 1994, Vesely, 2004)。まとめると、ビールの発酵中に酵母による麦汁中成分の代謝が進み、たとえば硫化水素等の硫黄源と EMB の反応や EMB のアルデヒド末端の還元が起こることで、2M3MB が生成すると考えられる (Fig. 3-8)。

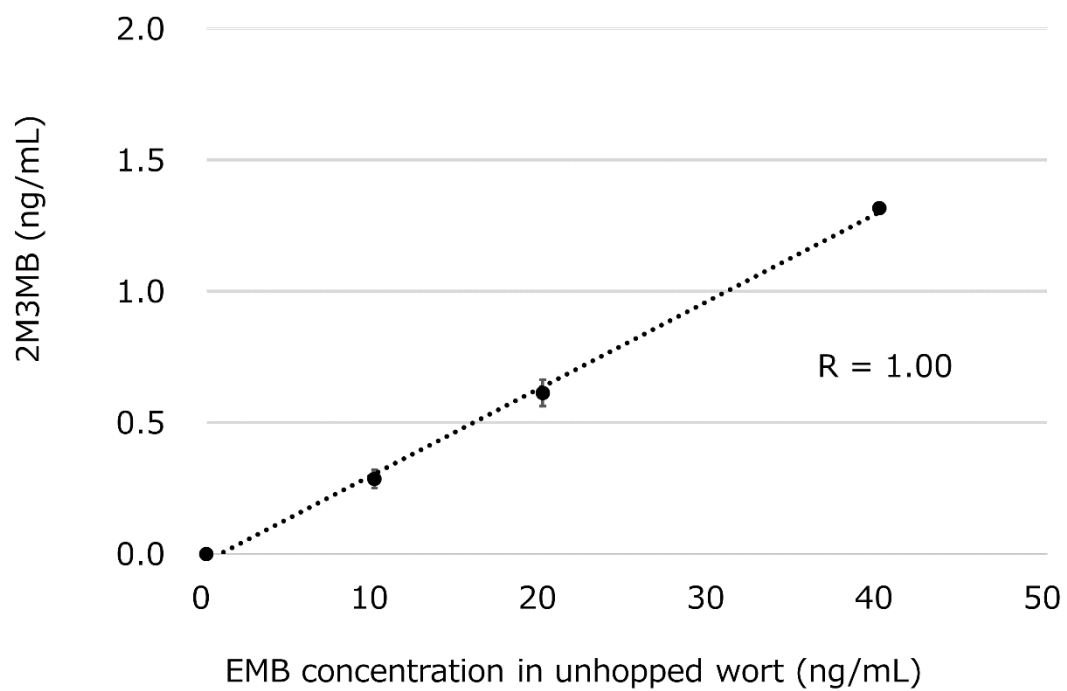


Fig. 3-7. EMB を添加した無ホップ麦汁を発酵させた後の 2M3MB 濃度 ($n = 3$)
 無ホップ麦汁を発酵させた場合、2M3MB は生成しなかったが、EMB を添加すると、添加濃度に応じて、2M3MB が生成した (Noba, 2018) 。

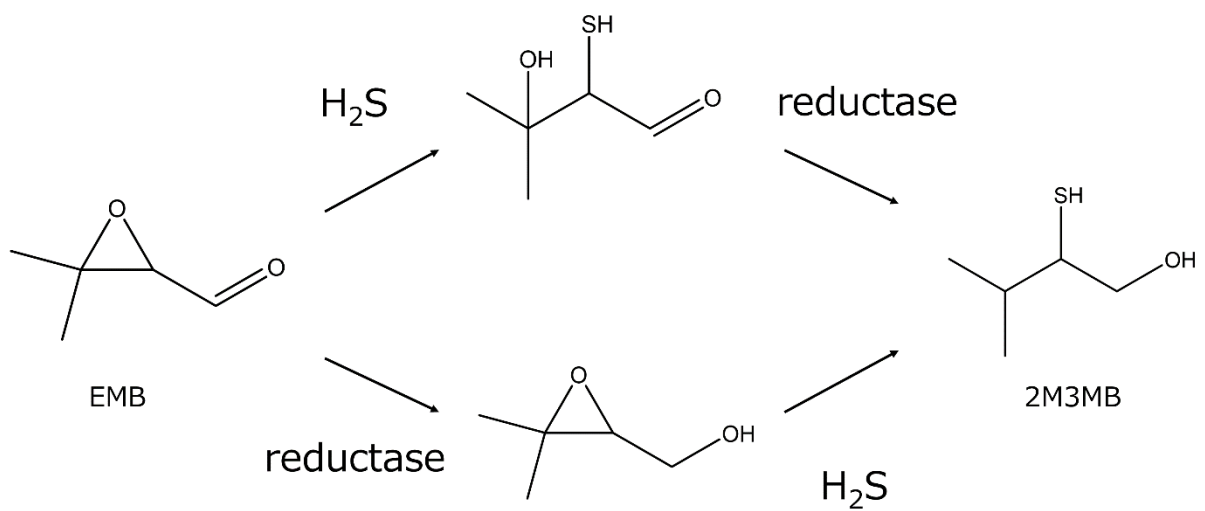


Fig. 3-8. 予想される 2M3MB 生成機構

ビールの発酵中に酵母による麦汁中成分の代謝が進み、たとえば硫化水素等の硫黄源と EMB の反応や EMB のアルデヒド末端の還元が起こることで、2M3MB が生成すると考えられる。EMB のアルデヒド末端がアルコールに変換される反応と、EMB のエポキシ基が開裂し、チオール基が付加する反応の順序によって、いずれかの経路を経ると考えられる。

3.4. 結論

本章では、ビール中のタマネギ様オフフレーバーの原因成分である 2M3MB の前駆体を探索した。イソ化ホップエキス中に含まれる 2,3-epoxy-3-methylbutanal (EMB) を 2M3MB の主要な前駆体として同定した。繰り返しとなるが、EMB は、食品中で初めて検出された成分である。EMB 自体の匂いは、タマネギ様オフフレーバーとは異なっており、麦汁中にはタマネギ様オフフレーバーはなく、発酵で生成する点も過去の報告と一致していた。

前駆体の構造に基づいて、2M3MB の生成機構を提案した。その生成機構に基づくと、EMB の濃度は、醸造工程中のイソアルファ酸の酸化を抑制することにより低下する可能性がある。さらに、EMB の 2M3MB への変換は、おそらく硫化水素などの硫黄源と酵母のアルデヒド還元活性のコントロールにより抑制できると推察される。麦汁中の EMB 濃度を定量化し、ビール製造工程中の 2M3MB の生成に関与する要因を詳細に調査することで、提案した生成機構が検証できると考えられる。2M3MB 前駆体である EMB を発見したことで、2M3MB の生成メカニズムの解明を通じて、ビールのタマネギ様オフフレーバーを制御することが現実味を帯びてきたと言える。

第 4 章

ビール中の 2M3MB 生成機構の解明 part I : 発酵中の重要成分の同定

4.1. 緒言

第 3 章においてビールのタマネギ様オフフレーバーの寄与成分である 2M3MB について、麦汁中に含まれる前駆体を探索し、ホップエキスから EMB を同定した。本章では、EMB の由来と EMB から 2M3MB への生成経路について明らかにすることを試みた。最初に EMB の定量分析法を構築し、ビール醸造中の EMB 濃度を測定した。続いて、2M3MB の生成要因として見出した麦汁のホットエアレーションが EMB を増加させるか検証した。また、EMB 自体はチオール化合物でなかったため、EMB の構造から 2M3MB へ至る反応中間体を推定し、GC-MS および GC-MS/MS を用いて EMB および、反応中間体のビール発酵中の濃度を追跡した。さらに、モデル実験にて EMB や中間体の生成への関与が推定された成分を用いて、実際に EMB や反応中間体が生成するか調査した。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 試薬

2M3MB (95%)、D₈-2M3MB (95%)、EMB (95%)、D₆-EMB (95%)、2,3-epoxy-3-methylbutanol (95%)、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (95%)、D₆-2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (95%) はナード研究所 (Hyogo, Japan) の委託合成品を使用した。3-Methoxy-1-butanol (98.0%) は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。硫酸アンモニウム (99.5%)、酢酸 (99.7%)、酢酸ナトリウム (98.5%) は和光純薬 (Tokyo, Japan) より購入した。メタノール (残留農薬試験用)、エタノール (残留農薬試験用)、ジクロロメタン (残留農薬試験用)、ヘキサン (残留農薬試験用)、無水硫酸ナトリウム (残留農薬試験・PCB 試験用)、硫化ナトリウム・九水和物 (98.0%) は関東化学 (Tokyo, Japan) より購入した。2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr, 99%) は Sigma-Aldrich (MO, USA) より購入した。イソアルフ

ア酸 (Iso-Extract 30%)、Dihydro (Rho) -イソアルファ酸 (Rho Iso-Extract 30%)、Tetrahydro-イソアルファ酸 (Tetra Iso-Extract 10%) は Hopsteiner (NY, USA) より購入した。

4.2.2. ホットエアレーション

500 mL の無ホップ麦汁に、イソアルファ酸、もしくは、Rho-イソアルファ酸、Tetrahydro-イソアルファ酸を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、90 °C、5 分間ホットエアレーションを行った。麦汁の作成およびホットエアレーションの方法は既報の通り実施した (Noba, 2017)。

4.2.3. 小スケール発酵試験

酵母株は Weihenstephan 34/70 (W34/70) 下面発酵酵母を使用し、尾形ら (Ogata, 2013) の記述に従って培養した。麦汁は既報と同様に作成し (Noba, 2018)、次のように発酵試験を実施した。

(1) 5 L シリンドロコニカルタンク

5 L のステンレス製シリンドロコニカルタンクを用いて、5 L の麦汁 に対し酵母数が 20×10^6 cells/mL になるよう W34/70 下面発酵酵母を添加した。12 °C 一定、加圧条件 ($0.5 \text{ kg}/\text{cm}^2$) でエキス 1.5%以下になるまで、7 日間発酵させた。発酵中にサンプリングが必要な場合は 5 L の発酵タンクを使用した。

(2) 200 mL トールチューブ

200 mL のプラスチック製のトールチューブを用いて、200 mL の麦汁に対し、酵母数が 20×10^6 cells/mL になるよう W34/70 下面発酵酵母を添加し、15 °C にて 7 日間発酵させた。発酵中、発酵液の対流を促進するために、沸騰石 (1 g) を添加した。2M3MB 中間体の特定のために、無ホップ麦汁へ 2,3-epoxy-3-methylbutanol (中間体候補 1) もしくは、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (中間体候補 2) を 20 ng/mL となるように添加した。

4.2.4. EMB および 2,3-epoxy-3-methylbutanol (中間体候補 1) 分析方法

酵母が入っているサンプルについては、4 °C、 $9000 \times g$ 、15 分遠心し、酵母を除去した。氷冷下、20 g のサンプルに 50 μL の D₆-2,3-epoxy-3-methylbutanal (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ エタノール溶液) および 50 μL の 3-Methoxy-1-butanol (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ エタ

ノール溶液) を内部標準 (IS) として添加した。検量線を作成する際には、測定成分の標準液を 0 から 40 ng/mL となるように 6 水準添加した。6 mL のメタノール、6 mL のミリ Q 水を 2 回通してコンディショニングした InertSep MA-1 カラム (500 mg/6mL, GL サイエンス (Tokyo, Japan)) に速やかに試料を負荷した。素通り画分を回収し、さらに 6 mL のミリ Q 水を通して、全量を合わせた。得られた溶液に 6 g の硫酸アンモニウムおよび 4 mL のジクロロメタンを加え、200 rpm にて 10 分振とう後、ジクロロメタン層を回収した。再度ジクロロメタンを加えて、振とう、遠心の操作をさらに 2 回繰り返し、全てのジクロロメタン層を合わせ、5 g の無水硫酸ナトリウムを加え、30 分間静置して脱水した。窒素気流下、穏やかに 500 μ L まで濃縮し、GC-MS にて分析した。GC-MS 分析は、MSD5975C 四重極型質量分析装置に接続した Agilent 7890 ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies, CA, USA) を使用して実施した。DB-WAX キャピラリーカラム (Agilent Technologies、長さ = 60 m、内径 = 0.25 mm、膜厚 = 0.25 μ m) を用いて、キャリアガスとしてヘリウムを一定流量 (1.0 mL/min) 流して分離を行った。注入口の温度を 250 $^{\circ}$ C に設定し、1.0 μ L のサンプルをパルスドスプリットレスモードを使用して注入した。オーブンの温度は、40 $^{\circ}$ C (5 分間保持) から 160 $^{\circ}$ C まで 5 $^{\circ}$ C/min、その後 240 $^{\circ}$ C まで、10 $^{\circ}$ C/min で上昇するように設定した。70 eV の電子衝撃イオン化法 (EI) にてイオン化し、選択イオン検出 (SIM) モードで、2,3-epoxy-3-methylbutanal に対しては m/z 85 (Target ion) 、60 (qualifier ion) 、2,3-epoxy-3-methylbutanol に対しては m/z 59 (Target ion) 、85 (qualifier ion) 、D₆-EMB (IS) に対しては m/z 88 (Target ion) 、62 (qualifier ion) 、3-methoxy-1-butanol (IS) に対しては、 m/z 59 (Target ion) 、89 (qualifier ion) を測定した。

4.2.5. 2-mercapto-3-hydroxy-3-methyl-butanal (中間体候補 2) 分析方法

酵母が入っているサンプルについては、4 $^{\circ}$ C 、9000 $\times g$ 、15 分遠心し、酵母を除去した。9 g のサンプルに、0.5 mL の 1M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) および 50 μ L の IS (D₆-2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal, 1 μ g/mL) を添加した。検量線には、0-40 ng/mL の濃度範囲で 6 水準をサンプルに添加した。6 mL の 0.4% PFBB_r エタノール溶液を添加して混合した後、60 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。溶液を 10 分氷冷後、5 mL のヘキサンを加え、200 rpm、10 分間振とうして抽出した。ヘキサン層を回収し、2 g の無水硫酸ナトリウムを加え、30 分以上脱水した。窒素気流下、

穏やかにおよそ 500 μL まで濃縮し、GC-MS/MS にて分析した。GC-MS/MS 分析は、7000C トリプル四重極型質量分析装置に接続した Agilent 7890B ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies) を使用して実施した。HP-5MS UI キャピラリーカラム (Agilent Technologies、長さ= 30 m、内径= 0.25 mm、膜厚= 0.25 μm) を用いて、キャリアガスとしてヘリウムを一定流量 (1.2 mL/min) 流して分離を行った。注入口の温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、1.0 μL のサンプルをパルスドスプリットレスモードを使用して注入した。オーブンの温度は、50 $^{\circ}\text{C}$ (5 分間保持) から 150 $^{\circ}\text{C}$ まで 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇、150 $^{\circ}\text{C}$ で 8 分保持し、その後 300 $^{\circ}\text{C}$ まで、さらに 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇するように設定した。EI 法によりイオン化し、multiple reaction monitoring (MRM) モードにて、それぞれの成分に対して、Table 4-1 のトランジションを用いて測定した。

4.2.6. 2M3MB 分析方法

2M3MB 分析は既報に従って前処理を実施し (Noba, 2018)、分析装置を GC-MS から GC-MS/MS へ変更して分析した。GC-MS/MS 分析は、7010 トリプル四重極型質量分析装置に接続した Agilent 7890B ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies) を使用して実施した。DB-WAX UI キャピラリーカラム (Agilent Technologies、長さ= 30 m、内径= 0.25 mm、膜厚= 0.25 μm) を用いて、キャリアガスとしてヘリウムを一定流量 (1.2 mL/min) 流して分離を行った。注入口の温度を 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、1.0 μL のサンプルをパルスドスプリットレスモードを使用して注入した。オーブンの温度は、50 $^{\circ}\text{C}$ (2 分間保持) から 80 $^{\circ}\text{C}$ まで 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇、80 $^{\circ}\text{C}$ で 38 分保持し、その後 230 $^{\circ}\text{C}$ まで、さらに 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で上昇するように設定した。EI 法にてイオン化し、multiple reaction monitoring (MRM) モードで、それぞれの成分に対して、Table 4-2 のトランジションを使用して測定した。

Table 4-1. 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (中間体候補 2)定量用の GC-MS/MS パラメーター

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal	296	181 ^a	20
	296	87 ^b	20
D ₆ -2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal	302	121 ^a	10
	302	93 ^b	30

^a Target transition; ^b Qualifier transition. (Noba, 2020a)

Table 4-2. 2M3MB 定量用の GC-MS/MS パラメーター

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
2M3MB	120	89 ^a	6
	120	55 ^b	16
D ₈ -2M3MB	128	97 ^a	8
	128	61 ^b	14

^a Target transition; ^b Qualifier transition. (Noba, 2020a)

4.3. 結果と考察

4.3.1. EMB 分析法の構築

麦汁、発酵液中の EMB を定量するための分析法の開発を行った。麦汁に、ジクロロメタンを加えて振とう抽出し、GC-MS にて測定したところ、抽出液から EMB のピークが検出された。しかしながら、Fig. 4-1 に示すように麦汁の抽出液を室温にて、10 時間静置すると、そのピークエリアが 7 倍程度増加することが明らかとなった。第 3 章で示したように、イソ化ホップエキスを培地に添加し発酵させると、2M3MB が生成したことから、イソアルファ酸の存在下において前駆体が生成すると予想された。このため溶媒抽出時に、溶媒へイソアルファ酸が抽出され、保存中に酸素と接触することによって EMB が増加したと考えられた。そこで、イソアルファ酸を除去するため、固相抽出による前処理を試みた。サンプルを固相カラムに負荷し、イソアルファ酸を吸着させ、素通り液を回収し、溶媒抽出した。固相カラムの種類を検討した結果、陰イオン交換カラムである MA-1 を用いた場合に、保存前後のピークエリアが変化しなかった。このため陰イオン交換カラムにより前処理を行うことで、安定して分析可能となった。分析法のバリデーション試験結果を Table 4-3 に示した。

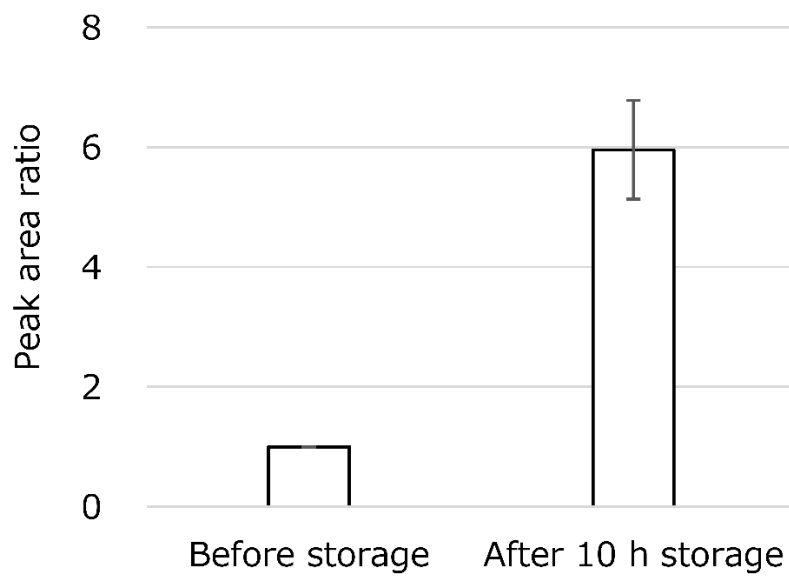


Fig. 4-1. 麦汁の溶媒抽出液を 10 時間静置した後の EMB のピーク面積の変化 ($n = 3$)

麦汁に、ジクロロメタンを加えて振とう抽出し、GC-MS にて測定したところ、抽出液から EMB のピークが検出された。麦汁の抽出液を室温にて、10 時間静置すると、そのピークエリアが 7 倍程度増加することが明らかとなった (Noba, 2020a)。

Table 4-3. EMB, 2,3-epoxy-3-methylbutanol, 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal および 2M3MB の定量法のバリデーション試験結果

	EMB ^a	Possible intermediate 1 ^a	Possible intermediate 2 ^b	2M3MB ^c
Linearity (<i>r</i>)	1	0.999	1	0.999
Limit of detection (ng/mL, S/N = 3)	0.29	0.19	0.013	0.021
Limit of quantification (ng/mL, S/N = 10)	0.97	0.64	0.044	0.069
Repeatability (RSD%, <i>n</i> = 6)	7.1	8.1	3.3	3.9
Intermediate precision (RSD%, <i>n</i> = 6, 3 days)	4.2	12.1	3.3	4.2

^a EMB および中間体候補 1 (2,3-epoxy-3-methylbutanol)はビールに 10 ng/mL を添加して測定した。 ^b 中間体候補 2 (2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal)はビールに 5 ng/mL を添加して測定した。 ^c ビールサンプル(*n* = 6) 中の 2M3MB 濃度は平均 0.21 ng/mL であった (Noba, 2020a) 。

4.3.2. EMB の生成に対するイソアルファ酸の種類の影響

以前の研究において、イソアルファ酸を含む YPD 培地にホットエアレーションを行うと発酵後の 2M3MB 量が増加した (Noba, 2018)。つまり、イソ化ホップエキスと高温の酸素が接触すると EMB が増加すると予想された。EMB の由来を調べるために、イソアルファ酸もしくは、Rho-イソアルファ酸、Tetrahydro-イソアルファ酸を無ホップ麦汁へそれぞれ、20 μ g/mL となるように添加し、ホットエアレーションしたサンプルとホットエアレーションしなかったサンプルのそれぞれの EMB 濃度を測定した (Fig. 4-2) その結果、無ホップ麦汁からは、EMB は検出されなかったが、イソアルファ酸、もしくは、Rho-イソアルファ酸、Tetrahydro-イソアルファ酸を添加したサンプルから EMB が検出された。さらに、ホットエアレーションをすることにより、イソアルファ酸を添加した麦汁中の EMB 濃度が大幅に増加した。一方で、Rho-イソアルファ酸、Tetrahydro-イソアルファ酸を添加した麦汁はホットエアレーションしてもその濃度がほとんど変わらなかった。Rho-イソアルファ酸はカルボニル基が還元されており、Tetrahydro-イソアルファ酸は、側鎖の 2 重結合が水素付加されている (Verzele, 1986)。このことから、イソアルファ酸と異なり、Rho-および Tetrahydro-イソアルファ酸は安定性が増加し、酸素と反応せず、EMB が生成しないと予想された。さらにこの結果から、EMB の生成に関与する部位は、ビールの光劣化臭の一つである、MBT の生成に関与する部位と同じであると考えられた。Rho-および Tetrahydro-イソアルファ酸は光に対して安定であるため、光ラジカル反応でイソアルファ酸から 3-methylbutenylradical が生成する反応が進行しないと考えられている (Sakuma, 1991)。

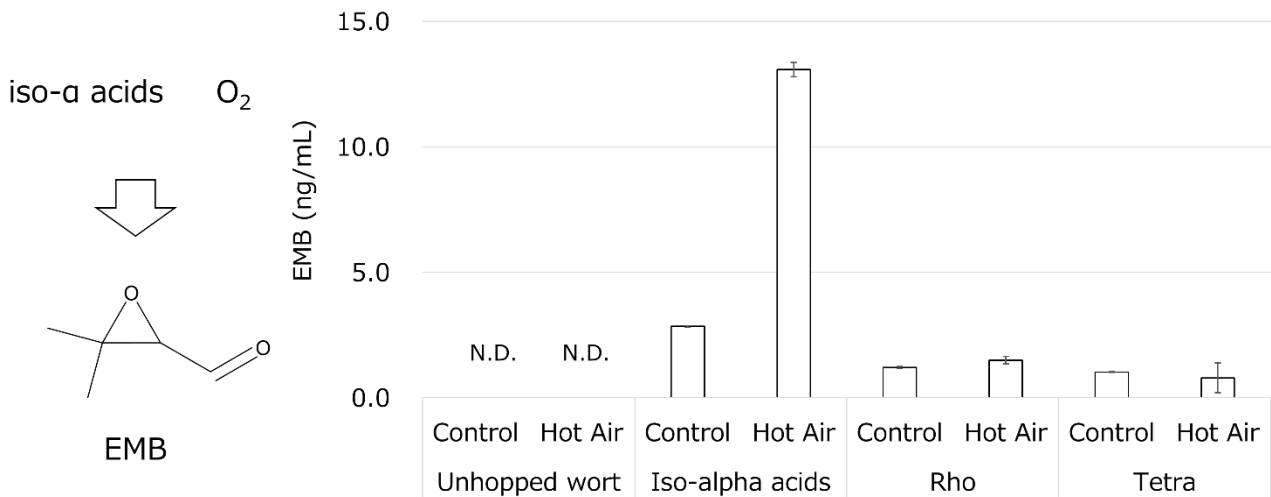


Fig. 4-2. ホットエアレーションによりイソアルファ酸と還元イソアルファ酸から生成した EMB の濃度($n = 3$)

無ホップ麦汁からは、EMB は検出されなかったが、イソアルファ酸、もしくは、Rho-イソアルファ酸、Tetrahydro-イソアルファ酸を添加したサンプルから EMB が検出された。さらに、ホットエアレーションをすることにより、イソアルファ酸を添加した麦汁中の EMB 濃度が大幅に増加した。一方で、Rho-イソアルファ酸、Tetrahydro-イソアルファ酸を添加した麦汁はホットエアレーションしてもその濃度がほとんど変わらなかった (Noba, 2020a)。

4.3.3. 酵母による中間体候補成分の 2M3MB への変換

次に EMB と 2M3MB の構造比較から 2M3MB 生成経路の推定を行った。それぞれの化合物の炭素骨格は同じであることから官能基の置換のみが起こっていると考えられた。変化している官能基は、EMB のエポキシ基とアルデヒド基の 2 つである。EMB から 2M3MB への変換過程には、エポキシ基の 2 位側の開裂とチオール基の付加、およびアルデヒド基のアルコール基への還元が予想される。エポキシ基が開裂し SH が付加する反応として、硫化水素とエポキシアルデヒドとの反応について調べられている (Sullivan, 1960) 。この文献によると、硫化水素 (もしくは sulfhydryl anion) がエポキシ基に隣接するカルボニル基に付加し、hemithiohydrate を形成する。隣接するオキシラン炭素上の硫黄による分子内置換により、一時的に dihydroxy episulfide が生成し、その後 β -hydroxy- α -mercaptocarbonyl 誘導体となると考えられている。さらに、発酵初期の硫化水素濃度が低い酵母株を用いた発酵試験において、2M3MB の生成量が少なかったという報告がある (Ogata, 2013) 。これらの知見から、硫化水素は 2M3MB の生成に関与していると考えた。アルデヒド基がアルコールへと変化する反応は、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼによる還元が良く知られている (De Smidt, 2008) 。EMB に対し、チオール基の付加とアルデヒドの還元のどちらか片方のみが起こると仮定すると、2,3-epoxy-3-methylbutanol (2M3MB 中間体候補 1) および 2-mercapto-3-hydroxy-3-methyl-1-butanol (2M3MB 中間体候補 2) の 2 成分が 2M3MB の中間体として考えられた (2M3MB 中間体候補 1 および 2 の化学構造は Fig. 4-6 を参照のこと)。

これらの中間体候補 2 成分について、酵母により 2M3MB へ変換されるかを検証した。200 mL の無ホップ麦汁へ 20 ng/mL となるように各候補成分を添加し、その後酵母を添加して 7 日間発酵させた。既報と同様の前処理法を用い、GC-MS/MS にて発酵後の 2M3MB 濃度を定量した。2M3MB 分析法のバリデーション結果については Table 4-3 に示し、定量した発酵液中の 2M3MB 濃度を Fig. 4-3 に示した。興味深いことに、無ホップ麦汁と、中間体候補 1 を添加した麦汁の発酵液からは 2M3MB はまったく検出されず、中間体候補 2 を添加した麦汁の発酵液からのみ 2M3MB が生成した。

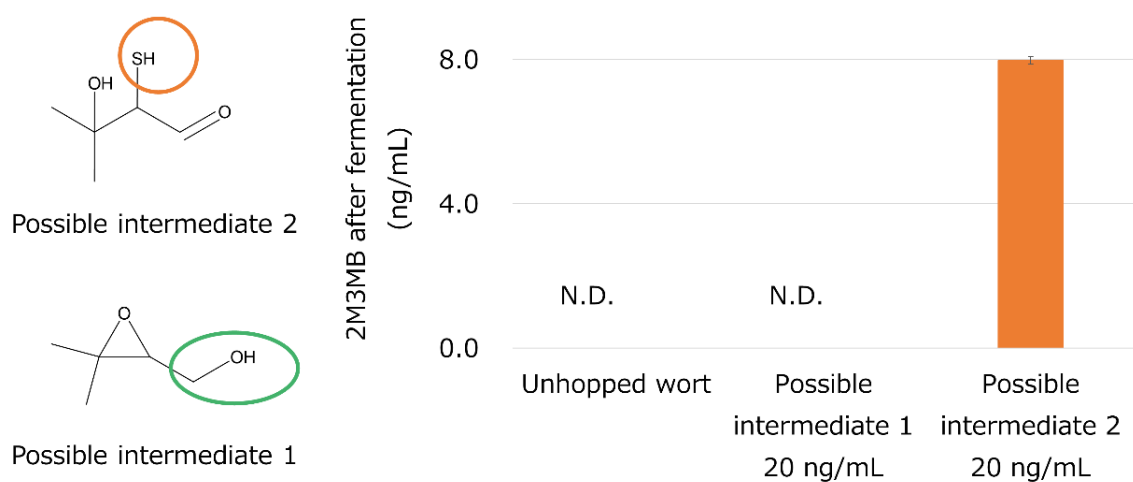


Fig. 4-3. 無ホップ麦汁に 2 個の 2M3MB 中間体候補を添加し、発酵させた後の 2M3MB 濃度 ($n = 3$)

無ホップ麦汁と、中間体候補 1 を添加した麦汁の発酵液からは 2M3MB はまったく検出されず、中間体候補 2 を添加した麦汁の発酵液からのみ 2M3MB が生成した (Noba, 2020a)。

4.3.4. EMB、2M3MB 中間体候補成分、硫化水素のビール発酵液中の濃度変化

添加試験により、中間体候補成分のうち 2-mercapto-3-hydroxy-3-methyl-1-butanal（中間体候補 2）のみから 2M3MB が生成したことから、この成分が 2M3MB の生成中間体である可能性が高いと考えられた。しかしながら、この成分が発酵中に実際に存在しているかどうか不明であることから、発酵中のもろみの分析を行った。同時に、EMB、中間体候補 1、硫化水素についても定量を行った。中間体候補 1 については、EMB の分析法と同じ方法で定量可能であった。また中間体候補 2 の定量については、誘導体化-GC-MS/MS 法を開発した。分析法のバリデーション結果を Table 4-3 に示した。硫化水素の定量は既報に従い、ヘッドスペース-GC-FPD により行った (Iijima, 2010)。

5 L の麦汁に、酵母を 20×10^6 cells/mL となるように添加し、発酵中のもろみをサンプリングして分析した。サンプリングは、酵母添加前、酵母添加後 3、5、7、9、24、48、168 時間後に実施した。Fig. 4-4 に示すように、EMB は発酵初期に急激に減少していた。硫化水素は、発酵開始後 7 時間で最大値を示し、その後急激に減少していた。興味深いことに、中間体候補 1、2 ともに検出され、さらに中間体候補 2 よりも 1 の濃度が高かった。これら 2 成分は私の知る限り食品中から初めて検出された成分であり、この 2 成分は、発酵初期に増加し、その後減少していた。2M3MB は中間体候補 2 の減少と同調して生成しており、発酵 48 時間でほぼ生成が完了していた。Fig. 4-3 の中間体候補成分添加試験とこの発酵試験の結果を合わせて考えることにより、中間体候補 2 が実際の 2M3MB の中間体であると結論づけた。中間体候補 1 については、酵母によって発酵中に EMB から還元されて生成すると予想された。Fig. 4-3 の中間体候補成分添加試験の結果より中間体候補 1 は 2M3MB に変換されなかったため、発酵中に生成するものの、2M3MB の生成には関与しない成分と結論づけた。発酵終了時点で、発酵前に検出した EMB 量のおよそ 15% 程度の 2M3MB が検出された。つまり EMB の一部が今回見出した中間体に変換され、それが 2M3MB となるが、一方で EMB の大部分は還元され、2M3MB 以外の化合物に変換されることが考えられた。さらにこれらの結果は EMB が直接 2M3MB に変換されないことを示しているため、「EMB は 2M3MB の前駆体である」という表現は適切ではなく、EMB は 2M3MB の生成に関与する重要な反応中間体の一つであると言うべきかもしれない。

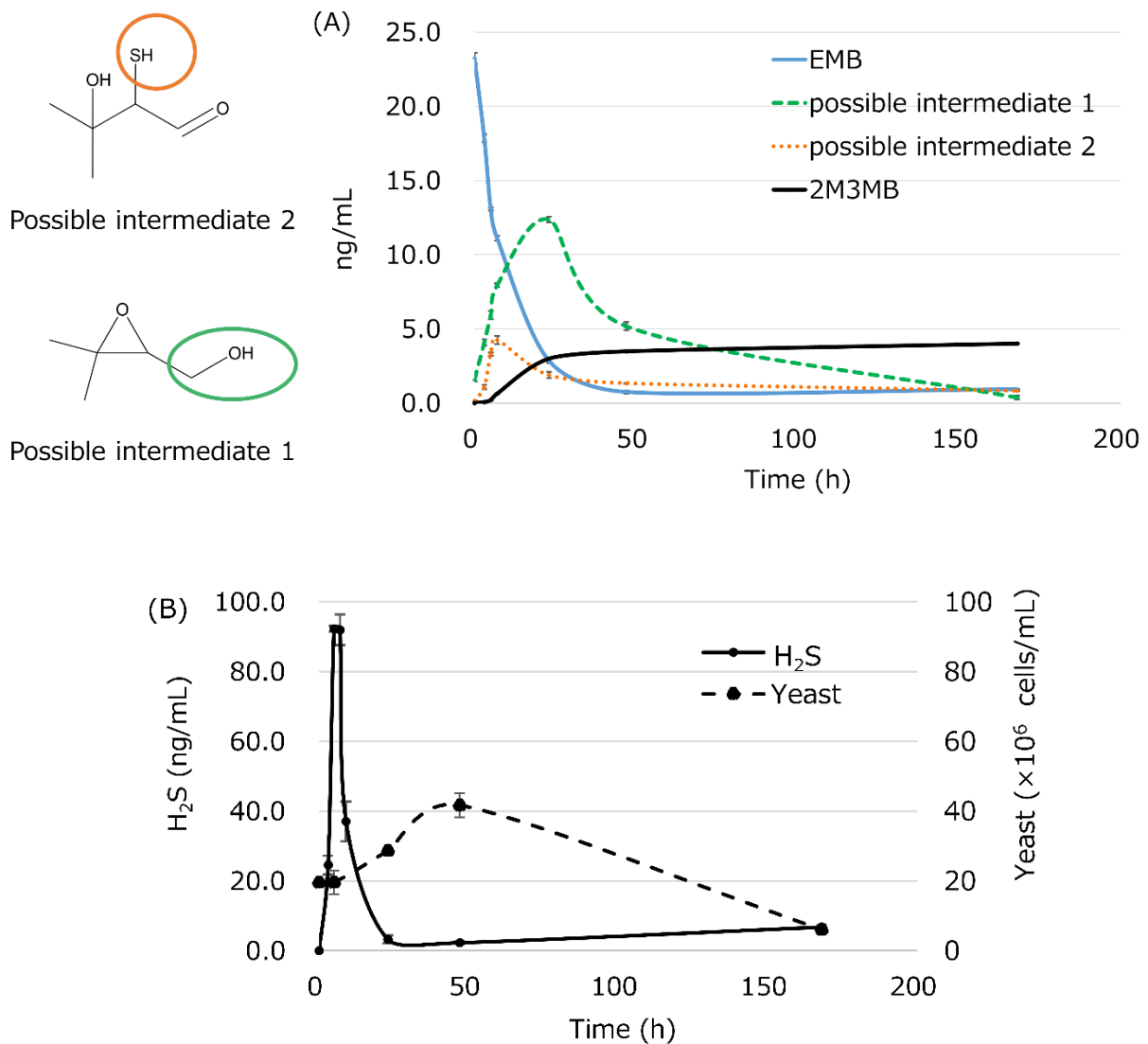


Fig. 4-4. EMB、中間体候補、2M3MB の発酵中の濃度 (A) 、および発酵中の硫化水素および酵母濃度 (B) の変化($n = 3$)

EMB は発酵初期に急激に減少していた。硫化水素は、発酵開始後 7 時間で最大値を示し、その後急激に減少していた。中間体候補 2 よりも 1 の濃度が高かった。2M3MB は中間体候補 2 の減少と同調して生成しており、発酵 48 時間でほぼ生成が完了していた。(Noba, 2020a)

4.3.5. EMBと硫化水素の反応

5 L 発酵試験において、EMB の減少期間に、約 100 ng/mL の硫化水素が検出されたため、EMB と反応する基質として十分な硫化水素が存在していると考えられた。そこで、50mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 中の 20 ng/mL の EMB に対して、100 ng/mL の硫化水素の添加もしくは無添加の溶液を 25 °C、1 時間静置した。硫化水素がない場合、反応後の溶液中から 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal は検出されなかったが、硫化水素を添加すると検出された (Fig. 4-5)。検出された 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal の濃度は、たった 1 時間の反応にもかかわらず、添加した EMB の半分程度の濃度であり、2,3-epoxy-3-methylbutanal と硫化水素の反応性は高いと推察された。また、酵母由来の他の硫黄化合物が EMB と反応する可能性もある。これについては、不活性化した酵母を添加し、酵母由来の硫黄化合物との反応を調べることで検証が可能であり、これは今後の検討課題と考えている。

4.3.6. 推定された 2M3MB 生成経路

これまでの試験結果に基づいて、2M3MB の生成経路についての概略を Fig. 4-6 に示す。イソアルファ酸と酸素が反応して EMB が生成する。次いで EMB の一部が硫化水素と反応し、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal が生成する。その後、酵母の作用によって 2M3MB が生成するというものである。一方、EMB の大部分は 2M3MB とならず発酵中に EMB のアルデヒド末端が還元され 2,3-epoxy-3-methylbutanol が生成し、さらに酵母によって代謝される。

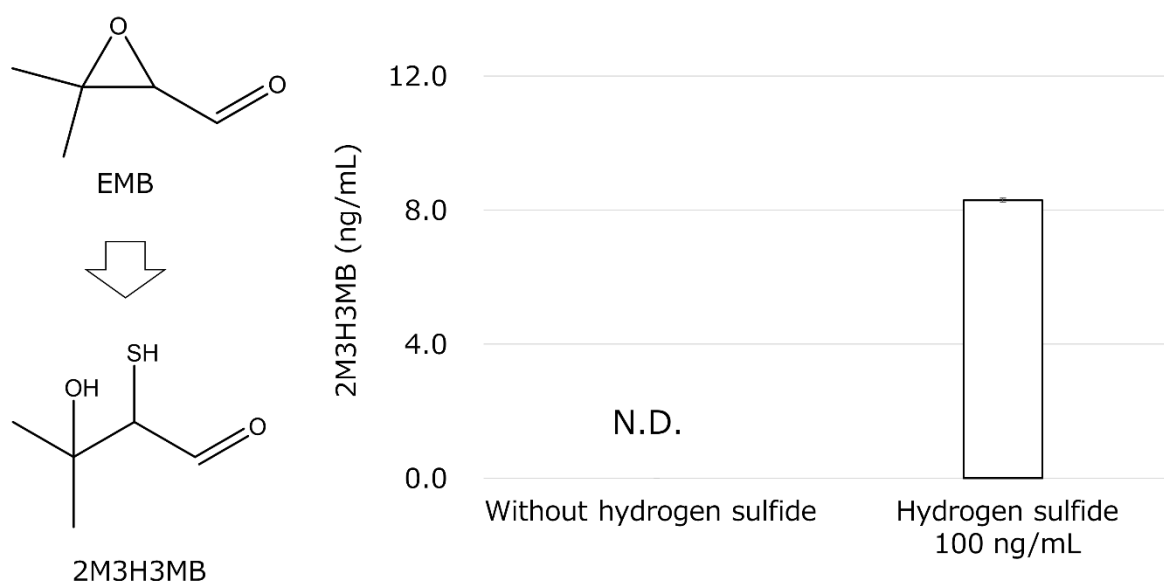


Fig. 4-5. EMBと硫化水素との反応 ($n = 3$)

硫化水素がない場合、反応後の溶液中から 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal は検出されなかったが、硫化水素を添加すると検出された (Noba, 2020a)。

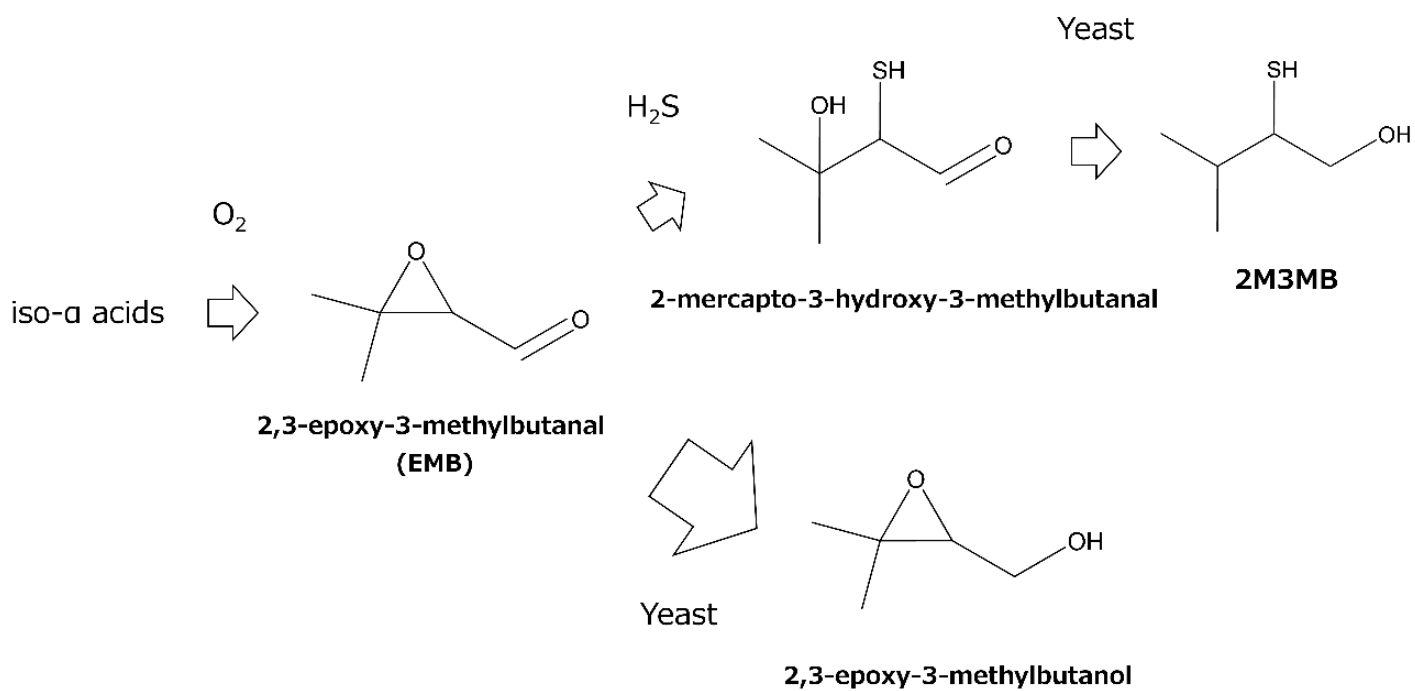


Fig. 4-6. 推定された 2M3MB 生成機構

イソアルファ酸と酸素が反応して EMB が生成する。次いで EMB の一部が硫化水素と反応し、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal が生成する。その後、酵母の作用によって 2M3MB が生成する。一方、EMB の大部分は 2M3MB とならず発酵中に EMB のアルデヒド末端が還元され 2,3-epoxy-3-methylbutanol が生成し、さらに酵母によって代謝される (Noba, 2020a)。

4.3.7. 異なるビール醸造所の麦汁中 EMB の定量

実際のビール製造において、3つの異なる醸造所から、同一ブランドビールの麦汁を採取し、EMBの濃度を測定した。Fig. 4-7に示したように、同じブランドの麦汁を製造していても、醸造所ごとに麦汁中のEMB濃度が異なることが明らかとなった。おそらく仕込み条件や設備の違いにより、麦汁中の酸素濃度が異なるためと考えられる。つまりEMBの濃度は麦汁の酸化指標として活用できると考えられる。EMBはイソアルファ酸から生成するため、ホップが添加される麦汁煮沸工程から、麦汁が冷却され、酵母が添加され、酵母によって酸素が消費されるまでの工程の酸素の混入を推定できると考えられる。さらに今後麦汁中のEMB濃度と、同一ロットのビール中の2M3MB濃度を測定することにより、2M3MBの変換率を算出でき、2M3MBの生成に関与している各因子の醸造所間の違いについても明らかにできると考えられる。

4.4. 結論

本章では、EMBと匂いの本体である2M3MBの構造比較を起点として、タマネギ様オフフレーバーの生成機構を推定した。モデル反応試験を実施し、成分の変換が起こることを実験的に明らかにした。さらに、可能性のある成分の定量法を開発し、ビール醸造中の成分の濃度変化を追跡した。モデル反応試験の結果に基づき、ビール発酵中の成分挙動を解釈すると、イソアルファ酸と酸素が反応してEMBが生成したのち、EMBは、硫化水素と反応して2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanalとなり、その後酵母の作用によって2M3MBへと変換されること、同時に大部分のEMBは、2,3-epoxy-3-methylbutanolへと変換され、2M3MBとならないことを明らかとした。これらのことから、生成経路の最も上流側にある酸素とイソアルファ酸の反応は、2M3MBの制御のための重要な因子と結論づけられる。また醸造所によって麦汁中のEMB濃度が異なる結果が得られたことから、EMBは麦汁の酸化指標として活用できると推察された。一方、EMBから2M3MBへと変換される過程のどの反応がボトルネックなのか、また酵母による2M3MBへの変換活性にビール醸造条件がどのように影響を与えるのかについては明らかとなっていない。それらを解明するには、酵母による2M3MBへの変換について詳しく調べる必要があると考えられる。

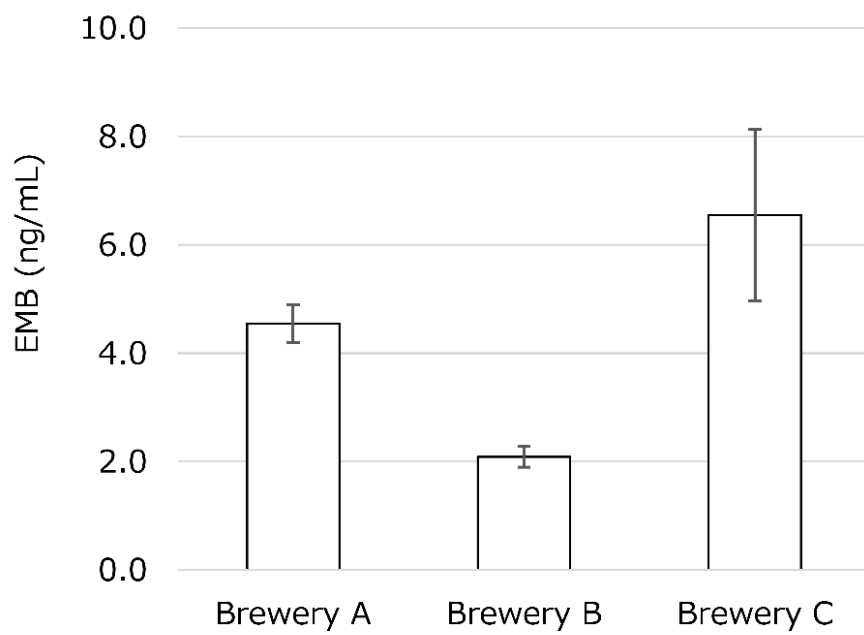


Fig. 4-7. 3つの異なる醸造所由来の麦汁中の EMB 濃度 ($n = 8$)

同じブランドの麦汁を製造していても、醸造所ごとに麦汁中の EMB 濃度が異なる (Noba, 2020a)。

第 5 章

ビール中の 2M3MB 生成機構の解明 part II : 酵母の重要酵素の同定

5.1. 緒言

第 4 章において、ビールのタマネギ様オフフレーバーの寄与成分である 2M3MB は、イソアルファ酸の酸化により生成した EMB とビール発酵中に生成する硫化水素から、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (2M3H3MB) を経て生成していることが明らかとなった。2M3H3MB から 2M3MB の変換は酵母内の酵素によって起こると推定された。

本章では、2M3H3MB が酵母によりどのように 2M3MB へと代謝されるのかを明らかにするため、変換に必要な酵素の特定を試みた。*Saccharomyces pastorianus* から分取クロマトグラフィーによって変換活性を有する酵素を精製し、LC-MS/MS にて解析した。2 つの酵素がこの変換の主要因として関与することが明らかとなり、それらの酵素の寄与を明らかにするために、*S. cerevisiae* の遺伝子破壊株を用いた試験および、組換え大腸菌から精製された酵素を用いた *in vitro* の反応試験を行った。得られた知見をもとに、2M3MB 生成機構の全体像を提示した。

5.2. 材料および方法

5.2.1. 試薬

プロテアーゼ阻害剤ミックス (DMSO 溶液)、ジチオスレイトール (DTT、97.0%)、塩化ナトリウム (99.5%)、硫酸アンモニウム (99.5%)、酢酸 (99.7%)、酢酸ナトリウム (98.5%)、D(+)-glucose (98.0%)、ampicillin ナトリウム (生化学用)、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG、99.0%)、還元型グルタチオン (97.0%) は和光純薬 (Tokyo, Japan) より購入した。1 M Tris-HCl (pH 7.0) は Nippon Gene (Tokyo, Japan) より購入した。D₈-2M3MB (95%)、EMB (95%)、2,3-epoxy-3-methylbutanol (95%)、2M3H3MB (95%) はナード研究所 (Hyogo, Japan) の委託合成品を使用した。Luria-Bertani (LB)

培地 (LB-broth Miller) は Formedium (Hunstanton, UK) より購入した。NADPH (90.0%)、2,3-butanedione (98.0%)、geraniol (96.0%)、3-methylbutanal (98.0%) は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。

5.2.2. 酵母破碎方法

酵母株は *Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan 34/70 (W34/70) 下面発酵酵母を使用し、既報 (Ogata, 2013) の記述に従って、yeast extract-peptone-dextrose (YPD, 1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) 培地を用いて培養した。培養液を $9000 \times g$ 、15 分、4 °C で遠心し酵母を回収した。50 mL チューブに 6 g の酵母、20 mL の 5 mM DTT を含む 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)、10 g の直径 0.5 mm のガラスビーズ (YGBLA05、安井機械、Osaka, Japan)、100 μ L のプロテアーゼ阻害剤を入れ、マルチビーズショーカー (MB601 (S)、安井機械) を用いて、4 °C、2700 rpm にて 30 秒振とう、30 秒静置を 1 サイクルとし、24 サイクルにわたって酵母を破碎した。その後 $3000 \times g$ 、5 分、4 °C で遠心し、上清をミラクロス (Merck, Darmstadt, Germany) にて濾過した。ろ液を透析膜 (Spectra/Por 7 Dialysis Membranes, MWCO=15 kD, Spectrum Chemical MFG, NJ, USA) に入れ、4 L の 5 mM DTT を含む 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) を用いて、4 °C で一晩脱塩した。脱塩後、 $5000 \times g$ 、5 分、4 °C で遠心し、上清を回収した。

5.2.3. 酵素の精製と同定

(1) 陽イオン交換樹脂を用いたオープンカラムによる精製

酵母を破碎し透析した溶液の 10 %の重量の陽イオン交換樹脂担体 (SP Sepharose Fast Flow, GE Healthcare, IL, USA) を採取し、蒸留水で洗浄した。さらに 100 mL の 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) にて洗浄した。透析液に洗浄済みの陽イオン交換樹脂を加え、室温にてゆっくりスターラーで 30 分間攪拌した。その後、オープンカラムに負荷し、3 カラムボリュームの 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) で洗浄後、5 カラムボリュームの 0.25 M NaCl を含む 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) で溶出した。溶出液は 4 L の 5 mM の DTT を含む 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) で透析膜を用いて、4 °C、一晩脱塩した。

(2) fast protein liquid chromatography (FPLC) による精製

透析後の溶液を、Hitrap SP HP カラム (1 mL, GE Healthcare) を用いて AKTA (explorer10S, GE Healthcare) にて分画した。移動相 A : 20 mM 酢酸ナトリウム (pH5.0) 、移動相 B : 20 mM 酢酸ナトリウム (pH5.0) 、0.5 M NaCl を使用し、流速 1 mL/min、検出波長 280 nm にて、以下の移動相条件でグラジエント溶出した。移動相条件[t (min) , % B]: (0, 0) , (30, 50) , (40, 100) , (45, 100) 。得られた各画分について 2M3MB 変換活性を測定した (変換活性測定法は下記参照) 。活性のあった画分を回収し、透析膜を用いて 2 L の 5 mM の DTT を含む 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) で透析膜を用いて、4 °C、一晚脱塩した。脱塩後の回収液を HitrapQHP (1 mL, GE Healthcare) を用いて分画した。移動相 A : 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 、移動相 B : 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 、0.5 M NaCl、流速 1 mL/min、検出波長 280 nm にて、以下の移動相条件でグラジエント溶出した。移動相条件[t (min) , % B] : (0, 0) , (40, 20) , (45, 100) , (50, 100) 。得られた画分について 2M3MB 変換活性を測定した。生成した酵素同定のための nanoLC-MS/MS 分析およびデータ解析は、日本プロテオミクス (Miyagi, Japan) が実施した。

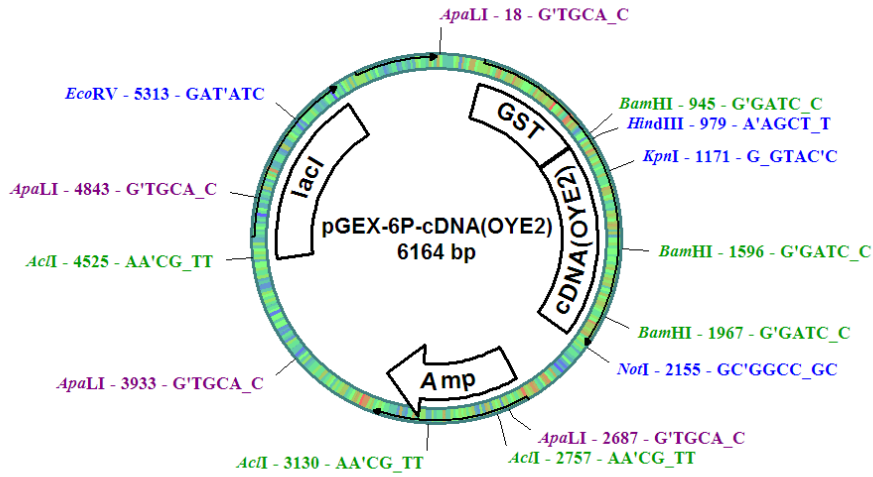
5.2.4. 2M3H3MB から 2M3MB への変換活性測定法

2.0 mL の反応溶液中に、20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 、100 ng/mL の 2M3H3MB、500 μ M NADPH、100 μ L の酵母破砕液もしくは精製した酵素を含むように調製し、25 °C、1 時間反応させた。最終精製画分に関しては、単独で活性のある画分がなく、2M3MB の変換に複数の酵素の関与が考えられたため、さらに精製前の酵母破砕液を 10 μ L (酵母菌体重量 3 mg から抽出した溶液に相当) 添加した。反応後の溶液に 100 μ L の内部標準 (1.0 μ g/mL D₈-2M3MB 溶液) 、1 g の硫酸アンモニウム、3 mL のジクロロメタンを添加し、200 rpm、20 min 振とう抽出した。3000 \times g、5 min で遠心分離し、ジクロロメタン層を回収し、0.5 g の無水硫酸ナトリウムを加え 10 分程度脱水した。その後、窒素気流下、穏やかに 100 μ L まで濃縮し、GC-MS/MS にて 2M3MB を分析した。分析条件は既報 (Noba, 2020a) に従った。酵母株の 2M3MB への変換活性の測定については、200 ml の YPD 培地に 20 ng/mL の 2M3H3MB、 20×10^6 個/mL となるように酵母株を加えて、3 日間 15 °C で培養し、培養液中の 2M3MB 濃度を測定した。

5.2.5. 組換え大腸菌の培養

pGEX-6P-1 ベクター (GE Healthcare) へ *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株由来の *OYE2* および *ADH6* 遺伝子を組み込み、glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として発現するベクターを作製した (Fig. 5-1) 。PCR 反応液 (50 μ L) には、10 μ L の 5x PrimeeSTAR GXL バッファー (Mg^{2+} plus) (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) 、2.5 mM dNTP Mix、0.8 μ M の各プライマー (Table 5-1) 、および 2.5 U PrimeSTARGXL DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ) を含み、次の PCR 条件にて増幅した。94 $^{\circ}$ C で 2 分間、98 $^{\circ}$ C で 10 秒間、58 $^{\circ}$ C で 15 秒間、68 $^{\circ}$ C で 2 分間 (35 サイクル) 。*ADH6* 遺伝子の PCR 産物を *Bam*HI および *Not*I で消化し、pGEX-6P-1 とライゲーションした。*OYE2* 遺伝子の PCR 産物を *Bam*HI、*Kpn*I、*Not*I で消化し、pGEX-6P-1 とライゲーションした。これらの組換えプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) コンピテントセルに導入し、構築された株をグリセロールストックとして保存した。ベクターの作製、大腸菌の形質転換、タンパク質発現条件検討については、ユニーテック社 (Chiba, Japan) へ委託した。*GST-OYE2* 発現株を 5 mL の LB 培地 (100 μ g/mL ampicillin) にて、37 $^{\circ}$ C、120 rpm で一晩振とう培養した。その後、1 L の LB 培地 (100 μ g/mL ampicillin) へ全量添加し、optical density (OD_{600}) の値が 0.5 に到達するまで 37 $^{\circ}$ C、110 rpm で振とう培養した。そこへ IPTG を 1 mM となるように添加し、16 $^{\circ}$ C で 19 時間振とう培養した。*GST-ADH6* 発現株については、LB 培地を 2% グルコース入りに変更し、さらに、IPTG の濃度を 0.1 mM へ変更した。

(A)



(B)

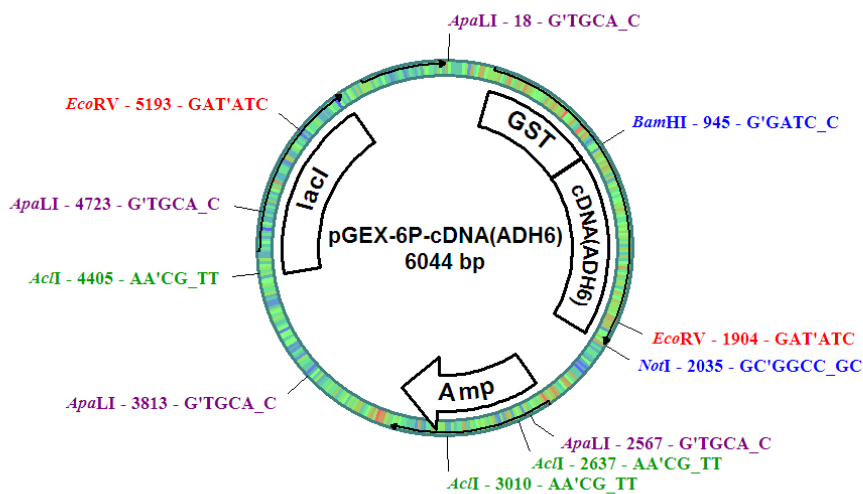


Fig. 5-1. (A) GST-OYE2 および (B) GST-ADH6 のベクターマップ

pGEX-6P-1 ベクター (GE Healthcare) へ *S. cerevisiae* S288C 株由来の OYE2 および ADH6 遺伝子を組み込み、glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として発現するベクターを作製した。プラスミド図はユニータック社より提供された (Noba, 2020b)。

Table 5-1. プラスミド構築に使用したプライマーのリスト

Name	Sequence (5'→3')	PCR objective
ASB30-O-ad-cDNA-F	AAAA GGATCC ATGCCATTTGTTAAGGACTTTAAGCC	Amplification of <i>OYE2</i>
ASB30-O-seq-cDNA-R2	TTAATTTGTTCTTCGGACCAGATAC	
ASB30-O-seq-cDNA-F1	ACCAACTTATTCAAACCAATCAAAA	
ASB30-O-ad-cDNA-R	AAAA GCGGCCGC TTAATTTTTGTCCCAACCGAGTTTT	
ASB30-A-ad-cDNA-F	AAAA GGATCC ATGTCTTATCCTGAGAAATTTGAAG	Amplification of <i>ADH6</i>
	AAAA GCGGCCGC	
ASB30-A-ad-cDNA-R	CTAGTCTGAAAATTCTTTGTCGTAGC	

pGEX-6P-1 ベクターへ *S. cerevisiae* S288C 株由来の *OYE2* および *ADH6* 遺伝子を組み込み、glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として発現するベクターを作製した。*ADH6* 遺伝子の PCR 産物を *Bam*HI および *Not*I で消化し、pGEX-6P-1 とライゲーションした。*OYE2* 遺伝子の PCR 産物を *Bam*HI、*Kpn*I、*Not*I で消化し、pGEX-6P-1 とライゲーションした。これらの組換えプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) コンピテントセルに導入した (Noba, 2020b)。

5.2.6. 組換え Oye2p および Adh6p の調製と活性測定

大腸菌の培養液を 4 °C、10,000 × g、5 min 遠心し、上清を捨てたのち、10 mL の 2 mM DTT を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) にて再度懸濁した。超音波ホモジナイザー (ULTRASONIC HOMOGENIZER MODEL H3-650, Kawajiri Machinery, Hyogo, Japan) を用い、チップ 7 mm、発振周波数 20 KHz、定格出力 650 W の 70% の出力、30 sec 破碎×30 sec 休止×10 回 (10 min) の条件で破碎を行った。得られた破碎液を 10,000 × g、4 °C、20 分遠心分離した後、0.22 μm のフィルターでろ過した。大腸菌破碎液を、GSTRAP HP カラム (5 mL, GE Healthcare) を用いて AKTA にて分画した。移動相 A: 1 mM DTT を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)、移動相 B: 1 mM DTT および 10 mM 還元型グルタチオンを含む Tris-HCl (pH 7.0) を使用し、流速 4.0 mL/min、検出波長 280 nm にて、以下の移動相条件で溶出した。移動相条件[t (min), % B]: (0, 0), (2, 0), (2.1, 100), (10, 100)。ピークのあった画分に 50 μL の PreScission Protease (GE Healthcare) を加えて、4 °C、一晩静置した。得られた溶液を上記と同条件にて一晩透析した。PreScission protease により切断された GST タグを除去するために、再度 GSTRAP HP カラムを用いて上記と同じ条件にて分画し、素通り液を回収した。

得られた溶液中のタンパク質濃度は、the Pierce Coomassie plus (Bradford) assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。キットに含まれる 2 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) の希釈液で作成した検量線と比較することにより、吸光度値をタンパク質濃度に変換した。得られたタンパク質の活性は Oye2p については 1.0 mL の反応液中に、0.5 μM (23 μg/mL) の酵素溶液、基質として、1.0 mM の 2,3-butanodione または 1.0 mM の geraniol、200 μM の NADPH、20 mM Tris-HCl (pH 7.0) を含むよう調製し、Adh6p については、1.0 mL の反応液中に、0.1 μM (4.2 μg/mL) の酵素溶液、基質として、1.0 mM の 3-methylbutanal、200 μM の NADPH、20 mM Tris-HCl (pH 7.0) を含むよう調製し、25 °C で反応させ、Shimadzu UV-1800 spectrometer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) を用いて、1、3、5、10 分後の 340 nm の吸光度を測定した。

5.2.7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

2M3MB 変換活性をもとに精製した酵母由来のタンパク質および、大腸菌過剰発現株

から精製したタンパク質を SDS-PAGE にて分離した。SDS-PAGE は 14% polyacrylamide gels (TEFCO, Tokyo, Japan) を使用して文献 (Laemmli, 1970) に従って実施した。分子量マーカーは Protein Molecular Weight Marker (Broad) (TaKaRa Bio) を使用した。染色は Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB, Bio-Rad, CA, USA) を用いた。

5.2.8. Adh6p の還元活性測定試験

2.0 mL の反応溶液中に、20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 、100 ng/mL の EMB、500 μ M NADPH、10 nM の精製した Adh6p を含むように調製し、25 °C、1 時間反応させた。反応前後の EMB および 2,3-epoxy-3-methylbutanol の濃度を GC-MS にて測定した。分析条件は既報 (Noba, 2020a) に従った。

5.2.9. 遺伝子 2 重破壊株作製法

孢子形成、四分子分離などの酵母遺伝学的手法は文献記載の通りに実施した (Amberg, 2005) 。*MAT* 座は PCR 法により解析した (Illuxley, 1990) 。*S. cerevisiae* BY4741、BY4742、BY4742 $\Delta adh6$ 、BY4742 $\Delta oye2$ は EUROSCARF collection より取得した。BY4741 と BY4742 $\Delta adh6$ からメチオニン、リジン要求性を用いて接合株 BYX_1、*MATa/a ADH6/ $\Delta adh6 his3\Delta 1/his3\Delta 1 leu2\Delta 0/leu2\Delta 0 LYS2/lys2\Delta 0 met15\Delta 0/MET15 ura3\Delta 0/ura3\Delta 0$* を作製した。作製した BYX_1 を孢子形成させ、四分子分離により一倍体株 BYX_ $\Delta adh6$ 、*MATa $\Delta adh6 his3\Delta 1 leu2\Delta 0 met15\Delta 0 ura3\Delta 0$* を分離した。BYX_ $\Delta adh6$ と BY4742 $\Delta oye2$ からメチオニン、リジン要求性を用いて接合株 BYX_2、*MATa/a $\Delta adh6/ADH6 OYE2/\Delta oye2 his3\Delta 1/his3\Delta 1 leu2\Delta 0/leu2\Delta 0 LYS2/lys2\Delta 0 met15\Delta 0/MET15 ura3\Delta 0/ura3\Delta 0$* を作製した。作製した BYX_2 を孢子形成させ、四分子分離により一倍体株 BYX_ $\Delta adh6 \Delta oye2$ 、*MATa $\Delta adh6 \Delta oye2 his3\Delta 1 leu2\Delta 0 lys2\Delta 0 ura3\Delta 0$* を分離した。

5.3. 結果と考察

5.3.1. 酵母破碎液添加試験

2M3MB は 2M3H3MB から、酵母により発酵中に変換されていることが示されている (Noba, 2020a) 。この変換に酵母による麦汁成分の代謝が必要なのかどうかを調べる

ため、YPD 培地にて培養した酵母を破碎して 0.45 μm のフィルター濾過した溶液を、バッファー溶液中で 2M3H3MB と反応させた (Fig. 5-2)。2M3H3MB に、酵母破碎液上清を添加すると 2M3MB が生成したが、一方で酵母破碎液を加熱処理すると、2M3MB が生成しなかった。これらのことから、2M3H3MB の変換に関して、麦汁中の成分は関与していないこと、また 2M3H3MB を変換しているのは酵母に含まれる熱に弱い成分であることが明らかとなった。つまり、酵母の酵素によって 2M3MB に変換されている可能性が高いと推察された。このアッセイ系を用いて、酵素の探索を試みた。

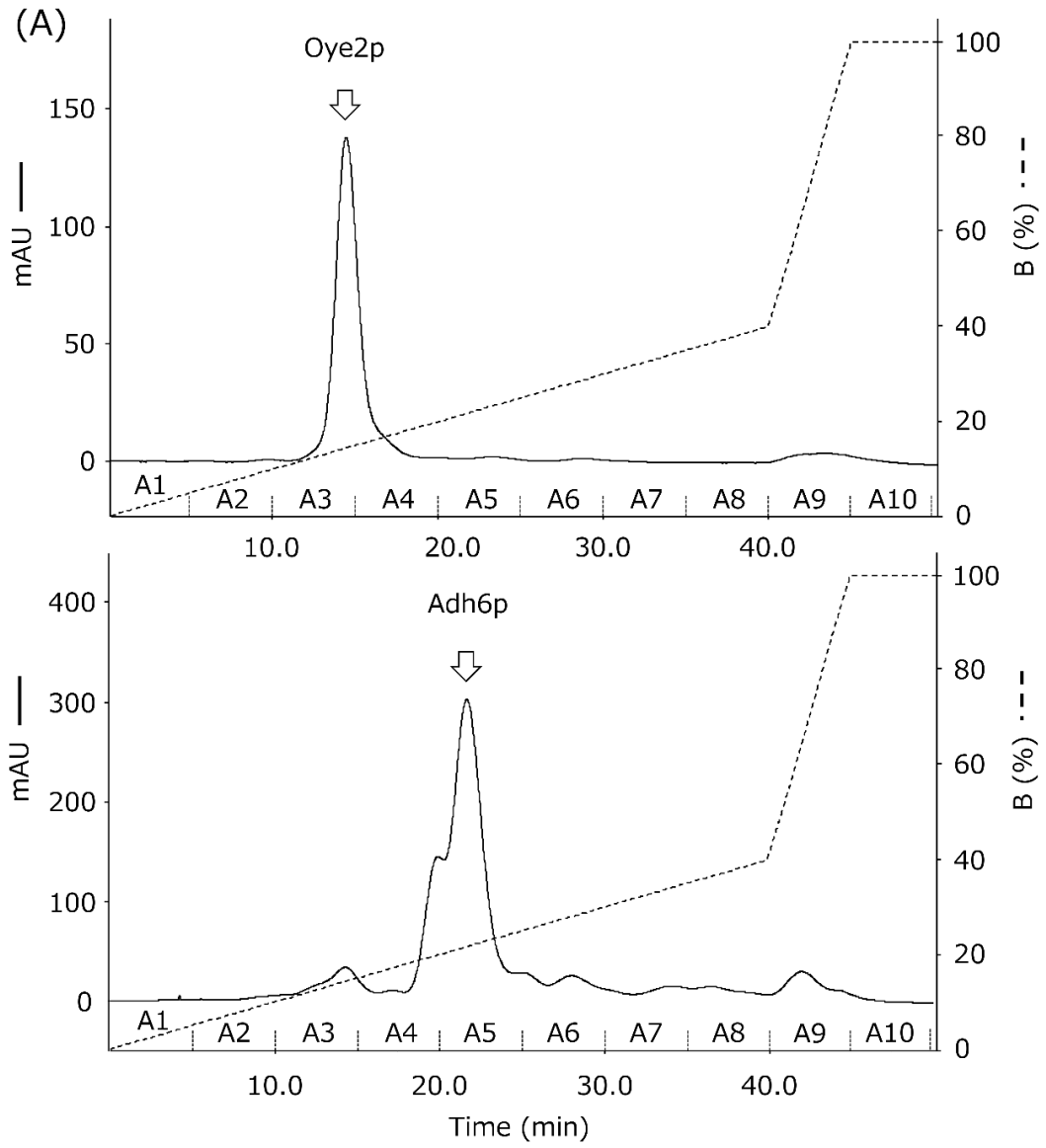


Fig. 5-2. 酵母破碎液による 2M3H3MB から 2M3MB への変換 ($n = 3$)

2M3H3MB に、酵母破碎液上清を添加すると 2M3MB が生成したが、一方で酵母破碎液を加熱処理すると、2M3MB が生成しなかった (Noba, 2020b)。

5.3.2. 2M3MB 変換酵素精製および同定

2M3MB の生成に酵母の酵素が関わっている可能性が高いと考えられたため、酵母破碎液から FPLC を用いて精製を行い、得られた酵素画分の 2M3MB 変換能を調べた。精製を進めていく過程において著しく活性が低下したため、補酵素の必要性について検討し、変換には NADPH が必要であることを見出した (data not shown)。また、精製が進むにつれて補酵素を添加しても変換活性の低下が起こり、陽イオン交換カラムにおいて弱い活性が 2 つの分離したフラクションで得られ、この画分についてさらに陰イオン交換カラムにより分画したところ、どの画分にも活性が検出されなかった (Fig. 5-3A)。この結果は、2M3MB の変換に 2 つ以上の酵素が関与していることを示す。そこで精製前の酵素破碎液を少量、陰イオン交換カラムの画分に加えて 2M3MB 変換活性を測定したところ、予想通り、主要な画分において 2M3MB 変換活性が観測された (Fig. 5-3B)。2 つの画分 (Fig. 5-3 のフラクション A3 と A5) それぞれについて、SDS-PAGE 上で単一バンド (40 kDa および 45 kDa) を得られたことから、バンドを切り出し、nano LC-MS/MS 分析を実施した。その結果、40 kDa のタンパク質は NADP 依存型アルコールデヒドロゲナーゼ (遺伝子名 *ADH6* : sequence coverage 53%、Mascot スコア 675) (Table 5-2)、45 kDa タンパク質は Old Yellow Enzyme 2 (遺伝子名 *OYE2* : sequence coverage 34%、Mascot スコア 434) (Table 5-3) であることが明らかになった。*Adh6p* は、NADPH を補酵素とし、脂肪族もしくは芳香族アルデヒドおよびアルコールを基質とするアルコールデヒドロゲナーゼとして報告されている (Larroy, 2002a)。Old Yellow Enzyme として知られる *Oye2p* は、フラビンモノヌクレオチド (FMN) を含む、炭素-炭素 2 重結合の還元酵素であり (Stott, 1993)、基質として geraniol (Yuan, 2011)、2,3-butandione (ジアセチル) (van Bergen, 2016) が報告されている。これらの酵素の生理学的な意義については解明されていないが、Old Yellow Enzyme は 1930 年代に、ドイツのグループによってビール醸造用酵母から見つかった酵素である。



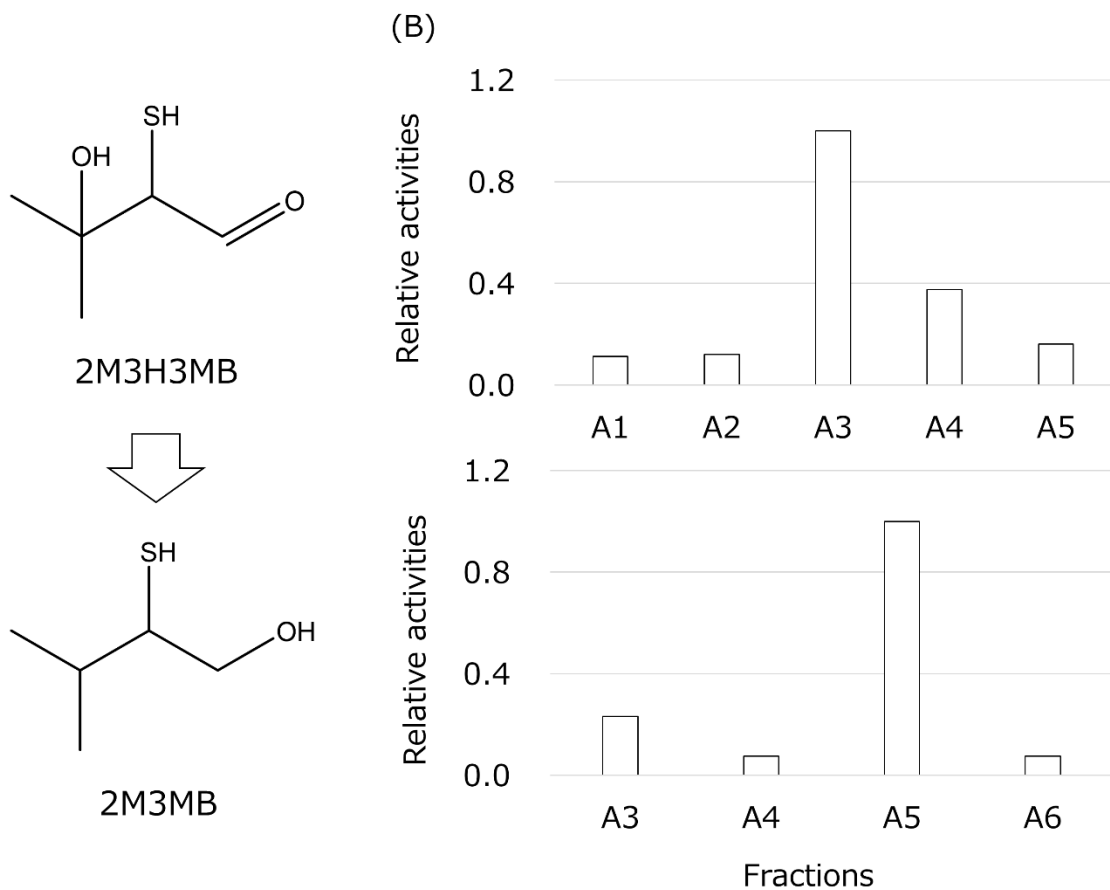


Fig. 5-3. 陰イオン交換カラムのクロマトグラム (A) と各画分の 2M3MB 変換活性 (B)

2M3MB 変換活性は、最も高い活性を示す画分に対する相対活性として示した。陰イオン交換カラムの分画液からは、どの画分にも活性が検出されなかったが、精製前の酵素破砕液を少量、陰イオン交換カラムの画分に加えて 2M3MB 変換活性を測定したところ、予想通り、主要な画分において 2M3MB 変換活性が観測された (Noba, 2020b)。

Table 5-2. *ADH6* のペプチドシーケンスデータ
一致したペプチドを**太赤字**で示した。

1 MSYPEKFEGI AIQSHEDWKN PKKTK**YDPKP FYDHDIDIKI** EACGVCGSDI
51 HCAAGHWGNM K**MPLVVGHEI VGK**VVKLGPK SNSGLKVGQR **VGGAQVFSC**
101 **LECDR**CKNDN EPYCTK**FVTT YSQPYEDGYV SQGGYANYVR** VHEHFVVIP
151 ENIPSHLAAP LLCGGLTVYS PLVRNGCGPG K**KVGIVGLGG IGSMGTLISK**
201 **AMGAETYVIS R**SSRKREDAM **KMGADHYIAT LEEGDWGEKY** FDTFDLIVC
251 ASSLTDIDFN IMPKAMKVGG R**IVSISIPEQ HEMLSLKPYG LKA**VSISYSA
301 **LGSIKELNQL LKL**VSEKDIK **IWVETLPVGE AGVHEAFERM** EKGDVRYR**FT**
351 **LVGYDKEFSD**

SDS-PAGE 上の単一バンドを切り出し、nano LC-MS/MS 分析を実施した。その結果、NADP 依存型アルコールデヒドロゲナーゼ（遺伝子名 *ADH6* : sequence coverage 53%、Mascot スコア 675）であることが明らかになった（Noba, 2020b）。

Table 5-3. *OYE2* のペプチドシーケンスデータ
一致したペプチドを**太赤字**で示した。

1 MPFVK**DFKPQ ALGDTNLFKP IKIGNNELLH RAVIPPLTRM** RAQHPGNIPN
51 RDWAVEYYAQ RAQRPGTLII TEGTFPSPQS GGYDNAPGIW SEEQIKEWTK
101 IFKAIHENKS FAWVQLWVLG WAAF PDTLAR DGLR**YDSASD NVYMNAEQEE**
151 **KAKKANNPQH SITKDEIKQY** VKEYVQAAKN SIAAGADGVE IHSANGYLLN
201 QFLDPHSNNR TDEYGGSIEN **RARFTLEVVD AVVDAIGPEK** VGLRLSPYGV
251 FNSMSGGAET GIVAQYAYVL GELERRAKAG KRLAFVHLVE PRVTNPFLTE
301 GEGEYNGGSN KFAYSIWKGP IIR**AGNFALH PEVVREEVKD** PRTLIGYGR**F**
351 **FISNPDLVDR LEKGLPLNKY DRDTFYKMSA EGYIDYPTYE EALKLGWDKN**

SDS-PAGE 上の単一バンドを切り出し、nano LC-MS/MS 分析を実施した。その結果、Old Yellow Enzyme 2（遺伝子名 *OYE2* : sequence coverage 34%、Mascot スコア 434）（Table 5-3）であることが明らかになった（Noba, 2020b）。

5.3.3. 組換え酵素による 2M3H3MB から 2M3MB への変換

S. pastorianus の Oye2p および Adh6p に対する *S. cerevisiae* オルソログタンパク質である Oye2p または Adh6p について、大腸菌 BL21 株に、pGEX-6P-1 ベクターを用いて glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として生産されるように設計した。GST タグ付き酵素をグルタチオンカラムを用いて精製した結果、各タンパク質を SDS-PAGE 上で単一バンドとして得ることに成功した (Fig. 5-4)。

精製した酵素はどちらも NADPH 依存型の酵素であることから、活性が保持されているかどうかは反応時の NADPH の吸光度を測定した。これまでに報告されている基質として Oye2p に対して geraniol または 2,3-butandione、Adh6p に対しては 3-methylbutanal を添加した。その結果、時間が経つにつれて吸光度が減少した (Fig. 5-5)。酵素を添加しない場合、吸光度は減少しなかった (data not shown)。この結果より、精製した酵素は十分な活性を保持していると考えられた。

続いて組換え大腸菌から精製した 10 nM (0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の Oye2p および 10 nM (0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の Adh6p の 2M3H3MB から 2M3MB の生成活性を測定した。酵素がない場合または酵素が片方のみの場合は、2M3MB は生成しなかったが、Oye2p と Adh6p を同時に添加すると 2M3MB が生成した (Fig. 5-6)。この結果から、2M3MB の生成には、Oye2p と Adh6p の両方が必要かつこれらの酵素で十分であることが分かった。

2M3H3MB と 2M3MB の化学構造を比較すると、変換の完了には OH 基の脱離と末端アルデヒドの還元が必要であることがわかる。Adh6p は脂肪族または芳香族のアルデヒドとアルコールを基質とするため (Larroy, 2002a)、Adh6p はおそらく末端アルデヒドの還元に関与していると推測された。したがって、OH 基の脱離は、Oye2p が担っている可能性が考えられた。Oye2p は炭素間二重結合還元活性を示すことが報告されている一方で (Stott, 1993)、2M3H3MB は炭素-炭素二重結合を持っていない。2M3H3MB から OH 基が脱水することで C2-C3 位置に炭素-炭素二重結合が形成される。脱水による二重結合形成とその還元の一両反応ともに Oye2p が担っている可能性が考えられる。

2M3H3MB から 2M3MB への変換経路には 2 つの可能性 (Fig. 5-7, Path A と Path B) が想定される。Path A は、Oye2p による 2M3H3MB から 2-mercapto-3-methylbutanal への変換と、引き続き Adh6p による 2-mercapto-3-methylbutanal の還元により 2M3MB が生成する。Path B は、Adh6p による 2M3H3MB から 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol の還元、および引き続

く Oye2p による 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol から 2M3MB への変換である。これら 2 つの酵素の反応順序を決定するために、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol を化学的に合成し、Oye2p による 2M3MB への変換を調査することにした。しかしながら、化学合成した 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol の 2M3MB への変換は観察されなかった (data not shown) 。一方、2M3H3MB を Oye2p と反応させると、2M3H3MB の濃度は 25 °C、1 時間で半分以下になったが、2-mercapto-3-methylbutanal に対応する分子量の化合物は GC-MS で観測されなかった (Fig. 5-6) 。このことは、2-mercapto-3-methylbutanal が不安定であることを示唆している。実際、2-mercapto-3-methylbutanal の化学合成も試みたが、おそらく溶液中での不安定さが原因で合成産物を得ることが出来なかった。その一方で、2M3H3MB を Adh6p と反応させると、2M3H3MB の濃度はわずかに減少した (Fig. 5-8) 。ただし、Adh6p により 2M3H3MB から 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol が生成するか検証を試みたが、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol を分析することができず、濃度を測定できなかった。Adh6p による 2M3H3MB の変換速度は Oye2p のものよりも格段に小さいため、2M3H3MB は主として Oye2p と反応すると結論づけた。これらの結果に基づいて、酵素反応順序は、Path A に示しているように、Oye2p が 2M3H3MB を 2-mercapto-3-methyl-2-butenal 経由で、2-mercapto-3-methylbutanal に変換し、次に Adh6p が 2-mercapto-3-methylbutanal を 2M3MB に変換すると推測される。これまでのところ、Old Yellow Enzymes には OH 基を H₂O の形で脱離する活性は報告されていない。したがって、これが正しければ、本研究は Old Yellow Enzyme ファミリーの酵素反応に新たな知見をもたらすと考えられる。Old Yellow Enzymes による脱水反応については、水中において脱水反応だけを検出することが困難であるため、これまで見過ごされてきたのではないだろうか。今回、これまで報告されてきた反応部位である炭素-炭素二重結合を持たない化合物が基質であったため、発見することができたと考えられる。今後、Old Yellow Enzymes の反応機構についても解明していく必要がある。今回の反応系では、反応中間体と考えられる成分が不安定で合成できなかったため、逆反応が進むかを確かめることができなかった。2M3H3MB の類縁体等、安定性の高い化合物を用いて逆反応が進むかを検証できれば、Old Yellow Enzymes による脱水反応を調べることができると考えられる。

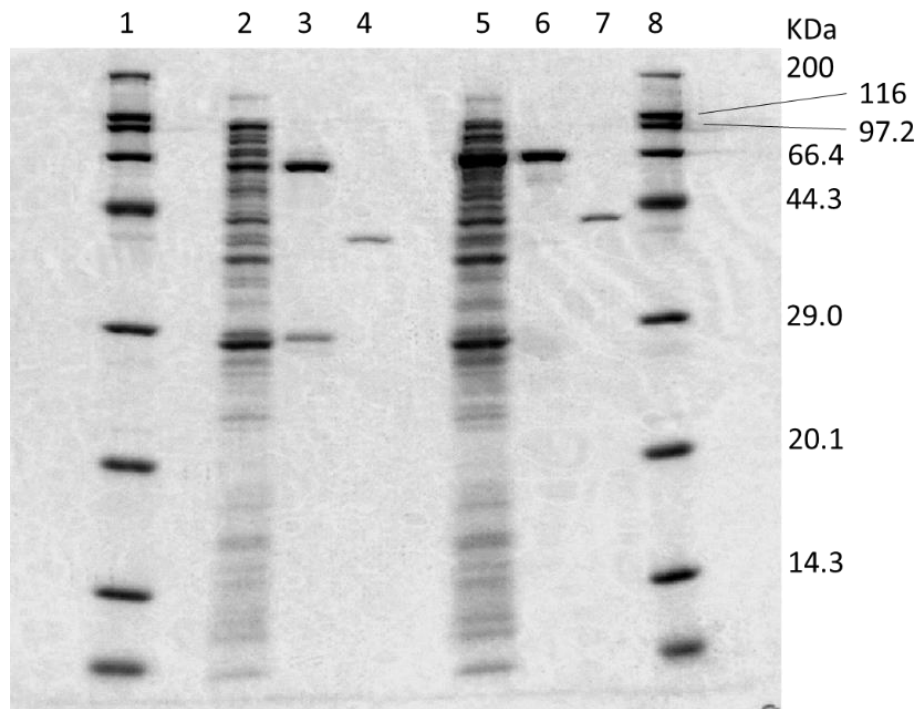


Fig. 5-4. SDS-PAGE 上の組換え大腸菌から精製されたタンパク質

レーン 1 : 分子量マーカー、レーン 2~4 : Adh6p (2 : GST-ADH6 を過剰産生する組換え大腸菌の細胞溶解物の上清、3 : グルタチオンカラムによる精製液、4 : GST タグ切断後の最終精製液) 、レーン 5~7 : Oye2p (5 : GST-OYE2 を過剰産生する組換え大腸菌の細胞溶解物の上清、6 : グルタチオンカラムによる精製液、7 : GST タグ切断後の最終精製液) 、レーン 8 : 分子量マーカー (Noba, 2020b)

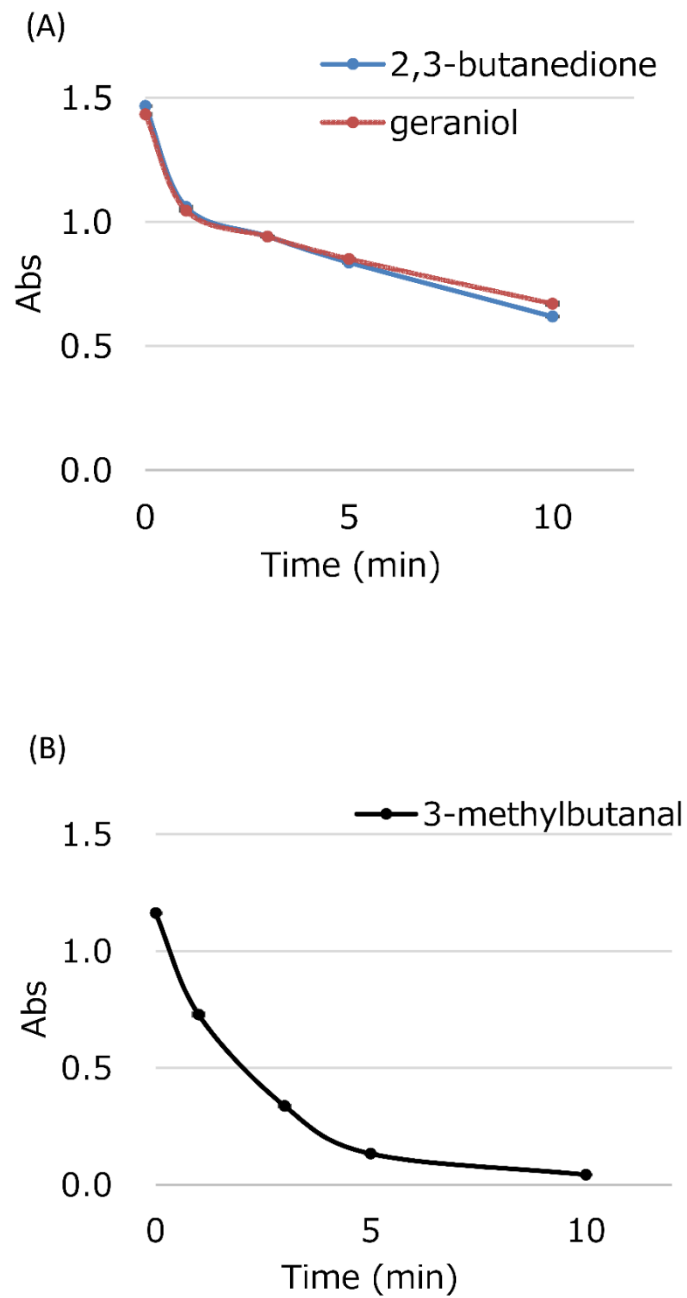


Fig. 5-5. 340nm での NADPH の吸光度の減少 ($n = 3$)

(A) Oye2p の基質として 2,3-Butanedione または geraniol を添加した。(B) 3-メチルブタナールを Adh6p の基質として添加した。時間が経つにつれて吸光度が減少し、酵素を添加しない場合、吸光度は減少しなかった。このため、精製した酵素は十分な活性を保持していると考えられた (Noba, 2020b)。

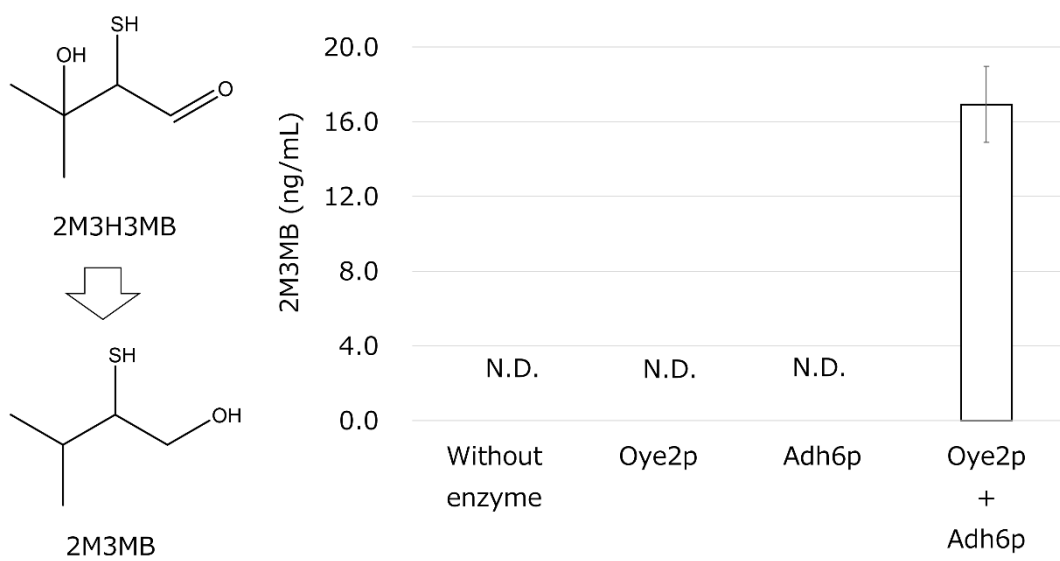


Fig. 5-6. Oye2pとAdh6pによる2M3H3MBから2M3MBへの変換 ($n = 3$)
 酵素がない場合または酵素が片方だけの場合は、2M3MBは生成しなかったが、
 Oye2pとAdh6pを同時に添加すると2M3MBが生成した (Noba, 2020b)。

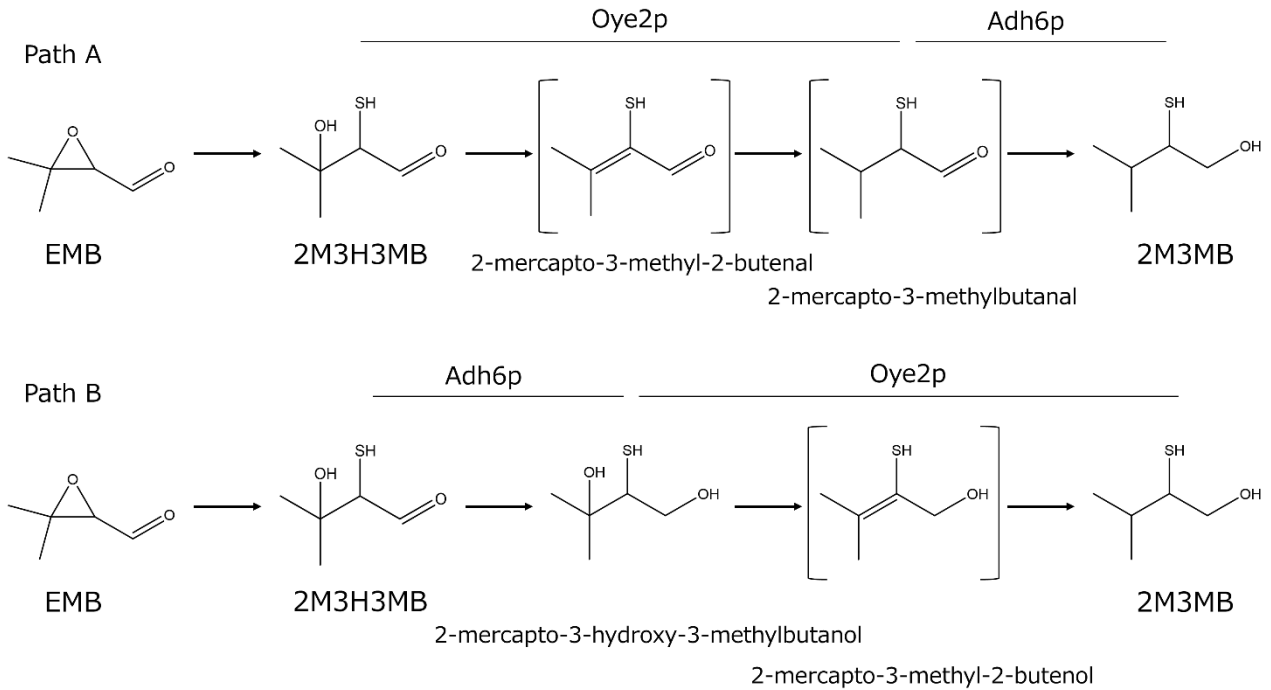


Fig. 5-7 予想される 2M3H3MB から 2M3MB への変換経路 (PathA および PathB)

Path A は、Oye2p による 2M3H3MB から 2-mercapto-3-methylbutanal への変換と、引き続き Adh6p による 2-mercapto-3-methylbutanal の還元により 2M3MB が生成する経路であり、Path B は、Adh6p による 2M3H3MB から 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol の還元、および引き続き Oye2p による 2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanol から 2M3MB への変換である。括弧で示した化合物は合成に成功しておらず、推定される構造を示した。



Fig. 5-8. Oye2p と Adh6p による変換に伴う 2M3H3MB(20 μg/mL)の減少($n = 3$)

2M3H3MB を Adh6p と反応させると、2M3H3MB の濃度はわずかに減少した。Oye2p の有無によらず、Adh6p を加えた際の 2M3H3MB 濃度の減少量は Oye2p よりも小さいため、Adh6p による反応は 2M3MB への変換の律速反応と考えられる (Noba, 2020b)。

5.3.4. 2M3H3MB から 2M3MB への変換における遺伝子破壊の影響

EUROSCARF collection より取得した、*S. cerevisiae* BY4742 株（親株）および、その *ADH6* 破壊株、*OYE2* 破壊株、さらに作製した *ADH6* および *OYE2* の 2 重破壊株を用いて 2M3MB の変換能を調べた。2M3H3MB を添加した YPD 培地で培養し、培地中の 2M3MB 濃度を測定した（Fig. 5-9）。親株に対し、*ADH6* 破壊株、*OYE2* 破壊株の培養液中の 2M3MB 濃度は、それぞれ 55%、27%まで減少していた。さらに 2 重破壊株では親株の 15%にまで減少した。これらの結果より、*Oye2p* および *Adh6p* による 2M3H3MB から 2M3MB への変換が 2M3MB 生成の主要なルートであると考えられた。*S. cerevisiae* の *OYE2* パラログとして *OYE1* と *OYE3* が知られており、アミノ酸配列相同性は *Oye2p* と *Oye1p* の間で 85%、*Oye2p* と *Oye3p* の間では 73%である（Saito, 1991、Niino, 1995）。したがって、*OYE2* 破壊株の残りの変換活性にはこれらのパラログ酵素が寄与している可能性がある。また、酵母ゲノムには多数アルコール脱水素酵素遺伝子がコードされていることが知られており（De Smidt, 2008）、これらが *ADH6* 破壊株における残りの変換活性を担うと考えている。その中でも特に、*Adh7p* は *Adh6p* と最も高いアミノ酸配列同一性（64%）を示すことから（Larroy, 2002b）、*Adh6p* と同様な基質特異性を示すことが推測される。今回の酵素精製過程では、これらのパラログ酵素を見出すことはできなかった。今回見出した酵素と比較し、発現量が低い可能性や、2M3H3MB 変換活性が低いことから検出できなかった可能性が考えられる。

5.3.5. *Adh6p* による EMB の還元

以前の研究において、発酵中に EMB のアルデヒド基がアルコール基に置換された成分（2,3-epoxy-3-methylbutanol）が検出されることから、EMB が発酵中に還元されて生成すると予想した（Noba, 2020a）。EMB の還元には *ADH6* が関与しているのか調べるため、EMB と組換え大腸菌より精製した *Adh6p* を反応させる試験を行った。酵素を添加することにより、EMB が減少し、2,3-epoxy-3-methylbutanol が生成した（Fig. 5-10）。ただし、EMB の減少量は 2,3-epoxy-3-methylbutanol の生成量と完全な一致を示さなかった。これは *Adh6p* によって生成した 2,3-epoxy-3-methylbutanol *Adh6p* がさらに他の化合物へと代謝された可能性や、*Adh6p* が EMB を 2,3-epoxy-3-methylbutanol 以外の化合物に変換した可能性があると考えられる。いずれにしても、発酵中に EMB が酵母のアルコールデヒドロゲナーゼによって還元されていることが示された。

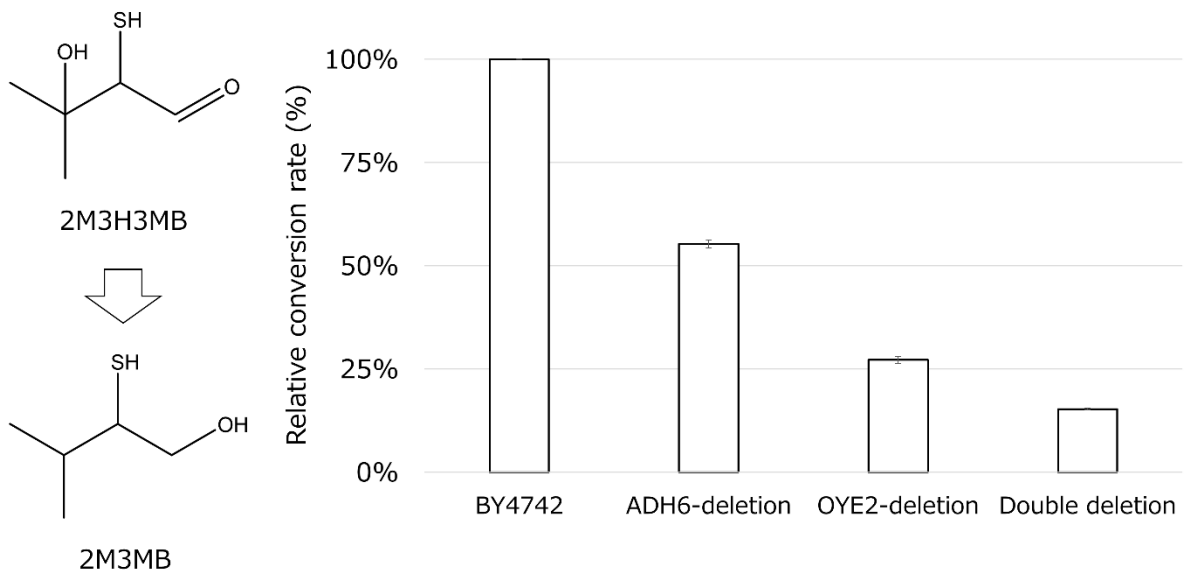


Fig. 5-9. 遺伝子破壊株による 2M3H3MB から 2M3MB への変換 ($n = 3$)

親株に対し、*ADH6* 破壊株、*OYE2* 破壊株の培養液中の 2M3MB 濃度は、それぞれ 55%、27%まで減少していた。さらに 2 重破壊株では親株の 15%にまで減少した。これらの結果より、*Oye2p* および *Adh6p* による 2M3H3MB から 2M3MB への変換が 2M3MB 生成の主要なルートであると考えられた (Noba, 2020b)。

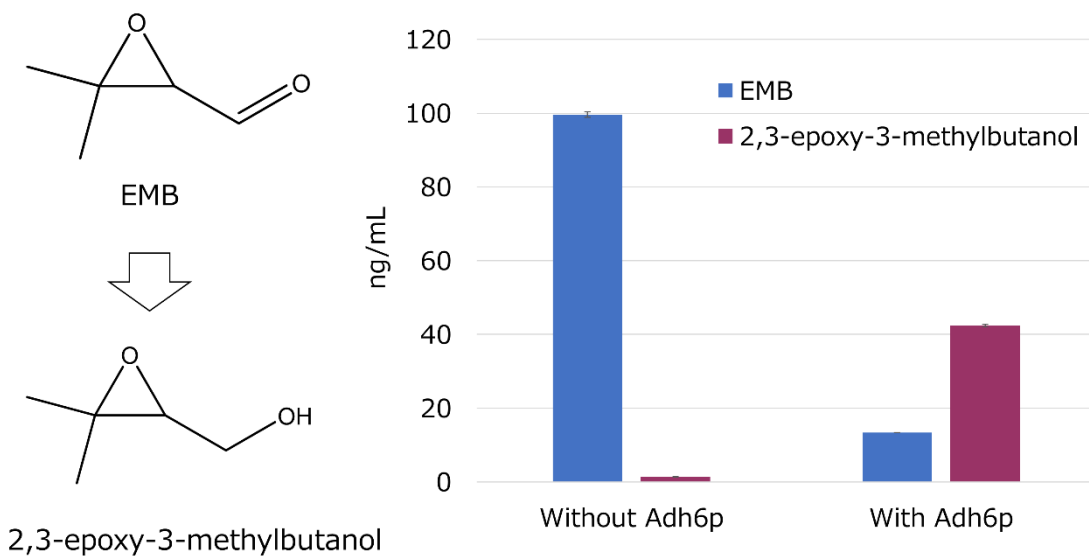


Fig. 5-10. Adh6pによるEMBの還元 ($n = 3$)

EMBと組換え大腸菌より精製したAdh6pを反応させると、EMBが減少し、2,3-epoxy-3-methylbutanolが生成した。ただし、EMBの減少量は2,3-epoxy-3-methylbutanolの生成量と完全な一致を示さなかった。これはAdh6pによって生成した2,3-epoxy-3-methylbutanolがさらに他の化合物へと代謝された可能性や、Adh6pがEMBを2,3-epoxy-3-methylbutanol以外の化合物に変換した可能性がある(Noba, 2020b)。

5.3.6. 2M3MB 生成経路の全体像

これまでの一連の試験結果 (Noba, 2018, Noba, 2020a) に基づいて、導き出された 2M3MB の主要な生成経路についての概略を Fig. 5-11 に示す。最初のステップとしてイソアルファ酸と酸素が反応すると EMB が生成する。EMB の一部が硫化水素と反応し、2M3H3MB が生成する。一方、発酵中に EMB のアルデヒド末端が Adh6p により還元され、2,3-epoxy-3-methylbutanol が生成し、EMB の大部分は 2M3MB とならずに代謝される。2,3-epoxy-3-methylbutanol については、発酵中に消失するため、おそらく未同定の酵素系によってさらに代謝されると考えられる。2M3H3MB は、主要な酵素として Oye2p および Adh6p により変換され、2M3MB が生成する。

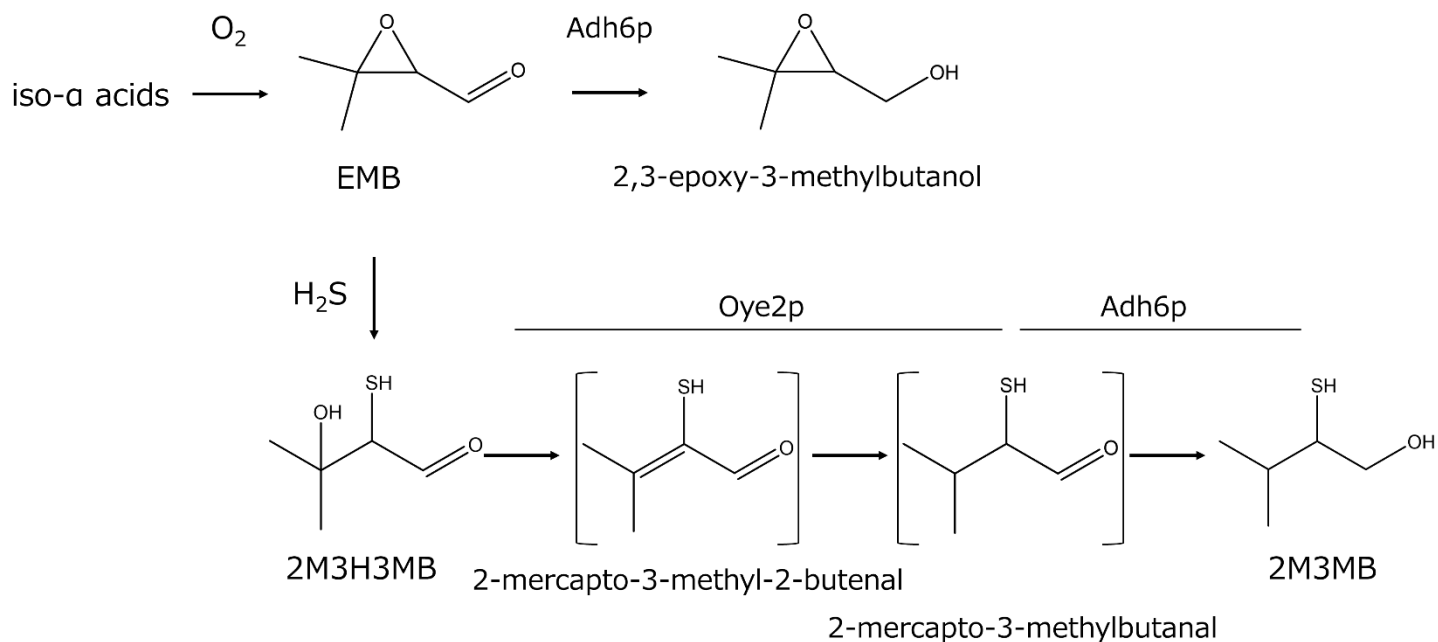


Fig. 5-11. ビール中の 2M3MB 生成機構の全体像

最初のステップとしてイソアルファ酸と酸素が反応すると EMB が生成する。EMB の一部が硫化水素と反応し、2M3H3MB が生成する。一方、発酵中に EMB のアルデヒド末端が Adh6p により還元され、2,3-epoxy-3-methylbutanol が生成し、EMB の大部分は 2M3MB とならず代謝される。2M3H3MB は、主要な酵素として Oye2p および Adh6p により変換され、2M3MB が生成する。括弧で示した化合物は合成に成功しておらず、推定される構造を示した。

5.4. 結論

本章では、ビール中のオフフレーバーであるタマネギ臭の生成に関与する酵母の酵素を探索した。精製により、*S. pastorianus* の 2 つの異なる酵素、Old Yellow Enzyme 2 (Oye2p) とアルコールデヒドロゲナーゼ 6 (Adh6p) が、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (2M3H3MB) の 2M3MB への変換に関与していることが明らかになった。この知見は、*S. cerevisiae* の遺伝子破壊株を用いた試験により、それら両方の酵素が欠失すると、2M3MB の生成量が 2 割以下に低下すること、組換え大腸菌から精製された *S. cerevisiae* の酵素を用いた *in vitro* の反応試験からも支持された。*S. cerevisiae* を用いて得られた知見が完全に *S. pastorianus* に当てはまると言うことはできないが、*S. cerevisiae* にも十分な 2M3H3MB の変換活性があること、*S. pastorianus* の酵母破碎液から主要な変換活性を持つ画分として、Oye2p と Adh6p のみが見出されたことから、これらの 2 個の酵素による変換が主要な 2M3MB 生成経路であると結論づけた。

これまでの一連の研究結果をまとめ、ビールの製造工程に沿って考えると、2M3MB の抑制のポイントは 2 つに大別される。1 つ目は、麦汁製造時の酸素濃度のコントロールである。麦汁への意図しない酸素の巻き込みや、酵母への酸素付与過多が起こると、酸素とイソアルファ酸が反応して EMB の生成量が増えてしまう。我々の醸造所においては、輸送ポンプにより配管内が陰圧となることで空気がバルブから侵入した事例があった。開発した EMB 分析法を用いて定量することで問題の工程箇所を特定することが可能である。2 つ目は酵母の酵素活性のコントロールである。硫化水素の発生につながる一連の硫黄代謝酵素や、今回見出した還元酵素等がターゲットとなる。酵母の培養、発酵、保存等による酵素活性の変化と温度や麦汁組成といった醸造条件による酵素活性の変化を mRNA 量の解析、もしくは酵素の変換アッセイ系を用いた解析により、酵母の状態を把握し最適な発酵条件とすることで、2M3MB の生成をコントロールすることができると考えられる。ビール業界における基礎研究と製造技術が、相互に知見を共有しながら進歩することで、より高品質なビールが実現すると考えられる。

第 6 章

総括および今後の展望

第 2 章では、タマネギ様オフフレーバーの官能強度が異なるビールを用いて、GC-olfactometry によりタマネギ様の匂いを持つ画分を探索した。その結果、タマネギ様オフフレーバーの強度と相関する 1 つの画分を見出した。その画分に存在する成分として 2M3MB および 3M3MB の 2 成分が推定された。これらの成分は香調モリテンションタイムも非常に近く、どちらが実際の寄与成分かわからなかった。そこで、2M3MB および 3M3MB の定量法を構築して、さまざまなビール中の 2M3MB および 3M3MB の定量を行った。その結果、2M3MB はビール中に 0~0.80 ng/mL の濃度で、3M3MB は 0~0.9 ng/mL の濃度で存在していることが分かった。2M3MB と 3M3MB の濃度には相関がなく、2M3MB より 3M3MB の濃度が高い製品もあれば、同程度の製品、逆に 2M3MB の濃度のほうが高い製品もあった。そこで、両者の官能閾値を測定したところ、ビール中の 2M3MB の官能閾値は 0.13 ng/mL、3M3MB の官能閾値は 17.5 ng/mL であり、両者は似た構造にもかかわらず、その官能閾値は 100 倍以上異なっていた。定量値と官能閾値から OAV を算出したところ、2M3MB が 1 を超えており、タマネギ様オフフレーバーに寄与していることが明らかとなった。一方、3M3MB の OAV はすべて 0.1 以下であり、その寄与はほぼないと考えられた。続いて、ビール醸造工程中の 2M3MB 濃度を測定した。その結果、2M3MB は麦汁には存在せず、発酵中に生成することが分かった。また、2M3MB 生成因子を探索すべく、過去報告されていた、麦汁のホットエアレーションやトループの有無による 2M3MB 生成量の違いを測定した。その結果、トループは 2M3MB 生成に影響せず、麦汁のホットエアレーションにより、2M3MB の生成量が増加することを明らかにした。このため、麦汁の酸化が、ビール中の 2M3MB 濃度を増加させる重要な因子であることが示唆された。また、麦汁には 2M3MB がないにもかかわらず、酸化によって発酵後の 2M3MB が増加することから、麦汁中には 2M3MB の前駆体が存在していること、さらに無ホップ麦汁からは 2M3MB が生成しないことから、2M3MB の前駆体はホップ由来であると考えられた。これまでに 3MBoI が 2M3MB および 3M3MB の前駆体として推定され、添加試験による 2M3MB および 3M3MB の生成が報告されている。しかしながら、麦汁の分

析結果および麦汁への 3MBoI の添加試験を行ったところ、3MBoI から 2M3MB および 3M3MB への変換は、ビール中に含まれているそれらの成分の濃度の 1/1000 以下であり、両成分の主要な前駆体ではないことが明らかとなった。このことから、麦汁中には未知の 2M3MB の前駆体が存在していると結論づけた。

第 3 章では、新たな 2M3MB 前駆体の探索を行った。過去の文献によるとアミノ酸のシステイン抱合体がいくつかのチオールの前駆体であるという報告があるため、まず 2M3MB-Cys が、2M3MB の前駆体であるかを確かめた。しかしながら、麦汁中の濃度を測定したところ不検出であった。また、合成した 2M3MB-Cys を麦汁へ添加し、発酵させたところ、2M3MB は増加しなかった。このため、2M3MB-Cys は、2M3MB の前駆体ではないと結論付けた。ホップエキスを蒸留した溜液を、無ホップ麦汁へ添加し、発酵させたところ 2M3MB が生成した。このことから、2M3MB の前駆体は揮発生成成分であろうと推定し、蒸留、順相カラムクロマトグラフィー、分取 GC による精製と濃縮を経て、2M3MB 生成能のある画分をほぼ単一ピークとなるまで精製した。NIST の化合物ライブラリにて検索したところ、精製した化合物とマススペクトルが一致する化合物は存在しておらず、未知成分であった。未知成分の DB-WAX カラムを使用した RI は 1179 で、DB-17 カラムを使用した RI は 902 であった。未知成分の同定のため、NMR による構造解析を検討したが、濃縮中にも揮発してしまい、NMR 測定を行うのに十分な量を得ることができなかった。このため、精密質量分析が可能な GC-QTOF を用いて、前駆体の精密質量を測定することで、 $[M+H]^+$ は m/z 101.0597、分子式は $C_5H_8O_2$ あることを突き止めた。また、フラグメントイオンの分子式から、構造を推定し、前駆体の構造は 2,3-epoxy-3-methylbutanal (EMB) であると推定した。次いで、EMB を化学合成したところ、その GC-MS の RI、MS スペクトルは麦汁から精製した前駆体と一致した。さらに EMB 添加発酵試験を行ったところ、2M3MB が生成した。以上の結果から、2M3MB の前駆体は EMB であると結論づけた。EMB から 2M3MB への変換率は約 3% であった。過去に、前駆体候補として報告されていた 3MBoI の 2M3MB への変換率は 0.001% 以下であり、EMB から 2M3MB への変換率 3% はそれに比べて非常に高いと言える。麦汁中に含まれる EMB 自体はタマネギ様オフフレーバーの匂いを発しない。これは、麦汁そのものにはタマネギ様オフフレーバーはなく、発酵で生成するという点においても過去の報告と一致していた。EMB は食品から初めて検出された成分であった。

第4章では、2M3MBの前駆体として見出したEMBの由来とEMBから2M3MBへの生成経路について調査した。まずEMBの由来を調べるために、EMBの定量法の検討を行った。麦汁を溶媒抽出して濃縮し、GC-MSによりEMBのピークは検出されたが、GC-MSのサンプルトレイ上で、抽出液を置いておくと、EMBのピークエリアが大幅に増加した。2章において、麦汁の酸化でビール中の2M3MBが増加したことから考えると、麦汁の抽出液に含まれる成分が酸化し、EMBが生成したと推察された。ホップ由来成分で、溶媒に抽出されるほど疎水性が高い成分はイソアルファ酸である。陰イオン交換カラムによって、イソアルファ酸を吸着させ、その素通り画分を分析することで安定してEMBが定量可能となった。つづいて、イソアルファ酸およびその構造を安定化させた、還元型イソアルファ酸をホップを含まない麦汁に添加して、ホットエアレーションしたあとのEMB濃度を測定した。その結果、イソアルファ酸を添加した麦汁からはホットエアレーションによりEMBの大幅な増加が観測されたが、還元型イソアルファ酸についてはEMBが増加しなかった。このことから、イソアルファ酸からEMBが生成すること、還元型イソアルファ酸の側鎖の還元部位が、イソアルファ酸が酸化されることによってEMBが生成する部位であると推察された。続いて、EMBと2M3MBの構造を比較し、EMBのエポキシ基へのチオール基の付加とEMBのアルデヒド末端の還元が2M3MBの生成に必要なと考えられた。エポキシアルデヒドに対する硫化水素の反応について調べられている文献より、硫化水素またはチオール基を持つ化合物がEMBと反応し、2-mercapto-3-hydroxy-3-methylbutanal (2M3H3MB) が生成している可能性と、EMBのアルデヒド末端が還元されている2,3-epoxy-3-methylbutanol が生成している可能性が考えられたため、それぞれの成分の定量系を構築し、ビール醸造中にそれら成分が生成しているかを検証した。興味深いことに、両者とも発酵中のもろみから検出され、2,3-epoxy-3-methylbutanolの量のほうが多かった。そこで、無ホップ麦汁へ、両者をそれぞれ添加し、発酵させたところ、2M3H3MBのみから2M3MBが生成した。モデル試験系としてバッファー溶液中で、EMBと硫化水素を反応させたところ、確かに2M3H3MBが生成していることがわかった。これらの結果より、2M3MBの生成機構は、イソアルファ酸の酸化によりEMBが生成し、EMBと硫化水素が反応して2M3H3MBとなり、その後酵母によって2M3MBに変換されることが明らかとなった。硫化水素は、発酵初期に酵母によりメチオニン生合成経路の中間体として硫酸イオンから産生される。ビール醸造用の下面発酵酵母では、今回の試験結果から分かる通り、EMBと比較して高濃度の硫化水素が生成する。とくに窒素源飢餓となりやすい麦芽使用比率の低いビール類では生成量がさらに増加する。このため硫化水素は、反応基質としては重要であ

るが、反応制御という観点ではターゲットにはなりえない。2,3-epoxy-3-methylbutanol はビール醸造中に検出されたが、2M3MB に変換されなかった。2,3-epoxy-3-methylbutanol は発酵中に消失していくため、EMB から生成したのち、さらに未同定の酵素系によってさらに別の化合物に代謝されていると示唆された。これらの結果より、生成経路の最も上流側にある、酸素とイソアルファ酸の反応は 2M3MB の制御のための重要な因子と結論づけた。同一ブランドの製品だが、異なる醸造所で仕込まれた麦汁中の EMB を測定したところ、醸造所によって麦汁中の EMB 濃度が異なる結果が得られたことから、EMB は麦汁の酸化指標として活用できると考えられた。この生成機構に基づいて、前駆体として考えていた EMB は 2M3MB の直接の前駆体ではなく、重要な反応中間体であることが明らかとなった。2M3H3MB は本研究で初めて見出した成分であった。

第 5 章では、2M3H3MB が酵母によってどのように 2M3MB に変換されるかについて調査した。酵母破碎液と 2M3H3MB を反応させると確かに 2M3MB が生成したが、酵母破碎液を加熱するとその変換能が消失するため、酵素が関与していると推察された。そこで、変換活性を評価するアッセイ系と分取クロマトグラフィーを組み合わせ、2M3MB の生成に必要な酵素の探索をおこなった。2M3H3MB と 2M3MB の構造比較より、ヒドロキシ基の脱離と、アルデヒドの還元を酵素が担っていると考えられた。精製を進めると著しく活性が低下したこと、両者を同時に行う酵素が文献上見出せなかったことから複数の酵素が関与していると示唆された。分取クロマトグラフィーで単一ピークとなるまで精製した後、LC/MS/MS によるタンパク質推定を行い、*S. pastorianus* の 2 つの酵素 Old Yellow Enzyme II (Oye2p) およびアルコールデヒドロゲナーゼ IV (Adh6p) を特定した。まず、組換え大腸菌により GST 結合型のタンパク質を発現するコンストラクトを作製し、タグ精製を経て得られた酵素を用いて、in vitro の系において 2M3H3MB から 2M3MB への変換が起こることを明らかとした。続いて、両酵素の遺伝子破壊株を作製し、2M3H3MB の変換活性を調べたところ、2 重破壊株の酵母では 2M3MB の生成が劇的に減少した。したがって、Oye2p および Adh6p が 2M3H3MB から 2M3MB への変換における主たる変換酵素であると結論付けた。Adh6p はアルデヒドの還元酵素として知られており、2M3H3MB のアルデヒド末端の還元を担っていると考えられる。一方、Oye2p については、炭素-炭素二重結合の還元酵素として知られており、ヒドロキシ基の脱離については報告例がない。このことから、Oye2p についてはおそらくヒドロキシ基を水分子として脱離させ、その後生成した 2 重結合を還元していると予想されたが、それはこれまでに知られていない

新たな反応形式であると考えられた。

これまでの一連の研究結果をまとめると、タマネギ様オフフレーバーの発生のポイントは2つに大別できている。1つ目は、麦汁製造時の酸素濃度のコントロールである。麦汁への意図しない酸素の巻き込みや、酵母への酸素付与が過剰になると、酸素とイソアルファ酸が反応して EMB の生成量が増えてしまう。我々の醸造所においては、輸送ポンプにより配管内が陰圧となることで空気がバルブから侵入した事例があった。開発した EMB 分析法を用いることで問題の工程箇所を特定することが可能である。そして2つ目は酵母の酵素活性のコントロールである。硫化水素の発生につながる一連の硫黄代謝酵素や、今回見出した還元酵素等がターゲットとなる。酵母の培養後、発酵後、保存等による酵素活性の変化と温度や麦汁組成といった醸造条件による酵素活性の変化を mRNA 量の解析、もしくは酵素の変換アッセイ系を用いた解析により、酵母の状態を観察し最適な発酵条件とすることで、2M3MB の変換をコントロールすることができると考えられる。また、ゲノム編集技術が一般的に受け入れられた場合には、2M3MB 変換酵素を欠損させることにより、2M3MB を減らすことも可能であると考えられる。

チオール香気の生成という観点では、含硫アミノ酸との抱合体からの遊離および、炭素-炭素二重結合への硫化水素の付加による生成が食品中のチオール香気成分の生成機構として一般的に報告されているが、今回見出したチオール香気の生成機構は、それとはまったく異なり、エポキシ基に硫化水素が付加するという新しい形式であった。酸素と熱によりエポキシ基が生成したと考えられることから、食品の製造過程において一般的にエポキシ基の生成が起こっているのではないかと推察される。またエポキシ基は反応性が高く、硫化水素の反応は速やかに起こっていたため、同様の機構によるチオール香気の生成は知られていないだけで、ビール以外の食品においても数多く存在しているのではないだろうか。今後食品の香味の中で重要な位置を占めるチオール香気の生成機構解明がますます進むことで、良質でより嗜好性が高い食品の開発に役立つと考えられる。

序章において、おいしいビールとは、「外観」：琥珀色で清澄であること、きめ細やかな白い泡があること、「香味」：爽快な苦みがあること、特有の爽快感、清涼感のあること、コクがあり飲み飽きないこと、を満たすと述べた。ビールのタマネギ様オフフレーバーは、それ自体ビールらしい風味とは異質であり、汗を想起させる不快な匂いであるが、それ以外にビールの香味にどのような影響を与えるか、2M3MB を添加したビールと無添加のビールをビールの官能評価パネルに供して調べたところ、ビールのキレ、つまりビール特有の爽快感を著しく悪化させ

た。このことから、タマネギ様オフフレーバーは、ビールのおいしさを損ねる解決すべき重要な課題であると言える。その生成要因の重要なポイントとして、イソアルファ酸の酸化による EMB の生成であると述べた。しかし大規模醸造所においては、過去、工程不具合に起因する EMB 高生成を経験してはいるが、通常、製造ラインは配管やタンクなどの密閉空間内であるため、工程中に酸素が意図せず入り込むことはなく、定常的に 2M3MB が高生成することはないと考えられる。一方、小規模醸造所においては、開放系での作業や配管のつなぎ替えが常時発生することから、2M3MB が生成するリスクが常につきまとっている。近年、アメリカにおいて、クラフトビールブームが起こっており、年間のビール販売額の 20% を超える規模にまで成長している。日本においても、1995 年の酒税法改正とともに、小規模でビールを造ることが認められるようになり、これをきっかけに日本各地でクラフトビールを手掛ける会社が増えている。今後ビールの少量多品種化が進むと、ますますタマネギ様オフフレーバーの対策が重要な課題となり、本研究がその解決の一助になると期待される。

これからも、すべてはお客様のうまい！のために、ビールをもっとおいしく、そしてお酒が作り出す楽しく豊かな社会の実現に貢献していきたい。

参考文献

- Acree, T. E., & Teranishi, R. (1993). Bioassays for flavor. In *Flavor science: Sensible principles and techniques*. American Chemical Society, 1-20.
- Acree, T. E., Barnard, J., & Cunningham, D. G. (1984). A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chemistry*, 14(4), 273-286.
- Ahvenainen, J., Vehviläinen, H., and Mäkinen, V. (1979). Effect of sludge removal on fermentation and beer quality, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 32, 141-144.
- Amberg, D. C., Burke, D.J. & Strathern, J. N. (2005). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 181-206.
- American Society of Brewing Chemists. (1992). Sensory Analysis. In *Methods of analysis. (8 th Revised Edition)*, American Society of brewing chemists.
- American Society of Brewing Chemists. (1980). Report of Subcommittee on Sensory Analysis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 38, 99-107.
- Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., Ogata, T., & Kitagawa, Y. (2009). Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 124-129.
- Back, W. (2003) Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie. *Brauwelt*, 24/25, 766-777.
- Baert, J. J., De Clippeleer, J., Hughes, P. S., De Cooman, L., & Aerts, G. (2012). On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11449-11472.

Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2004). The 'buttery' attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3), 235-252.

Bärwald, G. (1971). Die Schwefelverbindungen im Brauprozess. *Der Brauereitechniker*, 23, 130-134.

Blank, I. (2002). Sensory relevance of volatile organic sulfur compounds in food. In *Heteroatomic aroma compounds*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, 25-53.

Brown, D. G. W., Clapperton, J. F., Meilgaard, M. C., & Moll, M. (1978). Flavor thresholds of added substances. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 36(2), 73-80.

Chelack, B. J., & Ingledew, W. M. (1987). Anaerobic Gram-negative bacteria in brewing—A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 45(4), 123-127.

Cibaka, M. L. K., Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2015). Quantitation of selected terpenoids and mercaptans in the dual-purpose hop varieties Amarillo, Citra, Hallertau Blanc, Mosaic, and Sorachi Ace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 3022-3030.

Clark, S., & Winter, C. K. (2015). Diacetyl in foods: a review of safety and sensory characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 634-643.

Curioni, P. M. G., & Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12(12), 959-984.

Czerny, M., Mayer, F., & Grosch, W. (1999). Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 695-699.

- De Keukeleire, D., Heyerick, A., Huvaere, K., Skibsted, L. H., & Andersen, M. L. (2008). Beer lightstruck flavor: the full story. *Cerevisia*, 33(3), 133-144.
- De Smidt, O., Du Preez, J. C., & Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 967-978.
- Debourg, A., Laurent, M., Goossens, E., Borremans, E., Vandewinkel, L., & Masschelein, C. A. (1994). Wort aldehyde reduction potential in free and immobilized yeast systems. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 100-106.
- Drost, B. W., Van den Berg, R., Freijee, F. J. M., Van der Velde, E. G., & Hollemans, M. (1990). Flavor stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(4), 124-131.
- European Brewery Convention. (1998). Section 13. In *Analytica EBC (5 th edition)*, Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag.
- European Brewery Convention. (2007). Method 4.5.1. In *Analytica EBC*, Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag.
- Gale, P. W. (2007). Contents of Cause and Effect Fishbone Diagrams Section. In *Brewing Chemistry and Technology in the Americas*, American Society of Brewing Chemists, 54-56.
- Gerber, N. N., & Lechevalier, H. A. (1965). Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Applied microbiology*, 13(6), 935-938.
- Giudici, P., & Kunkee, R. E. (1994). The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 107-112.

- Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2008). Hop allylic alcohols are precursors of sulfur-containing odorants in fresh beer. *International Humulus Symposium*, 848, 273-278.
- Gros, J., Tran, H., & Collin, S. (2013). Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), 221-227.
- Grosch, W. (1994). Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour and Fragrance Journal*, 9(4), 147-158.
- Haikara, A., & Helander, I. (2006). Pectinatus, megasphaera and zymophilus. *Prokaryotes*, 4, 965-981.
- Hendriks, W., Woolhouse, A., Tarttelin, M., & Moughan, P. (1995). Synthesis of felinine, 2-amino-7-hydroxy-5, 5-dimethyl-4-thiaheptanoic acid. *Bioorganic Chemistry*, 23(2), 89-100.
- Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., & Takeda, K. (2006). Brewing performance of malted lipoxygenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer. *Cereal Chemistry*, 83(3), 250-254.
- Holscher, W., Vitzthum, O. G., & Steinhart, H. (1992). Prenyl alcohol-source for odorants in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4), 655-658.
- Iijima, K., & Ogata, T. (2010). Construction and evaluation of self-cloning bottom-fermenting yeast with high SSU1 expression. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1906-1913.
- Illuxley, C., Green, E. D., & Dunbam, I. (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in Genetics*, 6, 236.
- Inoue, T., & Yamamoto, Y. (1969). Absence of diacetyl in fermenting wort. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 135, 454-457.

- Isogai, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Nishimura, T., Iwata, H., & Goto-Yamamoto, N. (2009). Screening and identification of precursor compounds of dimethyl trisulfide (DMTS) in Japanese sake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 189-195.
- Ito, S., & Kubota, J. (2017). The development of a non-alcoholic beer using a novel idea undertaken by casting off preconceptions about beer. In *Proceedings of the 36th EBC congress, Ljubljana 2017* (L-25).
- Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 139-155.
- Jocelyn, P. C. (1987). Spectrophotometric assay of thiols. In *Methods in Enzymology*. Academic Press., 44-67.
- Kageyama, N., Inui, T., Fukami, H., & Komura, H. (2011). Elucidation of chemical structures of components responsible for beer aftertaste. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(4), 255-259.
- Kaneda, H., Osawa, T., Kawakishi, S., Munekata, M., & Koshino, S. (1994). Contribution of carbonyl-bisulfite adducts to beer stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(11), 2428-2432.
- Kaneda, H., Takashio, M., Osawa, T., Kawakishi, S., & Tamaki, T. (1996). Behavior of sulfites during fermentation and storage of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54(2), 115-120.
- Kishimoto, T., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A., & Wanikawa, A. (2008). Comparison of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 1051-1057.

Kishimoto, T., Noba, S., Yako, N., Kobayashi, M., & Watanabe, T. (2018). Simulation of Pilsner-type beer aroma using 76 odor-active compounds. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 330-338.

Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., & Shibata, K. (2006). Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8855-8861.

Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y., & Koshino, S. (1993). The production of linoleic and linolenic acid hydroperoxides during mashing. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(5), 371-375.

Krogerus, K., & Gibson, B. R. (2013). 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 86-97.

Kuroiwa, Y., & Hashimoto, H. (1961). Studies on hops with reference to their role in the evolution of sunstruck flavor of beer. *Report of the Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd.*, 4, 35-40.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Larroy, C., Fernández, M. R., González, E., Parés, X., & Biosca, J. A. (2002a). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochemical Journal*, 361(1), 163-172.

Larroy, C., Parés, X., & Biosca, J. A. (2002b). Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP (H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol

dehydrogenase family. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5738-5745.

Lentz, M. (2018). The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation*, 4(1), 20.

Lermusieau, G., Noël, S., Liégeois, C., & Collin, S. (1999). Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(1), 29-33.

Liebenow, R., & Esser, K. (1967). Erfahrungen mit der Heissbelüftung der Ausschlagwürze. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 20, 23-24.

Lüntzel, S. C., Widder, S., Vössing, T., & Pickenhagen, W. (2000). Enantioselective syntheses and sensory properties of the 3-mercapto-2-methylpentanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 424-427.

Mallia, S., Escher, F., & Schlichtherle-Cerny, H. (2008). Aroma-active compounds of butter: a review. *European Food Research and Technology*, 226(3), 315-325.

Masuda, S., Kikuchi, K., Harayama, K., Sakai, K., & Ikeda, M. (2000). Determination of lightstruck character in beer by gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58(4), 152-154.

Mattina, M. J. I., Pignatello, J. J., & Swihart, R. K. (1991). Identification of volatile components of bobcat (*Lynx rufus*) urine. *Journal of Chemical Ecology*, 17(2), 451-462.

Meier-Dörnberg, T., Kory, O. I., Jacob, F., Michel, M., & Hutzler, M. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe?-spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Research*, 18(4), foy023.

Meilgaard, M. C. (1975). Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles, *Technical Quarterly Master Brewers Association of America*, 12, 151-168.

Meilgaard, M. C. (1993). Individual differences in sensory threshold for aroma chemicals added to beer. *Food Quality and Preference*, 4(3), 153-167.

Meilgaard, M.C. & Peppard, T.L. (1986) The flavor of beer. In *Food Flavors. Part B. The Flavor of Beverages*, Elsevier Science, 99–170.

Miyazaki, M., Kamiie, K., Soeta, S., Taira, H., & Yamashita, T. (2003). Molecular cloning and characterization of a novel carboxylesterase-like protein that is physiologically present at high concentrations in the urine of domestic cats (*Felis catus*). *Biochemical Journal*, 370(1), 101-110.

Miyazaki, M., Yamashita, T., Suzuki, Y., Saito, Y., Soeta, S., Taira, H., & Suzuki, A. (2006). A major urinary protein of the domestic cat regulates the production of felinine, a putative pheromone precursor. *Chemistry & biology*, 13(10), 1071-1079.

Narziss, L., and Meyer, L. (1978). Die Auswirkung der Heißtrub Abscheidung bei Whirlpools und Zentrifugen. *Brauwelt*, 33, 1191–1200.

Niino, Y. S., Chakraborty, S., Brown, B. J., & Massey, V. (1995). A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 1983-1991.

Noba, S., Kikuchi, K., Ichinosawa, R., Sueda, R., Kobayashi, M., Hattori, S., Takaoka, H., Takagaki, H., Watanabe, T. (2018). Improvement of (*E*)-2-nonenal analysis method and discovery of (*Z*)-2-nonenal as a new aroma in beer. *Brewing Summit 2018*.

Noba, S., Kikuchi, K., Yako, N., Irie, T., Kobayashi, M., & Uemura, K. (2020a). Elucidation of the Formation Mechanism of 2-Mercapto-3-

- Methyl-1-Butanol in Beer. Part I: Identification of the Key Factors during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, In press.
- Noba, S., Kikuchi, K., Kato, T., Kusunoki, K., Toyota, S., Kobayashi, M., Uemura, K., & Nishiyama, M. (2020b). Elucidation of the Formation Mechanism of 2-Mercapto-3-Methyl-1-Butanol in Beer. Part II: Identification of the Key Enzymes in Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, in press
- Noba, S., Yako, N., Kobayashi, M., Masuda, S., & Watanabe, T. (2017). Search for compounds contributing to onion-like off-flavor in beer and investigation of the cause of the flavor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *124*(4), 419-424.
- Noba, S., Yako, N., Sakai, H., Kobayashi, M., & Watanabe, T. (2018). Identification of a precursor of 2-mercapto-3-methyl-1-butanol in beer. *Food Chemistry*, *255*, 282-289.
- Nyström, A., Grimvall, A., Krantz-Rülcker, C., Sävenhed, R., & Åkerstrand, K. (1992). Drinking water off-flavour caused by 2, 4, 6-trichloroanisole. *Water Science and Technology*, *25*(2), 241-249.
- Ogata, T., Kobayashi, M., & Gibson, B. R. (2013). Pilot-scale brewing using self-cloning bottom-fermenting yeast with high SSU1 expression. *Journal of the Institute of Brewing*, *119*(1-2), 17-22.
- Olsen, A., Christensen, B. W., & Madsen, J. Ø. (1988). Onion-like off-flavour in beer: Isolation and identification of the culprits. *Carlsberg Research Communications*, *53*(1), 1-9.
- Palamand, S. R. (1969). Studies on the relative flavor importance of some beer constituents. *Technical Quarterly Master Brewers Association of America*, *6*, 117-128.

- Patton, S., & Josephson, D. V. (1957). A method for determining significance of volatile flavor compounds in foods. *Food Research*, 22, 316-318.
- Roy, K. M. (2000). Thiols and organic sulfides. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 629-648.
- Saito, K., Thiele, D. J., Davio, M., Lockridge, O., & Massey, V. (1991). The cloning and expression of a gene encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20720-20724.
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 105-124.
- Sakuma, S., Rikimaru, Y., Kobayashi, K., & Kowaka, M. (1991). Sunstruck flavor formation in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(4), 162-165.
- Simpson, W. J. (1993). Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *Microbiology*, 139(5), 1041-1045.
- Stott, K., Saito, K., Thiele, D. J., & Massey, V. (1993). Old Yellow Enzyme. The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6097-6106.
- Strassman, M., Shatton, J. B., Corsey, M. E., & Weinhouse, S. (1958). Enzyme studies on the biosynthesis of valine in yeast. *Journal of the American Chemical Society*, 80(7), 1771-1772.
- Sullivan, W. J., & Williams, P. H. (1960). The reaction of glycidaldehyde and mesityl oxide epoxide with hydrogen sulfide. *The Journal of Organic Chemistry*, 25, 2128-2131.
- Suomalainen, H., & Ronkainen, P. (1968). Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. *Nature*, 220(5169), 792-793.

Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., & Kitamoto, K. (2008). Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 209-223.

Tanaka, T., Muramatsu, K., Kim, H. R., Watanabe, T., Takeyasu, M., Kanai, Y., & Kiuchi, K. (1998). Comparison of volatile compounds from Chungkuk-Jang and Itohiki-Natto. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(7), 1440-1444.

Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000a). Identification of cysteinylated aroma precursors of certain volatile thiols in passion fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2874-2876.

Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 29-33.

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Des Gachons, C. P., & Dubourdieu, D. (2000b). Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 178-181.

Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., & Dubourdieu, D. (1998a). Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(3), 159-162.

Tominaga, T., Murat, M. L., & Dubourdieu, D. (1998b). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1044-1048.

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (1998c). A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc:

S-Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5215-5219.

van Bergen, B., Cyr, N., Strasser, R., Blanchette, M., Sheppard, J. D., & Jardim, A. (2016). α , β -Dicarbonyl reduction is mediated by the *Saccharomyces* Old Yellow Enzyme. *FEMS Yeast Research*, 16(5), fow059.

Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, H., & Collin, S. (2006). Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5061-5068.

Verzele, M. (1986). 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(1), 32-48.

Vesely, P., Duncombe, D., Lusk, L., Basarova, G., Seabrooks, J., & Ryder, D. (2004). The impact of fermentation temperature on yeast reductase activity. *Technical Quarterly Master Brewers Association of America*, 41, 282-292.

Visser, M. K., & Lindsay, R. C. (1971). Ester precursors of aldehydes associated with staling of beer. *Technical Quarterly Master Brewers Association of America*, 8(3), 123-128.

Walker, M. D., Hughes, P. S., & Simpson, W. J. (1996). Use of chemiluminescence HPLC for measurement of positional isomers of hydroperoxy fatty acids in malting and the protein rest stage of mashing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(3), 341-346.

Wang, M., Avula, B., Wang, Y., Zhao, J., Avonto, C., Parcher, J, F., Raman, V., Zweigenbaum, J, A., Wylie, P. L., & Khan, I. A. (2014). An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products. *Food Chemistry*, 152, 391-398.

- Wang, X., & List, B. (2008). Asymmetric counteranion-directed catalysis for the epoxidation of enals. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 1119-1122.
- Yang, G., & Schwarz, P. B. (1995). Activity of lipoxygenase isoenzymes during malting and mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53(2), 45-49.
- Yang, G., Schwarz, P. B., & Vick, B. A. (1993). Purification and characterization of lipoxygenase isoenzymes in germinating barley. *Cereal Chemistry*, 70, 589-589.
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., & Yoshimoto, H. (2008). Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2787-2796.
- Young, W. F., Horth, H., Crane, R., Ogden, T., & Arnott, M. (1996). Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants. *Water Research*, 30(2), 331-340.
- Yuan, T. T., Chen, Q. Q., Zhao, P. J., Zeng, Y., Liu, X. Z., & Lu, S. (2011). Identification of enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol. *Natural Products and Bioprospecting*, 1(3), 108-111.
- 井上 喬. (2004). 食品とジアセチル. 日本醸造協会誌, 99(5), 315-323.
- 岸本 徹. (2013). ビールのオフフレーバーに関する近年の知見. におい・かおり環境学会誌, 44(1), 13-20.
- 都島 惟男 (1996). THE BEER ビールのすべて. 食品産業新聞社, 18-20.
- 日本醸造協会編 (1999). 醸造物の成分. 日本醸造協会, 250-272.
- 橋本 直樹 (1998). ビールのはなし-Part 2 おいしさの科学. 技報堂出版, 1-10.
- 濱口 和夫 (1988). ビールうんちく読本. PHP 研究所, 61-69.

ビール酒造組合国際技術委員会（分析委員会）編. (2002). BCOJ 官能評価法. 日本醸造協会.

ビール酒造組合編. (1999). ビール百科. ビール酒造組合, 34-40.

古庄 重樹. (2002). ビール官能評価法について. 日本醸造協会誌, 97(3), 178-187.

原著論文

Noba, S., Yako, N., Kobayashi, M., Masuda, S., & Watanabe, T. (2017). Search for compounds contributing to onion-like off-flavor in beer and investigation of the cause of the flavor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(4), 419-424.

Noba, S., Yako, N., Sakai, H., Kobayashi, M., & Watanabe, T. (2018). Identification of a precursor of 2-mercapto-3-methyl-1-butanol in beer. *Food Chemistry*, 255, 282-289.

Noba, S., Kikuchi, K., Yako, N., Irie, T., Kobayashi, M., & Uemura, K. (2020a). Elucidation of the Formation Mechanism of 2-Mercapto-3-Methyl-1-Butanol in Beer. Part I: Identification of the Key Factors during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, in press

Noba, S., Kikuchi, K., Kato, T., Kusunoki, K., Toyota, S., Kobayashi, M., Uemura, K., & Nishiyama, M. (2020b). Elucidation of the Formation Mechanism of 2-Mercapto-3-Methyl-1-Butanol in Beer. Part II: Identification of the Key Enzymes in Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, in press

謝辞

本研究を行い、学位論文としてまとめるにあたり、東京大学 西山真教授には多くの御指導と御鞭撻を賜りました。深謝の意を表します。

本研究の遂行に格別の御理解と御高配を賜りましたアサヒグループホールディングス株式会社執行役員 伊藤義訓博士、アサヒビール株式会社神奈川工場品質管理部長 初見 済氏、アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社社長 佐見学博士、醸造研究所長 永富康司博士、醸造研究所第一部長 樋口清一氏に深く感謝致します。

本研究の遂行に際して、共同研究者として多大なる御協力を戴きましたアサヒビール株式会社博多工場品質管理部副部長 小林稔氏、茨城工場生産技術センター 入江拓氏、製品保証センター次長 舛田晋博士、八子奈々氏、生産一部長 渡邊哲也氏、酒類技術研究所長 上村和彦氏、アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社解析科学研究所安全技術開発部長 坂井浩晃氏、醸造研究所第二部 加藤拓博士、楠慧三氏、豊田早紀氏、醸造研究所第一部 菊池かおり氏に心より感謝の意を表します。

また、研究の遂行において多くの御支援を頂きましたアサヒビール株式会社研究開発センター、本店、工場の皆様に厚く御礼を申し上げます。

最後に、論文執筆に多大な理解を示し、絶えず協力してくれた家族に深く感謝します。