

## 論文の内容の要旨

### 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

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。ビールにおいても原料由来のオフフレーバー、醸造工程由来のオフフレーバー、流通や保管時に増加するオフフレーバーなど多種多様な成分が報告されている。その中でも、硫黄を含む化合物は閾値が低いことから、低濃度でも問題になることが多く、たとえば硫化水素や日光臭（3-methyl-2-butene-1-thiol）といった成分についてその生成機構や制御方法が報告されてきた。同様に、タマネギ、汗といった風味を持つオフフレーバーについても古くからその存在が知られていた。過去の研究によると、そのタマネギ様オフフレーバーは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おり、金属への吸着性の高い含硫化合物であるチオール類と推定されてきた。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、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）を検出した事例や、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）が検出された事例が報告されている。

本研究は、ビール中に含まれるタマネギ様オフフレーバーについて、①オフフレーバーの寄与成分の同定、②その寄与成分の生成に必要な因子の特定、③関与している成分の定量系の確立、④生成機構の全体像の解明を目的とした。

### 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

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、gas chromatography(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官能強度と相関する 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 成分を推定した。この 2 成分のどちらがタマネギ様オフフレーバーに寄与するかを明らかにするために、2M3MB および 3M3MB の定量法を構築して、さまざまなビール中のこれら成分の定量を行った。さらに、官能閾値を測定し、Odor activity value (OAV)を算出した。その結果、2M3MB の OAV 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、発酵中に生成していた。また、2M3MB 生成因子を探索すべく、タマネギ様オフフレーバーの原因として報告されていた、麦汁のホットエアレーションや麦汁の熱凝固物（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 は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。

### ビールクタマネギ様オフフレーバーである 2M3MB の前駆体の同定

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 の前駆体は揮発性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できた。得られた精製物に含まれていた成分は未知成分であったため、その同定に NMR による構造解析を検討したが、揮発性が高く 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、前駆体およびそのフラグメントイオンの精密質量を測定することで構造推定を行った。その結果、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生成した前駆体のもものと一致した。さらに EMB 添加発酵試験を行い、2M3MB が生成することを確認した。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。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。

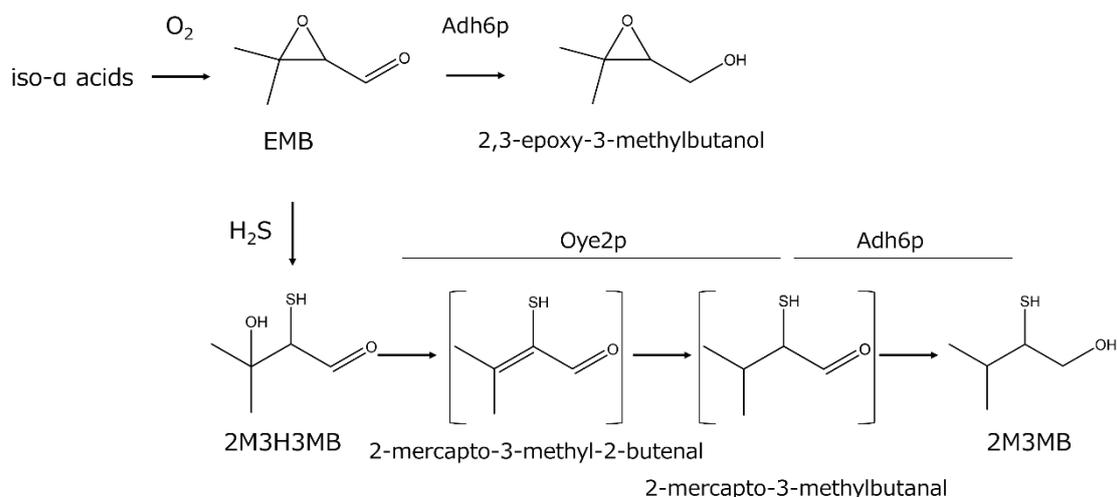
### ビール中の 2M3MB 生成機構の解明 part I : 発酵中の重要成分の同定

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 の定量法を構築した。その結果、EMB はホップの苦味成分であるイソアルファ酸の側鎖が酸化して生成することが明らかとなった。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た過去の研究より、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 の濃度が高かった。そこで、無ホップ麦汁へ、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。モデル反応試験として 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 に変換されると推察された。また、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。

### 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

最後に 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。酵母破砕液と 2M3H3MB を反応させると確かに 2M3MB が生成したが、酵母破砕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て、2M3MB の生成に必要な酵素の探索を行った。2M3H3MB と 2M3MB の構造比較より、酵素がヒドロキシ基の脱離と、アルデヒドの還元を担っていると考えられた。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 によるタンパク質解析を行い、*Saccharomyces 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) を同定した。まず、組換え大腸菌を用いて作製されたコンストラクトより、得られた酵素を用いて、*in vitro* の系においてこれらの 2 個の酵素のみから 2M3H3MB から 2M3MB への変換が起こることを明らかにした。続いて、実験室酵母を用いて、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 への主たる変換酵素であると結論付けた。Adh6p はアルデヒド類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。



## 総括

これまでの一連の研究の結果、タマネギ様オフフレーバー発生のポイントは 2 つに大別できると考えている。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。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。

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。