

博士論文

Sorachi Ace ホップの品種特有香に寄与する香気成分と
その相互作用に関する研究

2026 年 3 月

實方 綾子

目次

第1章 序論	1 -
1-1. ビールの香気成分とホップの育種トレンド	1 -
1-2. ホップの特徴と分類、育種上の課題	1 -
1-3. ビール製造工程とホップの使用法	3 -
1-4. ホップの品種特有香研究の現状と課題	4 -
1-5. Sorachi Ace ホップについて	6 -
1-6. 本研究の着眼点と目的	7 -
1-7. 本論文の構成	8 -
第2章 Sorachi Ace ホップの品種特有香に寄与する香気成分の探索	12 -
2-1. 序論	12 -
2-2. 実験方法	13 -
2-2-1. 試料	13 -
2-2-1-1. ホップ	13 -
2-2-1-2. 試験醸造ビール	13 -
2-2-1-3. 市販ビール	13 -
2-2-1-4. 試薬	13 -
2-2-2. 分析	14 -
2-2-2-1. 一次元二次元切替 GC-O/MS による品種特有香探索	14 -
2-2-2-1-1. サンプル調製	14 -
2-2-2-1-2. 一次元二次元切替 GC-O/MS による匂いかぎ分析	14 -
2-2-2-2. SPME-GC-MS による差分解析	16 -
2-2-2-3. 香気成分の同定	16 -
2-2-2-4. 純度及び異性体比率決定のためのガスクロマトグラフィー-水素炎 イオン化検出 (Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID)) 分析	16 -
2-2-2-5. SPME-GC-MS によるホップ由来化合物の定量	17 -
2-2-2-5-1. テルペンアルコール類、アルデヒド類、エステル類	17 -
2-2-2-5-2. カルボン酸類	18 -
2-2-2-6. トライアングル試験による官能検査	19 -
2-3. 結果	20 -
2-3-1. 匂いかぎ分析による Sorachi Ace 香気への寄与候補成分の探索	20 -
2-3-2. SPME-GC-MS による差分解析	20 -
2-3-3. SPME-GC-MS による試験醸造ビールのホップ由来香気成分の定量	22 -
2-3-4. トライアングル試験による官能検査	22 -

2-4. 考察	24 -
2-4-1. Sorachi Ace ホップ品種特有香に寄与する成分の同定とその特性評価全体の 流れ	24 -
2-4-2. 匂いかぎ分析による香気成分探索アプローチ	24 -
2-4-3. SPME-GC-MS 差分解析による geranic acid の同定	25 -
2-4-4. geranic acid とテルペンアルコールの香気相乗効果	25 -
第3章 geranic acid の閾値とホップ香気成分との相互作用	37 -
3-1. 序論	37 -
3-2. 実験方法	38 -
3-2-1. 試料	38 -
3-2-1-1. 試験醸造ビール	38 -
3-2-1-2. 市販ビール	38 -
3-2-1-3. 試薬	38 -
3-2-2. 方法	38 -
3-2-2-1. 試薬 geranic acid の香調の確認	38 -
3-2-2-2. geranic acid の閾値推定	38 -
3-2-2-3. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度の決定	39 -
3-2-2-4. SPME-GC-MS によるホップ由来香気成分の定量	39 -
3-2-2-5. アディクション試験による官能検査	40 -
3-2-2-5-1. モデルビールの調製	40 -
3-2-2-5-2. プロファイル官能検査	40 -
3-3. 結果	41 -
3-3-1. 試薬 geranic acid の香調	41 -
3-3-2. geranic acid の閾値推定	41 -
3-3-3. アディクション試験によるプロファイル官能検査	41 -
3-3-3-1. 候補成分を添加したモデルビールについて	41 -
3-3-3-2. アディクション試験	42 -
3-4. 考察	43 -
3-4-1. geranic acid の香気成分としての特性	43 -
3-4-2. geranic acid とホップ由来テルペン類の相乗効果と Sorachi Ace ビールに おけるホップ品種特有香の形成メカニズム	43 -
第4章 ホップ品種及び試験ビール中の geranic acid 及び関連成分含量の比較	50 -
4-1. 序論	50 -
4-2. 実験方法	51 -
4-2-1. 試料	51 -
4-2-1-1. ホップ	51 -

4-2-1-2. ホップの熱水抽出	51 -
4-2-1-3. 試験醸造ビール	51 -
4-2-1-4. 市販ビール	52 -
4-2-1-5. 試薬	52 -
4-2-2. 方法	52 -
4-2-2-1. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び 異性体比率決定	52 -
4-2-2-2. geranic acid 及び関連成分の定量	53 -
4-2-2-2-1. ホップ中の香気成分の定量	53 -
4-2-2-2-2. ビールサンプル中の香気成分の定量	53 -
4-3. 結果	54 -
4-3-1. ホップ中の対象香気成分の品種間比較	54 -
4-3-2. 各種ホップを用いて試験したビール中の geranic acid 及び関連成分の定量	54 -
4-4. 考察	56 -
第 5 章 ビール醸造工程中の geranic acid 及び関連成分の挙動	63 -
5-1. 序論	63 -
5-2. 実験方法	64 -
5-2-1. 試料	64 -
5-2-1-1. ホップ	64 -
5-2-1-2. 試験醸造ビール	64 -
5-2-1-2-1. ホップ違いの late-hopping で香り付けしたビールの醸造と サンプリング箇所	64 -
5-2-1-2-2. 添加タイミング違いの Sorachi Ace ビールの醸造とサンプリング 箇所	64 -
5-2-1-3. 試薬	64 -
5-2-2. 方法	65 -
5-2-2-1. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び 異性体比率決定と SPME-GC-MS による香気成分の定量	65 -
5-2-2-2. プロファイル官能検査	65 -
5-3. 結果	66 -
5-3-1. ホップ違いによる醸造工程中の geranic acid 及び関連成分の挙動	66 -
5-3-2. ホップ添加タイミングの違いによる醸造工程中の geranic acid 及び 関連成分の挙動	66 -
5-3-3. ホップ添加タイミングの異なるビールのプロファイル官能検査	67 -
5-4. 考察	68 -
5-4-1. ホップ違いによる試験ビール醸造工程中の geranic acid とその関連成分の	

挙動	68 -
5-4-2. ホップ添加タイミングの違いによる試醸ビール醸造工程中の geranic acid と その関連成分の挙動	69 -
5-4-3. ホップ添加タイミング違いの試醸ビールの香味特徴	70 -
第 6 章 Sorachi Ace と他のホップ品種との組み合わせによるビールの香りへの影響 ..	78 -
6-1. 序論	78 -
6-2. 実験方法	79 -
6-2-1. 試料	79 -
6-2-1-1. ホップ	79 -
6-2-1-2. 試験醸造ビール	79 -
6-2-1-3. 試薬	79 -
6-2-2. 方法	80 -
6-2-2-1. テルペン類の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び 異性体比率決定と SPME-GC-MS によるホップ由来テルペン類の定量 ..	80 -
6-2-2-2. GC-MS/MS によるチオール類の定量	80 -
6-2-2-3. プロファイル官能検査	81 -
6-3. 結果	82 -
6-3-1. Sorachi Ace と他のホップ品種をブレンドした試醸ビール	82 -
6-3-2. Sorachi Ace と Mosaic を組み合わせた試醸ビール	83 -
6-4. 考察	84 -
第 7 章 遅摘みによる Sorachi Ace ホップの香気成分の変動	92 -
7-1. 序論	92 -
7-2. 実験方法	94 -
7-2-1. 試料	94 -
7-2-1-1. ホップ	94 -
7-2-1-2. ホップの熱水抽出	94 -
7-2-1-3. 試薬	94 -
7-2-2. 方法	95 -
7-2-2-1. 苦味酸 (α 酸) の分析	95 -
7-2-2-2. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び 異性体比率決定と SPME-GC-MS による香気成分の定量	95 -
7-3. 結果	96 -
7-3-1. 遅摘みのホップの外観	96 -
7-3-2. 収穫日がホップ球果の α 酸含有量に与える影響	96 -
7-3-3. ホップ球果の熟成によるホップ由来香気成分の挙動	96 -
7-4. 考察	98 -

第 8 章 総合考察.....	105 -
総括.....	107 -
謝辞.....	109 -
参考論文	110 -
引用文献	111 -

第1章 序論

1-1. ビールの香気成分とホップの育種トレンド

発酵酒であるビール中に含まれる香気成分は多様であり、これまでに検出、報告されているものだけでも数千種類に及ぶとされている。それらは、由来の点でも原料である麦芽やホップに由来するもの、また酵母の発酵に由来するものなど多岐にわたり、物質としても、アルコール類、アルデヒド類、エステル類、ケトン類、脂肪酸類、テルペン類、フェノール類、含硫化合物など、実に多様な成分が含まれている(1)。また、そのような香気成分に由来する官能上の香気の特徴を表現する用語も数多く、それらを分類、整理したフレーバーホイールがビールの官能評価のガイドラインとなっている(Figure 1-1)。本研究においては、これらの中でも特にホップに由来する香気成分、とりわけホップの品種による香りの違いの原因となっている香気成分に着目することとした。

ビール醸造家(ブルワー)は、様々なホップ品種がそれぞれ異なる香気特徴を持っており、生ホップの香りもさることながら、そのホップを用いて醸造したビールがホップ品種により特有の香りを示すことを経験的に知っている。ただ、旧来の欧州産のアロマホップの中では、品種間の香りの差は小さく、特定の品種の特徴を強調したビールも必ずしも多くはなかった。その点では、同じ醸造酒でありながら、ぶどうの品種による香りの違いを語ることが文化となっているワインとは対照的であった。しかし2000年代以降、世界的にクラフトビール(地ビール)がブームとなっており、その醸造家の間では、より個性的なビールを醸造するために、香りの特徴が際立ったホップに人気が集まっている。そのため、ホップ農家、ホップメーカーによる育種のトレンドは香りに着目した試みが中心となり、クラフトビールにおいては特定のホップ品種の特徴を前面に出したり、それらをブレンドしたビール造りが活発に行われている。

1-2. ホップの特徴と分類、育種上の課題

1516年にドイツで制定された「ビール純粋令」に「ビールは大麦(麦芽)とホップと水のみから作らなくてはならない」とあることからわかるように、ホップはビールにとってなくてはならない原料であり「ビールの花」や「ビールの魂」とも呼ばれている。ホップ(*Humulus lupulus* L.)はアサ科に属する多年性蔓性雌雄異株の植物であり、ビールに用いられるのは雌性の未授精の球果(きゅうか。球花、毬花、毬果とも表記する)である。ホップ球果は鮮やかな緑色の松かさのような形状をしており(Figure 1-2)、花と思われがちであるが、実際は実に相当するものである。球果の内部にはルプリン腺と呼ばれる黄色の粒が蓄積されており、そこには多様な樹脂成分、精油成分が分泌、集積されている。またかさ状の苞の部分にもポリ

フェノールなどが豊富に含まれている。ホップ球果中の樹脂成分は特有の苦味を、精油成分は爽快な香気をビールに付与する。ホップ由来の苦味成分は強い抗菌作用を持ち、ビールの保存性向上にも寄与している。樹脂成分やポリフェノールには麦芽由来の過剰なタンパク質を醸造工程中で沈殿除去する作用もあり、ビールの清澄性の向上や保存の際の混濁生成を抑制する効果もある (2-4)。このように、ビール醸造にとっては様々な利点を持つ一方、強い苦味を持つため直接の食用等には適さず、長い栽培の歴史の中でもビール以外にはほとんど利用されてこなかった、極めて特殊な作物である。

古くからの分類では、ホップは主に苦味の付与を主目的とするビターホップと、香気の付与を主目的とするアロマホップに大別されてきた。経験的に、ビターホップは苦味の元となる樹脂成分 (α 酸) の含量は高いが苦味の質がやや粗く、香りの質の点でもやや劣り、アロマホップは α 酸の含量は少ないもののビールに上質な苦味と香りを付与するとされてきた。しかし、その分類は各品種の用途に応じた便宜的な分類であり、 α 酸の含量以外には明確な根拠のあるものではなかった。20 世紀後半以降、より効率的に苦味を付与できるよう α 酸含量が高いホップの育種が進み、そのような品種は高 α 酸ホップと呼ばれているが、そのような品種の中にも特徴的な香気をビールに付与できるものがあり、それらは苦味、香気付与の両方の目的に使用できることから dual purpose ホップと呼ばれることもある。また品種によっては α 酸含量が高いにもかかわらずホップメーカーでは単にアロマホップと分類しているケースもある。先に述べた世界的なクラフトビールのブームを背景に、2000 年以降になって、フレーバーホップ等と呼ばれる新たな分類のホップが誕生し始めた。これらのホップは、ビールに今までにない柑橘やトロピカルフルーツのような香りを付与できるホップであり、これまでの香りを付与する目的として用いられてきたアロマホップと比較して、それぞれの品種によって特有の香りがあるのが特徴である。

ホップ精油中に含まれる主要な香気成分としては、テルペン類、エステル類、アルデヒド類、ケトン類等が知られており、それらの成分の組成に着目したホップ品種の分類法がいくつか提唱されていた (3, 5-7)。このうち、テルペン類は量的に最も多く含まれ、特に炭化水素系テルペン類の β -myrcene、 α -humulene、 β -caryophyllene、 β -farnesene は古くからホップ品種の分類指標として用いられてきた (3, 5)。過去には、ホップ球果を gas chromatography-olfactometry (GC-O) で分析したところ、 β -myrcene と linalool の香気が最も強く感じられたとの報告もあった (8)。一方、上記の炭化水素系テルペン類は疎水性、揮発性が高く、麦汁煮沸や発酵等のビール製造工程を経た製品ビール中ではあまり検出されないことも古くからよく知られており、近年のホップ由来香気成分の研究においても、その理由から製品ビールにおける香気寄与成分としては除外されることが多い (9-11)。ビール香気への寄与度の低い炭化水素系テルペン類が原料ホップの精油成分中では高い構成比を占めていることが、ホップ由来のビール香気寄与成分に関する解析を難しいものにしてきたことは否

めない。

また、ホップの成分組成による分類には、苦味成分である樹脂成分に着目したものもある。例えば、 α 酸と β 酸の比による分類や α 酸の側鎖構造の異なる同族体の組成比による分類も上記の炭化水素系テルペン類組成と併用する形で用いられてきた (3, 5)。しかし、 α 酸 (humulones) は煮沸工程の熱による異性化反応でイソ α 酸 (isohumulones) に変換され、水溶性が増すことで麦汁に移行し、ビールの苦味成分となるが、 β 酸はビールにはほとんど移行しないことが知られており、 α 酸の同族体比も、醸造上、香味上の意義は必ずしも明らかではない。

このように、従来のホップの分類指標は、香気の面でも苦味の面でも、そのホップでビールを醸造した場合の香味品質を適切に予測できるものではなかった。このことは、ホップを使用する醸造家にとっても、ホップを育種する農家にとっても共通の課題であった。特に、前述の通り、急速に多様化しつつあるアロマホップにおいても、ホップ球果の香りからはビールでの香気を予測できないため、ホップ品種の香気特性を評価するためには実際にビールを醸造する以外に手段がなく、醸造家の用いるホップの選択も、育種家の選抜も経験に頼る面が大きかった。そのため、ビールを醸造した後の香気品質をホップの段階で予測できるような指標が求められているといえる。

1-3. ビール製造工程とホップの使用方法

ここで、ビールの製造工程の概略を Figure 1-3 に示す。仕込工程においては、粉碎した麦芽を温水と混ぜ、麦芽中の分解酵素が自身のでんぷん、タンパク質、細胞壁成分等を十分に分解できるよう、各酵素の最適作用温度で段階的に維持する。その後、麦汁ろ過により固形分を除き、麦汁を得る。この段階で、マルトースを主体とする糖分やアミノ酸等、酵母によるアルコール発酵に必要な成分が生成される。この麦汁にホップを添加して煮沸を行う。麦汁煮沸工程においては、加熱による殺菌、過剰なタンパク質の熱凝固による除去、好ましくない香気成分の揮散等が行われる。煮沸後の麦汁は凝固したタンパク質やホップ粕等を沈殿槽で除去した後、冷却され、そこへ酵母を添加することで発酵が開始される。発酵工程は、主発酵と後発酵に大別され、主発酵では旺盛な発酵による糖分のアルコールへの変換が進められ、後発酵では diacetyl 等の好ましくない香気の還元や、低温での熟成による炭酸ガスの溶解、混濁性物質 (タンパク質、シュウ酸等) の沈殿等が進められる。十分な熟成の後、ビールろ過により酵母や混濁性物質を除去した後、びん、缶、樽等の容器に充填されて製品ビールが出荷される (12-14)。

ビール製造に用いられるホップは、保存性を向上させるために球果を乾燥後にペレット状に成形したホップペレット、もしくは樹脂成分、精油成分を超臨界 CO₂ で抽出したホップエキスの形態で供給されている。ホップの添加方法は一般に kettle-hopping、late-hopping、dry-

hopping に大別される。kettle-hopping は麦汁ろ過の後の麦汁煮沸工程の開始時にホップを投入する。ホップ樹脂成分の α 酸 (humulones) は煮沸工程の熱による異性化反応でイソ α 酸 (isohumulones) に変換され、水溶性が増すことで麦汁に移行し、ビールの苦味成分となるが、一方、香気に寄与するホップ精油成分は煮沸により揮発するため、kettle-hopping はホップの香りは強調せず、苦味を効率的に付与する方法である。late-hopping は苦味づけのためのホップを麦汁煮沸開始時に投入しつつ、煮上り直前もしくは麦汁冷却前に香り付けのためのホップをさらに投入する方法であり、ホップの香気を適度にビールに付与する方法としてよく用いられている。dry-hopping は麦汁煮沸工程だけでなく、発酵、貯酒工程においてもホップを投入する方法であり、発酵、貯酒工程の低温では α 酸のイソ化は起こらないため苦味付与にはやや不利であるが、生のホップに近い強い香気をビールに付与する方法として特にクラフトビールではよく用いられる添加方法である (4)。

これらのビール製造工程において、ホップ由来の香気成分はまず麦汁煮沸での揮散にさらされる。late-hopping においても短時間ではあるが高温を経るため、揮散を完全に免れるわけではない。冷却された麦汁に酵母が添加され発酵が始まると、その初期において、旺盛な発酵により高泡が形成される。高泡では発酵液中の疎水性物質が濃縮されデッケと呼ばれる不溶性の塊を形成するが、ここには麦芽由来のタンパク質、前述のホップ樹脂成分や炭化水素系テルペン類等も含まれる。また、発酵で生成する炭酸ガスにも香気成分を揮散する効果がある。そのため、dry-hopping においても元のホップに由来する香気成分がそのまま移行するわけではない。このような発酵工程での物理的なロスだけでなく、一部の香気成分は酵母の代謝による変換を受けたり、さらには麦汁までは前駆体として存在し酵母の作用により新たな香気成分として生成するような成分も知られており、ビールの製造工程でのホップ由来香気成分の変動は実に多岐にわたっていると考えられている (15)。

1-4. ホップの品種特有香研究の現状と課題

過去のホップ由来香気成分研究において試験材料として比較的よく使われてきたアロマホップ品種にアメリカ産の Cascade がある。このホップで香り付けを行ったビールはフローラル、柑橘系、マスカットの等と評される独特の香気を有することが知られており、その香気に寄与する成分としてはこれまで主にモノテルペンアルコール類 (linalool、geraniol 等) が提案されていた (11, 16-18)。この品種はアメリカで 1950 年代に開発され、一時はアメリカ産ホップの過半を占めたこともある主要品種である。クラフトビールにおいては古くから世界的に広く使われており、現在でも広く栽培されている。

2000 年以降、ホップの品種特有香を前面に押し出したクラフトビールが人気となっている。特に、インディア・ペールエール (India Pale Ale : IPA) は、その苦味とフルーティなホップの風味から、最も人気のあるクラフトビールの一つとなっている。クラフトビールの醸造家

は、IPA に香り付けするための新しいホップ品種を探索しており、「フレーバーホップ」(19, 20)、「スペシャルフレーバーホップ」、あるいは「インパクトホップ」と呼ばれる新しい種類のホップが、クラフトビールに使われている (21)。フレーバーホップは主に 2000 年代以降に新たに開発され、製品ビールに柑橘系やエキゾチックフルーツ (トロピカル) 等、独特の香りを付与する。これらのホップは品種改良され、世界中でクラフトビールに広く使用されている (19, 22-26)。例えば、Nelson Sauvin、Citra、Mosaic などは、よく知られたフレーバーホップ品種である。Nelson Sauvin の品種特有の香りは、白ワインや砕いた新鮮なブドウ、グーズベリーに似ていると表現される。また Citra は、グレープフルーツ、メロン、ライム、パッションフルーツ等の香り、Mosaic は、ブルーベリー、タンジェリン、パパイヤ、バラ、花、草、マンゴーといった香りがすると言われている。

各フレーバーホップについて、その品種特有香に寄与する香気成分の探索研究も世界中でなされている。白ワイン (ソーヴィニヨン・ブラン) 様と表現される特徴的な香りをビールに付与する、ニュージーランド産のホップ品種 Nelson Sauvin について、蛸井らの研究で、その香気に寄与する香気成分として新規なチオール類 (3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol, 3-sulfanyl-4-methylpentyl acetate) が同定された。それらチオール類とその他の香気成分との相互作用についても官能評価手法を用いて明らかにされている。チオール類は、その構造に-SH 基を含み、非常に閾値が低く、かつ特徴的な香りを持つため、近年、ホップの品種特有香に寄与する香気成分として注目されている。そのほか、蛸井らは、複数のフレーバーホップ品種において、モノテルペンアルコール類と揮発性チオール類がホップ由来の品種特有香にどのように寄与しているかを解明するため、ビール製造中におけるこれらの化合物の挙動、そして様々な香気成分間の相乗効果による品種香気形成のメカニズムを明らかにしてきた (27-35)。

既に述べた通り、原料ホップの精油成分の中では、炭化水素系テルペン類が量的に大部分を占めている。また、ビールの香気成分の中では、酵母が発酵で生成するエステル類やアルコール類が量的には主要成分となる (1)。そのため、ホップ由来でビールにまで移行して香気に寄与している成分は、ホップ中においても、ビール中においても、微量成分に相当する。このような成分は、官能閾値が低く、微量であっても香気への寄与が大きい成分と推察されるが、その分析のためには、量的に多い香気成分の妨害を排除して目的の成分を分析するための微量分析技術が必要となる。

微量の香気成分を分析するためには、その濃縮度を上げる必要があり、そのための前処理方法が種々開発されている。その例としては、ページ&トラップ法 (36-38)、SAFE (Solvent-Assisted Flavor Evaporation) (39)、SPME (Solid Phase Microextraction、固相マイクロ抽出) (40)、SBSE (Stir Bar-Sportive Extraction) (10) など、様々な手法がある。しかし、選択する手法と目的成分の特性によっては、目的以外の成分も濃縮されてしまい、その後の分析で目的の微量成分を妨害成分から分離しきれないようなケースもある。そこで前処理で濃縮さ

れたサンプルを分析する装置についても、香気成分分析で汎用されている gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) よりさらに分離できる手法や異なる検出方法が開発されている。例えば成分をより細かく分離する comprehensive two-dimensional gas chromatography (包括的二次元ガスクロマトグラフィ、GC×GC) (18)、同定する成分の質量分析を 2 回行うプロセスにより、詳細なスペクトル情報が得られることで成分を正確に特定できる gas chromatography- tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)、人間が直接匂いを嗅ぐことで、GC のピークだけでは検出しにくい閾値の低い微量成分を探索する gas-chromatography-olfactometry/mass spectrometry (GC-O/MS (匂いかぎ GC)) (41-43) 等、様々な手法が開発されているが、これらの手法から得られる情報は膨大であり、目的の成分を絞り込む解析に従来以上に時間を要する、という側面もある。

また、このような微量香気分析で分離した香気成分の寄与度を推定する指標としては、目的の食品、飲料中の香気成分の濃度を閾値で除した OAV (Odor Activity Value) がある (44, 45)。これは数値が大きい香気成分ほど寄与度が高く、1 を下回る成分は閾値を下回っているため寄与度が低いとするシンプルな指標であり、上記のような分析手法で検出された多数の香気成分の中からキー成分を絞り込むためによく使われている。しかし、一般に OAV の高い香気成分の香気特徴は、必ずしも元の食品、飲料の香気特徴とは一致せず、実際の香気は多数の香気成分の相互作用により形成されていると考えられている。そのようなマトリクスの中では、閾値を下回る成分が香気に影響している可能性もあるが、そのような現象を解析できる手法はまだ十分には確立されていなかった。前述の蛸井らの研究 (27-35) は、閾値の低い linalool やチオール類 (3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol, 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one) が他の香気成分に対するエンハンサーとして機能することで、OAV で 1 を下回るような微量の香気成分であっても、複数成分の相互作用によって製品ビールで感じるホップの品種特有香に寄与しうることを示すものであり、上述のような課題に対して一定の回答を与える成果であった。

ホップ中の香気成分の発見や複数成分の相互作用によるビールの香気への影響の解明は進んでいるものの、フレーバーホップをメインとした活発なホップ育種・開発は現在も続いており、その品種数とともにそれぞれの香気特徴は多様性を増してきている。そのため、各種フレーバーホップの香気発現に関わる寄与成分とそのメカニズムには、まだまだ未解明の部分が課題として残されている。

1-5. Sorachi Ace ホップについて

北海道の地名「空知」を名前に冠するホップ品種 Sorachi Ace は、製品ビールに松様、ウディ、ディル (ハーブ) 様、シトラス、レモングラス様等、独特の品種香気を付与することから、2010 年代以降注目を集めている。

Sorachi Ace は、約 40 年前に北海道空知郡でサッポロビール社によって育成された品種である。当時、サッポロビール社のホップを育種する研究部門では、 α 酸含量の高いアロマホップを目指した育種プロジェクトに取り組んでおり、その中で誕生したのが Sorachi Ace である。1975 年に雌株 Brewer's Gold と雄株 Saaz を交配させ、これらの交配種から雌株 70K-SH6 が選抜された。そして、雄株 Beikei と交配され、最終的に Sorachi Ace が誕生した (Figure 1-4)。Sorachi Ace は育種していた地名にちなんで名づけられ、1984 年に日本で品種登録された (46)。ただし、日本で広く栽培されている国産ホップ品種、信州早生を置き換えるには至らず、普及は進んでいなかった。その後、1994 年にサッポロビール社がオレゴン州立大学とホップ育種に活用するホップの株交換を行った際、その中に Sorachi Ace も含まれていた。2000 年代になり、ホップ香を強調したクラフトビールがブームになる中で、アメリカで株保存のために栽培されていた Sorachi Ace ホップの独特の香味が注目されるようになった。特に 2010 年代以降、アメリカ、ベルギー、日本、その他多くの国でその特徴香を生かしたクラフトビールが醸造され、フレーバーホップ品種の一つとして認識されるようになった。現在はワシントン州とオレゴン州の商業規模の農場で栽培されている。

過去、多くの研究者が、Sorachi Ace を含む様々なホップやビールに含まれるホップ由来の香気成分の組成を調査してきた。(35, 47-50) しかし、Sorachi Ace の品種特有の香りに寄与する主要な寄与成分は十分に解明されていなかった。

1-6. 本研究の着眼点と目的

本研究では、フレーバーホップ品種の一つである Sorachi Ace ホップを対象としているが、私が Sorachi Ace ホップの香気研究に出会うきっかけは、自社が Sorachi Ace ホップを 100% 使ったビールを発売するにあたり、その複雑な香りを科学的に解明できないか？という相談を受けたことにある。実際に初めて Sorachi Ace の試験醸造ビールを飲んだとき、柑橘を思わせるフルーティさと、少しオイリーさも混じったような苦みを連想させる独特の香りを感じて衝撃を受けたことを覚えている。そして Sorachi Ace ホップの香りにすっかり魅了された私は、本テーマに対する強い関心を契機として、研究に着手した

ここまで概観してきたホップ香気成分研究上の課題に鑑み、本研究では以下に挙げる目的を設定することとした。

■ Sorachi Ace の品種特有香に寄与する香気成分を探索すること

品種特有香を探索するため、既存のアプローチに加え、クロマト分析による差分解析を実施し、寄与成分の探索を試みた。

■ 探索した香気成分の特徴や相互作用について確認して、Sorachi Ace を使ったビールの品種

特有香の形成メカニズムを解明すること

香気成分単独が持つそれ自身の香気特徴だけではなく、ビールに添加した場合に感じられる香りに注目し、他の香気成分との相互作用を確認することで、Sorachi Ace を使ったビールの香りの形成メカニズムを解明することを試みた。またそのメカニズムを応用し、その他のホップとの組み合わせによって形成される香りを確認した。

■ Sorachi Ace の特有香成分の特異性、工程挙動、生合成経路を明らかにすること

Sorachi Ace の品種特有香に寄与する香気成分について、ホップやビール中の含量を測定し、その特異性を明らかにした。さらに寄与成分についてビール醸造工程中の挙動や遅摘みホップ中の濃度を調査することで、その物性の工程挙動への影響を考察するとともに、ホップ中での寄与成分の生合成経路の推察を行った。

1-7. 本論文の構成

本論文は 8 章から構成されている。本論文の研究概要について Figure 1-5 に示した。序論の後、第 2 章では、Sorachi Ace の品種特有香に寄与する香気成分をどのように見出したか、その手法について述べるとともに、見出した香気成分 geranic acid の興味深い香気特性について述べる。第 3 章では、Sorachi Ace の品種特有香の形成に geranic acid がどのように寄与しているのかを調査するために、単独での閾値を推定した後、感性科学手法（アディクション試験による官能検査）による Sorachi Ace ビールの香りの形成メカニズムについて考察した内容について述べる。第 4 章では、Sorachi Ace ビールの香りに寄与する成分として同定した geranic acid の特異性を調査するため、さまざまなホップ品種中やホップを用いて醸造したビール中の geranic acid の含有量を調査した内容について述べる。第 5 章では、香気成分としての geranic acid のビール醸造工程中の挙動を調査し、製品ビールの香りに与える影響を述べる。第 6 章では、第 5 章で得られた香気成分の挙動特性を応用して、他のホップと組み合わせたビールの香気特徴について調査、考察した内容を述べる。第 7 章では、Sorachi Ace ホップ中の geranic acid の生合成・蓄積能を検証するために、ホップを遅摘みしてその挙動を調査し、ホップ球果登熟中のホップ中での生合成経路を検証した内容について述べる。最後の第 8 章は総合考察として、第 2 章から第 7 章で得られた知見とその意義を上記 1-6 に示した研究目標に照らして議論する。



Figure 1-1. ビールのフレーバーホイール



Figure 1-2. Sorachi Ace ホップ球果の写真

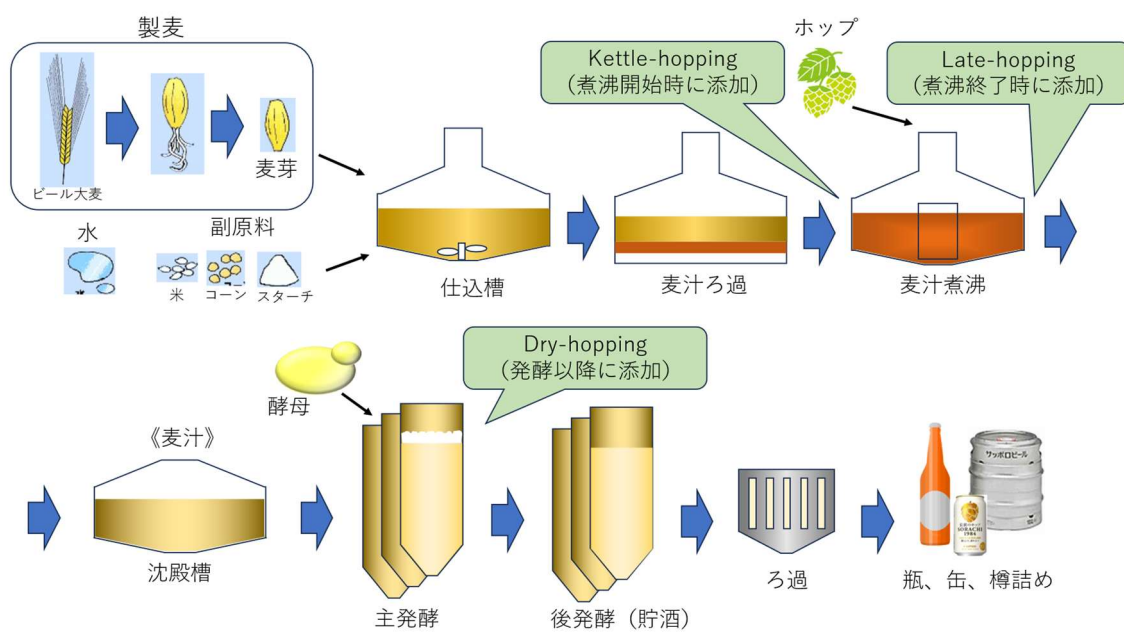


Figure 1-3. ビール醸造工程とホップの使用方法

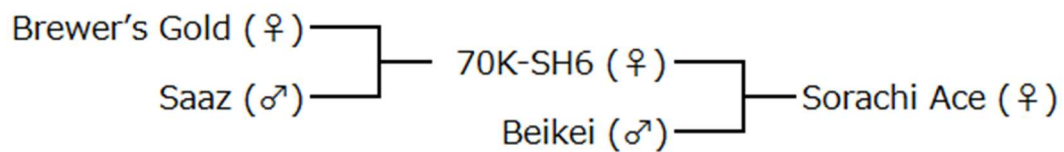


Figure 1-4. Sorachi Ace ホップ系譜

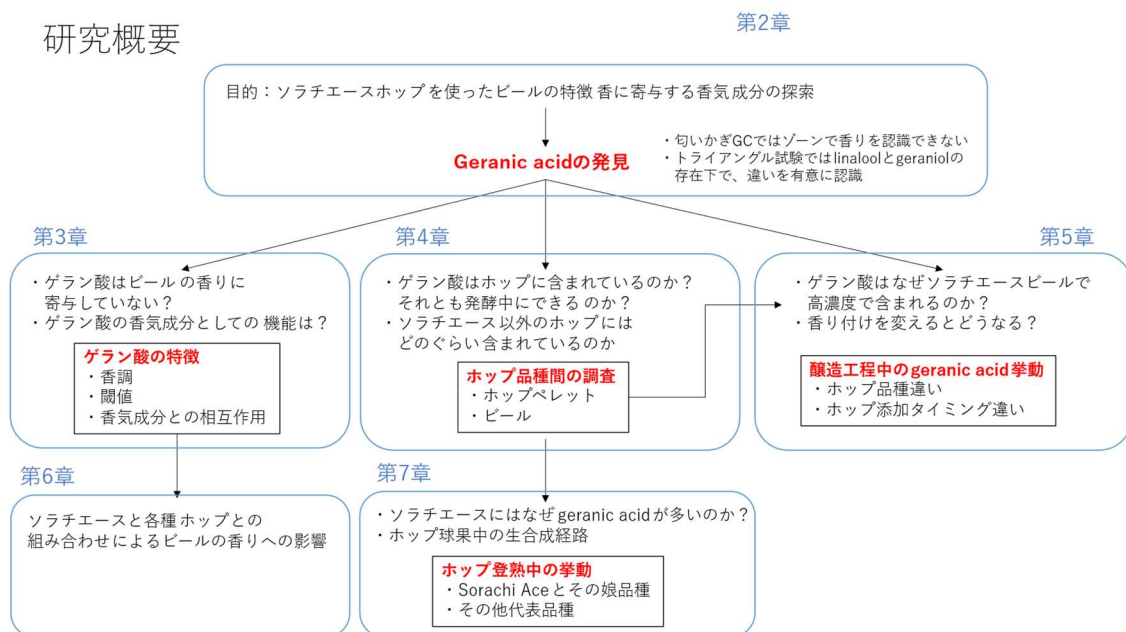


Figure 1-5. 本研究の概要

第2章 Sorachi Ace ホップの品種特有香に寄与する香気成分の探索

2-1. 序論

前章で述べた通り、フレーバーホップ品種の一つである Sorachi Ace がビールに与える香りは複雑であり、松様、ウッディ、ディル（ハーブ）様、シトラス、レモングラス様等と表現される。多くの研究者が、Sorachi Ace を含む、様々なホップやビールに含まれるホップ由来の香気成分や組成をこれまでに調査・報告している (35, 47-50)。しかしながら、Sorachi Ace の品種特有の香りに寄与する主要な香気成分は不明のままであった。

そこで、本章では Sorachi Ace に由来する品種特有の香気成分の探索を試みた。探索手法としては、一般的な試料中の特徴香の探索方法として知られている匂いかぎ分析 (GC-O/MS) にまずは取り組んだ。Sorachi Ace と、対照としてドイツのアロマホップ品種である Hallertauer Tradition を用いてそれぞれ late-hopping でビールを試験醸造 (試醸) し、香気成分を抽出・濃縮したサンプルについて、匂いかぎ分析を実施した。装置は one-dimensional or two-dimensional gas chromatography – olfactometry/mass spectrometry (¹D or ²D GC-O/MS、一次元二次元切替 GC-O/MS) で、一次元二次元切替 GC-MS に匂いかぎポートがついている仕様である。通常の GC クロマト分析では一つに見えるピークであっても、複数の成分が検出されている場合もあり、匂いかぎのコメントでは品種特有香へ寄与する成分の可能性があるピーク箇所、ライブラリ検索による同定を行っても MS スペクトルが一致せず、同定できない場合がある。その際、当該ピークを異種の液相の二次元目のカラムに再導入することで、重なっていた複数の成分が分離され、さらに匂いかぎ分析と組み合わせることで、寄与成分が同定できる可能性が高くなる。本手法は、検出器が嗅覚であるため、労力がかかるが、最も確実な方法であり、分析の自動化が進む現在でも香気成分の探索としてはスタンダードメソッドとされる。

匂いかぎ分析のほかに、SPME-GC-MS も実施し、各ビールのクロマトグラムを差分解析して、違いのあるピークを確認し、Sorachi Ace にのみ検出されるピークを探索した。SPME は試料の揮発性成分をファイバーの先の液相に吸着させ、GC へ導入して分析する方法であり、揮発性成分の分析では非常に感度よく測定できる。匂いかぎ分析のデメリットとして、人の嗅覚には個人差があり、匂いがあっても匂いかぎ分析の担当者によっては検知しない (検知できない) という事象が起こる。そのため差のあるピーク (成分) を客観的にとらえる手法と組み合わせることで、寄与成分を見つける確率をあげることができると考えた。

候補成分のビール香気への効果については、官能検査試験の一つであるトライアングル試験を用いて評価した。トライアングル試験は三つのベース液に一つだけ候補成分を添加し、ブラインドで評価をして候補成分が添加されたサンプルがわかるかどうかを確認することで、その成分の効果を検証する方法である。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試料

2-2-1-1. ホップ

本章の試験には米国産 Sorachi Ace (2014 年 crop)、ドイツ産 Hallertauer Tradition (HTR) (2015 年 crop) で、どちらも T90 ベレットを使用した。(ホップ名称について、International Hop Growers Convention (IHGC) にて登録されたホップ品種には IHGC コードがある。本研究中でホップの名称が長いものについては、IHGC コードで示す。)

2-2-1-2. 試験醸造ビール

本章で分析及び官能検査のために用いた試験ビール 2-A、2-B、2-C は、ビール仕様 (麦芽 100 %) で、サッポロビール (株) 商品・技術開発イノベーション部保有のパイロットブルワリーの常法に準じて造った。煮沸時間は 90 分とし、初沸にて HTR を 0.2 g/L となるように添加した。(これは香り付けではなく、麦汁に苦味の付与及び抗菌作用を持たせるとともに、煮沸工程における突沸を防ぐ目的がある。) ビール 2-A と 2-B については香り付けのホップ添加方法は late-hopping で、煮沸終了 5 分前に各ホップ 2.0 g/L を添加した。各冷麦汁を発酵タンクに移し、 15.0×10^6 cells/mL の下面酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) を添加し、10-12°C で主発酵を行った。その後、CO₂ 雰囲気下で別のタンクに移送した発酵液は 12°C で 6 日間保持し、0°C で 2-3 週間熟成させた。熟成後の液はパイロット設備で抗酸化条件にてろ過から瓶詰めまでを実施し、試験ビールとした。ビール 2-C の場合は、麦汁煮沸の前までは上記記載方法と同じで、初沸時に Sorachi Ace ホップを 0.09 g/L となるように添加した。香り付けは dry-hopping とし、冷麦汁に酵母を添加するのと同じタイミングで Sorachi Ace を 1.5 g/L となるように添加した。これらビールの香り付けの条件は Table 2-1 に示した。

2-2-1-3. 市販ビール

市販規模で kettle-hopping により醸造したピルスナータイプビールを官能検査のベースビールとして使用した。

2-2-1-4. 試薬

標準試薬：香気成分の同定及び定量には、市販の標準試薬を標準試薬として用いた。geranic acid (>85 %, mixture of isomers)、(*S*)-(-)-perillyl alcohol (>96 %) は Merck 社製 (Sigma-Aldrich) を、linalool (>96%)、 α -terpineol (>95 %)、 β -citronellol (>95 %)、geraniol (>97 %)、nerol (>98 %)、citral (>98 %, mixture of isomers)、farnesol (>95 %, mixture of isomers)、benzyl acetate (>99 %) は東京化成工業社製を用いた。methyl geranate (>94 %, mixture of isomers) は、Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) から購入した。

その他試薬：ジクロロメタン、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、リン酸は富士フイルム和光純薬社製を用いた。ジクロロメタン及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬・PCB グレード 300 を、それ以外の試薬は試薬特級グレードを用いた。

2-2-2. 分析

2-2-2-1. 一次元二次元切替 GC-O/MS による品種特有香探索

2-2-2-1-1. サンプル調製

匂いかぎ分析には、Sorachi Ace と HTR を使用した試醸ビール（ビール 2-A と 2-B）を試料とし、前処理方法及び匂いかぎ分析条件等は常田らの方法（51）に従って行った。前処理のため、各ビールを溶媒抽出した後、Engel らより報告されている SAFE による蒸留（39）を行い、濃縮したものをサンプルに用いた。

溶媒抽出の段階で、pH 調整（塩基性処理）のあり、なしの 2 つを準備した。（ビールは pH 4.0 前後の酸性飲料である。）通常、ビールの匂いかぎ分析は、ビール中に含まれる酢酸等の酸類が匂いかぎ分析に大きな影響を及ぼすため、ビールの pH を塩基性にする。一方で、求める香気成分が酸性物質である可能性もあるため、本研究においては、pH 調整を行わずに前処理したサンプルも用意した。

まず酸性の揮発性画分を得るため、200 mL のビールに 60 g の塩化ナトリウムを添加し、よく攪拌して溶解させた。そのサンプルを 500 mL の分液ロートに移し、200 mL のジクロロメタンを加え、15 分間振とう抽出を行った。下層のジクロロメタンを回収した後、200 mL のジクロロメタンを再度ビール層に加え、振とう抽出し、下層のジクロロメタンを回収した。得られたジクロロメタンを合わせて、5 g の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ガラスウールを用いて無水硫酸ナトリウムを除去したのち、ジクロロメタンを梨型フラスコに移し、沸石を加えたのち、ビグリュ管（長さ 60 cm、内径 1 cm）を接続して、60℃のウォーターバスにて加温しながら 30 mL まで濃縮した。その後、SAFE による蒸留は Engel らの方法に従って実施した。得られた蒸留液は窒素気流下で 1 mL（200 倍）もしくは 100 μ L（2000 倍）まで濃縮した。

中性-塩基性の揮発性画分を得るため、200 mL のビールに 4.2 g の炭酸水素ナトリウムを添加し、よく攪拌して溶解させた。そのあとの前処理については、酸性の揮発性画分と同様の操作を行った。

2-2-2-1-2. 一次元二次元切替 GC-O/MS による匂いかぎ分析

酸性揮発性画分と中性-塩基性揮発性画分は、それぞれ一次元二次元切替 GC-O/MS に供した。一次元二次元切替 GC-O/MS のプロトコールは常田らの方法（51）を参照した。ビールサンプルの匂いかぎ分析は 1 名で行い、HTR ビール（ビール 2-B）と比較して、まずは一次

元カラムにのみ導入して、Sorachi Ace ビール（ビール 2-A）だけで匂いを感じた箇所もしくはより強く匂いを感じた箇所について、香気成分の同定を実施した。

さらに一次元カラムによるクロマトグラム上のピークに 2 成分以上の重複があったため、当該ピークを二次元カラムへのハートカット導入し、さらに分離して匂いかぎ分析と成分の同定も実施した。

GC-MS 条件

機器：7890A GC-5975C MS, LTM System (Agilent Technologies 社製)

：におい嗅ぎ装置 ODP3 (GERSTEL 社製)

一次元目カラム：DB-WAX 30 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm LTM
(Agilent Technologies 社製)

二次元目カラム：DB-5 10 m × 0.18 mm 内径、膜厚 0.40 μm LTM
(Agilent Technologies 社製)

注入モード：スプリットレス注入

注入口温度：250°C トランスファーライン温度：300°C

注入量：1 μL

オーブン：250°C

Aux 1：308 kPa (一次元二次元切替装置 (バルブ 1) へのガス供給用)

Aux 2：20 kPa (一次元二次元切替装置へのガス供給用)

Aux 3：50 kPa (鼻の乾燥防止ガスの供給用)

MS 検出器：SCAN モード m/z 29~550

1D2D 切替装置：ODP：MS = 2 : 1 となるように分岐

：各部接続キャピラリーは Figure 2-1 を参照

ハートカット条件

オーブン温度設定

一次元目：40°C, 1 min → 6°C/min → 200°C → 20°C/min → 240°C

二次元目：30°C, [ハートカット終了時間] + 0.2 min → 20°C/min → 260°C

圧力設定

LTM-GC 1：397 kPa, [ハートカット終了時間] + 0.5 min → 999 kPa/min → 20 kPa

LTM-GC 2：308 kPa

バルブ 1 設定 (一次元二次元切替装置へのガス供給用バルブ：Figure 2-1 参照)

[ハートカット開始時間] → オン

(Figure 2-1、バルブ 1 のガス供給が点線ライン側に切替わる)

[ハートカット終了時間] → オフ

2-2-2-2. SPME-GC-MS による差分解析

匂いかぎ分析のほかに、SPME ファイバーを用いてビールの香気成分を吸着・濃縮し、GC-MS へ導入して差分解析を行った。なお、SPME-GC-MS による差分解析は、簡便に揮発性成分は吸着して装置導入できるため、香気成分分析分野ではよく用いられる方法である。

ビール 2-A もしくはビール 2-B 8 mL を、あらかじめ 3 g の塩化ナトリウムを入れた 20 mL SPME 用バイアルに入れ、密栓した。前処理装置には Combi PAL オートサンプラー (CTC Analytics 社製) を用いて、バイアルを 40°C で 15 分振とうさせて、気相へ香気成分を移行させたのち、SPME 用ファイバー (polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) 65 µm Supelco 社製) をバイアルのヘッドスペースに露出させた。40°C で 15 分間揮発成分をファイバーに吸着させた後、SPME ファイバーをすぐに GC の注入口に挿入し、3 分間加熱脱着した。GC-MS 条件は以下の通り。

装置 : 6890A GC-5973 MS (Agilent Technologies 社製)

カラム : DB-WAX 60 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 µm

(Agilent Technologies 社製)

キャリアガス : He 定流量モード 2.1 mL/min

注入口 : 温度 270°C、スプリットレス

昇温条件 : 40°C (3 min) → 5°C/min → 250°C (5 min)

MS : EI (Electron Ionization) イオン化電圧 70 eV

イオン源温度 230°C、四重極温度 150°C

scan モード m/z 29–280 Dwell 2–3sec/cycle

2-2-2-3. 香気成分の同定

ホップ由来の化合物はすべて、同じ機器を使用して、各ピークの MS を用いて、NIST 05.L データベース (Agilent Technologies) のものと比較することにより、対象物質を推定した。その後、市販で入手可能な標準試薬と RI (Retention Index : 保持指数)、匂いの質、MS (質量スペクトル) を比較することによって同定した。なお、RI は、同じ GC-MS 条件下で C6-C20 アルカンシリーズ (Supelco 社製) を分析して算出した。

2-2-2-4. 純度及び異性体比率決定のためのガスクロマトグラフィー-水素炎イオン化検出 (Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID)) 分析

標準試薬のうち、geranic acid は異性体を含んでおり、geranic acid には geranic acid (*trans* 体) と neric acid (*cis* 体) が含まれている。同様に、citral、methyl geranate も各々の異性体を含んだ状態で市販されている。またすべての標準試薬においては、当該成分以外に副生成物や分解物などの不純物がわずかに含まれているため、正確な定量値を求める上では、当該

成分の含有率を求める必要がある。

異性体の比率及び試薬の純度を算出するため、GC-FID による分析を実施した。分析には各標準試薬をエタノールで 500 mg/L に希釈した溶液を用い、分析条件は以下に従った。

装置：6890N gas chromatograph (Agilent Technologies 社製)

カラム：HP-INNOWax 30 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm

(Agilent Technologies 社製)

キャリアガス：He 定流量モード 1.7 mL/min

注入口：温度 250°C、1 μL 注入 スプリット 100 : 1

パージ流量 168.5 mL/min

昇温条件：50°C (2.5 min) → 10°C/min → 240°C (5 min)

FID 検出器：温度 250°C、水素ガス 40 mL/min、空気 450 mL/min

分析で得られたクロマトグラムで、溶媒ピークを除いて検出された全ピーク面積を 100 とし、当該成分の面積を純度として求めた。異性体の比率についても同様に、検出された検出された両異性体のピーク面積合計を 100 とし、それぞれの異性体の面積の割合を異性体比率として、それに試薬としての純度も掛け合わせて算出した。異性体成分の同定と溶出時間については、NIST Library に掲載されている RI と AromaOffice データベース (西川計測社製) の化合物情報を参考に、標準試薬を別途、GC-MS 分析してフラグメントや溶出時間を確認した上で定量に用いた。

2-2-2-5. SPME-GC-MS によるホップ由来化合物の定量

2-2-2-5-1. テルペンアルコール類、アルデヒド類、エステル類

テルペンアルコール類である linalool、geraniol 及び nerol、アルデヒド類である geranial 及び neral、エステル類である methyl geranate 及び methyl nerolate の定量は、SPME-GC-MS で実施した。揮発性化合物の抽出には、SPME ファイバー (PDMS/DVB、膜厚 65 μm、Supelco 社製) を使用した。あらかじめ 3 g の塩化ナトリウムを入れた 20 mL の SPME 用ガラスバイアルに 8 mL のビールを加え、続いて内部標準として 10 mg/L の benzyl acetate 40 μL を添加した。バイアルを密封し、Combi-PAL オートサンプラー (CTC Analytics 社製) で 40°C、15 分間攪拌した。SPME ファイバーをバイアルのヘッドスペースに挿入し、揮発性成分を吸着させるため 15 分間保持した。吸着後、SPME ファイバーをすぐに GC の注入口に挿入し、3 分間加熱脱着した。GC-MS 条件は以下の通り。

装置：6890N GC-5973 MS (Agilent Technologies 社製)

カラム：DB-WAX 30 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm

(Agilent Technologies 社製)

キャリアガス：He 定流量モード 1.0 mL/min

注入口：温度 270°C、スプリットレス

昇温条件：40°C (3 min) → 5°C/min → 250°C (5 min)

MS：EI、イオン化電圧 70 eV、イオン源温度 230°C、四重極温度 150°C

SIM モード 定量イオンと定性イオンは Table 2-2 参照

検量線は、各化合物をあらかじめ添加したビールを分析して作成した。検量線の濃度範囲は、サンプルビールの各化合物の濃度にあわせた範囲とした。定量イオン、定性イオン、検量線の範囲及び標準試薬の異性体の比率は、Table 2-2 に示した。各検量線の相関係数 R^2 値はすべて 0.99 以上であった。すべての定量分析は $n=2$ で実施した。

2-2-2-5-2. カルボン酸類

カルボン酸類である geranic acid 及び neric acid の定量は、SPME-GC-MS で行った。揮発性化合物の抽出には、SPME ファイバー (PDMS/DVB 膜厚 65 μm Supelco 社製) を使用した。あらかじめ 3 g の塩化ナトリウムを入れた 20 mL SPME 用ガラスバイアルにビール 4 mL と 0.1 % (v/v) リン酸水溶液 4 mL を加え、内部標準として 10 mg/L の benzyl acetate を 20 μL 添加した。バイアルを密封し、Combi-PAL オートサンプラー (CTC Analytics 社製) で 60°C、15 分間攪拌した。SPME ファイバーをバイアルのヘッドスペースに挿入し、揮発性成分を吸着させるため 15 分間保持した。吸着後、SPME ファイバーをすぐに GC の注入口に挿入し、3 分間加熱脱着した。GC-MS 条件は以下の通り。

装置：6890N GC-5973 MS (Agilent Technologies 社製)

カラム：DB-FFAP 30 m $\times$ 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm

(Agilent Technologies 社製)

キャリアガス：He 定流量モード 1.0 mL/min

注入口：温度 270°C、スプリットレス

昇温条件：40°C (3 min) → 5°C/min → 250°C (5 min)

MS：EI、イオン化電圧 70 eV、イオン源温度 230°C、四重極温度 150°C

SIM モード 定量イオンと定性イオンは Table 2-2 参照

検量線は、geranic acid 標準成分を 10、25、50、100、250、500、1000 $\mu\text{g/L}$ となるように、事前に添加したビールを分析して作成した。定量イオン、定性イオン、検量線の範囲及び標準試薬の異性体の比率は、Table 2-2 に示した。各検量線の相関係数 R^2 値はすべて 0.99 以上であった。すべての定量分析は $n=2$ で実施した。

2-2-2-6. トライアングル試験による官能検査

官能検査に用いた試験用ビールは、kettle-hopping で造られた市販のピルスナータイプのビールに、香気成分を添加してモデルビールを調製した。添加濃度は、Sorachi Ace で late-hopping によって香り付けされた試験ビール（ビール 2-A）で定量された同じ成分の 3 倍の量とした。評価検査用ビールは 2 セット準備した。試験の 1 セット目は、コントロールサンプルは無添加のピルスナータイプのビールで、テストサンプルは geranic acid（neric acid を含む）のみを添加したモデルビールとした。試験の 2 セット目では、コントロールサンプルはテルペンアルコール類である linalool と geraniol を添加したモデルビールで、テストサンプルは linalool と geraniol を添加したところにさらに geranic acid を添加したモデルビールとした。これらの試験セットのトライアングル試験による官能検査は、よく訓練された 9 人のパネルで実施された。官能検査は専用の部屋で実施し、空調温度は 23°C に保たれていた。サンプルは 4°C で保管され、パネルに提示する直前に、蓋のないガラス容器（総容量 = 150 mL）に 70 mL 注いだ。結果の有意性は二項分布に従って判定した。

2-3. 結果

2-3-1. 匂いかぎ分析による Sorachi Ace 香気への寄与候補成分の探索

Sorachi Ace ホップの品種特徴に寄与する香気成分を探索するために、Sorachi Ace を用いて試醸したビール（ビール 2-A）と HTR を用いて試醸したビール（ビール 2-B）について、匂いかぎ分析を実施した。両ビールとも late-hopping による香り付けを行ったビールである。ホップの香り付けの手法としては、dry-hopping で香り付けしたビールの方がより香りが強くビールに着く傾向にあるが、様々なホップ由来の香気成分が多く含まれるが故に、対象化合物の分離/精製を妨げる可能性があったため、この目的のためには late-hopping を選択した。対照となるビールサンプルは、特徴が比較的弱いホップを用いたビールを選ぶことで、より差を確認しやすくなると考え、ホップ品種はドイツの標準的なアロマホップである HTR が最適と考え、コントロールとした。

Sorachi Ace ビール（ビール 2-A）と HTR ビール（ビール 2-B）の香気成分を抽出・濃縮したサンプルについて、¹D GC-O/MS で匂いかぎ分析した。各サンプルで香りを感じたりレンションタイム及びその時に感じた香りの特徴をまとめた上、Sorachi Ace サンプルでのみ香りを強く感じ、HTR サンプルでは匂いを感じないゾーン、または Sorachi Ace サンプルの方が HTR サンプルよりも香りの強度が大きいゾーンをいくつかピックアップした。これらのゾーンで検出されたピークについて、得られた MS の NIST 05.L データベースによるライブラリ検索、RI、及び標準試薬の MS と香気特徴を比較することで同定した（Table 2-3）。匂いかぎ分析の結果、試醸した Sorachi Ace ビールには、linalool、geraniol、 β -citronellol 等、いくつかのモノテルペンアルコール類が HTR ビールよりも多く含まれていた。これらの化合物は、蛸井らの先行研究によれば、3 成分の相互作用でレモン、ライム様の香気を呈するとの報告があり（31）、Sorachi Ace ビールの品種特有香のうち、例えば柑橘類のような特徴香に寄与する候補化合物である可能性が考えられた。しかし、それ以外の化合物がもつ香気特徴（Table 2-3）は、Sorachi Ace ビールの特徴香とは異なっており、特に松様やウッディな香りの特徴を感じるゾーンはなかった。よって、Table 2-3 で同定された化合物だけでは、Sorachi Ace ビール特有の香気を完全に説明することはできないと判断した。ホップ香気成分の分野でも品種特有香の同定に実績のある匂いかぎ GC で同定できないという場合、ピークの分離が不十分で、ほぼ同じ溶出位置により香りの強い成分が重なっていることなどが理由としては考えられる。

2-3-2. SPME-GC-MS による差分解析

匂いかぎ分析の結果では、Sorachi Ace ビール特有の香気成分を特定するには不十分であったため、別のアプローチで探索することとした。前項で使用した DB-WAX カラム（30 m×0.25 mm 内径、0.25 μ m 膜厚）では対象化合物が他の化合物と重複している可能性があ

ったため、より長さの長いカラムを使用すれば、重複した成分のピークを分離できる可能性がある」と推察し、30 m と 60 m の 2 種類で比較してみることにした。また探索したい香気化合物は比較的高い閾値を持っている可能性もあったため、幅広く揮発性成分を吸着して分析できる SPME ファイバー (PDMS/DVB) を用いて GC-MS にて分析することとした。前項の匂いかぎ分析と同様に、サンプルは Sorachi Ace ビール (ビール 2-A) と HTR ビール (ビール 2-B) を分析し、それらのクロマトグラムを比較した (Figure 2-2)。

30 m と 60 m の DB-WAX カラムを用いて SPME-GC-MS 分析を行った結果、30 m の DB-WAX カラムを使用した場合には重複して肩のある一つのピーク (Figure 2-2-I) になっているが、60 m の DB-WAX カラムを使用した場合に二つのピーク (Figure 2-2-II) に分離される箇所が見出された。それぞれを同定したところ、これらは geranic acid と 9-decenoic acid であった (Figure 2-2-II)。HTR ビールでは、この箇所で検出されたのは 9-decenoic acid のピークのみであった。この差分解析により、Sorachi Ace ビールにのみ「geranic acid」(IUPAC; 3,7-dimethyl-2,6-octadienoic acid、CAS 番号 459-80-3) が含まれていることが明らかになった。

geranic acid の同定については、得られた Sorachi Ace ビール由来 geranic acid と推察されたピークと標準物質の geranic acid の MS を比較した結果、ほぼ一致していた。Figure 2-3 に 30 m の DB-WAX カラムを使用して geranic acid と 9-decenoic acid が重複した場合の MS (A)、60 m カラムで分離できたときの geranic acid の MS (B)、標準物質の MS (C) を示した。geranic acid の RI を算出したところ、2349 となった。

前項の 30 m の DB-WAX カラムを用いた匂いかぎ分析では、geranic acid の匂いは検出できなかった。上述の差分解析の結果から、これは、geranic acid のピークが、9-decenoic acid のピークと重なっており、9-decenoic acid が匂いかぎ分析で強いムレ臭を呈していたためではないかと推察された。そこで、前項の匂いかぎ分析に用いた Sorachi Ace ビールサンプルを使用して、二次元カラムへ導入することで geranic acid の匂いを検出できるかどうか確認した。2 つの香気成分が重複したピークをハートカットすることで、geranic acid のピークと 9-decenoic acid のピークは分離できたが、よく訓練されたパネル 3 名で匂いかぎを行っても、geranic acid のピーク部分で匂いを検出することはできなかった。すなわち、geranic acid は閾値が高く、香気強度の弱い化合物ではないかと推察された。

今回、未同定の微量香気成分の分析手法として主流である匂いかぎ分析で成分探索を試みたが、仮に geranic acid が分離できる 60 m の DB-WAX カラムを匂いかぎ分析に用いていたとしても、geranic acid のゾーンで匂いを感じて同定に至ることはなかったと考えられる。過去にホップ香研究で geranic acid を分析していた例は 1 件だけであったものの (52)、Sorachi Ace を分析した先行研究で geranic acid に言及したものは 1 件もなかった。本研究は SPME-GC-MS の差分解析によって、Sorachi Ace ビールに含まれるホップ由来の geranic acid の存

在について報告した初めての報告となった。

2-3-3. SPME-GC-MS による試醸ビールのホップ由来香気成分の定量

Sorachi Ace ビール中より検出された geranic acid は、その構造から分かる通り geraniol や geranial の類縁体物質である。一方で、geranic acid のメチルエステルである methyl geranate がホップ精油中に含まれていることは古くから知られていた (47, 48, 53, 54)。そこから、ホップ球果における geraniol 類縁体の生合成は、まず geraniol が酸化されて geranial になり、geranial が酸化されて geranic acid になり、最後に geranic acid がエステル化されて methyl geranate になると推察した (Figure 2-4)。この推察の背景として、カヤツリグサ属の植物の一つ *Cyperus iria* (コゴメカヤツリ) には、farnesol から methyl farnesoate への生合成経路があることが報告されていることにある (55)。Farnesol の構造は geraniol の構造に類似していることから、この経路は farnesol だけでなく geraniol でも起こる可能性がある。一例として、ワインブドウのゲヴェルツトラミネール品種には、methyl farnesoate、methyl geranate、geranic acid が含まれているとの報告がある (56)。ホップには methyl geranate が含まれていることから、ホップ球果にもこの生合成経路があるのではないかと考えられる。

Figure 2-4 に示した geraniol 類縁体には、*cis* 型の異性体として、それぞれ nerol、neral、neric acid、methyl nerolate が存在する。また前述の匂いかぎ分析で、Sorachi Ace ビールには geraniol と linalool が高濃度に含まれている可能性があることが分かった。Linalool は一般的にホップの香りに大きく寄与することが知られている (30-35)。そのため、linalool も分析対象に加えることとし、アルコール類 (geraniol、nerol)、アルデヒド類 (geranial、neral)、カルボン酸類 (geranic acid、neric acid)、エステル類 (methyl geranate、methyl nerolate) をターゲット成分として選抜した。Table 2-1 のビール 2-A、2-B、2-C について、SPME-GC-MS を用いてこれらの化合物を定量した。ビールにおける検出限界 (LOD) と定量下限 (LOQ) は、geranic acid 及び neric acid ではそれぞれ 10 µg/L と 25 µg/L、他のテルペン類では 0.3 µg/L と 1 µg/L とした (Table 2-2)。各異性体の濃度は、Table 2-2 に記載されている比率を用いて算出した。3 種のビール中のこれらの香気成分濃度を Table 2-4 に示した。

その結果、geranic acid は、Sorachi Ace ビールでのみ定量可能な濃度で検出され、ビール 2-A は 133 µg/L、ビール 2-C は 178 µg/L であった。対照であるビール 2-B からは geranic acid は検出されなかった。また Sorachi Ace ビールには geranic acid が非常に特異的に含まれている一方、methyl geranate は微量しか含まれていなかった。さらに、geraniol と linalool の濃度は、Sorachi Ace ビールで HTR ビールよりも高かった。

2-3-4. トライアングル試験による官能検査

2-3-2 で述べた通り、geranic acid は匂いかぎ GC では検出できなかったことから、香気強

度の弱い成分と考えられた。一方で、Sorachi Ace に特異的な成分であることは 2-3-3 の分析結果からも明らかである。Sorachi Ace をサンプルとした過去の研究でも、品種特有香に寄与する成分の報告は無く、本研究の匂いかぎ GC 及び差分解析でも、他のホップ品種になく Sorachi Ace に特異的な成分は geranic acid 以外には見出されていない。そこで、geranic acid が Sorachi Ace 品種特有香に寄与している可能性を検証するため、やや強調した条件での官能検査を計画した。

具体的には、geranic acid のビールの香味への寄与の有無を確認するため、トライアングル試験による官能検査を実施した。強調試験であるため、ホップ香のしないベースのビールに添加する各香気成分の量はビール 2-A で定量された濃度の 3 倍の量とした。Table2-5 に官能検査の結果を示した。セット 1（対照：ピルスナータイプビール、試験区：ピルスナータイプビールに geranic acid を添加したモデルビール）のセットでは、訓練されたパネルは 9 人中 2 人しか正答せず、対照と試験区のサンプルの違いを認識できなかった。すなわち、geranic acid だけがビールに添加されても、その香気は感じられないと推察された。

一方で、セット 2（対照：linalool と geraniol をあらかじめ添加したモデルビール、試験区：linalool、geraniol、さらに geranic acid を添加したモデルビール）では、9 人のパネルのうち 7 人が正答し、有意水準 0.01 で geranic acid を含む試験サンプルを識別した。以上の結果より、geranic acid 自体はビールの香味に直接的な影響を与える可能性は少ないが、linalool と geraniol が混在した場合、これらの香りを増強する効果があると推測した。さらに、セット 2 の geranic acid を添加したモデルビールは、パネルのコメントとして「レモンのような」や「ウッディな香り」が挙がり、geranic acid はテルペンアルコール類との組み合わせにより Sorachi Ace 特有の香味に寄与するキー成分の一つである可能性が示唆された。

2-4. 考察

2-4-1. Sorachi Ace ホップ品種特有香に寄与する成分の同定とその特性評価全体の流れ

これまでも多くの研究者が、様々なホップやビール中のホップ由来の香気成分について調査を行っており、Sorachi Ace ホップやそれを用いたビールも含まれている。(34, 46-49) しかし、Sorachi Ace の品種特有香に寄与する主要成分は十分にはわかっていなかった。本研究では、一次元二次元切替 GC-O/MS による匂いかぎ分析と SPME-GC-MS 分析を用いて、Sorachi Ace 由来の品種特有香に寄与する香気成分の探索を試みた。最終的に、Sorachi Ace に特有の香気成分として geranic acid が存在することを発見したが、この geranic acid の同定と Sorachi Ace ビールの香りへの寄与の解明プロトコールは、これまで広く行われてきた試料中の特有香探索方法とは異なっているため、Figure 2-5 にその全体の流れをわかりやすく示した。以下に試験結果について、詳細な考察を述べる。

2-4-2. 匂いかぎ分析による香気成分探索アプローチ

Sorachi Ace ホップの品種特有香を探索するにあたり、よく知られている手法の一つである匂いかぎ分析を選択した。一般に、匂いかぎ分析は、揮発性チオール等の閾値が低い未知化合物を探索するのに適しているといわれている(27-29)。しかし、今回の匂いかぎ分析では Sorachi Ace ビールのみで認められる特異な香気を示すゾーンは見出されなかった。

また、今回の匂いかぎ分析では、Sorachi Ace ビールサンプルで複数のテルペンアルコール類を検出した。テルペンアルコール類は、花や柑橘類のような特徴的な香気を持つことが一般的に知られており、蛸井らは、ビールにあるレモン、ライムのような柑橘系の香りは、共存する linalool、geraniol、および β -citronellol の相互作用によるものであると推察している(30)。Sorachi Ace ビールで感じる香りにも、レモンやレモングラス様の特徴があるが、その香りにはこれらのテルペンアルコール類だけでは説明できない、独特のニュアンスがあった。

一方、フレーバーホップ品種の中には揮発性チオール類がその品種特有香として知られている。例えば 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP (ブラックカラントやマスカットを彷彿とさせる風味と表現される(57))) は、閾値が非常に低い (1.2 ng/L(34)) 揮発性チオールの一つであり、いくつかのフレーバーホップ品種に含まれていることが報告されている (28, 29, 48, 49, 57)。本研究で使用した Sorachi Ace ホップについてもチオール類の定量を行った結果、非常に微量ではあるが 4MSP が含まれていた(データ未掲載)。過去の報告(49)でも Sorachi Ace より 4MSP の検出が報告されており、本結果と一致はしたものの、Sorachi Ace ビールの特徴的な香りは、4MSP の香りとは異なっている(57)。さらに、匂いかぎ分析では、4MSP 以外の揮発性チオール類、例えば 3-sulfanylhexasan-1-ol (28, 29, 48) および/または 3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol (28, 29) が検出されると思われる箇所で、それらの香りは認識

されなかった。

総じて、本研究の匂いかぎ分析では Sorachi Ace ビールに特有の成分は検出されなかった。そのため、Figure 2-5 に示したように、別のアプローチを試みた。

2-4-3. SPME-GC-MS 差分解析による geranic acid の同定

本研究の匂いかぎ分析で Sorachi Ace ビールに特有の成分が検出できなかった理由として、DB-WAX カラム (30 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm) で分析した場合に、強い匂いを持つ他の化合物と重複したまま溶出している可能性が考えられた。そこで、香り研究分野では一般的とされる DB-WAX の 30 m カラム以外に、同じ DB-WAX でも、より分離能の高い 60 m のカラムでも分析を行い、二つのクロマトグラムを比較した。すると、30 m のカラムではピークが重複しており、60 m では二つのピークに分かれる箇所を Sorachi Ace ビールの分析で見出し、9-decenoic acid のすぐ後ろに検出されたピークを geranic acid と同定した (Figure 2-2、2-3)。

geranic acid は、過去の研究 (55, 56, 58-63) ではレモングラス、ショウガ、レモン精油、トマト、ブドウ等で検出が認められている。醸造科学の分野では、geranic acid のメチルエステルである methyl geranate がホップ精油由来の香気成分として報告されている (47, 48, 53, 54)。Roberts らは、ホップ精油で初めて同定した methyl geranate (53) の、前駆体の可能性の一つとして geranic acid の存在を推定していた (54)。しかし、ホップとビールに由来する geranic acid の検出を報告した論文はこれまでに 1 件 (52) しかなく、特定の品種に特異的かつビール中から定量可能なレベルで検出したのは、本研究が初めてであった。

2-4-4. geranic acid とテルペンアルコールの香気相乗効果

本章では、匂いかぎ分析では匂いは検出できなかったものの、差分解析とその後の定量で Sorachi Ace ビール中で明らかに高い濃度で検出された geranic acid に着目し、Sorachi Ace ビールにおいて、香味に影響している可能性があるのか否か、検証してみることにした。

具体的には、Sorachi Ace ビールの匂いかぎ分析で認識されたテルペンアルコール類である linalool と geraniol に着目して、geranic acid による香りの相乗効果を確認することとした。予備試験として、ピルスナータイプの市販ビールにそれぞれ、geranic acid のみを添加、テルペンアルコール類の linalool と geraniol の 2 成分を添加、geranic acid、linalool、geraniol の 3 成分を添加し、合計 3 種のビールについて官能検査した結果、3 成分の香気成分を含むビールの香りは、geranic acid のみ、または 2 つのテルペンアルコール類を含むビールの香りと比較して、Sorachi Ace ビールの香りに似ていることを確認した (データ未掲載)。

そこで、ビールの香りに対する geranic acid の影響を把握するための強調試験として、トライアングル試験による官能検査を実施することとした。late-hopping の Sorachi Ace ビール中

の定量値の3倍にあたる 399 µg/L の geranic acid のみをピルスナータイプビールに添加したモデルビールの試験サンプルでは、その添加を認識できなかったが、linalool と geraniol の2成分を共通で含むセット 2 では同じ濃度の geranic acid を添加したモデルビールが有意に認識された。その結果から、geranic acid は単独では香気への影響は弱いものの、他のホップ由来香気成分 (linalool や geraniol など) の香気強度を増強することで、Sorachi Ace ホップの香りに寄与している可能性があるとし唆された。

フレーバー研究の分野では、類似の構造を持つ同じ官能基の化合物間には相乗効果があることがよく知られている (64, 65)。例えば、3-sulfanylhexasen-1-ol (C6) は、3-sulfanylpentane-1-ol (C5) と 3-sulfanylheptane-1-ol (C7) の香りを増強する可能性があることが報告されている (65)。一方、コーヒーの香りに寄与する芳香化合物の一部において、その香りの強さが、閾値以下の濃度のカルボン酸である acetic acid (C2) と butyric acid (C4) によって増強される可能性があることが報告されている (66, 67)。これらの研究 (64-67) から、geranic acid は geraniol と互いに類似した構造を持ち、さらにカルボン酸でもあるため、閾値以下のレベルで geraniol の香りを増強するのではないかと推察した。

Table 2-1. 試醸ビールの香り付け条件

beer	flavoring hop						
	hop variety	hop type	origin	grown area	form	hopping	hop dosage (g of hop/L)
2-A	Sorachi Ace Hallertauer Tradition (HTR)	flavor hop	Japan	U.S.	T90	late	2.0
2-B		aroma hop	Germany	Germany	T90	late	2.0
2-C	Sorachi Ace	flavor hop	Japan	U.S.	T90	dry	1.5

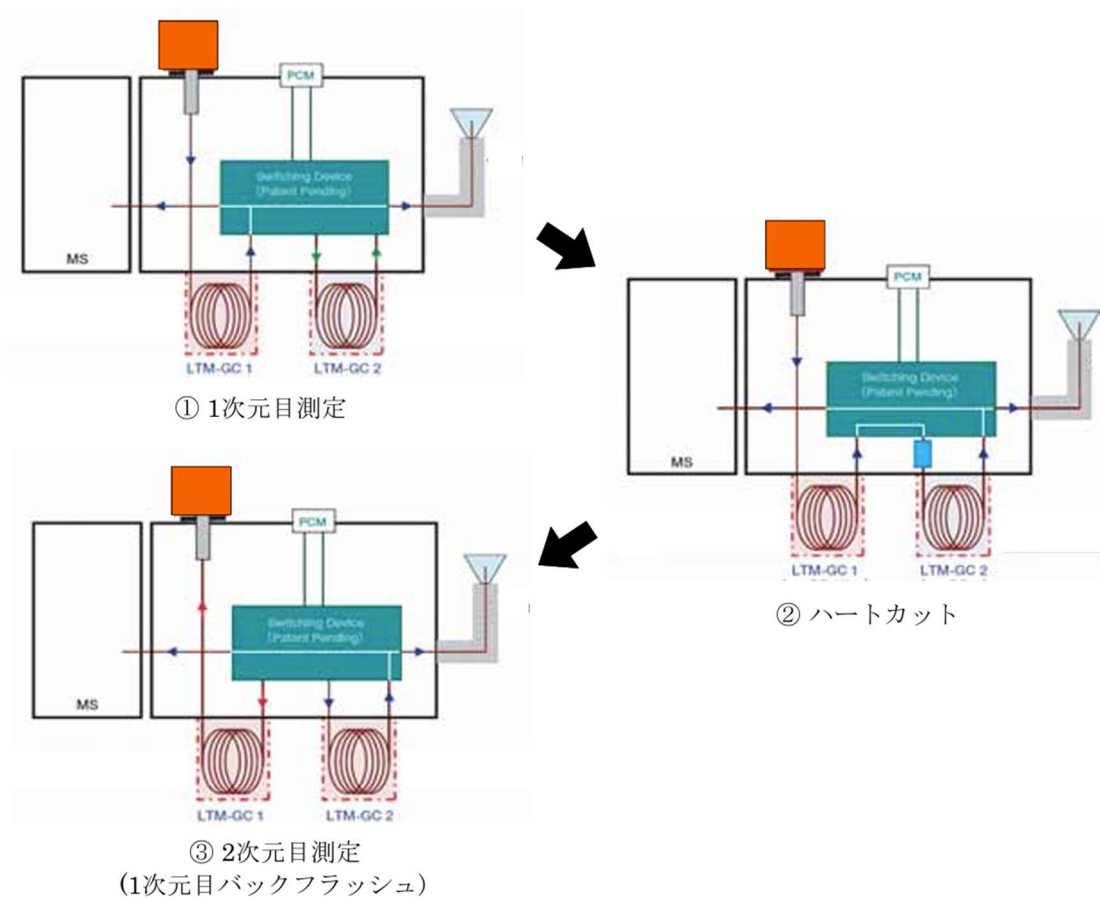
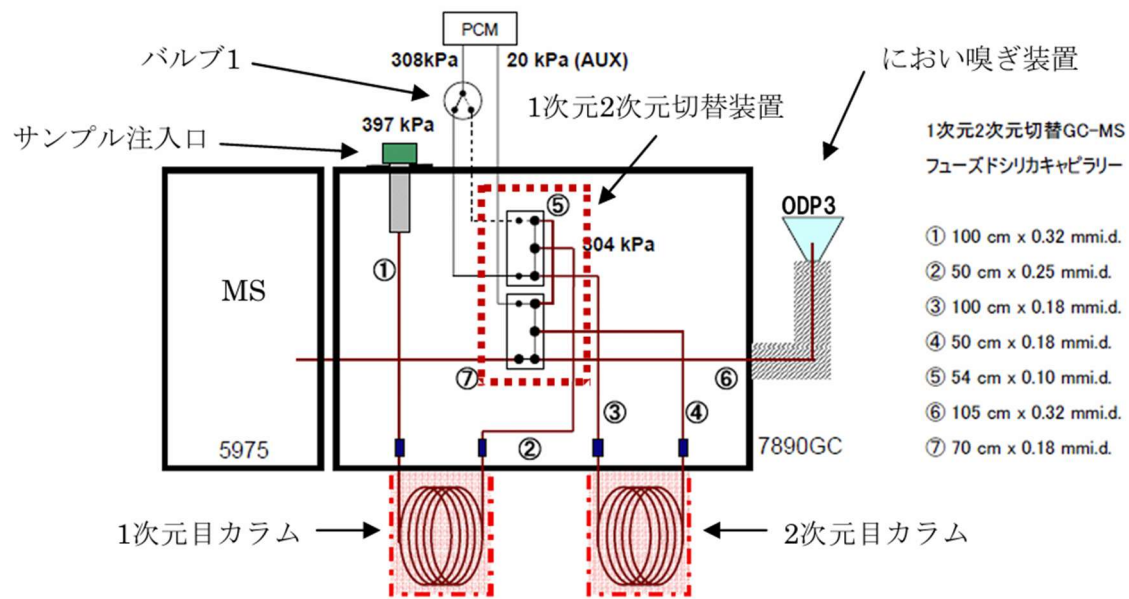


Figure 2-1 一次元二次元切替 GC-O/MS 装置概要と一次元二次元切替の仕組み

Table 2-2. 香気成分定量のための GC-MS パラメーター

group	compound	isomers	ratio of isomers	quantifier ion (<i>m/z</i>)	qualifier ion (<i>m/z</i>)	column	linear range ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
alcohols	linalool	-	-	136	121	DB-WAX	1-100	0.3	1
	geraniol	-	-	136	121	DB-WAX	1-100	0.3	1
	nerol	-	-	121	93, 69	DB-WAX	1-100	0.3	1
aldehydes	citral	geranial neral	0.53	152	137	DB-WAX	0.5-50	0.3	1
			0.27	137	119	DB-WAX	0.3-30	0.3	1
carboxylic acids	geranic acid	geranic acid neric acid	0.7	123	168, 100	DB-FFAP	7-700	10	25
			0.2	123	168, 100	DB-FFAP	10-200	10	25
esters	methyl geranate	methyl geranate methyl nerolate	0.715	114	182	DB-WAX	1-70	0.3	1
			0.285	114	182	DB-WAX	0.3-30	0.3	1
-	benzyl acetate (ISTD)	-	-	108	91	-	-	-	-

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation

Table 2-3. 匂いかぎ分析による香気成分の同定と香気特性

DB-WAX ^a	compound	odor qualities ^b			ID ^c
		Sorachi Ace beer (beer 2-A)	HTR beer (beer 2-B)		
1553	linalool	floral, acrid-smelling	floral, acrid-smelling		MS, RI, CI
1774	β -citronellol	citrus	(weak)		MS, RI, CI
1856	geraniol	floral, flowery	floral, flowery		MS, RI, CI
2016	(S)-(-)-perillyl alcohol	sweet, floral	(none)		MS, RI, CI
2338	farnesol	floral, powdery	(none)		MS, RI, CI

HTR, Hallertauer Tradition

^aRetention Index on a DB-WAX column

^bOdor Qualities perceived at the olfactory port

^cIdentification Method: MS, mass spectral identification; RI, retention index confirmation with olfactory event; CI, chemical standard identification using pure analytical standards

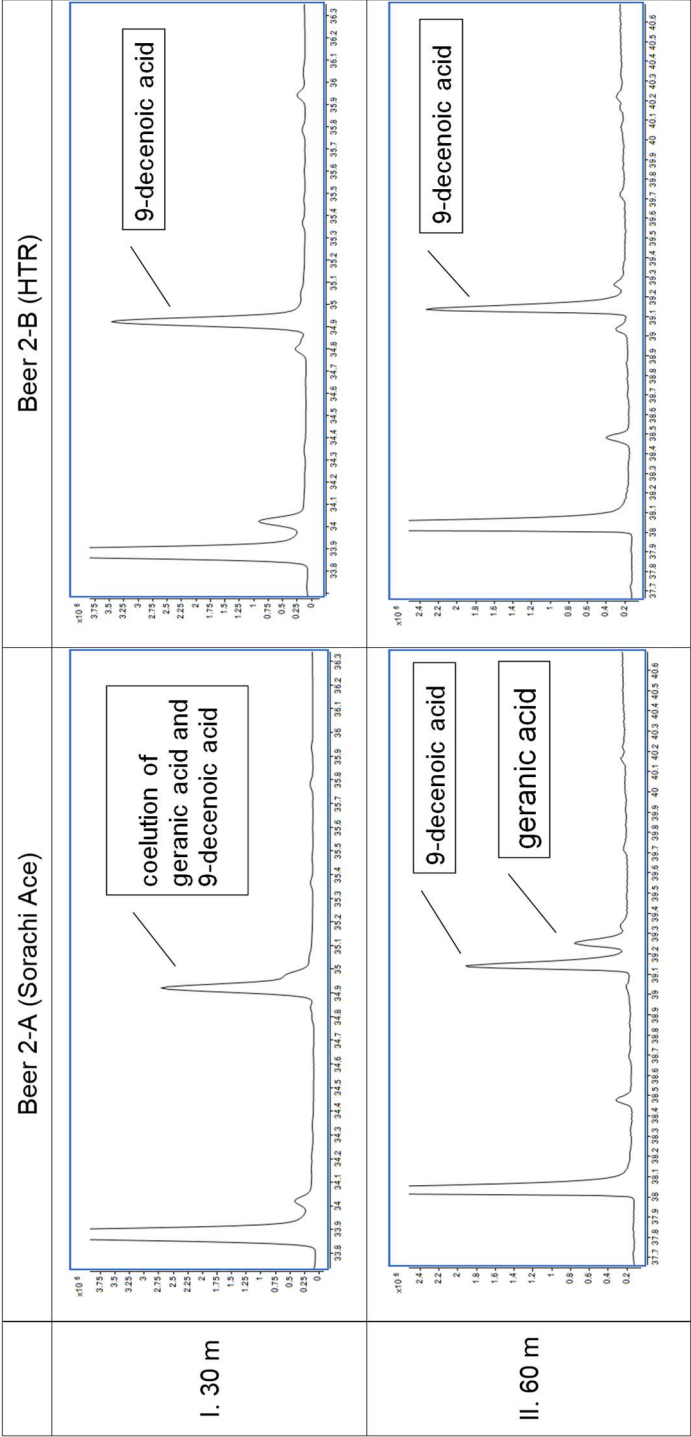


Figure 2-2. 試醸ビールの各カラムにおけるクロマトグラムの比較

- (I) 30 m, DB-WAX (30 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm) で分析した場合
- (II) 60 m, DB-WAX (60 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm) で分析した場合

Beer 2-A, Sorachi Ace ホップで late-hopping したビール、Beer 2-B, HTR ホップで late-hopping したビール

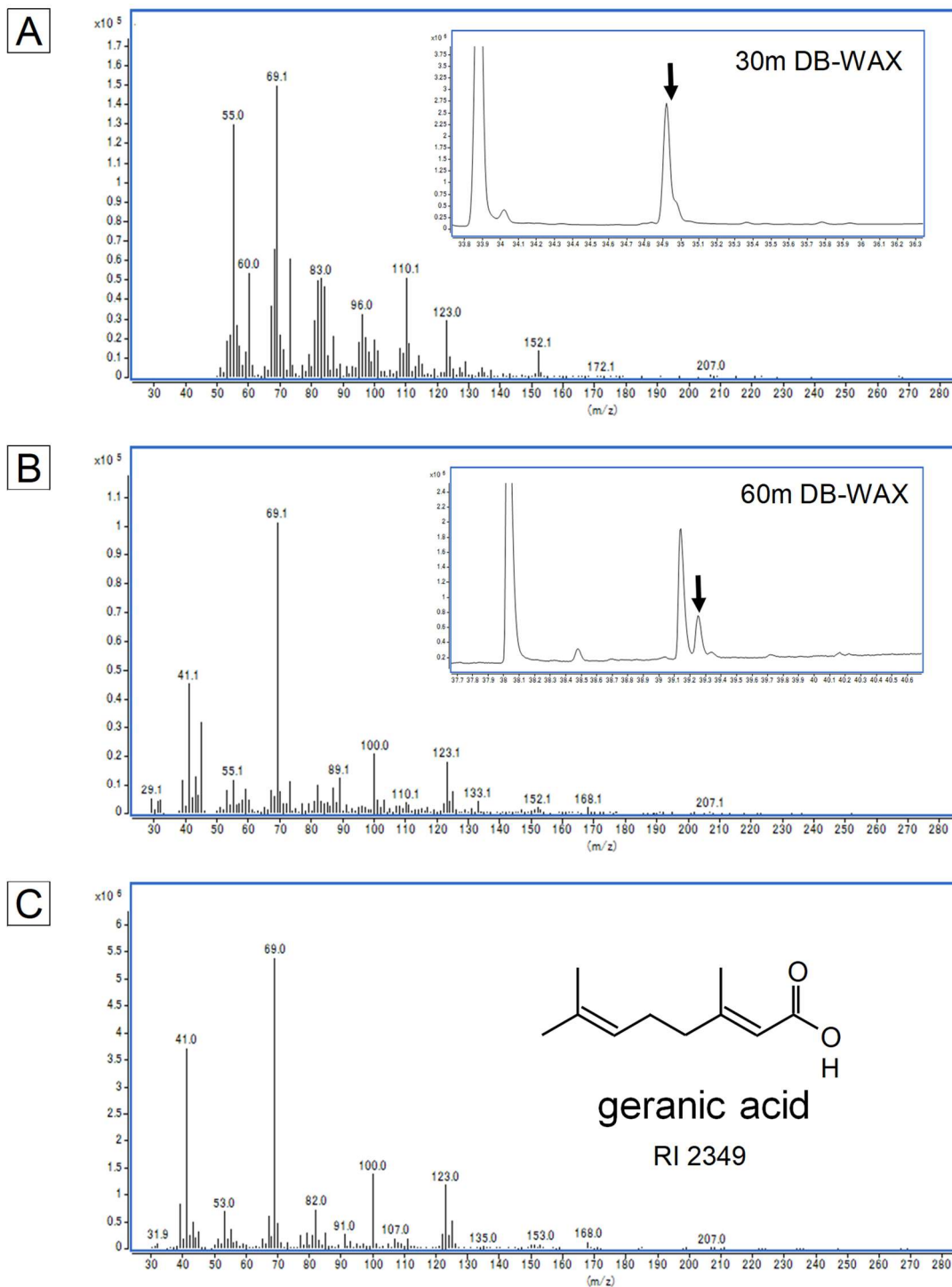
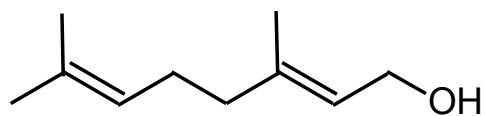


Figure 2-3. マススペクトルの比較

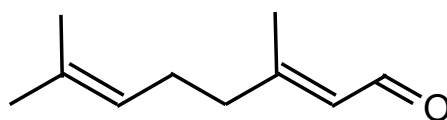
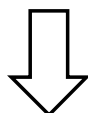
(A) DB-WAX 30 m カラムの使用で 9-decenoic acid と geranic acid 重複時

(B) DB-WAX 60 m カラムの使用で 9-decenoic acid と geranic acid 分離時

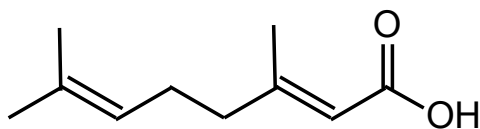
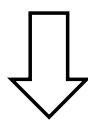
(C) 標準物質 geranic acid



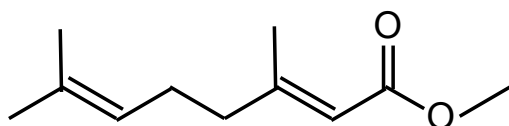
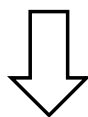
geraniol



geranial



geranic acid



methyl geranate

Figure 2-4. 植物における geraniol, geranial, geranic acid, methyl geranate の生合成経路の推察

Table 2-4. 試醸ビール中の選抜した香気成分の定量

			alcohols			aldehydes		carboxylic acids		esters		
			linalool (µg/L)	geraniol (µg/L)	nerol (µg/L)	geranial (µg/L)	neral (µg/L)	geranic acid (µg/L)	neric acid (µg/L)	methyl geranate (µg/L)	methyl nerolate (µg/L)	
beer	flavoring hop	hopping										
2-A	Sorachi Ace	late	70	16	4.1	tr	nd	133	nd	tr	nd	
2-B	HTR	late	60	5.2	1.4	tr	nd	nd	nd	tr	nd	
2-C	Sorachi Ace	dry	97	98	9.6	2.7	tr	178	nd	1.2	nd	

tr, trace; nd, not detected

Table 2-5. 市販 kettle-hopping ビルスナータイプビールをベースとしたターゲット成分添加による
トライアングル試験の官能検査 (パネル 9 人)

sample	test	control	correct answers/ total answers	<i>p</i>	free comments of correct answers
set 1	beer + 399 µg/L geranic acid	beer	2/9	-	-
set 2	beer + 210 µg/L linalool + 49 µg/L geraniol + 399 µg/L geranic acid	beer + 210 µg/L linalool + 49 µg/L geraniol	7/9	0.01	green woody lemon-like

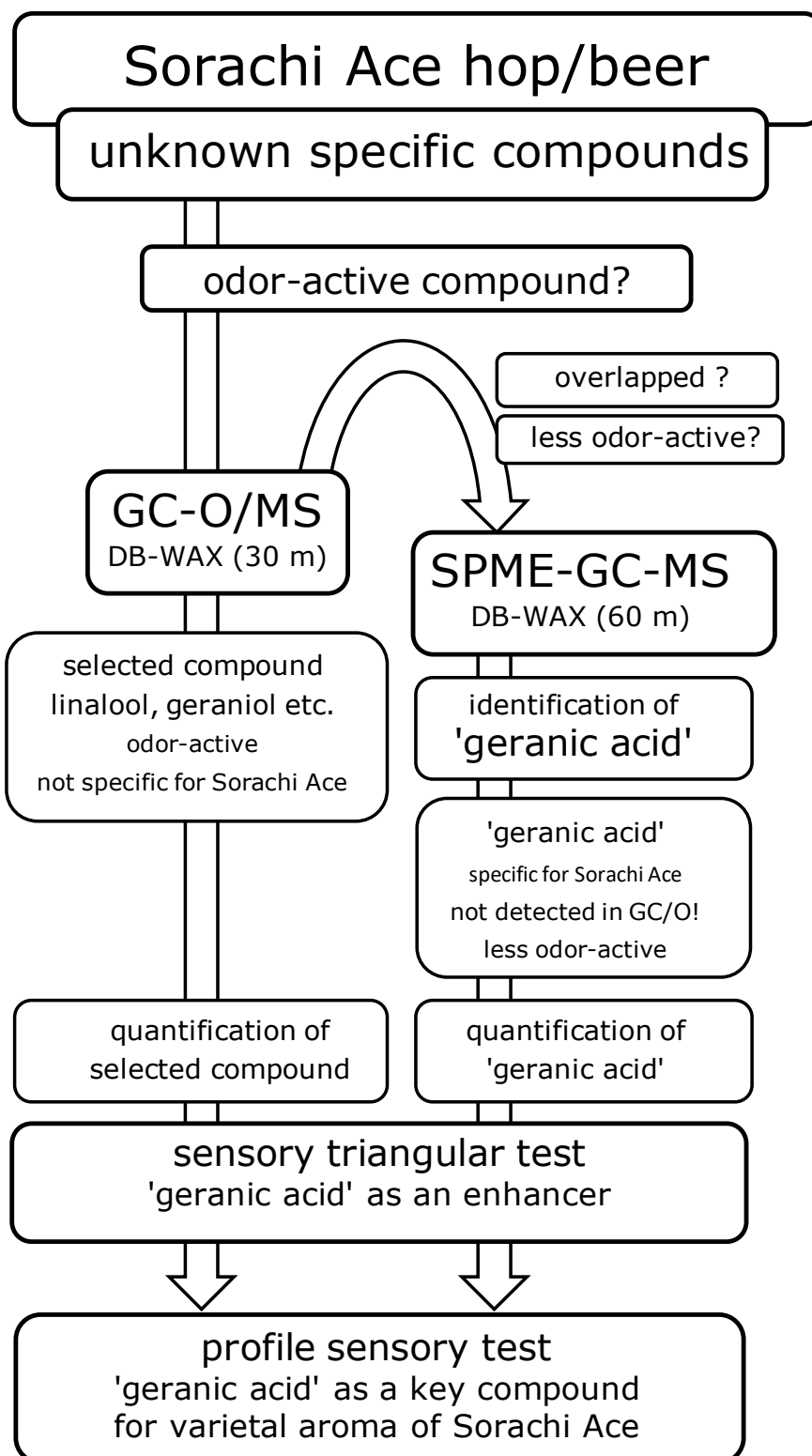


Figure 2-5. 本研究における Sorachi Ace ホップ品種特有香に寄与する成分の同定とその特性評価手法

第3章 geranic acid の閾値とホップ香気成分との相互作用

3-1. 序論

前章で Sorachi Ace ビールの特異的な香気成分として geranic acid を同定し、フレーバーホップ中でよく検出される geraniol と linalool を添加したビールに geranic acid をさらに添加したときに、パネルは有意にその違いを認識することができることを示した。その一方で、同定に至るプロセスの中では、ビールの香りを抽出したサンプルで匂いかぎ分析を実施しても、geranic acid の溶出時間にあたるゾーンで明確な香りを認識できなかった。そこで本章では、香気成分としての geranic acid の特徴を把握することを目的として、感性科学の手法を活用した試験を実施した。

まず、geranic acid の香調の確認と閾値の推定を行った。閾値とは、一般的な言葉の意味としては、ある現象や反応が「起こる／起こらない」を分ける境目となる数値・条件のことで、言い換えると、それを超えると変化が起きる基準値である。香気成分における官能閾値は、その香りをヒトが認識できる濃度を指すことになる。本章では、BCOJ 官能検査法にある極限法 (68) にならって geranic acid の水中及びビール中での閾値を推定した。

次に、前章でトライアングル試験によって linalool 及び geraniol の存在下で geranic acid がビール香気へ影響を与える可能性が明らかとなったが、その効果を確認したのは各成分とも実際のビール中の含量の3倍量という強調条件での官能検査であった。そこで、geranic acid が Sorachi Ace ビールの香りにどのように影響を及ぼしているのかをより詳細に把握するため、また Sorachi Ace ビールがもつ複雑な香りのメカニズムを解明するため、感性科学の手法を用いた試験を行った。具体的には Sorachi Ace で dry-hopping したビール中のホップ由来香気成分を定量し、その濃度をもとに官能検査としてアディクション試験を実施した。アディクション試験は、香気成分をビール等のベース液に加えて、添加する香気成分を増やして香気の変化を比較し、加えた成分の香気への寄与を評価する手法である。また、本試験で研究対象としている Sorachi Ace ビールの香りを例にすれば、加えていった成分が特定の組み合わせになった際に Sorachi Ace ビールの香りが再現できるかを確認する目的でも活用できる。本章では geranic acid について、ビール全体への香りの寄与について詳細に試験を行った。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試料

3-2-1-1. 試験醸造ビール

本章で官能検査試験をする際にターゲットビールとして、Sorachi Ace を用いて dry-hopping した試験したビール 2-C（第 2 章 2-2-1-2 で試験したビール）を用いた。

3-2-1-2. 市販ビール

本章で官能検査に用いるコントロールやベース液に用いたビールは、市販規模で kettle-hopping により醸造したピルスナータイプビールを用いた。

3-2-1-3. 試薬

標準試薬：閾値の調査、香気成分の定量、官能検査試験には、市販の標準試薬を用いた。geranic acid (>85 %, mixture of isomer)、myrcene (>90 %)は Merck 社製 (Sigma-Aldrich) を、Linalool(>96%)、 α -terpinene (>90 %)、 γ -terpinene (>95 %)、 α -terpineol (>95 %)、 β -citronellol (>95 %)、geraniol(>97 %)、nerol (>98 %)、citral (>98 %, mixture of isomer)、(+)-limonene(>95 %)、terpinolene (>85 %)は東京化成工業社製を、Methyl geranate (>94 %, mixture of isomers)は Thermo Fisher Scientific 社製を用いた。

その他試薬：エタノール (99.5)、塩化ナトリウム及びリン酸は、富士フイルム和光純薬（大阪、日本）から購入した。試薬はすべて試薬特級グレードを用いた。

3-2-2. 方法

3-2-2-1. 試薬 geranic acid の香調の確認

3 名のよく訓練された官能検査パネルにおいて、試薬の geranic acid 原液を匂い紙に少量つけ、香調を確認した。

3-2-2-2. geranic acid の閾値推定

第 2 章において同定した geranic acid の閾値は極限法（上昇系列）(68)にて推定した。すなわち、炭酸水 (3.0 kg/cm² ガス圧) とコントロールビール（市販のピルスナータイプビール）をベース液として、geranic acid を添加していない対照 2 点と、geranic acid を添加した試験 1 点の 3 点試験法を 6 組、試験区への geranic acid 添加濃度が 2 倍ずつ増加するように、0.25 mg/L から 8 mg/L の範囲で用意した。試験のイメージ図を Figure 3-1 に示した。添加時、geranic acid は添加濃度の 1000 倍濃い濃度となるようにエタノール溶液で調製し、それを 0.1 % 添加したため、対照にも同等となるように 0.1 % のエタノールを添加した。それぞれ 50 mL をプラコップに入れて、パネルの評価に供した。

本試験はサッポロビール(株) 価値創造フロンティア研究所及び商品・技術イノベーション部のよく訓練された官能検査パネル 15 名で実施した。閾値の推定は、BCOJ 官能評価法にある極限法 (68) にならって、個々のパネルの結果を添加濃度の高い方から確認し、連続して正解した最低の濃度と、その一段階下の濃度 (不正解であった濃度) の相乗平均をそのパネルの推定最良閾値とし、全パネルの平均を本パネル集団の推定最良閾値とした。

なお、geranic acid の閾値推定試験の予備試験として、複数名のパネルでおおよその閾値を求めた上で、本閾値推定試験に臨んだ。

3-2-2-3. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度の決定

試薬の純度を算出するため、第 2 章 2-2-2-4 と同様の条件で、GC-FID による分析を実施した。分析で得られたクロマトグラムで、溶媒ピークを除いて検出された全ピーク面積を 100 とし、当該成分の面積を純度として求めた。

3-2-2-4. SPME-GC-MS によるホップ由来香気成分の定量

本章で Sorachi Ace ビールの香りに寄与する香気成分の候補の化合物について、第 2 章 2-2-2-5 で定量した成分以外の成分について、以下の方法で定量を行った。テルペンアルコール類である α -terpineol 及び β -citronellol、炭化水素系テルペン類である α -terpinene、 γ -terpinene、(+)-limonene、myrcene 及び terpinolene の定量は、SPME-GC-MS で実施した。揮発性化合物の抽出には、SPME ファイバー (PDMS/DVB、膜厚 65 μm 、Supelco 社製) を使用した。あらかじめ 3 g の塩化ナトリウムを入れた 20 mL の SPME 用ガラスバイアルに 8 mL のビールを加え、続いて内部標準として 10 mg/L の benzyl acetate 40 μL を添加した。バイアルを密封し、Combi-PAL オートサンプラー (CTC Analytics 社製) で 40°C、15 分間攪拌した。SPME ファイバーをバイアルのヘッドスペースに挿入し、揮発性成分を吸着させるため 15 分間保持した。吸着後、SPME ファイバーをすぐに GC の注入口に挿入し、3 分間加熱脱着した。GC-MS 条件は以下の通り。

装置 : 6890N GC-5973 MS (Agilent Technologies 社製)

カラム : DB-WAX 30 m $\times$ 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm

(Agilent Technologies 社製)

キャリアガス : He 定流量モード 1.0 mL/min

注入口 : 温度 270°C、スプリットレス

昇温条件 : 40°C (3 min) $\rightarrow$ 5°C/min $\rightarrow$ 250°C (5 min)

MS : EI、イオン化電圧 70 eV、イオン源温度 230°C、四重極温度 150°C

SIM モード 定量イオンと定性イオンは Table 3-1 参照

検量線は、各化合物をあらかじめ添加したビールを分析して作成した。検量線の濃度範囲は、サンプルビールの各化合物の濃度にあわせた範囲とした。定量イオン、定性イオン、検量線の範囲及び標準試薬の異性体の比率は、Table 3-1 に示した。各検量線の相関係数 R^2 値はすべて 0.99 以上であった。すべての定量分析は $n=2$ で実施した。

3-2-2-5. アディクション試験による官能検査

3-2-2-5-1. モデルビールの調製

第2章で試醸したビール 2-C (dry-hopping にて香り付けした Sorachi Ace ビール) の候補成分の定量値をもとに、アディクション試験サンプルについて、それぞれ添加する成分量を決定し、モデルビールを調製した。ターゲット成分の分析値の 500 倍濃い濃度のエタノール試薬混合溶液をそれぞれ調製して用いた。異性体の混合ミックス試薬については、トランス体の濃度に合わせて調製を行った。また前章 Table 2-4 で tr (ピークは認められるが定量下限未満) である neral と、本章の定量で nd (not detected : 不検出) となった炭化水素類についても、当該成分のピークは認められたため、検量線の傾きとピーク面積から濃度を算出したものを概算濃度として算出し、添加量とした。試醸ビール 2-C の定量値及び官能検査試料の詳細は Table 3-2 に示した。

市販のピルスナータイプビール中壺 (500 mL) に各ターゲット成分の混合溶液 (エタノール溶液) を 1 mL 添加した。このとき、ベース液としたビールに含まれるターゲット成分の濃度は計算に含めず、dry-hopping した Sorachi Ace ビール 2-C の算出濃度を添加した。コントロールビールは市販ピルスナータイプビールに 1 mL のエタノールを添加してエタノールの濃度を合わせた。添加後、各モデルビール及びコントロールビールは打栓して 10 回程度転倒混和し、4°Cで一晩放置したものを翌日の官能検査に使用した。

3-2-2-5-2. プロファイル官能検査

官能検査試験はサッポロビール (株) 価値創造フロンティア研究所及び商品・技術イノベーション部のよく訓練された官能検査パネル 8 名で実施した。4°Cで保存しておいた各サンプルは評価直前に、開口ガラス容器 (総容量=150 mL) に 70 mL を注いで提供した。評価は、各サンプルの 6 つの官能特性 (フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーン、ウッディ) について、0 (香りが無い) から 3 (強い香り) で、0.5 間隔で点数付けした。各特性の平均値を計算し、Microsoft Excel 2013 で対応のある t 検定を行った。

3-3. 結果

3-3-1. 試薬 geranic acid の香調

匂い紙に直接、試薬の geranic acid 原液をしみこませ、香りを確認したところ、パネルから、ウッディ、ハーバル (ハーブ様)、フローラル、オイリーというコメントが出た。しかし、その香りの強度は、一般的に知られている品種特有香に寄与すると言われている香気成分類と比較すると、非常に弱かった。例えば揮発性チオール類は、含硫化合物であり、数 ng/L でも香りを認識できるものもある。それと比較すると、原液の状態ですら香りはわかりにくく、Sorachi Ace ビールにおいてよく表現されるコメントの中にもウッディ、ハーブ様の表現は含まれているものの、geranic acid が成分単独で直接ビールの香りに寄与している可能性は低いと考えられた。

3-3-2. geranic acid の閾値推定

本試験で用いた標準試薬の geranic acid (neric acid を含む) の閾値は、15 人のよく訓練されたパネルによる官能検査の結果から、炭酸水中で 2.2 mg/L と推定された。また市販のピルスナータイプビールの場合では 5.7 mg/L となり、さらに閾値濃度は高く、ビール中ではより識別しにくくなると考えられた。

3-3-3. アディクション試験によるプロファイル官能検査

3-3-3-1. 候補成分を添加したモデルビールについて

Sorachi Ace ホップは dry-hopping で香り付けされるクラフトビールによく使用されているため、Sorachi Ace の品種特有の香りを再現するためのターゲットとして、dry-hopping で香り付けした Sorachi Ace ビール (ビール 2-C) を選択した。ビール 2-C を再現するために、Table 3-2 に示す geraniol 類縁体だけでなく、炭化水素系テルペン類もターゲット成分として加えた。炭化水素系テルペン類である myrcene、 α -terpinene、 γ -terpinene、(+)-limonene、terpinolene 等は、樹脂臭やウッディな香りを持つ香気成分であり、dry-hopping によってビールに豊富に含まれる可能性がある。そしてこれらの成分は geraniol 類縁体と構造が似ていることから、第2章で考察したような構造類似成分による香気相互作用がありうると仮定し、Sorachi Ace ビールの特徴香に寄与する可能性のあるホップ由来香気成分として選択した。ビール 2-C 中の候補成分の中には濃度が微量で、各成分の閾値よりも低い濃度のものもあった。しかしながらこれらの香気成分間の相互作用を検証するため、閾値未満の香気成分も候補成分に加え、一部の成分で定量下限未満の成分については、SPME-GC-MS 法で作成した検量線を用いて暫定的に濃度を算出し、候補の香気成分をベース液のビールに添加してモデルビールとした (添加した化合物のうち、neral、neric acid、methyl nerolate については、市販のそれぞれ異性体を含む標準試薬である citral、geranic acid、methyl geranate を使用したため、

ビール 2-C で定量された濃度に合っていない点は注記しておく)。以下の官能検査に必要な候補成分をベース液のビールに添加して調製したモデルビール類の組成を Table 3-2 に示した。

3-3-3-2. アディクション試験

8 人のよく訓練されたパネルは、モデルビールの 6 つの官能特性（フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーン、ウッディ）について 0～3 点の 0.5 点間隔で点数をつけて評価した。官能特性の平均スコアのレーダーチャートを Figure 3-2 に示すとともに、モデルビール 3-B と 3-C について、対応のある t 検定による p 値と有意差を Table 3-3 に示した。まずコントロールビールは、6 つの官能特性すべてが非常に低かった。geranic acid と neric acid のみを添加したモデルビール 3-A では、フラワリー、フルーティ、グリーンの平均スコアがわずかに上昇したが、すべてのスコアは低いレベルであった。ホップ由来のテルペン類を含むモデルビール 3-B（カルボン酸以外の候補成分）では、フラワリー、フルーティ、レモン様、グリーン、ウッディのスコアが明らかに高くなった。そしてすべての候補成分を添加したモデルビール 3-C では、フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーンの官能特性がモデルビール 3-B よりもさらに高いスコアとなった。特に、フラワリーとレモン様のスコアは、モデルビール 3-B と比較して危険率 5 %で有意に高くなった (Table 3-3)。以上の結果より、geranic acid は、ホップ由来香気成分のテルペン類の香りをエンハンスしたり、ビールの香気特性を変化させる可能性があることが示唆された。さらに、モデルビール 3-C すなわち geranic acid 類を含む全 16 成分を添加したビールのレーダーチャートは、ターゲットとしたビール 2-C すなわち dry-hopping した Sorachi Ace ビールのレーダーチャートと似ており、これは、geranic acid を含む候補成分のすべてを添加することで Sorachi Ace ビールの香りを再現できていることを示している。

3-4. 考察

3-4-1. geranic acid の香気成分としての特性

第2章で SPME-GC-MS 法で得られたクロマトグラムの差分解析で geranic acid を見出しものの、GC-O/MS による匂いかぎで geranic acid の検出箇所の香りを嗅いでも、明確に匂いを感じることができなかったため、試薬の geranic acid の香りを確認することとした。試薬原液を匂い紙に付着させ、香りを確認したところ、フローラル、ハーバル、ウッディ、オイリーな香調であることがわかったが、香気の強度は極めて弱かった。これまでフレーバーホップの品種特有香に寄与する成分として知られているテルペンアルコール類やチオール類は香気強度が極めて強く、特にチオール類は含硫化合物であるため、その閾値は数 ng/L レベルである。一方で、geranic acid そのものの香調は Sorachi Ace ホップビールに表現される香りと近いニュアンスもあった。そこで geranic acid の閾値を調査することとした。

閾値の推定は炭酸水とビールベースで実施した。ビール中の推定閾値は 5.7 mg/L となり、第2章で調査した Sorachi Ace の late-hopping ビールで 133 µg/L、dry-hopping ビールで 178 µg/L であったことから、各ビールの閾値に対する含量、すなわち OAV (odor activity value) はそれぞれ 0.02、0.03 となった。一般的に OAV が 1 を超えると全体の香味に影響すると言われ、香気研究分野では重要な指標となるが、Sorachi Ace ビール中の geranic acid 含量は閾値と比較しても非常に低濃度であった。しかしながら第2章で実施したトライアングル試験による官能検査では、閾値以下である 399 µg/L の geranic acid を添加した場合でも linalool と geraniol の存在下では違いを有意に認識したことから、閾値以下の濃度であっても、geranic acid が他の成分に対するエンハンス効果を持っている可能性が考えられた。

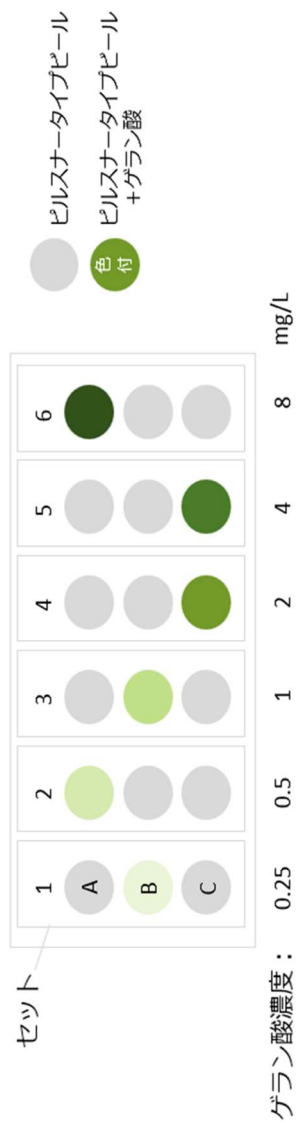
3-4-2. geranic acid とホップ由来テルペン類の相乗効果と Sorachi Ace ビールにおけるホップ品種特有香の形成メカニズム

本試験に用いたアディクション試験は感性科学手法のひとつで、ターゲットとした香気成分の全体の香りへの寄与を調査する手法である。ベース液に候補成分を順次添加していき、それぞれの香りの変化を確認することで、各成分の相互作用による香りの寄与を調査する方法である（なお、香りに寄与していると思われる複数成分を定量し、添加することで再現度を評価する試験を特にリコンビネーション試験と呼ぶ）。本研究ではターゲットとしたビール 2-C 中の 16 成分の候補成分が、Sorachi Ace ビールの香りに寄与していると仮定し、定量値を元にピルスナータイプビールに添加し、6つの官能特性（フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーン、ウッディ）について評価した。geranic acid のみを添加したビール 3-A では、チャートは広がらず、ピルスナータイプビールのようなホップの香りがほとんどしない（ホップ由来の香気成分の含量が低い）ビールにおいては geranic acid の影響は小さいことが推察された。次に、geranic acid 類以外の 14 成分を添加したモデルビール 3-B のチャー

トは、コントロールビールと比較すると平均スコアは高くなった。これは過去の研究におけるテルペンアルコール類の相互作用に近い結果であった。最後に、geranic acid 類を含む全 16 成分を添加したモデルビール 3-C を評価した結果、3-B と比較して、フラワリーとレモン様の官能特性のスコアが有意に高くなり、そのチャートはターゲットとしたビール 2-C のチャートに近づいた。この結果は、選抜した 16 成分すべてが Sorachi Ace ビールの香りに寄与しており、特に geranic acid は Sorachi Ace ビールの品種特有香に非常に重要な役割をもつ化合物であることを示唆するものである。

本章の試験を通じて、新たに geranic acid の香気成分としての特性が明らかとなった。geranic acid は自身の香りの強度は弱く、また Sorachi Ace ビール中の geranic acid 濃度は推定閾値より低い濃度であったが、閾値未満の濃度であってもホップ由来香気成分のテルペン類に対してエンハンサーとして働く可能性が高く、geranic acid は非常にユニークな特性を示すことが結論付けられた。

＜方法：極限法（添加物質の閾値の測定法の一つ）＞
 ピルスナータイプビール中のゲラン酸の閾値を調査した（パネル 15名、3点識別）



連続して正解できた濃度と不正解となった濃度との間に閾値があるという判断となる

①各パネルの間違った最高濃度とその次に高い（正解した）濃度の相乗平均を計算
 →最良推定閾値（Best Estimate Threshold、BET）とする

②個々人のBETのLog₁₀（BET）の合計値からグループの閾値を算出し、これをゲラン酸の閾値とする

Figure 3-1. 極限法による geranic acid 閾値推定

Table 3-1. 香気成分定量のための GC-MS パラメーター

group	compound	quantifier ion (<i>m/z</i>)	qualifier ion (<i>m/z</i>)	column	linear range ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
alcohols	α -terpineol	136	121	DB-WAX	1-100	0.3	1
	β -citronellol	138	109	DB-WAX	1-100	0.3	1
hydrocarbons	α -terpinene	136	121	DB-WAX	1-5	0.1	0.3
	γ -terpinene	136	121	DB-WAX	1-5	0.1	0.3
	(+)-limonene	136	121	DB-WAX	1-5	0.1	0.3
	terpinolene	136	121	DB-WAX	1-5	0.1	0.3
	myrcene	93	69	DB-WAX	1-100	0.3	1
-	benzyl acetate (ISTD)	108	91	-	-	-	-

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation

Table 3-2.官能検査サンプル詳細

		concentrations of spiked compounds				
	isomer ratio ^a (%)	control beer	target beer 2-C	model beer 3-A	model beer 3-B	model beer 3-C
			dry-hopping Sorachi Ace	only carboxylic acids	terpenoids except for carboxylic acids	all compounds (carboxylic acids + terpenoids)
alcohols	linalool (μg/L)	-	97	-	97	97
	α-terpineol (μg/L)	-	20	-	20	20
	β-citronellol (μg/L)	-	13	-	13	13
	geraniol (μg/L)	-	98	-	98	98
	nerol (μg/L)	-	9.6	-	9.6	9.6
aldehydes	geranial (μg/L)	53	2.7	-	2.7 ^c	2.7 ^c
	neral (μg/L)	27	tr (0.46) ^b	-	1.4 ^c	1.4 ^c
carboxylic acids	geranic acid (μg/L)	70	178	178 ^c	-	178 ^c
	neric acid (μg/L)	20	nd	51 ^c	-	51 ^c
esters	methyl geranate (μg/L)	71.5	1.2	-	1.2 ^c	1.2 ^c
	methyl nerolate (μg/L)	28.5	nd (0.01) ^b	-	0.5 ^c	0.5 ^c
hydrocarbons	α-terpinene (μg/L)	-	tr (0.20) ^b	-	0.2	0.2
	γ-terpinene (μg/L)	-	nd (0.03) ^b	-	0.03	0.03
	(+)-limonene (μg/L)	-	tr (0.26) ^b	-	0.26	0.26
	terpinolene (μg/L)	-	nd (0.06) ^b	-	0.06	0.06
	myrcene (μg/L)	-	10	-	10	10
tr, trace; nd, not detected						
^a isomer ratio in standard substances (geranial, geranic acid, and methyl geranate), omitting degradation products and/or contaminants.						
^b concentrations of 'tr' compounds were calculated according to the calibration curves in SPME-GC-MS for profile sensory test.						
^c concentrations of spiked standard substances (geranial, geranic acid, and methyl geranate) were adjusted according to the concentrations of major isomers.						

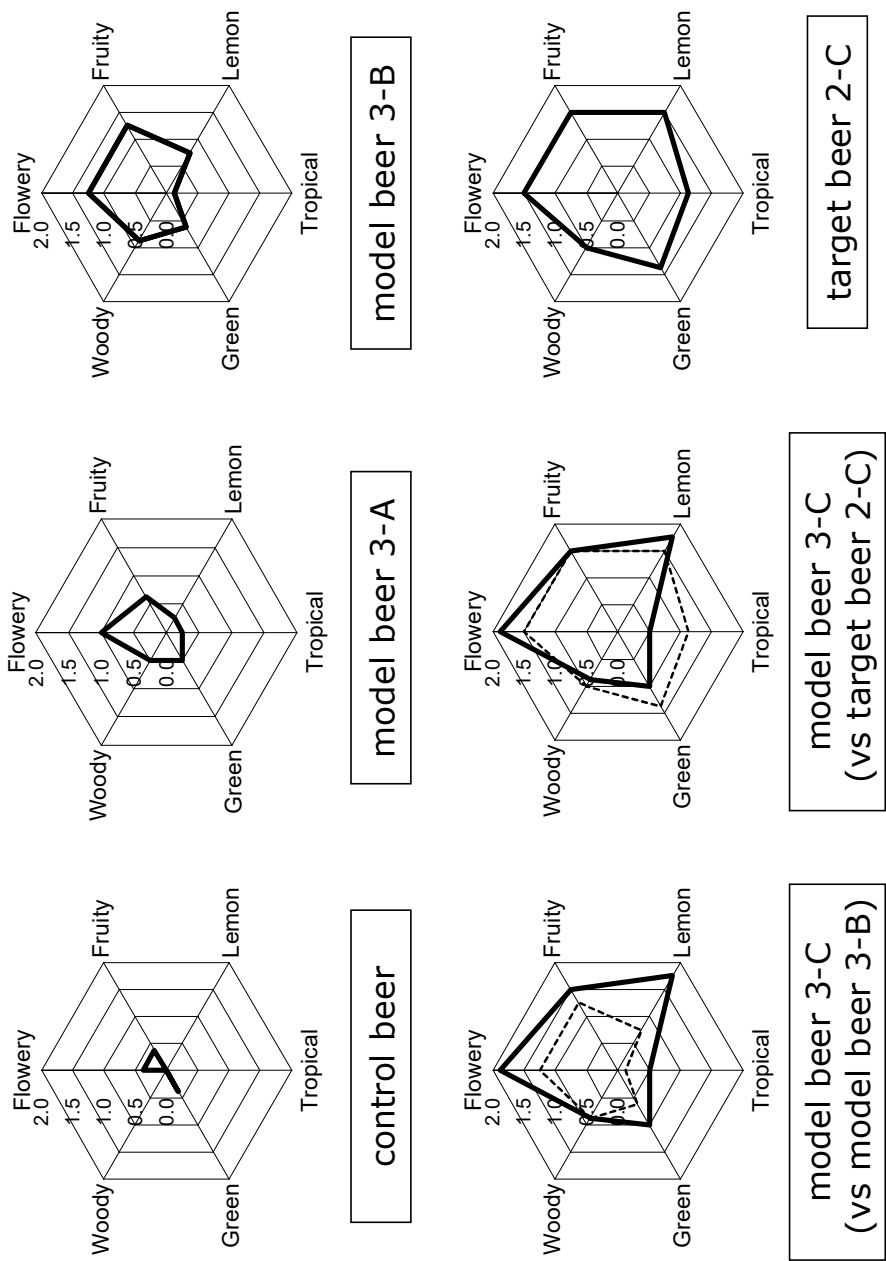


Figure 3-2.官能検査リーダーチャート

Table 3-3. 官能検査の評点と有意水準

	intensity ^a					p ^b
	control beer	target beer 2-C	model beer 3-A	model beer 3-B	model beer 3-C	model beer 3-B : 3-C
flowery	0.38	1.50	1.00	1.25	1.88	0.049 *
fruity	0.38	1.50	0.63	1.25	1.50	0.351
lemon	0.00	1.50	0.25	0.75	1.75	0.018 *
tropical	0.00	1.13	0.25	0.13	0.50	0.080
green	0.38	1.38	0.50	0.63	1.00	0.080
woody	0.00	1.00	0.50	0.88	0.88	1.000

^a mean intensity value of the scores from eight well-trained panels

^b paired t -test comparing model beer T and T+GA.

*, significant difference with a risk of 5 %

第4章 ホップ品種及び試醸ビール中の geranic acid 及び関連成分含量の比較

4-1. 序論

第2章では Sorachi Ace を用いたビール中より品種特異的と思われる成分として geranic acid を同定し、対照として用いた HTR のビール中からは geranic acid は検出されなかった。geranic acid は匂いかぎ分析では香りを認識できなかったが、ビールの香気への影響の有無を確認するべく官能検査試験（トライアングル試験）を行った結果、geranic acid の成分単独では香気への影響は小さかったものの、linalool と geraniol の共存下でこれら2成分の香気をエンハンスする効果をもつ可能性があった。そこで、第3章では geranic acid の香気成分としての特性の調査と感性科学手法によるホップ由来香気成分との相互作用の確認を行った。その結果、geranic acid は香気成分としては非常に珍しい特性を持ち、geranic acid 自身はあまり匂いを持たないものの、閾値以下のレベルでホップ由来テルペン類のエンハンサーとして機能することが明らかとなった。

本章では、第2章で対照の HTR ビールからは検出が認められなかった geranic acid について、調査範囲を拡大し、17 品種のホップペレット中及びさまざまなホップ品種を用いて醸造した 13 種類のビール中の geranic acid の含量を調査した。geranic acid と構造の近い geraniol や geranial はホップ由来香気成分として知られており、特に geraniol はフレーバーホップによく含まれるとされる。また geranic acid のメチルエステル体である methyl geranate は、これまでにホップ精油由来の化合物として報告されている (47, 48, 53, 54)。Figure 4-1 にホップ球果中で起こっていると推察される geranic acid を中間生成物として含む生合成経路を示す。geranic acid は geraniol が geranial に酸化され、その後さらに酸化されることで生成する。そして最終的に geranic acid から methyl geranate にエステル化されると推察される。他の植物の例として、カヤツリグサ属の一種コゴメカヤツリ (*Cyperus iria*) では farnesol から methyl farnesoate への生合成経路があることが報告されており (55)、farnesol の構造は geraniol の構造と似ているため、farnesol だけでなく geraniol もこの反応経路によって変換される可能性がある。すなわち、ホップ中にも Figure 4-1 の生合成経路があると推察される。また geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate にはそれぞれ立体異性体の nerol、neral、neric acid、methyl nerolate が含まれていることから、この8成分を本章で着目する定量成分とした。さらに linalool はホップの香りの形成に重要であることが知られており (30-35)、第2章での Sorachi Ace ビール中でも linalool が比較的高濃度で検出されていることからターゲット成分として選択した。最終的に合計9成分を選定し、定量することとした。

4-2. 実験方法

4-2-1. 試料

4-2-1-1. ホップ

ホップ中の geranic acid 含量の測定に用いたホップは、米国産の Sorachi Ace、Cascade (2014 年 crop の T90 ペレット)、Citra、Mosaic (2015 年 crop の T90 ペレット)、Ekuanot (HBC366) (2012 年 crop のホップパウダー)、ドイツ産の Hallertau Blanc、Hallertauer Tradition (HTR)、Mandarina Bavaria 及び Polaris (2012 年 crop の T90 ペレット)、Comet (2015 年 crop の T90 ペレット)、チェコ産の Kazbek (2014 年 crop の T90 ペレット)、Saaz (2015 年 crop の T90 ペレット)、フランス産の Aramis、Barbe Rouge、Triskel (2013 年 crop の T90 ペレット)、ニュージーランドの Nelson Sauvin (2015 年 crop の T90 ペレット)、オーストラリア産の Galaxy (2013 年 crop の T90 ペレット) であった。すべてのホップサンプルの品種、タイプ、原産地、栽培地及び形状については Table 4-1 にまとめた。

試醸ビール及び市販ビールに用いられたホップは、米国産の Sorachi Ace、Cascade (2014 年 crop の T90 ペレット)、Citra、Mosaic (2015 年 crop の T90 ペレット)、Ekuanot (HBC366) (2012 年 crop のホップパウダー)、ドイツ産の Comet、Hallertau Blanc、Polaris (2014 年 crop の T90 ペレット)、Hallertauer Tradition (HTR) (2015 年 crop の T90 ペレット)、チェコ産の Saaz (2015 年 crop の T90 ペレット)、Kazbek (2014 年の T90 ペレット)、フランス産の Aramis、Barbe Rouge、Triskel (2013 年 crop の T90 ペレット)、ニュージーランド産の Nelson Sauvin (2015 年 crop の T90 ペレット) を用いた。すべてのホップサンプルの品種、タイプ、原産地、栽培地及び形状については Table 4-2 にまとめた。

4-2-1-2. ホップの熱水抽出

Table 4-1 のすべてのホップは、ホップの熱水抽出サンプルの調製のために使用された。各ホップペレットは乳鉢で粉碎し、抽出のためにクエン酸一水和物 (0.05 M) とクエン酸三ナトリウム (0.05 M) を用いてクエン酸バッファー (0.05 M、pH 5.5) を調製した。事前に 1 L メジウム瓶にクエン酸バッファーを 500 mL 入れ、ウォーターバスで 80°C となるように加温しておき、そこへ粉碎または粉末ホップサンプル 1 g を入れて 80°C で 30 分間、スターラーで攪拌しながら抽出を行った。得られた抽出液を流水で冷却し、ブフナーロートを用いてろ紙 (Advantech No.5B) で吸引ろ過した。ろ液をホップ熱水抽出サンプルとして、対象香気成分の定量に用いた。抽出は n=2 で実施し、分析に供するまで冷凍保管した。

4-2-1-3. 試験醸造ビール

本章で分析のために用いた試醸ビール 4B-A~J は、ビール仕様 (麦芽 100 %) で、サッポロビール (株) 商品・技術開発イノベーション部保有のパイロットブルワリーの常法に準じて

造った。煮沸時間は 90 分とし、初沸にて HTR を 0.2 g/L となるように添加した。(これは香り付けではなく、麦汁に苦味の付与及び抗菌作用を持たせるとともに、煮沸工程における突沸を防ぐ目的がある。) 香り付けのホップ添加方法は late-hopping で、煮沸終了 5 分前にビール 4B-A~D については各ホップ 2.0 g/L を、4B-E~J は各ホップ 0.5 g/L を添加した。各冷麦汁は発酵タンクに移し、 15.0×10^6 cells/mL の下面酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) を添加し、10-12°C で主発酵を行った。その後、CO₂ 雰囲気下で別のタンクに移送した発酵液は 12°C で 6 日間保持し、0°C で 2~3 週間熟成させた。熟成後の液はパイロット設備で抗酸化条件にてろ過から瓶詰めまでを実施し、試醸ビールとした。これらビールの香り付けの条件は Table 4-2 に示した。

4-2-1-4. 市販ビール

市販規模の late-hopping ビール (ビール 4B-K、L、M) を分析のために用いた。ビール 4B-K は Mosaic、ビール 4B-L は Citra と Polaris、ビール 4B-M は Nelson Sauvin と Hallerau Blanc で香り付けした。これら市販ビールの香り付け条件は Table 4-2 に示した。

4-2-1-5. 試薬

標準試薬：香気成分の同定及び定量には、市販の標準試薬を標準試薬として用いた。geranic acid (>85 %, mixture of isomers) は Merck 社製 (Sigma-Aldrich) を、linalool (>96%)、geraniol (>97 %)、nerol (>98 %)、citral (>98 %, mixture of isomers)、benzyl acetate (>99 %) は東京化成工業社製を用いた。methyl geranate (>94 %, mixture of isomers) は、Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) から購入した。

その他化学物質：クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム、エタノール (99.5)、塩化ナトリウム及びリン酸は、富士フイルム和光純薬 (大阪、日本) から購入した。試薬はすべて試薬特級グレードを用いた。

4-2-2. 方法

4-2-2-1. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び異性体比率決定

試薬の純度及び異性体比率を算出するため、第 2 章 2-2-2-4 と同様の条件で、GC-FID による分析を実施した。分析で得られたクロマトグラムで、溶媒ピークを除いて検出された全ピーク面積を 100 とし、当該成分の面積を純度として求めた。異性体の比率についても同様に、検出された検出された両異性体のピーク面積合計を 100 とし、それぞれの異性体の面積の割合を異性体比率として、それに試薬としての純度も掛け合わせて算出した。異性体成分の同定と溶出時間については、NIST Library に掲載されている RI と AromaOffice データベース (西川計測社製) の化合物情報を参考に、標準試薬の GC-MS 分析してフラグメントや

溶出時間を確認し、定量に用いた。

4-2-2-2. geranic acid 及び関連成分の定量

4-2-2-2-1. ホップ中の香気成分の定量

ホップに含まれる geranic acid 及び関連成分の含量を定量するため、第 4 章 4-2-1-4 に記載の通り、クエン酸バッファーにホップが 2 g/L となるように添加して抽出を行い、熱水抽出サンプルを調製した。本条件の場合、第 2 章の Sorachi Ace 試醸ビールのホップ添加量と同じであり、この抽出サンプルは単純計算でビール中の定量時の検量線と同じ範囲で定量できると考えた。ホップ熱水抽出サンプル中の各香気成分の定量も、ビールの定量と同じ方法を採用し、第 2 章 2-2-2-5 の方法に従い、SPME-GC-MS で分析を行った。ただし、SPME バイアル調製時には、8mL の抽出液サンプルに対して、エタノールを 400 μ L 添加して分析に供した。検量線は、ホップ品種の熱水抽出サンプルを等量ずつ混合した溶液に標準試薬を添加して作成し、マトリックスマッチングによる定量を行った。

得られた濃度について、ホップの添加量をもとに換算し、ホップ中の香気成分含量として算出した。

4-2-2-2-2. ビールサンプル中の香気成分の定量

ビール中の geranic acid 及び関連成分の定量は、第 2 章 2-2-2-5 の方法に従い、SPME-GC-MS で分析を行った。検量線はビール 4B-B に標準試薬を添加して作成し、マトリックスマッチングによる定量を行った。

4-3. 結果

4-3-1. ホップ中の対象香気成分の品種間比較

さまざまなホップ中の geranic acid 及び関連成分の組成を調べるために、17 種類のホップから調製したホップ熱水抽出サンプル中の濃度を測定した。ホップの定量における検出限界 (LOD) と定量下限 (LOQ) は、それぞれカルボン酸類では 5 mg/kg と 12.5 mg/kg、テルペンアルコール類とテルペンアルデヒド類では 0.15 mg/kg と 0.5 mg/kg、エステル類では 0.05 mg/kg と 0.15 mg/kg とした。ホップ抽出物中の各香気成分の濃度は、最終的に抽出前のホップ中の含量に換算し、Table 4-3 に示した。

linalool は多くのフレーバーホップにおいて、それ以外のテルペンアルコール類よりも高い濃度で含まれていた。geraniol も、Kazbek (4 E-B) で 134 mg/kg、Ekuanot (HBC366) (4E-O) で 136 mg/kg、Mosaic (4E-P) で 115 mg/kg となり、高濃度で検出された。Peacock らは、Cascade には大量の linalool、geraniol および geranyl acetate が含まれていると報告しており (52)、蛸井らは linalool と geraniol が、Cascade、Citra、Mosaic 等で高濃度に検出されたことを報告した (31-35)。全体として、Table 4-3 の結果は以前の研究の結果と一致していた。(31-35, 52, 69-71)

17 のホップ品種の中で、Sorachi Ace (4E-Q) は geranic acid の濃度が 81 mg/kg であり、最も高いことが分かった。ほかに定量可能な濃度で検出されたホップは Citra (4E-N) と Ekuanot (HBC366) (4E-O) で、それぞれ 21 mg/kg と 20 mg/kg だった。geranic acid はこの 3 品種のホップ以外では検出されなかった。推察したホップ中の生合成経路における geranic acid の下流にある methyl geranate は、Sorachi Ace (4E-Q) で他のフレーバーホップと比較して低かった (2.7 mg/kg)。ただし、いくつかのホップサンプルでは methyl geranate 濃度が Sorachi Ace ホップ (4E-Q) の濃度と同等かそれより低いものもあった (0.9~2.9 mg/kg)。一方で、geranic acid が検出されたのは上記の通り 3 品種のみで、含量の点では Sorachi Ace で特に顕著であった。以上の結果は、geranic acid が Sorachi Ace に特異性があることを裏付けている。

4-3-2. 各種ホップを用いて試醸したビール中の geranic acid 及び関連成分の定量

試醸ビール及び市販ビール計 13 種類についても、geranic acid 及び関連成分の定量を実施し、Table 4-4 にまとめた。Sorachi Ace を用いたビール (4B-A) はテルペンアルコール類が比較的高濃度で検出されたが、これらは Barbe Rouge (4B-F)、Mosaic (4B-K)、Citra (4B-L)、Cascade (4B-D) のビールにも、総濃度で Sorachi Ace より多く含まれていた。エステル類の methyl geranate は品種間差が大きく、4B-K の Mosaic では 51 µg/L 含まれていたのに対し、4B-A の Sorachi Ace では trace レベルの検出にとどまった。

ビール 13 種類中の geranic acid 含量を比較すると、Sorachi Ace を用いたビール 4B-A で

133 µg/L となり、他の品種と比べ、圧倒的に多く含まれていた。前項で測定したホップにおいては、Citra と Ekuanot からは、Sorachi Ace ほどではないが geranic acid が検出されたが、それらを用いたビールにおいては不検出であった。

4-4. 考察

第2章でHTRホップとSorachi Aceホップを用いてlate-hoppingしたビール中のgeranic acid濃度及びその関連成分を定量した。その結果、HTRビールからはgeranic acidは検出されず、Sorachi Aceビールからはgeranic acidの検出が認められた。その後、官能検査の結果により、geranic acidがSorachi Aceの品種特有香に寄与する成分とみなして研究を進めてきたが、HTR以外のホップやビールにgeranic acidが含まれるかどうかを確認する必要があると考えた。第3章で、Sorachi Aceホップビールの香りの形成に寄与するターゲット香気成分として、16成分を選択したが、本章では、geranic acidと構造が近く、ホップ球果中での変換反応の可能性が推察されるgeraniol、geranial、geranic acid、methyl geranateに着目した。他の植物で報告(55)のある生合成経路を参考に、ホップ球果中では、まずgeraniolが酸化されてgeranialになり、geranialが酸化されてgeranic acidになり、最後にgeranic acidがエステル化されてmethyl geranateになると仮定している(Figure 4-1)。これらのgeraniol関連成分には、それぞれnerol、neral、neric acid、methyl nerolateという立体異性体がある。さらにテルペンアルコールに関する以前の研究(31-35)では、すべてのホップにlinaloolが存在することが報告されている。以上のことからlinaloolも含めた合計9成分について定量し、確認することとした。

本章で17のホップペレット中及びさまざまなホップを用いて試醸したビール13種類中の香気成分について定量した結果、geranic acid以外の香気成分については、特にテルペンアルコールであるlinaloolとgeraniolについて品種間差が明確であった。linaloolは過去の報告の通り、さまざまなフレーバーホップを使用したビールで顕著に検出された。一方、geraniolは、linaloolよりも品種特異性が高いと考えられている。ヨーロッパのホップ品種であるHallertauer Tradition、Magnum、Saazにはgeraniolはごく微量しか含まれていないが、米国のホップ品種であるCascade、Citra、Mosaicにはgeraniolが多く含まれていることがよく知られている。本分析の結果はこの傾向と同じであった。またSorachi Aceホップ及びビールからのmethyl geranateの検出は、他の特徴的なフレーバーホップと比較して低い傾向にあった。

geranic acidは、Sorachi Aceビール中とSorachi Aceホップ中の両方で、他の品種と比較して圧倒的に高い濃度で含まれていた。そしてホップ中においては、CitraとEkuanotからはSorachi Aceほどではないがgeranic acidが検出された。しかしながら、それらを用いた製品ビールにおいては不検出であった。これはSorachi Aceのホップには相当量のgeranic acidが含まれるため、おそらく発酵液中にも残存し、製品ビールでも定量するのに十分な量が残っているのに対し、CitraやEkuanotのホップ中はその含量が少なく、ビール中では検出できなかった可能性が考えられる。

本章の調査により、geranic acidはSorachi Aceホップに特異的に多く含まれることが明ら

かとなり、さらにその化合物は製品ビールにまで残存することがわかった。そこで次章では、Sorachi Ace ビールを醸造するにあたり、Sorachi Ace ホップ中の geranic acid が、ホップを麦汁に添加する段階から製品ビールが出来上がるまでの間に、どのような挙動をするのかを調査し、更なる geranic acid の香気成分としての特性を探ることとした。

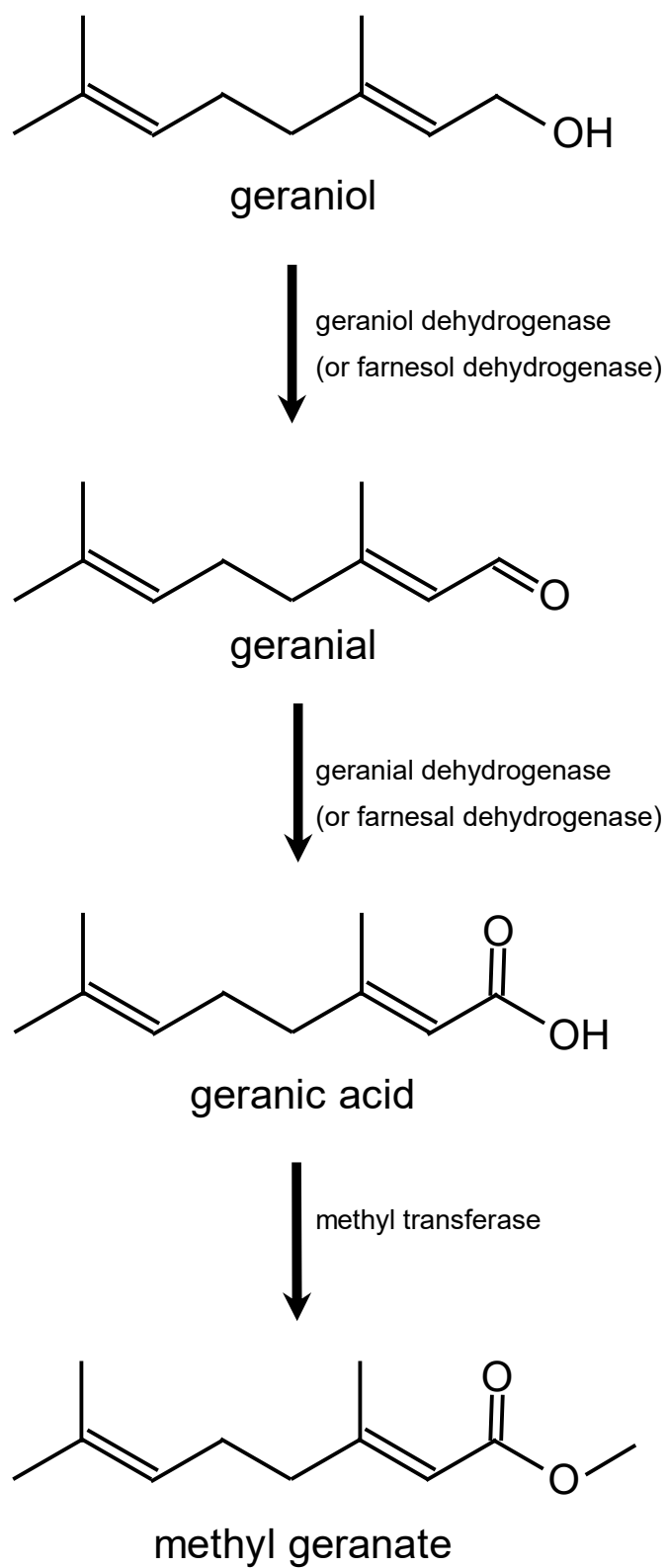


Figure 4-1. ホップ中の geranic acid 生合成経路 (推察)

Table 4-1. geranic acid 分析対象ホップ品種

beer	hop variety	type	origin	grown area	harvest year	form
4E-A	Galaxy	flavor hop	Australia	Australia	2013	T90
4E-B	Kazbek	flavor hop	Czech	Czech	2014	T90
4E-C	Saaz	aroma hop	Czech	Czech	2015	T90
4E-D	Aramis	flavor hop	France	France	2013	T90
4E-E	Barbe Rouge	flavor hop	France	France	2013	T90
4E-F	Triskel	flavor hop	France	France	2013	T90
4E-G	Comet	flavor hop	U.S.	Germany	2014	T90
4E-H	Hallertau Blanc	flavor hop	Germany	Germany	2012	T90
4E-I	HTR	aroma hop	Germany	Germany	2012	T90
4E-J	Mandarina Bavaria	flavor hop	Germany	Germany	2012	T90
4E-K	Polaris	flavor hop	Germany	Germany	2012	T90
4E-L	Nelson Sauvin	flavor hop	New Zealand	New Zealand	2015	T90
4E-M	Cascade	flavor hop	U.S.	U.S.	2014	T90
4E-N	Citra	flavor hop	U.S.	U.S.	2015	T90
4E-O	Ekuanot (HBC366)	flavor hop	U.S.	U.S.	2012	powder
4E-P	Mosaic	flavor hop	U.S.	U.S.	2015	T90
4E-Q	Sorachi Ace	flavor hop	Japan	U.S.	2014	T90

Table 4-2. 試醸ビールに用いたホップ品種と香り付け条件

flavoring hop									
beer	hop variety	hop type	origin	grown area	harvest year	form	hopping	hop dosage (g of hop/L)	Notes
4B-A	Sorachi Ace	flavor hop	Japan	U.S.	2014	T90	late	2.0	beer 2-A
4B-B	HTR	aroma hop	Germany	Germany	2015	T90	late	2.0	beer 2-B
4B-C	Saaz	aroma hop	Czech	Czech	2015	T90	late	2.0	
4B-D	Cascade	flavor hop	U.S.	U.S.	2014	T90	late	2.0	
4B-E	Aramis	flavor hop	France	France	2013	T90	late	0.8	
4B-F	Barbe Rouge	flavor hop	France	France	2013	T90	late	0.8	
4B-G	Comet	flavor hop	U.S.	Germany	2014	T90	late	0.8	
4B-H	Ekuanot (HBC366)	flavor hop	U.S.	U.S.	2012	powder	late	0.8	
4B-I	Kazbek	flavor hop	Czech	Czech	2014	T90	late	0.8	
4B-J	Triskel	flavor hop	France	France	2013	T90	late	0.8	
4B-K*	Mosaic	flavor hop	U.S.	U.S.	2015	T90	late	1.1	
4B-L*	Citra	flavor hop	U.S.	U.S.	2015	T90	late	0.8	
	Polaris	flavor hop	Germany	Germany	2014	T90	late	0.3	
4B-M*	Nelson Sauvin	flavor hop	New Zealand	New Zealand	2015	T90	late	1.1	
	Hallertau Blanc	flavor hop	Germany	Germany	2014	T90	late	0.1	

*Japanese commercial beer; HTR, Hallertauer Tradition

Table 4-3. ホップ中の geranic acid とその関連成分の定量値

No.	hop variety	type	alcohols			aldehydes		carboxylic acids		esters	
			linalool (mg/kg)	geraniol (mg/kg)	nerol (mg/kg)	geranial (mg/kg)	neral (mg/kg)	geranic acid (mg/kg)	neric acid (mg/kg)	methyl geranate (mg/kg)	methyl nerolate (mg/kg)
4E-A	Galaxy	flavor hop	178	45	2.7	7.9	3.0	tr	nd	5.7	nd
4E-B	Kazbek	flavor hop	159	134	3.0	21	4.6	nd	nd	4.1	0.35
4E-C	Saaz	aroma hop	26	5.7	1.0	0.88	tr	nd	nd	0.92	tr
4E-D	Aramis	flavor hop	67	7.9	1.1	2.4	0.86	nd	nd	2.3	0.25
4E-E	Barbe Rouge	flavor hop	181	20	3.1	4.8	1.8	nd	nd	4.8	1.8
4E-F	Triskel	flavor hop	95	12	1.6	2.1	0.86	nd	nd	2.7	0.24
4E-G	Comet	flavor hop	63	46	3.0	10	3.3	tr	nd	3.8	0.33
4E-H	Hallertau Blanc	flavor hop	39	42	1.7	2.6	0.55	nd	nd	1.5	tr
4E-I	HTR	aroma hop	109	4.1	1.5	1.0	tr	nd	nd	2.9	0.20
4E-J	Mandarina Bavaria	flavor hop	30	27	2.9	3.8	0.95	nd	nd	1.7	tr
4E-K	Polaris	flavor hop	58	46	3.1	6.8	1.9	tr	nd	6.8	0.43
4E-L	Nelson Sauvign	flavor hop	35	9.4	0.62	2.7	1.2	nd	nd	2.3	0.18
4E-M	Cascade	flavor hop	28	15	tr	7.3	1.7	nd	nd	1.5	nd
4E-N	Citra	flavor hop	180	92	4.7	4.7	0.97	21	nd	7.3	0.41
4E-O	Ekuanot (HBC366)	flavor hop	108	136	8.1	9.3	1.4	20	nd	3.6	0.20
4E-P	Mosaic	flavor hop	106	115	10	8.5	2.1	tr	nd	8.9	2.5
4E-Q	Sorachi Ace	flavor hop	77	27	2.9	3.0	0.63	81	nd	2.7	nd

HTR, Hallertauer Tradition; tr, trace; nd, not detected

Table 4-4. 試験ビール中の geranic acid とその関連成分の定量値

beer	flavoring hop	type	alcohols			aldehydes		carboxylic acids		esters		
			linalool (µg/L)	geraniol (µg/L)	nerol (µg/L)	geranial (µg/L)	neral (µg/L)	geranic acid (µg/L)	neric acid (µg/L)	methyl geranate (µg/L)	methyl nerolate (µg/L)	hopping
4B-A	Sorachi Ace	test brewed beer	70	16	4.1	tr	nd	133	nd	tr	nd	late
4B-B	HTR	test brewed beer	60	5.2	1.4	tr	nd	nd	nd	tr	nd	late
4B-C	Saaz	test brewed beer	16	5.5	1.2	tr	nd	nd	nd	tr	nd	late
4B-D	Cascade	test brewed beer	42	43	3.1	tr	nd	nd	nd	3.1	nd	late
4B-E	Aramis	test brewed beer	42	5.7	1.3	nd	nd	nd	nd	3.9	nd	late
4B-F	Barbe Rouge	test brewed beer	100	11	2.2	tr	nd	nd	nd	17	tr	late
4B-G	Comet	test brewed beer	32	17	1.4	tr	nd	nd	nd	2.4	nd	late
4B-H	Ekuanot (HBC366)	test brewed beer	25	15	2.6	tr	nd	nd	nd	7.7	nd	late
4B-I	Kazbek	test brewed beer	11	5.3	0.8	tr	nd	nd	nd	tr	nd	late
4B-J	Triskel	test brewed beer	52	7.7	1.9	tr	nd	nd	nd	10	nd	late
4B-K	Mosaic	commercial beer	74	21	4.8	2.8	nd	tr	nd	51	1.6	late
4B-L	Citra*	commercial beer	87	25	4.4	2.3	nd	nd	nd	32	tr	late
4B-M	Nelson Sauvvin*	commercial beer	43	9.1	1.7	1.2	nd	nd	nd	2.2	nd	late

*flavoring together with other hop (see Table 4-2); HTR, Hallertauer Tradition; tr, trace; nd, not detected

第5章 ビール醸造工程中の geranic acid 及び関連成分の挙動

5-1. 序論

第2章～第4章の研究を通じて、Sorachi Ace ホップの品種特有香に geranic acid が寄与していることが明らかとなり、geranic acid は Sorachi Ace ホップに極めて多く含まれていることや、醸造したビールにおいて geranic acid を定量可能な濃度で含むのは Sorachi Ace を使って醸造したビールのみであることがわかった。そこで、Sorachi Ace ホップ中に含まれる geranic acid は醸造工程中でどのような挙動を示すのかについて調査することとした。

大きく2つの試験を計画した。一つ目は、Sorachi Ace を含む代表的なホップ4品種を用いて late-hopping で香り付けしたビールの醸造の工程中で、それぞれサンプリングを行い、第4章で着目した geranic acid 及びその関連成分の含量を測定し（なお、参考までに、前章でも測定した linalool だけではなく、フレーバーホップの特徴に寄与すると報告されている他のテルペンアルコール類も合わせて測定した）、香気成分の挙動の違いを観察することを目的とした。二つ目に、Sorachi Ace で香り付けのタイミングを変えた場合に、その醸造工程中での geranic acid 及び関連成分がどのような挙動を示すのか、について調査をすることとした。ホップ添加のタイミングを変えた場合、麦汁煮沸の開始時点でホップを投入する kettle-hopping では一般的に煮沸によって香気成分が揮発することが想定され、late-hopping（煮沸終了時に添加）や dry-hopping（低温の発酵工程で添加）ではその揮発が抑えられ、よりホップ由来の香気成分が残存しやすい。そのような極端な添加条件の違いがアルコール、アルデヒド、カルボン酸、エステル、といった特性の異なる関連成分それぞれの挙動にどのように影響するか、確認するのが目的である。

5-2. 実験方法

5-2-1. 試料

5-2-1-1. ホップ

本章では米国産の Sorachi Ace、Cascade (2014 年 crop の T90 ペレット)、ドイツ産の HTR (2015 年 crop の T90 ペレット)、チェコ産の Saaz (2015 年 crop の T90 ペレット) を用いた。

5-2-1-2. 試験醸造ビール

5-2-1-2-1. ホップ違いの late-hopping で香り付けしたビールの醸造とサンプリング箇所

試験醸造ビール 5-A~D は、第 2 章 2-2-1-2 と同様の方法で製造した。初沸には HTR ホップを 0.2 g/L となるように添加した。late-hopping として香り付け目的で添加するホップは、煮沸終了 5 分前に各ホップ品種 (Sorachi Ace、HTR、Saaz、Cascade) いずれも 2.0 g/L を添加した。これらビールのホップ添加の条件は Table 5-1 に示した。本ビールの醸造工程中で、香気成分の分析のため、冷麦汁、発酵工程の 3 日目の発酵液、発酵終了時の発酵液、貯酒工程中 (貯酒 6 日目) の貯酒液及び製品ビールをサンプリングした。なお、本章のビール 5-A、5-B は第 2 章のビール 2-A、2-B とそれぞれ同じである。

5-2-1-2-2. 添加タイミング違いの Sorachi Ace ビールの醸造とサンプリング箇所

試験ビール 5-E~G についても、Sorachi Ace ホップを添加する条件を除いては第 2 章 2-2-1-2 と同様の方法で醸造した。ビール 5-E は初沸時に Sorachi Ace ホップ 1.59 g/L を添加した (kettle-hopping)。ビール 5-F は Sorachi Ace を初沸時に 0.09 g/L 添加し、煮沸工程の終了 5 分前にさらに 1.5 g/L 添加し、late-hopping の香り付けを行った。ビール 5-G においては、ビール 5-F と初沸時の添加は同じで、dry-hopping の香り付けのため、Sorachi Ace 1.5 g/L は酵母を添加する前の冷麦汁に添加した。これらビールの香り付けの条件は Table 5-1 に示した。本ビールの醸造工程中で、香気成分の分析のため、冷麦汁、発酵終了時の発酵液、製品ビールをサンプリングした。なお、本章のビール 5-G は第 2 章のビール 2-C と同じものである。

5-2-1-3. 試薬

標準試薬: geranic acid (>85 %, mixture of isomers)、は Merck 社製 (Sigma-Aldrich) を、linalool (>96%)、 α -terpineol (>95 %)、 β -citronellol (>95 %)、geraniol (>97 %)、nerol (>98 %)、citral (>98 %, r mixture of isomers)、benzyl acetate (>99 %) は東京化成工業社製を、methyl geranate (>94 %, mixture of isomers) は Thermo Fisher Scientific 社製を用いた。

その他試薬: エタノール (99.5)、塩化ナトリウム及びリン酸は富士フイルム和光純薬社製、

試薬特級グレードを用いた。

5-2-2. 方法

5-2-2-1. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び異性体比率決定と SPME-GC-MS による香気成分の定量

本章では、第 3 章で着目した 16 成分のうち炭化水素を除く 11 成分について、醸造工程中サンプルの定量を行った。定量に用いた標準試薬中の当該成分の純度及び異性体比率は第 3 章 3-2-2-3 の分析条件に従って決定した。5 %程度のアルコールを含むサンプル（発酵終了時サンプル、貯酒サンプル及び製品）の分析方法は第 3 章 3-2-2-4 と同様とした。アルコールを含まない冷麦汁と微量含む発酵 3 日目のサンプルの分析においては、第 4 章 4-2-2-2-1 と同様に、サンプル 8 mL に対してエタノールを 400 μ L 添加したサンプルについて定量を行った。ビール 5-A～D の定量については、ビール 5-B に標準試薬を添加して、またビール 5-E～G の定量については、ビール 5-E に標準試薬を添加して、それぞれ検量線を作成した。検出限界 LOD 及び定量下限 LOQ について、methyl geranate 及び methyl nerolate はそれぞれ 0.1 μ g/L 及び 0.3 μ g/L とし、それ以外の成分について第 2 章 Table 2-2 及び第 3 章 Table 3-1 と同じとした。

5-2-2-2. プロファイル官能検査

試験ビール 5-E～G については官能検査を実施した。各官能検査は、ビールの官能検査について訓練を受けた 8 人のパネルで実施した。試験醸造ビール 5-E から 5-G (Table 5-1) は 4°C で保管され、パネルに提示する直前に、蓋のないガラス容器(総容量=150 mL)に各サンプル 70 mL を注いで、評価を行った。フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーン、ウッディの 6 つの官能検査項目について、0(感じない)から 3(強く感じる)までの 0.5 間隔で評点をつけた。各評価項目の平均値を計算し、Microsoft Excel 2013 を用いて、対応のある t 検定を行った。

5-3. 結果

5-3-1. ホップの違いによる醸造工程中の geranic acid 及び関連成分の挙動

SPME-GC-MS を用いて、各ホップ (Sorachi Ace、HTR、Saaz、Cascade) で香り付けした試醸ビール (Table 5-1 ビール 5-A~D) の発酵工程中のホップ由来香氣成分の挙動を調査した。各発酵工程サンプルは、冷麦汁、発酵 3 日目、発酵終了時、貯酒 6 日目および製品ビールとした。

試験醸造したビールの発酵中の 11 種類の香氣成分の定量結果を Table 5-2 にまとめた。醸造工程中の最初の冷麦汁段階では、どのホップを使用したビールにおいても香氣成分は定量可能な濃度で存在していたが、発酵を経てほとんどの香氣成分は減少した (Table 5-2)。geranic acid は Sorachi Ace (ビール 5-A) でのみ有意に検出され、麦汁 (206 µg/L) から発酵 3 日目 (143 µg/L) でやや減少したものの、その後は製品ビール (133 µg/L) まで全工程で濃度はほとんど変動しなかった。

発酵工程中の 4 つの geraniol 類縁体 (geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate) の挙動を Figure 5-1 に示す。geranial はすべての麦汁サンプルにおいて低濃度であり、その後定量できないレベルまで減少した。methyl geranate も、Cascade 以外のホップを使ったビールの冷麦汁サンプルでは濃度が非常に低かったが、発酵を経て定量下限未満まで減少した。Cascade (ビール 5-D) では、methyl geranate は麦汁中で 17 µg/L で、4 品種の中で最も高濃度で存在しており、徐々に減少し、製品ビールでは 3.1 µg/L であった。HTR と Saaz を使用した試醸ビール (ビール 5-B と 5-C) では、全発酵工程中で geraniol の濃度は低かった。Sorachi Ace (ビール 5-A) と Cascade (ビール 5-D) の麦汁中の geraniol 濃度は、それぞれ 63 µg/L と 233 µg/L であったが、発酵 3 日間で急速に減少し、最終的に製品ビール 5-A と 5-D ではそれぞれ 16 µg/L と 43 µg/L まで減少した。geraniol のこの挙動は、以前にも報告 (29-31、34) されているように、酵母の増殖期に細胞膜のためのエルゴステロール生合成経路に取り込まれることによるものと推察された。

5-3-2. ホップ添加タイミングの違いによる醸造工程中の geranic acid 及び関連成分の挙動

麦汁の煮沸工程を含む醸造工程における geranic acid とその関連成分の挙動を調査した。試醸ビールは、Sorachi Ace を使用し、ホップ添加タイミングを変えて醸造した (Table 5-1)。第 1 章 1-3 でビール醸造工程を示した (Figure 1-3) が、ホップ添加のタイミングは kettle-hopping (ビール 5-E) と、late-hopping (ビール 5-F) と、dry-hopping (ビール 5-G) とした。冷麦汁、発酵終了時、製品ビールの各段階で得られたサンプルのホップ香氣成分 11 種類を定量した (Table 5-3)。kettle-hopping のビール 5-E では、ほとんどのホップ由来香氣成分は麦汁の煮沸によって揮散し、低濃度であった。一方 late-hopping ビール 5-F と dry-hopping ビール 5-G では冷麦汁からビールまである一定量のホップ由来香氣成分は残存していた。

試験ビール (Table 5-1 ビール 5-E, F, G) の 4 つの geraniol 誘導体 (geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate) の醸造工程中の挙動を折れ線グラフでプロットした (Figure 5-2)。ビール 5-E (kettle-hopping) の冷麦汁中の geraniol、geranial、methyl geranate 濃度は、麦汁煮沸中の揮発により、他の試験ビールよりも低かった。ビール 5-F (late-hopping) では、これらの香気成分は高い濃度で冷麦汁に移行していた。ビール 5-G (dry-hopping) においては、冷麦汁サンプリング段階でホップを添加していないため、Figure 5-2 には数値をプロットしていない。そしてこれらの成分は、発酵段階でのホップ添加のため麦汁煮沸による揮発の影響がなく、発酵終了時以降において、ビール 5-E やビール 5-F よりも高い濃度で含まれていた。ビール 5-F 及び 5-G において、geraniol、 α -terpineol、 β -citronellol は発酵終了時と製品ビールでほとんど濃度は変わらないか、むしろ少し増加したが、同じテルペンアルコール linalool は発酵終了時から製品ビールへの工程で減少していた。

Sorachi Ace ホップ特有の香気成分である geranic acid は、late-hopping の製品ビール 5-F で 184 $\mu\text{g/L}$ 、dry-hopping の製品ビール 5-G で 178 $\mu\text{g/L}$ 含まれていた。また、驚くべきことに、kettle-hopping の製品ビール 5-E においても、kettle-hopping による長い煮沸時間があったにもかかわらず、159 $\mu\text{g/L}$ 含まれていた。工程を遡った冷麦汁においても、5-E の geranic acid は 214 $\mu\text{g/L}$ 存在し、late-hopping の 5-F の冷麦汁 252 $\mu\text{g/L}$ よりやや少ない程度であった。工程挙動の特徴として 5-E と 5-F では冷麦汁から発酵終了までの間にある程度の減少が見られたものの、発酵終了から製品ビールまでは、dry-hopping の 5-G も含め、添加タイミングにかかわらず、比較的高い濃度の状態を維持していた。

5-3-3. ホップ添加タイミングの異なるビールのプロファイル官能検査

Sorachi Ace ホップを使用し、ホップの添加タイミングを変えた 3 種類のビール (ビール 5-E~G) の官能検査を実施した。その結果はレーダーチャート (Figure 5-3) で示し、そのデータは対応のある t 検定を使用して分析した (Table 5-4)。late-hopping ビール 5-F および dry-hopping ビール 5-G のフラワリー、フルーティ、トロピカル、レモン様の官能特性の平均点は、kettle-hopping ビール 5-E の平均点よりも有意に高かった ($p<0.05$)。一方、ウッディおよびグリーンの評価項目の平均点は、ほぼすべてのビールで同じ程度であった。

5-4. 考察

5-4-1. ホップ違いによる試醸ビール醸造工程中の geranic acid とその関連成分の挙動

本章では、発酵工程中の 4 つの geraniol 類縁体 (geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate) の挙動を比較すること目的とし、Sorachi Ace、HTR、Saaz、Cascade の 4 品種のホップを用いて late-hopping による香り付けでビールを試醸醸造した。各工程サンプルにおける 4 成分の挙動はそれぞれ異なっていた。geraniol は Cascade と Sorachi Ace を用いた冷麦汁中で、それぞれ 233 $\mu\text{g/L}$ 、63 $\mu\text{g/L}$ であり高濃度で含まれていたものの、発酵 3 日間で減少した。一方 HTR と Saaz は冷麦汁の段階でも低濃度であった。geraniol はバラのような香りを与える香気成分で、特にフレーバーホップで香り付けしたビールにおいては、linalool や β -citronellol と相互作用して複雑な花様の香りや特徴的な柑橘系の香りの形成に大きく寄与するため、フレーバーホップを使用したビールにとって特に重要とされる (30, 31)。ヨーロッパの伝統的なホップ品種では geraniol の濃度が低いことはよく知られており (32, 35)、本研究結果と一致した。methyl geranate は Sorachi Ace ホップの冷麦汁濃度が 4 品種の中で最も低かった (1.5 $\mu\text{g/L}$)。第 4 章のホップ中の定量結果と完全には合致しなかったが、これは抽出条件による違いと、methyl geranate がエステルで疎水性が高く、水溶液中に溶けにくいことによるばらつきの可能性が考えられた。

Sorachi Ace を除く麦汁サンプルでは geranic acid は検出されなかった。Sorachi Ace を用いて late-hoppign した麦汁では geranic acid が高濃度 (206 $\mu\text{g/L}$) で存在していたが、発酵の最初の 3 日間で減少した (143 $\mu\text{g/L}$)。しかし、その後の発酵と貯酒の工程で geranic acid わずかに減少するにとどまった (製品ビールでは 133 $\mu\text{g/L}$)。上述の通り、geraniol は発酵の最初の 3 日間で急激に減少するが、この現象は以前にも報告されており (30-32, 35, 72, 73)、これは、酵母の成長中にエルゴステロールの生合成が必要であり、geraniol が利用されているためと考えられる (74)。すなわち、geraniol は、エルゴステロール生合成経路でゲラニルピロリン酸として利用されると考えられる。一次発酵の初期段階で geranic acid の含量が減少する理由はまだはっきりとはわかっていない。しかしながら、geranic acid の構造は geraniol に似ていることから、エルゴステロール生合成経路で使用されている可能性がある。

第 4 章でホップ中の geranic acid 含量を調査した結果、Citra や Ekuanot からは低濃度の geranic acid の検出は認められたものの、これらのホップを用いたとしても麦汁へ移行する geranic acid 量に限りがあり、麦汁の煮沸や発酵の過程で揮発する等の要因で失われるため、geranic acid は製品ビールに残らない、もしくは残っているとしても定量できないレベルになっていると考えられた。

5-4-2. ホップ添加タイミングの違いによる試醸ビール醸造工程中の geranic acid とその関連成分の挙動

Sorachi Ace ホップを用いて、香り付けホップの添加タイミングを変えた場合の発酵工程中のサンプルについて、4 つの geraniol 類縁体 (geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate) の挙動を比較した。第 1 章 1-5 で述べたが、ホップ添加のタイミングを変えることで、ビールに付与されるホップ由来の香りの強度は変わる。kettle-hopping の場合、ホップ由来香気成分は、麦汁の煮沸工程で系外へ揮散し、冷麦汁にまで移行する香気成分含量は減少する。一方 late-hopping や dry-hopping の場合は、kettle-hopping 時と比較すると冷麦汁からビールまでである一定量のホップ由来香気成分は残存する。

本研究の試醸ビール (Table 5-1 ビール 5-E, F, G) 中の香気成分の挙動を調査したところ、geranic acid 以外の 3 成分は想定通りの挙動となった。ビール 5-E (kettle-hopping) の冷麦汁中の geraniol、geranial、methyl geranate 濃度は、麦汁煮沸中の揮発により、他の試験ビールよりも低くなった。ビール 5-F (late-hopping) とビール 5-G (dry-hopping) はビール 5-E と比較して、3 成分の残存量が多いことが確認された。

Sorachi Ace ホップ特有の香気成分である geranic acid は、発酵 3 日間で減少するものの、工程全体を通してみると、他のホップ香気成分と比較して製品ビールまでの残存濃度は極めて高いことが明らかとなった。製品ビール中の geranic acid は、late-hopping のビール 5-F で 184 µg/L、dry-hopping のビール 5-G で 178 µg/L 含まれており、kettle-hopping のビール 5-F でさえも 159 µg/L の高濃度を維持した。kettle-hopping の香り付けの場合は麦汁の煮沸時間が長く、その間、ホップ由来香気成分は通常、揮発して系外へと抜けてしまうことが多い。しかしながら geranic acid は発酵工程中でも大きく減少することなく、製品ビールに残存していた。これは geranic acid の構造に着目してみると、カルボキシ基を含んでおり、酸としての機能によると考えられる。すなわち、ホップから麦汁へ移行した後、ある一定量は液中で解離していると推察される。Figure 5-4 に予想される液中の geranic acid の解離を示した。geranic acid の解離定数は約 5.17 と推察され (74)、煮沸した麦汁中の pH が 5.5 のとき、geranic acid は約 68 %イオン化していることになる。イオン化することで、麦汁の煮沸中でも揮発しにくくなると考えられる。さらに、geranic acid は沸点が高いため、他の香気化合物よりもさらに揮発しにくいと思われる。具体的には、geranic acid、geraniol、geranial、methyl geranate の沸点はそれぞれ約 295.3、229.5、229.0、247.4°Cである。実際、late-hopping の麦汁中の geranic acid 含有量は 252 µg/L であったのに対し、kettle-hopping の麦汁中の含有量は 214 µg/L であったため、麦汁の煮沸中に揮発したと推察される量はわずか 15 %であった (Table 5-3)。その後の発酵工程では、pH は 4.5 に低下するが、それでも geranic acid の 15 %はイオン化するため、他のホップ香気成分と比較して発酵工程中もずっと揮発しにくい状態を維持できると考えられる。その結果、Sorachi Ace 由来の geranic acid は部分的にイオ

ン化して麦汁や発酵中の液中に溶解し、麦汁の煮沸や酵母による消費によって減少したとしても、最終の製品ビールには一定量残留する可能性があることが示唆された。総じて geranic acid は一般的なホップ由来香気成分とは異なる挙動をすることが明らかとなった。

5-4-3. ホップ添加タイミング違いの試醸ビールの香味特徴

Sorachi Ace ホップを使用し、ホップの添加タイミングを変えた 3 種類のビール（ビール 5-E～G）の官能検査を実施したところ、late-hopping と dry-hopping したビールではフラワリー、フルーティ、トロピカル、レモン様の評価が kettle-hopping より高くなった。これは late-hopping 及び dry-hopping したビールでは、kettle-hopping したビールに比べてテルペンアルコール類の量が多いためと考えられる。一方、ウッディやグリーンの評価については、三つのビールで大きな違いがなかったことから、これらの特性は、ホップ由来の他のフレーバー化合物の有無に関わらず、geranic acid のみによると推測される。これらの結果は、Sorachi Ace ホップの品種香気は、geranic acid の存在だけでなく、完成したビールに他のホップ由来の香気成分が共存することによって形成されるという、第 3 章でモデルビールの官能検査から推察した仮説を支持するものである。

Table 5-1. 試醸ビールに用いたホップ品種概要と香り付け条件

beer	hop variety	form	hopping	hop dosage (g of hop/L)	
				bittering	flavoring
5-A	Sorachi Ace	T90	late	0.2 ^a	2.0
5-B	HTR	T90	late	0.2 ^a	2.0
5-C	Saaz	T90	late	0.2 ^a	2.0
5-D	Cascade	T90	late	0.2 ^a	2.0
5-E	Sorachi Ace	T90	kettle	1.59 ^b	–
5-F	Sorachi Ace	T90	late	0.09 ^b	1.5
5-G	Sorachi Ace	T90	dry	0.09 ^b	1.5

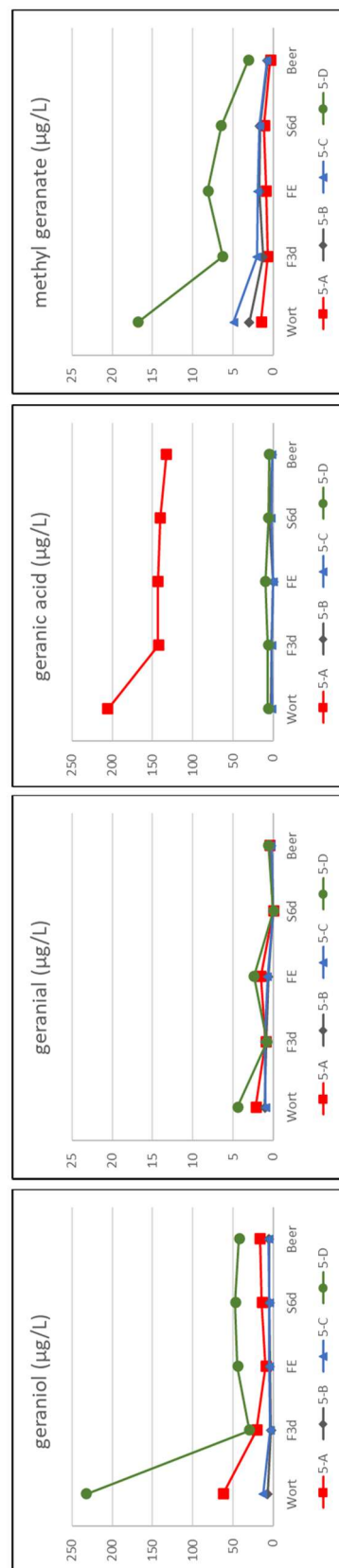
HTR, Hallertauer Tradition

^a HTR hop was used as bittering hop

^b Sorachi Ace was used as bittering hop.

Table 5-2. ホップ違いによる試験ビール醸造工程中の香気成分の定量

beer	hop variety	process	alcohols				aldehydes			carboxylic acids		esters		Notes
			geraniol (µg/L)	nerol (µg/L)	linalool (µg/L)	α-terpineol (µg/L)	β-citronellol (µg/L)	geranial (µg/L)	neral (µg/L)	geranic acid (µg/L)	neric acid (µg/L)	methyl geranolate (µg/L)	methyl nerolate (µg/L)	
5-A	Sorachi Ace	wort	63	7.0	115	19	tr	2.2	tr	206	nd	1.5	nd	beer 2-A
		fermentation for 3 d	21	4.1	87	15	7.3	tr	4.2	143	nd	0.69	nd	
		fermentation end	9.4	3.0	94	15	3.7	1.6	nd	143	nd	0.89	nd	
		storage for 6 d	14	3.9	81	14	13	nd	nd	141	nd	1.1	nd	
		beer (finished beer)	16	4.1	70	14	14	tr	nd	133	nd	0.37	nd	
5-B	HTR	wort	6.9	2.7	100	6.3	tr	1.0	tr	nd	nd	3.0	tr	beer 2-B
		fermentation for 3 d	2.7	1.2	75	5.0	tr	tr	1.9	nd	nd	1.3	nd	
		fermentation end	4.1	1.5	89	5.3	1.6	tr	nd	nd	nd	1.7	tr	
		storage for 6 d	4.5	1.7	81	5.1	3.4	nd	nd	nd	nd	1.7	nd	
		beer (finished beer)	5.2	1.4	60	5.0	3.1	nd	nd	nd	0.71	nd		
5-C	Saaz	wort	13	2.6	31	2.8	tr	tr	tr	nd	nd	4.9	tr	
		fermentation for 3 d	3.8	1.2	20	2.7	1.5	1.1	1.9	nd	nd	2.0	tr	
		fermentation end	4.9	1.3	22	2.4	2.0	tr	nd	nd	nd	2.0	tr	
		storage for 6 d	4.8	1.5	20	2.4	4.8	nd	nd	nd	nd	1.7	nd	
		beer (finished beer)	5.5	1.2	16	2.6	4.6	nd	nd	nd	0.81	nd		
5-D	Cascade	wort	233	4.6	71	5.9	tr	4.5	1.6	nd	nd	17	tr	
		fermentation for 3 d	30	2.7	48	5.3	11	tr	16	nd	nd	6.3	tr	
		fermentation end	44	3.6	58	5.3	24	2.4	nd	nd	nd	8.1	tr	
		storage for 6 d	47	3.8	52	4.8	43	nd	nd	nd	nd	6.5	tr	
		beer (finished beer)	43	3.1	42	5.3	40	tr	nd	nd	3.1	nd		
perception threshold			7 ^a	80 ^a	3 ^a	450 ^a	9 ^a	30-32 ^b	30-32 ^b	2200	-	-	-	



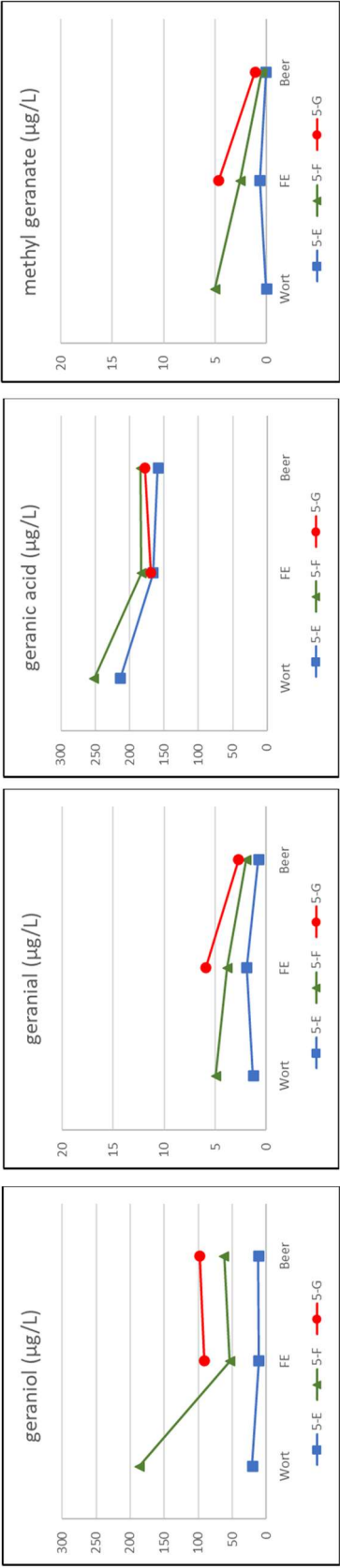
F3d, fermentation for 3 d; FE, fermentation end; S6d, storage for 6 d
 beer 5-A brewed with Sorachi Ace; beer 5-B, with HTR (Hallertauer Tradition); beer 5-C with Saaz; and beer 5-D with Cascade.

Figure 5-1. 試醸ビール（ホップ違い）の醸造工程中の geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate の挙動

Table 5-3. ホップ添加タイミング違いによる試験ビール醸造工程中の香気成分の定量

beer	hopping	process	alcohols					aldehydes			carboxylic acids		esters	
			geraniol (µg/L)	nerol (µg/L)	linalool (µg/L)	α- terpineol (µg/L)	β- citronellol (µg/L)	geranial (µg/L)	neral (µg/L)	geranic acid (µg/L)	neric acid (µg/L)	methyl geranate (µg/L)	methyl nerolate (µg/L)	
5-E		wort	21	tr	3.3	2.0	tr	1.3	tr	214	nd	nd	nd	
	kettle	fermentation end	11	1.7	3.2	2.3	1.0	2.0	nd	166	nd	0.67	nd	
		beer (finished beer)	12	1.6	2.3	1.4	1.6	tr	nd	159	nd	nd	nd	
5-F		wort	186	9.3	110	17	1.3	4.9	2.5	252	nd	5.0	tr	
	late	fermentation end	54	5.0	78	14	5.9	3.8	nd	183	nd	2.6	tr	
		beer (finished beer)	62	5.3	58	13	9.3	2.0	nd	184	nd	0.48	nd	
5-G		wort	1.8	nd	tr	nd	tr	1.0	nd	tr	nd	nd	nd	
	dry	fermentation end	92	9.6	143	6.9	8.9	5.9	tr	169	nd	4.7	tr	
		beer (finished beer)	98	9.6	97	20	13	2.7	tr	178	nd	1.2	nd	
tr, trace; nd, not detected.														

tr, trace; nd, not detected.



FE, Fermentation end
 beer 5-E, kettle-hopping; beer 5-F, late-hopping; beer 5-G, dry-hopping.

Figure 5-2. 試験ビール（ホップ添加タイミング違い）の醸造工程中の geraniol、geranial、geranic acid、methyl geranate の挙動

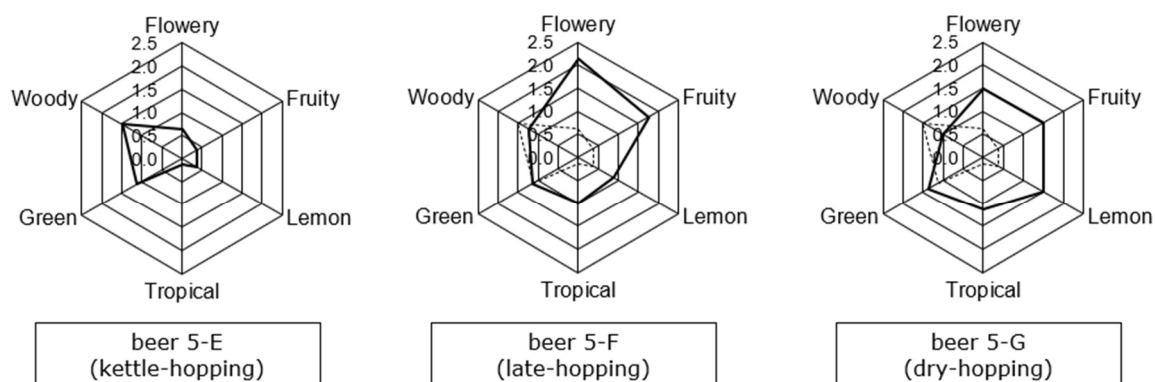


Figure 5-3. 試醸ビール（ホップ添加タイミング違い）の官能検査レーダーチャート

Table 5-4. 官能検査の評点と有意水準

	beer 5-E kettle-hopping		beer 5-F late-hopping		beer 5-G dry-hopping	
	intensity ^a		intensity ^a	<i>p</i> ^b	intensity ^a	<i>p</i> ^b
flowery	0.63		2.13	0.0001 ***	1.50	0.041 *
fruity	0.38		1.75	0.0012 **	1.50	0.015 *
lemon	0.38		0.88	0.033 *	1.50	0.015 *
tropical	0.13		1.00	0.006 **	1.13	0.018 *
green	1.13		1.13	1.000	1.38	0.563
woody	1.50		1.25	0.351	1.00	0.104

^a mean intensity value of the scores from eight well-trained panelists

^b paired *t*-test comparing beer 5-F and 5-G against beer 5-E.

*, significant difference with a risk of 5 %

**, significant difference with a risk of 1 %

***, significant difference with a risk of 0.1 %

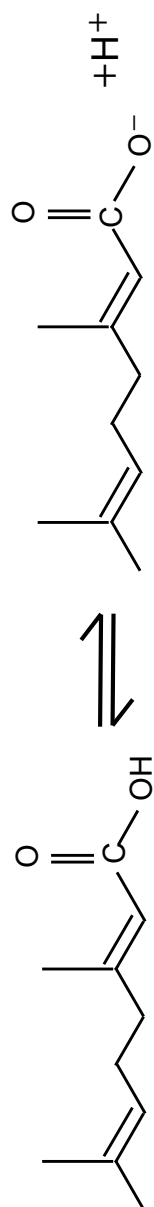


Figure 5-34、麦汁やビール液中での geranic acid の解離

第6章 Sorachi Ace と他のホップ品種との組み合わせによるビールの香りへの影響

6-1. 序論

第1章1-5で述べたように、Sorachi Ace ホップはサッポロビール社が育種し、1984年に品種登録した、日本生まれのホップである。しかしながら、当時の日本では普及せず、オレゴン州立大学との育種母本の株の交換でアメリカに渡り、その後クラフトビールの流行にともない、アメリカで人気のホップとなった。アメリカやヨーロッパのクラフトブルワーの間では、Sorachi Ace を単独で、あるいは他のフレーバーホップとのブレンドで使用したビールが造られるようになっていた。

第2章～第5章までの研究で、geranic acid は Sorachi Ace ホップに特異的に多く含まれ、醸造工程中也液中に残存し製品ビールでも高い濃度を維持することが確認された。さらに、閾値調査と官能検査により、geranic acid が非常にユニークな特性を持つことが明らかとなった。すなわち、geranic acid はそれ自身の香りの強度は弱いものの、閾値以下のレベルでホップ由来テルペン類のエンハンサーとして機能して、Sorachi Ace のビールの品種特有香を形成していることが示唆された。

本研究では、geranic acid がもつホップ由来香気成分との相互作用についてより詳細に把握するため、Sorachi Ace と他のフレーバーホップ品種とブレンドした試験醸造を行い、それらのビールの香味の変化を官能試験で評価した。

6-2. 実験方法

6-2-1. 試料

6-2-1-1. ホップ

本章で使用したホップはすべて T90 ペレットで、米国産の Sorachi Ace、Cascade (2014 年 crop)、Citra (2012 年 crop)、Mosaic (2013 年 crop)、チェコ産の Kazbek (2014 年 crop)、ドイツ産の HTR (2015 年 crop)、Hallertau Blanc (2012 年 crop) を用いた。

6-2-1-2. 試験醸造ビール

一連の試験醸造ビール (6-A~6-F) は、ホップの香り付けの条件が異なることを除いて、第 2 章 2-1-2-2. と同じ方法で製造された。本章の試験醸造では、初沸時に添加するホップには Sorachi Ace (0.09 g/L) を用いた。香り付けは late-hopping で、煮沸工程の終了 5 分前に Sorachi Ace (1.0 g/L) を添加した。その後、さらに dry-hopping で、各フレーバーホップ (0.5 g/L) を冷麦汁に酵母とともに添加した。

続いて、別の一連の試験醸造ビール (6-G、6-H) も醸造した。ビール 6-G は、HTR ホップ (1.3 g/L) を初沸時に添加し、dry-hopping で冷麦汁に酵母とともに Mosaic ホップ (0.5 g/L) を添加した。ビール 6-H は、Sorachi Ace ホップ (0.09 g/L) を初沸時に添加し、late-hopping で Sorachi Ace を煮沸工程の終了 5 分前に添加した (1.0 g/L) 後、dry-hopping で Mosaic ホップ (0.5 g/L) を酵母とともに冷却した麦汁に添加した。これらのビールは、Sorachi Ace と他のフレーバーホップ品種のブレンド効果を評価するために試醸された。すべてのホップの添加条件は Table 6-1 に示した。

6-2-1-3. 試薬

標準試薬：geranic acid (>85 %、mixture of isomers)、myrcene (>90 %) は Merck 社製 (Sigma-Aldrich) を、linalool (>96 %)、 α -terpinene (>90 %)、 γ -terpinene (>95 %)、 α -terpineol (>95 %)、 β -citronellol (>95 %)、geraniol (>97 %)、nerol (>98 %)、citral (>98 %、mixture of isomers)、(+)-limonene (>95 %)、terpinolene (>85 %)、および benzyl acetate (>99 %) は、東京化成工業 (東京、日本) 社製を、methyl geranate (>94 %、mixture of isomers) は、Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) 社製を用いた。4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) は、Combi-Blocks (San Diego, CA, USA) 社製を、3-sulfanylpropyl hexanoate (3SPH) は富士フイルム和光純薬 (大阪、日本) 社製を用いた。3-sulfanylhexas-1-ol (3SH) は、Alfa Aesar (Lancashire, United Kingdom) から、3-sulfanylhexasyl acetate (3SHA) は、Matrix Scientific (Columbia, SC, USA) からそれぞれ購入した。3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol (3S4MP) と 3-sulfanyl-4-methylpentyl acetate (3S4MPA) は合成したものを用いた。(合成詳細は (28) 参照)

その他化学物質：アセトニトリル、無水硫酸ナトリウム、ジクロロメタン、酢酸エチル、リン酸、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、チオグリセロールは、富士フイルム和光純薬（大阪、日本）から購入した。5,5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）は、東京化成工業（東京、日本）社から購入した。試薬は、アセトニトリルはLC/MS用グレードを、無水硫酸ナトリウム、ジクロロメタン及び酢酸エチルは残留農薬・PCBグレード300を、それ以外の試薬は試薬特級グレードを用いた。

6-2-2. 方法

6-2-2-1. テルペン類の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び異性体比率決定と SPME-GC-MS によるホップ由来テルペン類の定量

本章では、第3章で着目した16成分のテルペン類について定量を行った。定量に用いた標準試薬中の当該成分の純度及び異性体比率は第3章3-2-2-3の方法に従った。SPME-GC-MSによる定量は第3章3-2-2-4の方法に従った。定量イオン、検量線の範囲、および参照化合物中の異性体の比率は、Table 2-2 及び Table 3-1 と同じ値を採用した。検出限界 LOD 及び定量下限 LOD については第5章5-2-2-1と同じとした。

6-2-2-2. GC-MS/MS によるチオール類の定量

試醸ビール中の揮発性チオール類の定量は、高澄ら（76）によって報告された方法に従って実施した。分析に供するサンプルを以下に従って調製した。50 mL のガラス遠心チューブに、6 g の塩化ナトリウム、20 mL のビール、20 mL のジクロロメタン、および 20 µL の内部標準溶液（3SPH 10 mg/L エタノール）を加えて15分間振とうした。1800 g で15分間遠心分離した後、ジクロロメタン層を回収し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。固相抽出は、ASPEC GX-274（Gilson、Middleton、WI、USA）で実施した。まず、銀イオンを固定した固相抽出カートリッジ Meta-Sep IC-Ag（GL Sciences、東京、日本）を6 mL のジクロロメタンでコンディショニングした。次に、各ビールの抽出物全量を流速 2 mL/min でカートリッジに負荷した。カートリッジを10 mL のジクロロメタンと20 mL のアセトニトリルの順にすすいだ後、カートリッジを逆向きにして10 mL のジクロロメタンで洗浄した。そして10 g/L チオグリセロール（ジクロロメタン溶液）6 mL を流速 0.66 mL/min で負荷し、揮発性チオールを溶出させた。得られた溶出液をガラス遠心チューブに移し、30 mL の飽和塩溶液 50 mL を加えて15分間振とうした。1800 g で15分間遠心分離した後、下層の有機溶媒層を回収し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。最後に1 mL の酢酸エチルを溶出物に加え、窒素気流下で20 µL まで濃縮した。

調製したサンプルについて、GC-MS/MS を用いて以下条件で定量を行った。

装置：Agilent 7890A-7000B トリプル四重極 GC-MS/MS (Agilent Technologies)

カラム：InertCap PureWAX 30 m × 0.25 mm 内径、膜厚 0.25 μm (GL Sciences)
キャリアガス：He 定流量モード 1 mL/min
注入量：3 μL (Combi PAL システム (CTC Analytics 社製))
注入口：温度 250°C、pulsed splitless mode (30 psi, 1 min)
昇温条件：40°C (1 min) → 5°C/min → 250°C (10 min)
MS：EI (Electron Ionization) イオン源温度 230°C、四重極温度 150°C
検出モード：選択反応モニタリング (SRM: the selected reaction monitoring)
(トランジション及び CE は Table 6-2 参照)

検量線は標準物質の混合溶液を分析して作成した。各揮発性チオール原液の濃度は、混合前に 5,5-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) を使用した Ellman の方法で決定された (77)。混合標準溶液は、5 つの揮発性チオール原液を混合して酢酸エチルで希釈して調製した。すべての混合標準溶液に、内部標準物質として 3SPH (終濃度 10 mg/L) とアナライトプロテクタントとしてチオグリセロール (終濃度 10 g/L) を加えた。チオール類は微量な定量となるため、定量下限は設けず、検出限界のみ各成分について個別に設定した (Table 6-2)。

6-2-2-3. プロファイル官能検査

試醸ビール 6-A~6-F の評価試験は十分に訓練されたパネル 6 人で、試醸ビール 6-G と 6-H の評価試験は十分に訓練されたパネル 7 人で実施した。試醸ビールは 4°C で保存され、パネルに提示する直前に、蓋のないガラス容器に 70 mL を注いだ (総容量 = 150 mL)。その後、各サンプルの 6 つの評価項目 (フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーン、ウッディ) について、0 (感じない) から 3 (強く感じる) まで、0.5 間隔で点数付けされた。各評価項目の平均点が計算され、Microsoft Excel 2013 で、対応のある t 検定を行った。

6-3. 結果

6-3-1. Sorachi Ace と他のホップ品種をブレンドした試醸ビール

ホップのブレンドによるビールの香味への効果を評価するために、一連の試醸ビール（6-A から 6-F）を製造した。この一連の試験では、late-hopping に Sorachi Ace（冷却麦汁 1 L あたりホップ 1.0 g）を共通で使用した。そして dry-hopping で香り付けするホップには、Sorachi Ace（6-A、コントロール）、Kazbek（6-B）、Hallertau Blanc（6-C）、Cascade（6-D）、Citra（6-E）、Mosaic（6-F）を選択し、添加は冷麦汁 1 L に対してホップ 0.5 g とした。ホップの香り付け条件はすべて Table 6-1 に示した。すべての試醸ビールのホップ由来の香気成分の定量結果を Table 6-3 に示した。

官能検査は十分に訓練されたパネル 6 人によって実施した。Figure 6-1 に、フレーバーホップ各品種を組み合わせた試醸ビールを 6 つの評価項目（フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカル、グリーン、ウッディ）で評価したスコアの平均値のレーダーチャートを示す。Kazbek で dry-hopping したビール 6-B の官能特性の平均点は、Sorachi Ace のみで醸造したビール 6-A と比較して、フルーティ、グリーン、ウッディで低下した。特にフルーティのスコアは危険率 5 % で有意に低下した（Table 6-4）。Hallertau Blanc で dry-hopping したビール 6-C では、フルーティ、レモン様、ウッディの平均スコアが低下した。フルーティとレモン様の評点は、それぞれ 1 % と 5 % の危険率で大幅に低下した（Table 6-4）。この試醸ビール 6-C では、すべての評価項目スコアが非常に低くなっていた。Cascade で dry-hopping したビール 6-D では、フルーティ、グリーン、ウッディの平均スコアが低下した。ウッディの平均点は危険率 5 % で大幅に低下した（Table 6-4）。Sorachi Ace での late-hopping に、dry-hopping を組み合わせるホップの品種によっては、製品ビールの香味強度がむしろ低下する可能性があることが明らかとなった。一方、Citra で dry-hopping した試醸ビール 6-E のレーダーチャートでは、フラワリー、フルーティ、レモン様、トロピカルの平均スコアが増加した。Mosaic で dry-hopping した試醸ビール 6-F では、フルーティ、レモン様、トロピカルの平均点が上昇した。特に、トロピカルの評点はコントロールの試醸ビール 6-A（Sorachi Ace ホップ）と比較して危険率 0.1 % で大幅に高くなった。試醸ビール 6-E 及び 6-F は、Sorachi Ace 単独のビールと比較して、4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one（4MSP）の濃度が高かった（Table 6-3）。4MSP にはモノテルペンアルコール類のエンハンサーとして機能し、ビールにトロピカルな香味を付与する効果がある、との報告がある（34）。しかしながら、この 2 つの試醸ビールにおける複数の官能特性の上昇は Sorachi Ace に含まれる geranic acid や、チオール類の 4MSP が持つ香りの強度を高める相乗効果というよりは、単に Citra 及び Mosaic に含まれる 4MSP によるトロピカルな香りの付与、つまりは相加効果による可能性が高いと推察された。

6-3-2. Sorachi Ace と Mosaic を組み合わせた試醸ビール

前項で Sorachi Ace と Mosaic をブレンドした試醸ビールのレーダーチャートが大きく変化していた。この試験条件は Sorachi Ace に対して Mosaic をブレンドした場合の効果のみを見ていたため、逆に Mosaic に対して Sorachi Ace をブレンドした効果を調査するため、追加で試醸ビール（6-G、6-H）を醸造した（Table 6-1）。ビール 6-G では、kettle-hopping に HTR（1.3 g/L）を使用し、late-hopping は行わず、dry-hopping に Mosaic（0.5 g/L）を使用した。ビール 6-H のホッピング条件は 6-F と同じで、kettle-hopping に Sorachi Ace（0.09 g/L）を、late-hopping に Mosaic（1.0 g/L）を、dry-hopping に Mosaic（0.5 g/L）を使用した。

これら 2 つのビールの官能検査結果のレーダーチャートを Figure 6-2 に示す。Sorachi Ace で late-hopping し、Mosaic で dry-hopping した試醸ビール 6-H のチャートは、Mosaic のみで dry-hopping したチャートと比較して、有意差まではないものの、レモン様とグリーンの平均点が増加していた。これらの特徴はブレンドした Sorachi Ace に由来すると推察された。一方で、Mosaic のビールの特徴とされるトロピカルの特徴は 2 つのビールの間で同等であった。このことから、先に考察した通り、前項のビール 6-F も含め、トロピカルの特徴は主に Mosaic に由来すると考えられる。

6-4. 考察

第3章で Sorachi Ace 品種特有香の形成メカニズムの解明のために、geranic acid と、geranic acid と構造が類似したテルペン類等、合計 16 成分を選抜して感性科学的アプローチ（アディクション試験の官能検査手法）で試験を行った。その結果、geranic acid がホップ由来のさまざまなテルペン類の香気を強め、Sorachi Ace の特有香を形成しているという新しいメカニズムを提唱した。最近の研究では、ホップ香の形成に関するいくつかのメカニズムが報告されている。主要なフレーバー化合物はモノテルペンアルコール類 (30, 31)、揮発性チオール類 (28, 29, 33)、および分岐鎖脂肪酸類 (78) 等が報告されている。そういった背景から、Sorachi Ace とこれらの主要な香気成分を含む他のホップ品種とを組み合わせることによる各香気成分のビール香気への影響を調査した。

本試験醸造ビール 6-A から 6-F では、すべての試醸ビールに共通して Sorachi Ace を late-hopping し、さまざまな品種を用いて dry-hopping で香り付けした。そうすることで、Sorachi Ace から持ち込まれる geranic acid の存在下で、品種固有の香気成分への影響を確認することができる。驚いたことに、Sorachi Ace ホップと Kazbek (6-B)、Hallertau Blanc (6-C)、Cascade (6-D) とをブレンドしたところ、Sorachi Ace ホップ単独での使用 (6-A) と比較してレーダーチャートが小さくなり、有意に低くなる官能特性項目もあった。Sorachi Ace ビールの香りの形成に寄与すると推測している 16 成分の定量値では、ビール 6-B~6-D と 6-A を比較しても、やや linalool は低いが geraniol は高いものもあり、また水中の閾値と比較しても十分なテルペンアルコール類が含まれていた。ビール 6-B、6-C、6-D で観察されたネガティブな効果は、これらのサンプルに含まれる今回対象とした香気成分だけでは十分に説明できず、さらなる調査が必要と思われる。一方、Sorachi Ace と Citra もしくは Mosaic とのブレンドホッピングは、製品ビールの香りにプラスの影響を与える可能性があることがわかった。試醸ビール 6-E (Citra) 及び 6-F (Mosaic) は、Sorachi Ace 単独のビールと比較して、4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) が高い濃度で含まれており、Citra 及び Mosaic に含まれる 4MSP によるトロピカルな香りの付与、つまりは相加効果による可能性が高い。

追加で試醸したビール 6-G と 6-H の試験においては、上で仮定した相加効果の検証をするべく、6-G では Mosaic の dry-hopping のみとして、6-F 同様に Sorachi Ace と Mosaic を組み合わせた 6-H と比較してみた。ビール 6-G と 6-H とを比較した時、また 6-A と 6-F を比較した時でそれぞれトロピカルなスコアに違いは認められなかったことから、これらのビールがもつトロピカルな特徴は geranic acid の影響を受けない可能性が考えられる。これは前項のビール 6-E 及び 6-F と 6-A を比較した結果とも一致する。一方、ビール 6-H では 6-G と比較してレモン様とグリーン系の官能特性が増加した。特にグリーン系の項目は geranic acid の存在下で大幅に増加しており、これらの特徴は Sorachi Ace に由来すると考えられる。この結果から、4MSP を含むホップは Sorachi Ace とのブレンドすることで、ブレンドした品種の両

方の特徴が感じられるビールを醸造できる有効な選択肢であると考えられる。

先に述べた通り、Sorachi Ace とさまざまなフレーバー化合物を含む他のホップ品種とのブレンドホッピングの効果を調査したところ、予想に反し、Sorachi Ace と特定のホップ品種（Kazbek、Hallertau Blanc、Cascade）とのブレンドホッピングでは、製品ビールの香りにマイナスの影響を与える可能性があることがわかった。これまでホップ香気成分の相互作用を報告した論文では、香気成分の組み合わせが増えることで、香味のレーダーチャートは変化しないか、増えるか、というポジティブな報告が主であり、組み合わせることで香気強度が有意に低下する香気成分の組み合わせがある、というのは新規な知見である。なお、Sorachi Ace とのブレンドで香気が低下していた品種の中でも、ビール 6-C の Hallertau Blanc は 4MSP とは別のチオール 3S4MP が含まれており、この 3S4MP もテルペンアルコールなどの他の香気成分の香気強度をエンハンスする効果があるという報告もある(29)。上記の結果から、3S4MP およびそれにエンハンスされるテルペンアルコール類が形成するホップ香に対しては、Sorachi Ace とのブレンドがネガティブな影響を及ぼしたと推察される。同じ成分へのエンハンス効果のあるチオール類の間でも、このような効果の違いがあることは興味深い。

Table 6-1. 試醸ビールのホップ香り付け条件

beer	hop dosage (g of hop/L)		
	bittering	late-hopping	dry-hopping
	variety dosage	variety dosage	variety dosage
6-A	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Sorachi Ace 0.5
6-B	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Kazbek 0.5
6-C	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Hallertau Blanc 0.5
6-D	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Cascade 0.5
6-E	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Citra 0.5
6-F	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Mosaic 0.5
6-G	HTR 1.30	- -	Mosaic 0.5
6-H	Sorachi Ace 0.09	Sorachi Ace 1.0	Mosaic 0.5

Table 6-2. 揮発性チオール類の SRM 条件及び検出限界

compound	target			qualification			LOD (ng/L)
	precursor ion	product ion	collision energy (V)	precursor ion	product ion	collision energy (V)	
4-methyl-4-sulfanylpentane-2-one	132	89	6	132	75	2	1.4
3-sulfanyl-4-methylpentyl acetate	116	88	4	116	101	4	2.9
3-sulfanylhexyl acetate	116	88	4	116	101	4	3.7
3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol	134	100	0	134	57	8	1.9
3-sulfanylhexan-1-ol	134	82	2	134	82	0	7.1
3-sulfanylpropyl hexanoate (ISTD)	106	60	4	106	88	0	-
LOD, limit of detection							

Table 6-3. 試験ビール中の香気成分の定量値

test-beer		6-A		6-B		6-C		6-D		6-E		6-F		6-G		6-H		perception threshold
		Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	Sorachi Ace	HTR	Mosaic	Sorachi Ace	Sorachi Ace	
hopping condition	bittering																	
	late-hopping																	
	dry-hopping																	
alcohols	limonol	(µg/L)	62		49	45		48		92		63		36		75		3 ^a
	α-terpineol	(µg/L)	11		11	9.0		8.2		8.4		9.8		2.4		8.3		450 ^a
	β-citronellol	(µg/L)	16		19	20		27		16		28		19		26		9 ^a
	geraniol	(µg/L)	15		19	21		26		18		30		25		29		7 ^a
	nerol	(µg/L)	4.0		3.5	3.0		3.8		5.3		5.9		5.0		7.0		80 ^a
aldehydes	geranial	(µg/L)	tr		tr	tr		tr		tr		tr		tr		tr		30-32 ^b
	neral	(µg/L)	nd		nd	nd		tr		nd		nd		nd		nd		30-32 ^b
carboxylic acids	geranic acid	(µg/L)	115		89	85		116		72		73		tr		65		2200
	neric acid	(µg/L)	tr		tr	tr		tr		tr		tr		tr		tr		—
esters	methyl geranate	(µg/L)	1.3		1.7	1.9		4.6		25		25		29		27		—
	methyl nerolate	(µg/L)	nd		nd	nd		nd		0.31		0.65		0.90		0.86		—
hydrocarbons	α-terpinene	(µg/L)	tr		nd	tr		tr		tr		tr		nd		0.30		—
	γ-terpinene	(µg/L)	nd		nd	nd		nd		nd		nd		nd		nd		260 ^c
	(+)-limonene	(µg/L)	tr		tr	tr		tr		tr		tr		nd		tr		200 ^c
	terpinolene	(µg/L)	nd		nd	nd		nd		nd		nd		nd		nd		41 ^c
	myrcene	(µg/L)	nd		nd	nd		nd		nd		nd		1.4		4.0		100 ^c
volatile thiols	4-methyl-4-sulfanylpentane-2-one	(ng/L)	nd		nd	2.0		1.5		23		16		15		17		1.2 ^d
	3-sulfanyl-4-methylpentyl acetate	(ng/L)	nd		nd	18		nd		nd		14		12		11		120 ^e
	3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol	(ng/L)	nd		20	547		7.3		24		332		298		272		40 ^f
	3-sulfanyloxy acetate	(ng/L)	nd		nd	nd		nd		nd		nd		nd		nd		4 ^f
	3-sulfanylohexan-1-ol	(ng/L)	72		75	79		75		74		76		85		76		60 ^f

tr, trace; nd, not detected; ^a perception threshold reported in ref 30; ^b perception threshold reported in ref 75; ^c perception threshold reported in ref 79; ^d perception threshold reported in ref 34; ^e perception threshold reported in ref 28; ^f perception threshold reported in ref 80.

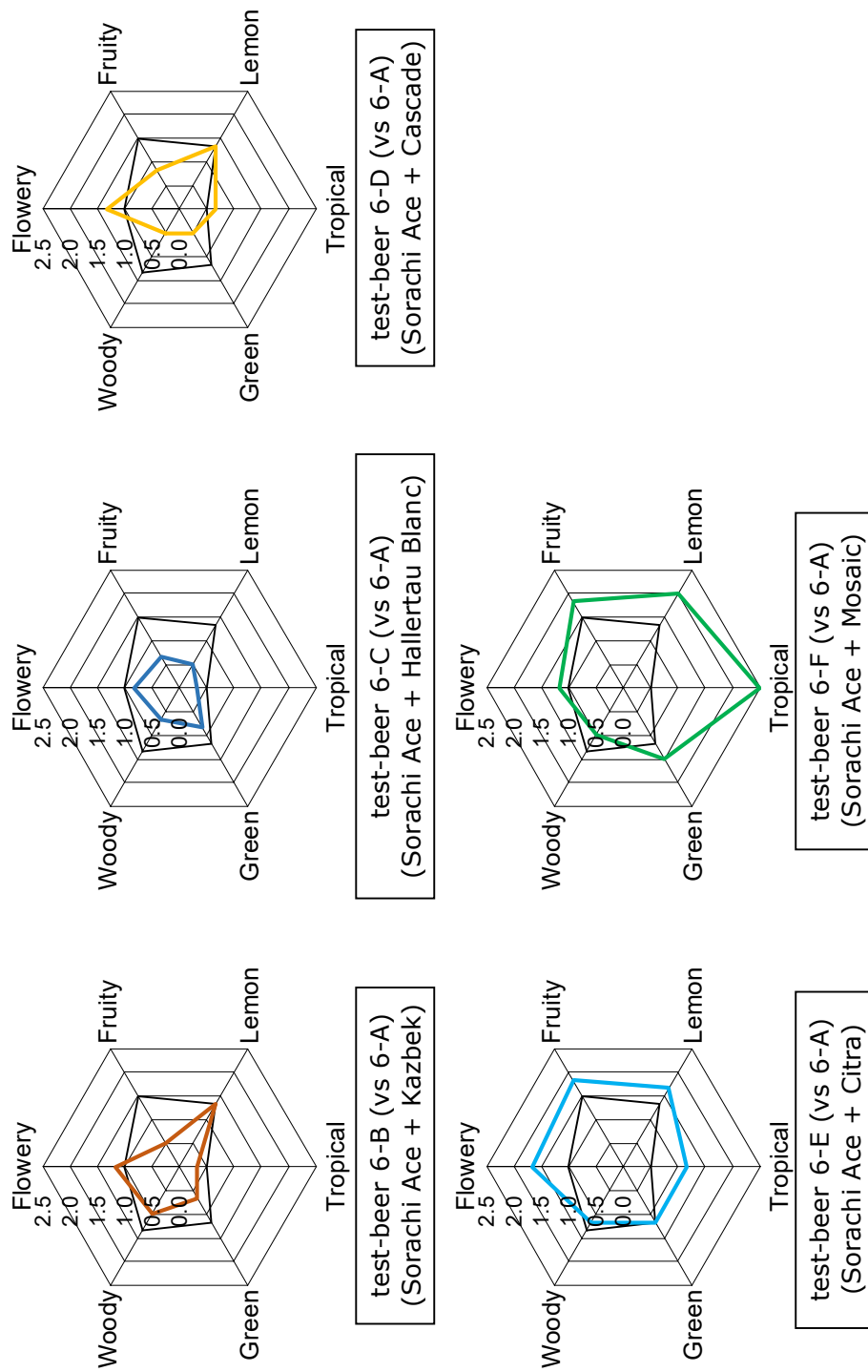
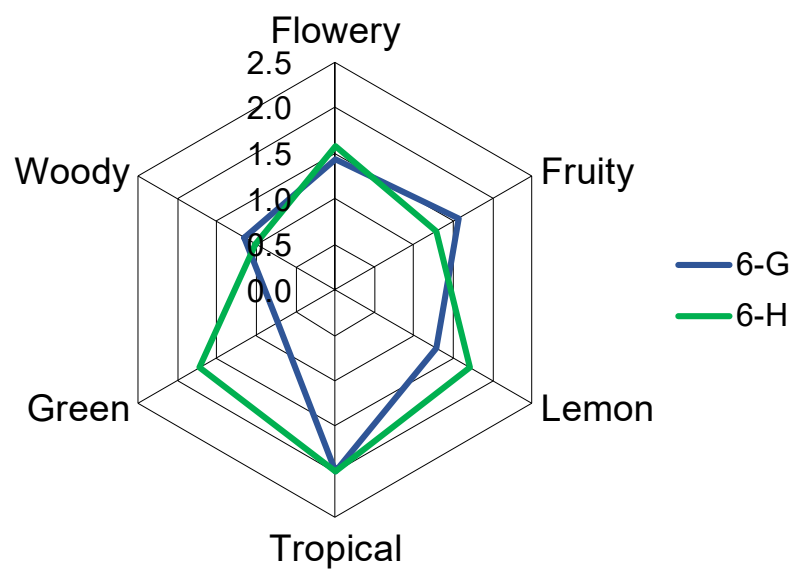


Figure 6-1. Sorachi Ace と各種ホップとの組み合わせたビールの官能検査レーダーチャート



test-beer 6-G (Mosaic)
vs 6-H (Sorachi Ace + Mosaic)

Figure 6-2. Mosaic ホップ単独と Sorachi Ace+Mosaic の
ブレンドビールの官能検査レーダーチャート

Table 6-4. ブレンドビールの官能検査スコア平均点と有意水準

test-beer	6-A			6-B			6-C			6-D			6-E			6-F			6-G			6-H		
	bittering			late-hopping			dry-hopping			Sorachi Ace			Sorachi Ace			Sorachi Ace			HTR			Sorachi Ace		
hopping condition	Sorachi Ace			Sorachi Ace			Sorachi Ace			Sorachi Ace			Sorachi Ace			Sorachi Ace			-			Sorachi Ace		
	Sorachi Ace			Kazbek			Hallertau Blanc			Cascade			Citra			Mosaic			Mosaic			Mosaic		
	intensity		p^a	intensity		p^a	intensity		p^a	intensity		p^a	intensity		p^a	intensity		p^a	intensity		p^a	intensity		p^b
flowery	1.00			1.17	0.695		0.83	0.611		1.33	0.363		1.67	0.175		1.17	0.695		1.43			1.57	0.604	
fruity	1.50		0.50	0.50	0.012 *		0.67	0.004 **		0.83	0.175		1.83	0.363		1.83	0.363		1.57			1.57	1.000	
lemon	1.33		1.33	1.000			0.50	0.042 *		1.33	1.000		1.67	0.465		2.00	0.175		1.29			1.57	0.631	
tropical	0.50		0.33	0.611			0.33	0.611		0.67	0.695		1.17	0.102		2.50	0.0006 ***		2.00			2.00	1.000	
green	1.17		0.67	0.076			0.83	0.576		0.50	0.102		1.17	1.000		1.50	0.465		0.86			1.71	0.078	
woody	1.33		1.00	0.530			0.67	0.102		0.50	0.042 *		1.17	0.611		1.00	0.175		1.00			1.00	1.000	

^apaired t-test comparing model beer 6-B to 6-F against beer 6-A by six well-trained panellists^bpaired *t*-test comparing model beer 6-H against beer 6-G by seven well-trained panellists.

*, significant difference with a risk of 5 %; **, significant difference with a risk of 1 %; ***, significant difference with a risk of 0.1 %

第7章 遅摘みによる Sorachi Ace ホップの香気成分の変動

7-1. 序論

第1章 1-5 でも述べたように、Sorachi Ace は、それを用いて香り付けしたビールに松様、ウッディ、ディル（ハーブ）様、シトラス、レモングラス様の香りを付与することができる非常に特徴的なフレーバーホップ品種である。原産地にちなんで名付けられたこのホップは、もともと 40 年ほど前に北海道空知郡でサッポロビール社によって育成された（46）。サッポロビール社は、さまざまな新しいホップ品種の育成を続けており、Sorachi Ace を育種の母株としても利用している。Sorachi Ace は他の品種に比べて、品種登録された当時としては苦味酸（ α 酸）の含有量が多いことから、これを母株として苦味酸を多く含むホップを作出することを目的に、Hokuto Ace と Furano Special を育種した（Figure 7-1）。Hokuto Ace は、雌株の Sorachi Ace と雄株の Saaz を交配して作られ、1995 年に日本で品種登録された（81）。Furano Special も、雌株の Sorachi Ace と雄株の USDA 19058 を交配して作られ、2007 年に日本で品種登録された（82）。

第2章で Sorachi Ace ホップのビールから geranic acid を同定し、第4章では 17 のホップ品種を比較した結果、Sorachi Ace ホップでは geranic acid の含有量が特異的に高いことを見出した。そして第3章では官能評価的アプローチにより geranic acid 自体は香りの強度が弱く、ほとんど香りを感じないものの、他のホップ由来香気成分がもつ香りを閾値以下の含有量であってもエンハンスし、Sorachi Ace ビールの品種特有の香りを形成していることを明らかにした。

ここまでの研究において、他の植物の研究事例（55）を参考に、ホップ球果中の geraniol 類縁体の生合成経路を推察している。すなわち、geraniol はまず酸化されて geranial となり、続いて geranic acid に酸化される。最後に geranic acid はエステル化されて methyl geranate となる。geranic acid は植物ではレモングラス、ショウガ、レモン精油、トマト、ワイン用ブドウにも含まれており（55, 56, 58-63）、また他の植物の例として、カヤツリグサ属の一種であるコゴメカヤツリ（*Cyperus iria*）では farnesol から methyl farnesoate への生合成経路を持っていることが報告されている（55）。farnesol（C15）と geraniol（C10）は、構造が似ていることから両方ともこの反応経路に従うと想定されており、ホップ精油中には methyl geranate が存在することからホップにもこの生合成経路が存在していると推察した。そして、第4章で他のホップ品種で醸造したビールでは methyl geranate の濃度が高かったのに対し、Sorachi Ace ビールには微量しか検出されなかったことから、Sorachi Ace ホップにおける geranic acid の蓄積メカニズムとして、Sorachi Ace のホップ球果では、geranic acid から methyl geranate への生合成が抑制されている可能性があるという仮説を立てた。

収穫日が果実の品質に与える影響は、ホップを含むさまざまな植物種で研究されている。例えば、「late harvest」という用語は、ワイン醸造の分野では通常よりも遅くブドウを収穫す

ることを指し、そうすることで甘いワインを作ることができる。これは、収穫を遅らせると、ブドウの糖度が高まるからである。ホップ科学では、ホップが最適な収穫時期を過ぎて収穫されると、ホップ球果の収量が減少することがよく知られている (83)。また、一般的な最適収穫時期よりも遅く収穫されたホップでは、乾物含有量が増加して収穫時にホップ球果がもろく崩れ易くなり、収量が減少する (84)。一方、ホップの精油は収穫時期が遅れるにつれて増加し続けることが知られているが (85-90)、ホップ中の α 酸の含有量はホップ中の精油と比較して、もっと早くに最大含量に達すると言われている (83, 88-91)。含硫化合物、特に dimethylsulfide や *S*-methyl thioisovalerate などのネガティブな風味を持つ化合物は、ホップの収穫日が遅れると増加することが示されている (92)。また近年、Lafontaine らと上本らは、特定の揮発性チオール含有量は収穫時期を遅らせると増加することを報告している (89, 93)。特に、3-sulfanyl-4-methylpentan-1-ol の含有量は、収穫時期を遅らせた Furano Beauty ホップ、Furano Magical ホップ、Cascade ホップで通常の収穫時期のものに比べ数倍に増加することが観察された (93)。

本研究では、Sorachi Ace の geranic acid に注目し、その娘品種である Hokuto Ace と Furano Special の geranic acid 含有量を調査した。また、これら 3 品種と他の 5 品種のホップを同じ試験圃場で栽培し、収穫時期を遅らせることでホップ球果中の geranic acid と一連の類縁体の含有量の変動を確認し、geraniol 類縁体の生合成について推察した。

7-2. 実験方法

7-2-1. 試料

7-2-1-1. ホップ

本章の収穫試験で用いるホップは、Table 7-1 に示すように 8 種類のホップ品種を選択した。日本におけるホップ球果は通常、開花後 45 日 (45 days after flowering ; DAF) で収穫する。本研究では、上本らの研究 (93) にならい、45 DAF から 85 DAF の間に収穫したものを試験サンプルとした。Sorachi Ace、Hokuto Ace、Furano Special はそれぞれ 45、55、65、75、85 DAF で収穫され、Hallertauer Tradition (HTR)、Saaz、Cascade、Columbus、Magnum はそれぞれ 45 および 65 DAF に収穫した。各ホップは北海道にある試験圃場で 2018 年に栽培・収穫した。

ホップサンプルの調製方法についても上本らの方法に従って実施した (93)。各 10 本のホップから収集したホップ球果を水分含有量が約 10 %になるまで 60°Cで熱風乾燥し、各々約 7 kg の乾燥ホップを調製した。乾燥後、ホップをカッターミル (ZM200、Verder Scientific 社製) を使用して 0.5 mm メッシュで 15,000 rpm で粉碎し、真空包装後、分析するまでマイナス 20°Cで保管した。

7-2-1-2. ホップの熱水抽出

ホップの熱水抽出サンプルを調製するにあたり、第 4 章で用いたホップの熱水抽出サンプルの調製方法を参考に、スケールダウンした改良法を採用した。ホップ抽出物サンプルの調製には、Table 7-1 に記載されているすべてのホップを使用した。抽出液として、クエン酸一水和物 (0.05 M) とクエン酸三ナトリウム (0.05 M) からクエン酸バッファー (0.05 M、pH 5.5) を調製した。粉碎したホップサンプル 1 g を 200 mL 三角フラスコに入れ、0.05 M クエン酸バッファー 50 mL を加えた。全重量を測定した後、三角フラスコにアルミホイルを被せ、105°Cで 30 分間オートクレーブした。常温まで戻した後、蒸発した水分量を補正し、ホップ抽出物を、ブフナーロートを使って吸引しながらろ紙 (Advantech No. 5B) でろ過した。このろ液をホップ熱水抽出サンプルとし、香気成分の定量に用いた。本抽出操作は n=2 で実施し、抽出サンプルは分析するまで冷凍保管した。

7-2-1-3. 試薬

標準物質: geranic acid (>85%、mixture of isomers)、myrcene (>90 %) は Merck 社製 (Sigma-Aldrich) を、linalool (>96%)、 α -terpineol (>95%)、 β -citronellol (>95 %)、geraniol (>97%)、nerol (>98%)、citral (>98%、mixture of isomers)、および benzyl acetate (>99%) は、東京化成工業 (東京、日本) 社製を、methyl geranate (>94%、mixture of isomers) は、Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) 社製を用いた。

その他の化学薬品: クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム、塩化ナトリウム、およびリン酸は、富士フイルム和光純薬（大阪、日本）から購入した。

7-2-2. 方法

7-2-2-1. 苦味酸（ α 酸）の分析

ホップサンプル（Table 7-1）の苦味酸は、分光光度計（U-2900、日立ハイテク、東京、日本）を使用して、ASBC 分析法ホップ 6（94）に従って分析した。

7-2-2-2. 各香気成分の定量のための GC-FID による標準試薬中の純度及び異性体比率決定と SPME-GC-MS による香気成分の定量

本章では、第 5 章と同じ 11 成分のホップ由来香気成分について定量を行った。標準試薬の純度及び異性体比率の決定と、SPME-GC-MS による定量は第 5 章 5-2-2-1 に従って分析した。ただし、7-2-1-2 のホップ熱水抽出サンプルは、4-2-1-2 のホップ熱水抽出サンプルと比較して 10 倍濃く調製されている。そこで、本研究で定量に用いているビール中の定量時の検量線と同じ範囲で定量するため、7-2-1-2 のホップ抽出サンプルを 10 倍希釈し、さらに希釈サンプル 8 mL に対してエタノール 400 μ L を添加して分析に供した。定量イオン、検量線の範囲、および参照化合物中の異性体の比率は、Table 2-2 及び Table 3-1 と同じ値を採用した。

7-3. 結果

7-3-1. 遅摘みのホップの外観

異なる DAF で収穫したホップ球果の写真を Figure 7-2 に示した。ホップ品種によっては、収穫時期が遅くなるにつれて色が徐々に緑から茶褐色に変化した。

7-3-2. 収穫日がホップ球果の α 酸含有量に与える影響

α 酸含有量は、収穫日が遅くなるにつれ、Sorachi Ace では 9.7 % から 7.9 % に、その娘品種である Hokuto Ace では 7.6 % から 5.1 % に減少し、同様の減少は Magnum ホップでも見られた。一方、Furano Special、HTR、Saaz、Cascade、Columbus ホップでは、収穫時期の違いによる α 酸含有量の大きな変化は見られなかった。結果を Table 7-2 にまとめた。 α 酸が減少するケース、あまり変化がないケースいずれもあることは、これまでもいくつかの報告がある (83, 86-89, 93)。

7-3-3. ホップ球果の熟成によるホップ由来香気成分の挙動

第 4 章において、Sorachi Ace ホップには他のホップ品種と比較して非常に高い濃度の geranic acid が含まれていることを明らかにした。本章では、遅摘み試験に用いるホップとして、Sorachi Ace に加えて Sorachi Ace の娘である Hokuto Ace と Furano Special に着目した。

(Hokuto Ace 及び Furano Special は過去の分析において、Sorachi Ace ほどではないが、ゲラン酸を検出することを確認済み。) またその他代表的なホップ品種として、HTR、Saaz、Cascade、Columbus、Magnum ホップも比較対象とした。Table 7-3 に Sorachi Ace 香気に関する本研究で注目しているホップ香気成分の、各収穫日の定量値を示した。また、仮説の段階にあるホップ球果の geraniol から methyl geranate への生合成経路に沿って、収穫時期を遅らせることによるこれらの成分の挙動を比較しやすいように、geraniol から geranial、geranic acid、そして最終的に methyl geranate に至る生合成経路を Figure 7-3A (Figure 4-1 と同じ) と対となるように、geraniol 類縁体の経時変化のグラフを Figure 7-3B に示した。収穫期間が遅くなるにつれて各香気成分の濃度は変化し、その挙動の傾向はホップ品種間において違いが見られた。

45 DAF サンプルでは、Sorachi Ace とその娘品種である Hokuto Ace と Furano Special の geraniol の濃度が、他の 5 つのホップ品種よりも高くなった。linalool の濃度は、Sorachi Ace、Hokuto Ace、HTR、Cascade、Columbus、Magnum ホップで近いレベルであったが、Furano Special と Saaz ホップではそれらの品種より低かった。nerol と α -terpineol の含量が低レベルであったことと、 β -citronellol はどのホップからも検出されなかったことは、これまでの報告と一致している (32, 35)。geranial は Sorachi Ace と Hokuto Ace でのみ定量可能なレベルで検出され、他の品種では微量レベルであった。geranic acid は Sorachi Ace とその娘品種でのみ検出された。Sorachi Ace は 45 DAF サンプルで 83 mg/kg の geranic acid を含んでいたが、Hokuto Ace と Furano Special はそれぞれ 54 と 14 mg/kg を含んでいた (Table 7-3)。

2つの娘品種は Sorachi Ace よりも低い geranic acid レベルを示したが、Sorachi Ace の geranic acid 蓄積の可能性はこれらの娘ホップに受け継がれていると推察された。

収穫時期である 45DAF から 85DAF に着目すると、これら 3 品種の geraniol と geranial 含有量は収穫が遅れるにつれて減少する傾向にあった。対照的に、geranic acid のレベルは Sorachi Ace で 83 から 141 mg/kg へ、Hokuto Ace で 54 から 119 mg/kg へ、Furano Special で 14 から 25 mg/kg へ増加した。geranic acid の蓄積が高い Sorachi Ace と Hokuto Ace では、methyl geranate は DAF が進んでも微量レベルにとどまり、収穫時期による影響はほとんどなかった。同様に geranic acid の蓄積が見られる Furano Special では、前の 2 品種と少し異なり、methyl geranate は収穫の遅れとともにわずかに増加した。そして methyl geranate の増加傾向は、代表的なホップ品種のうち、HTR、Columbus、Magnum でも観察された (Figure 7-3B)。今回、研究対象としたホップ品種のうち、その他代表的なホップ品種は geranic acid から methyl geranate への変換が認められ、geranic acid はほぼ検出されない、もしくは trace レベルであったのに対し、Sorachi Ace と Hokuto Ace では前述の通り、methyl geranate は全期間で微量にとどまり、収穫時期が長くなるにつれて geranic acid が増加していく傾向が認められた。この結果は、geranic acid から methyl geranate へのエステル化が進んでいないため geranic acid が蓄積されるのではないか、という Sorachi Ace における geranic acid 蓄積のメカニズムに関する仮説を裏付けている。

Figure 7-3 に示すように、geraniol 類縁体は、低 geraniol ホップと見なされる HTR と Saaz にも非常に低いレベルで存在する (32, 35)。Cascade、Columbus、Magnum では geranic acid はほぼ検出されなかったが、geraniol、geranial、methyl geranate のレベルは 45 DAF から 65 DAF にかけて増加する場合が多かった。対照的に、Sorachi Ace とその娘品種では、収穫期間が長くなるにつれて geraniol 含有量が徐々に減少した。つまり、この結果は、ホップ球果におけるこれらの化合物の生合成が geranic acid の蓄積によって抑制される可能性があることを示唆していると思われる。

7-4. 考察

本研究で着目している Sorachi Ace ホップ中の geranic acid は、非常に興味深い特性を持ち、香気成分でありながら、自身は香らず、共存するテルペン類等のホップ由来香気成分の香りをエンハンスすることで、Sorachi Ace ビールの香りの形成に寄与することが明らかとなった。そしてさまざまな品種を用いてホップ中の geranic acid 含量を調査したところ、Sorachi Ace ホップは 17 のホップ品種の中で最も高濃度で geranic acid を含んでいた。ここまでの研究では、他の植物に存在する生合成経路を参考とした仮説として、以下の geranic acid 類縁体の生合成経路を考えた。すなわち、geraniol が酸化されて geranial となり、さらに酸化され、geranic acid が生成、それがエステル化されて methyl geranate が生成する。そして通常のホップでは methyl geranate への生成が優先的に進むが、Sorachi Ace ホップはその生成が進みにくく、geranic acid が蓄積されるのではないかと考えた。

これまでに上本らはフレーバーホップである Furano Magical や Furano Beauty を遅摘みすることで、その特徴香に寄与することが知られているチオール 3S4MP の含量が増加することを新しい知見として報告している (93)。そこで、Sorachi Ace ホップも同様に遅摘みすることで、品種特異的な化合物として見出した geranic acid や類縁体の挙動に関して新たな知見が得られると予想した。

本試験では、45 日から 85 日まで段階的に収穫したホップ球果中の、geraniol 誘導体の濃度を定量し、その挙動を観察した。その結果、Sorachi Ace ホップは収穫が遅くなるにつれて、仮説の生合成経路では geranic acid の上流に位置すると推察している geraniol や geranial の濃度は減少し、geranic acid は増加した。そしてその下流に生成するであろう methyl geranate はほとんど検出が認められなかった。これら 4 成分の挙動は品種によって違いがみられ、代表的なホップ 5 品種は geranic acid がほとんど検出されず、methyl geranate は増加するものが多かった。これは、ホップ球果中の生合成経路で geranic acid から methyl geranate への反応が優先的に進む、という仮説を裏付ける結果であった。なお、Sorachi Ace ホップを母にもつ娘ホップ 2 品種の中でも、Hokuto Ace では Sorachi Ace とほぼ同じ挙動で、methyl geranate がほとんど検出されなかったのに対して、Furano Special では定量できる程度の methyl geranate が検出され、これら 4 成分の挙動は異なっていた。

これまでの報告で、geranic acid は、植物ではレモングラス、ショウガ、レモン精油、トマト、ワイン用ブドウにも含まれていることが知られている (55, 56, 58-63)。カヤツリグサ属の一種コゴメカヤツリ (*Cyperus iria*) においてはセスキテルペンの farnesol から methyl farnesoate への生合成経路があることが報告されている (55)。セスキテルペンの farnesol (C15) とモノテルペンの geraniol (C10) は、構造が似ていること、そしてホップ中には methyl geranate が存在することからホップ植物にもこの生合成経路があると推察されたことから、前述の仮説を考えた。一連の予測される geraniol から methyl geranate までの生合成経路を

Figure 7-3A に示したが、ホップを遅摘みし、ホップ内での geraniol から methyl geranate への生合成経路の順に、各化合物の挙動を確認した結果、この生合成経路の仮説を支持する結果が得られた。そして Sorachi Ace では geraniol から geranic acid までは反応が進み、何らかの原因で methyl geranate は生成されず、geranic acid が蓄積すると考えられる。Figure 7-3A の経路中に記載した酵素についても、カヤツリグサ属において報告されている farnesol からの生合成経路 (55) に示されている酵素名を参考にしたものである。本推察の生合成経路において、Sorachi Ace ホップ球果中の geranic acid の蓄積の原因として、geranic acid から methyl geranate への methyl transferase の活性が弱い、もしくは何らかの理由で発現が少ない可能性が考えられる他、一度は methyl transferase によって通常のホップ同様に変換は起こるが、esterase 等によって geranic acid に再度分解することで、見かけ上、methyl geranate の生合成が起こらず、geranic acid が蓄積している可能性も考えられる。これまでに、ホップについて、methyl transferase が存在することを報告した例はないが、esterase が存在し、dry-hopping によってビール中に移行したホップ由来の esterase が、ビール保管中にエステル類を分解するという報告はある (95, 96)。今後、Sorachi Ace ホップ球果中の methyl transferase や esterase を含めた各反応を触媒する酵素の発現や活性を確認することで geranic acid の蓄積メカニズムがより詳細に明らかになることが期待される。

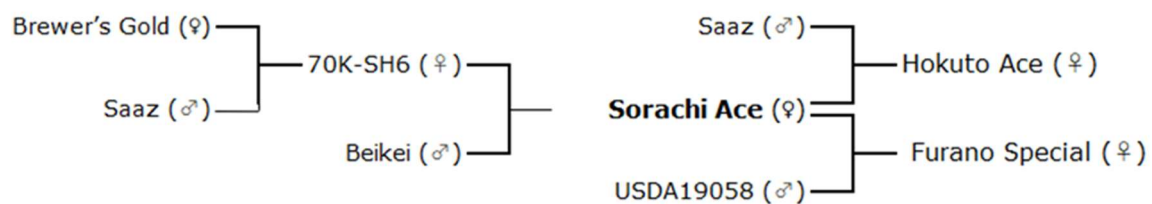


Figure 7-1. Sorachi Ace と娘ホップの系譜

Table 7-1. ホップ遅摘み試験の試験品種

hop variety	crop year	origin	DAF sample
Sorachi Ace	2018	Japan	45, 55, 65, 75, 85
Hokuto Ace	2018	Japan	45, 55, 65, 75, 85
Furano Special	2018	Japan	45, 55, 65, 75, 85
Hallertauer Tradition (HTR)	2018	Germany	45, 65
Saaz	2018	Czech Republic	45, 65
Cascade	2018	U.S.	45, 65
Columbus	2018	U.S.	45, 65
Magnum	2018	Germany	45, 65

DAF, days after flowering

variety	DAF ^a				
	45	55	65	75	85
Sorachi Ace					
Hokuto Ace					
Furano Special					
HTR ^b		-		-	-
Saaz		-		-	-
Cascade		-		-	-
Columbus		-		-	-
Magnum		-		-	-

^aDAF, days after flowering; ^bHTR Hallertauer Tradition.

Figure 7-2. 収穫日ごとのホップ球果外観

Table 7-2. 試験ホップ中の苦味酸

hop variety	Sorachi Ace		Hokuto Ace		Furano Special		HTR ^b		Saaz		Cascade		Columbus		Magnum	
	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)	α acid (%)	β acid (%)
45	9.7	5.4	7.6	7.1	15	6.8	3.4	1.9	2.3	2.8	4.1	3.7	6.7	2.5	9.7	4.0
55	9.8	5.6	7.1	6.4	14	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DAF ^a 65	11	6.4	6.0	5.5	13	6.6	3.9	1.9	2.5	3.0	3.8	4.0	6.3	2.4	7.2	3.3
75	7.4	5.2	5.4	5.5	15	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	7.9	5.4	5.1	5.2	14	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aDAF, days after flowering; ^bHTR, Hallertauer Tradition

Table 7-3. 試験ホップ中の geranic acid 関連成分の定量値

hop variety	DAF ^a	alcohols					aldehydes		carboxylic acids		esters	
		geraniol (mg/kg)	nerol (mg/kg)	linalool (mg/kg)	α -terpineol (mg/kg)	β -citronellol (mg/kg)	geranial (mg/kg)	neral (mg/kg)	geranic acid (mg/kg)	neric acid (mg/kg)	methyl geranate (mg/kg)	methyl nerolate (mg/kg)
Sorachi Ace	45	29	0.93	20	1.7	nd	0.97	tr	83	nd	0.16	nd
	55	14	0.73	20	1.3	nd	0.81	tr	126	tr	tr	nd
	65	5.6	0.61	22	1.6	nd	0.62	tr	114	tr	tr	nd
	75	2.3	tr	20	1.3	nd	0.51	tr	108	tr	tr	nd
	85	2.9	0.55	16	1.5	nd	tr	tr	141	tr	tr	nd
Hokuto Ace	45	18	0.55	15	1.1	nd	0.85	tr	54	nd	tr	nd
	55	10	0.56	20	1.2	nd	0.99	0.6	93	nd	tr	nd
	65	5.4	tr	23	1.3	nd	0.74	tr	125	tr	tr	nd
	75	2.9	tr	20	1.2	nd	0.63	tr	147	tr	nd	nd
	85	2.2	tr	19	0.92	nd	tr	tr	119	tr	nd	nd
Furano Special	45	15	0.68	7.6	1.8	nd	tr	tr	14	nd	0.37	nd
	55	9.2	0.76	17	2.3	nd	tr	tr	16	nd	0.51	nd
	65	4.7	0.53	14	2.0	nd	tr	tr	16	nd	0.36	nd
	75	2.7	0.57	19	2.2	nd	tr	tr	25	nd	0.51	nd
	85	4.8	0.90	15	2.6	nd	tr	tr	25	nd	0.57	nd
HTR ^b	45	3.4	tr	16	1.0	nd	tr	nd	nd	nd	tr	nd
	65	1.7	tr	30	1.5	nd	tr	tr	nd	nd	0.36	nd
Saaz	45	4.1	0.57	6.0	0.78	nd	tr	tr	nd	nd	0.27	nd
	65	3.1	0.55	5.5	0.83	nd	tr	tr	nd	nd	0.29	nd
Cascade	45	6.2	tr	13	1.3	nd	tr	tr	nd	nd	0.22	nd
	65	8.1	tr	20	2.2	nd	tr	tr	nd	nd	0.19	nd
Columbus	45	8.4	tr	14	1.8	nd	tr	nd	nd	nd	0.24	nd
	65	13	tr	36	3.2	nd	tr	tr	nd	nd	0.49	nd
Magnum	45	6.6	0.81	12	2.0	nd	tr	nd	nd	nd	0.43	nd
	65	9.1	1.9	24	2.7	nd	0.56	tr	tr	nd	1.2	nd

nd, not detected; tr, trace; ^aDAF, days after flowering; ^bHTR, Hallertauer Tradition

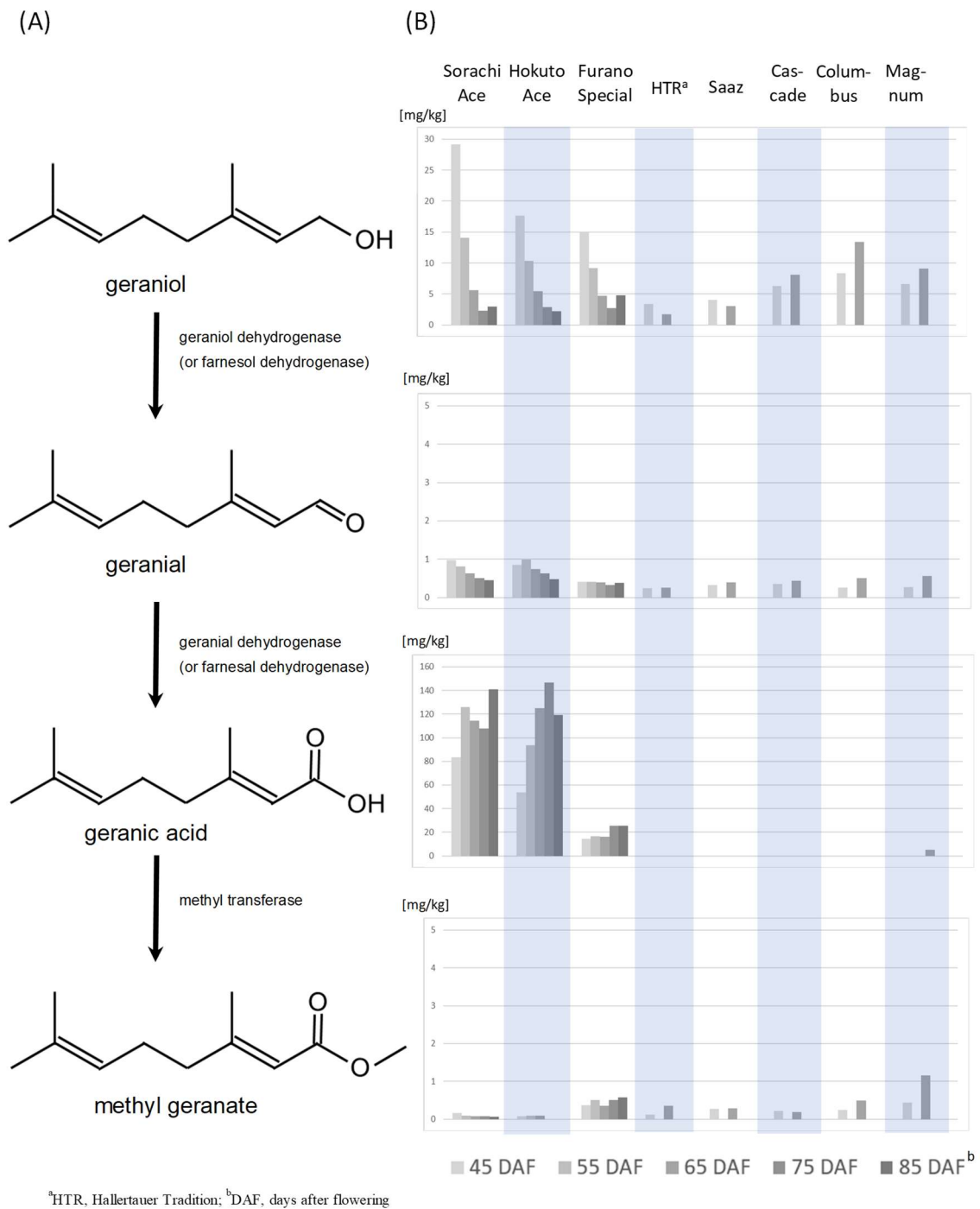


Figure 7-3. (A)推察される geraniol, geranial, geranic acid, methyl geranate の生合成経路
(B)遅摘みホップ中の geranic acid 関連成分の挙動

第8章 総合考察

ホップはビールに特有の苦味と香りを付与し、それ以外にもビールの清澄性や泡持ちを向上させ、またビールに抗菌性を与える等の特性があり、きわめて重要な原料である。近年、世界的なクラフトビールのブームを背景に、より香りに特徴のあるホップの育種が行われている。Sorachi Ace は、サッポロビール社が育種・品種登録した日本生まれのホップであり、ビールに複雑な香りを付与する。Sorachi Ace ビールの香りは、レモングラス様、松様、ディル（ハーブ）様、シトラス、グリーン、ウッディ等と表現される。これまで多くの研究者の取り組みにより、様々なホップの品種特有香に寄与する成分が明らかになってきているが、Sorachi Ace の香りに寄与する香気成分は不明なままであった。

本研究では、Sorachi Ace ホップの特徴的な香気に寄与する香気成分を探索し、その成分が Sorachi Ace ホップの香気にどのように影響しているのかについて感性科学手法を用いて詳細に調査した。そして香気成分としての特性、醸造工程中での挙動についても調査した。さらにホップ中のその成分の生合成経路についても推察した。

総合考察では、第1章序論で示した研究目的に照らして、本研究の結果について、ビール香気研究における意義について概説する。

■Sorachi Ace の品種特有香に寄与する香気成分を探索すること

第2章で品種特有香を探索するため、既存のアプローチである匂いかぎ分析（GC-O/MS）に加え、SPME-GC-MS による差分解析を実施した。そして Sorachi Ace ビール中より寄与成分として geranic acid を見出した。

■探索した香気成分の特徴や相互作用について確認して、Sorachi Ace を使ったビールの品種特有香の形成メカニズムを解明すること

第2章では geranic acid と、linalool 及び geraniol を加えたトライアングル試験を、第3章では geranic acid の閾値の推定と、詳細なアディクション試験による官能検査を実施した。geranic acid はビール中の閾値が 5.7 mg/L であり、Sorachi Ace ビール中の geranic acid 含量は閾値以下であったが、ホップ由来香気成分のテルペン類と相互作用し、それらの香りをエ nhance することで、Sorachi Ace ビールの香りを形成しているメカニズムを解明した。

第6章では他のホップ品種とのブレンドによる、ビールの香気への影響を調査し、特定の品種とのブレンドによる双方の特徴を活かした特徴的なビール醸造の可能性を見出した。

■Sorachi Ace の特有香成分の特異性、工程挙動、生合成経路を明らかにすること

第4章でホップ中やビール中の geranic acid 含量を測定したところ、Sorachi Ace ホップ及び Sorachi Ace ビールには顕著に高い濃度の geranic acid が含まれていた。そして第5章でビールの醸造工程中の geranic acid とその関連成分の挙動を調査し、他の香気成分は醸造工程

中に濃度が減少するが、geranic acid は液中で解離することで、原料のホップから製品ビールへ高い濃度のまま残存し続けることを明らかにした。さらに Sorachi Ace ホップではなぜ、geranic acid が特異的に多く含まれるのか解明するため、第 7 章で遅摘みホップの球果中の geranic acid 及び関連成分の変動を調査した。ホップ中での寄与成分の生合成経路を推察し、通常のホップでは geranic acid からメチルエステル化されて methyl geranate が優先的に生成し、geranic acid はほとんど含まれないが、Sorachi Ace ホップではメチルエステル化が抑制され、geranic acid が蓄積する可能性が示された。

本研究においては、Sorachi Ace ビールの品種特有香に寄与する成分を探索し、geranic acid という非常にユニークな特性をもつ香気成分を見出した。第 2 章、第 3 章、第 5 章、第 6 章では geranic acid や、Sorachi Ace ホップビールの官能検査によって、geranic acid は単独ではほとんど香りのしない化合物であるが、ビールに含まれる量が閾値以下であっても、エンハンサーとして機能することで全体の香りに寄与し、Sorachi Ace ビールの品種特有香を形成しているというメカニズムを推察した。この知見は、ホップ育種やビール醸造における「香気設計」の新たな指針となり、従来は注目されていなかった微量成分を含め、ホップ全体の成分プロファイルを総合的に活かした香りづくりへと展開できる。とりわけ、Sorachi Ace のような品種特性の解明および活用に資するものであり、今後の製品価値向上にも寄与すると期待される。

一方で、本研究によって Sorachi Ace ビールの特徴的な香りが完全に解明できたわけではなく、Sorachi Ace と他のホップブレンドによるネガティブ効果に対する検証や、geranic acid を含むホップ中での生合成経路に関わる酵素の発現や活性の調査等も必要と考える。また Sorachi Ace ホップは crop やテロワール（生育地の地理、地勢、気候等による特徴）によっても香りが違うとも言われており、まだ Sorachi Ace ホップの香気研究にはまだ続けていく意義があると考えている。

これまで、品種特有香に寄与する成分＝「閾値が低い」かつ「匂いかぎ分析でしか見つからない」かつ「それ自身が品種特有香を形成する」というのが通説であったが、geranic acid はどれにも当てはまらない稀有な成分であり、本研究成果は、香気成分研究において従来注目されてこなかった“香らない成分”や“閾値以下の成分”の役割を再評価し、新たな効果や機能を見出す契機となりうると考える。

総括

本博士論文では次のことを明らかにした。

1. 本研究は、Sorachi Ace ホップがビールに与える香りの複雑さとその特徴的な香気成分の探索に焦点を当てている。これまでに多くの研究者がホップやビール中の香気成分を調査してきているが、Sorachi Ace の品種特有の香りに寄与する主要な香気成分は不明でのままであった。60 m の WAX 系カラムを用いた SPME-GC-MS による差分解析により Sorachi Ace にのみ含まれる香気成分として geranic acid を発見した。二次元ハートカットによる匂い分析でも geranic acid の香りは認識できなかった。しかしながらトライアングル試験の官能検査によって、geranic acid 単独ではビールの香りへの影響は弱いものの、linalool や geraniol と組み合わせることで有意に違いが認識され、これらの香りを増強する効果があることが確認された。
2. 香気成分としての geranic acid の特徴を把握することを目的とし、その閾値とホップ由来香気成分との相互作用を調査した。geranic acid の香調はウッディ、ハーバル、フローラル、オイリーと判明したが、その強度は非常に弱く、閾値は炭酸水中で 2.2 mg/L、ビール中で 5.7 mg/L と推定された。アディクション試験の官能検査の結果、geranic acid とホップ由来テルペン類を添加したモデルビールにおいて、フラワリーやレモン様の官能特性が有意に高まった。よって、geranic acid は単独ではビールの香りにほとんど影響を及ぼさないが、閾値未満の濃度であってもホップ由来香気成分のテルペン類との相互作用により、Sorachi Ace ビールの香りを形成するユニークな特性を有することが結論付けられた。
3. 17 のホップ品種及び様々なホップ品種を用いて醸造したビール 13 種類中の geranic acid 含量を調査した。調査対象の香気成分は、geranic acid と構造が近いテルペン類計 8 成分と、ホップの香りの形成に重要な linalool の合計 9 成分とした。geranic acid は、Sorachi Ace ホップ中及び Sorachi Ace ビール中で最も高い濃度で含まれていた。他のホップ品種では Citra 及び Ekuanot で定量可能な濃度で検出されたものの、ビール中では Mosaic の trace を除いて、検出されなかった。また他のホップと比較して、Sorachi Ace ホップ中では methyl geranate の含有量が低いことも明らかとなった。これらの結果から、geranic acid は Sorachi Ace ホップに特異的に多く含まれ、製品ビールにも残存することが明らかとなった。
4. Sorachi Ace ホップに含まれる geranic acid とその類縁体(geraniol、geranial、methyl geranate)のビール醸造工程中の挙動を調査した。Sorachi Ace ホップを含む 4 品種のホップを使用し、

late-hopping で香り付けしたビールを発酵工程中の各段階でサンプリングし、geranic acid 及び関連成分の挙動を SPME-GC-MS で測定した結果、geranic acid は Sorachi Ace ホップを使用したビールでのみ有意に検出され、発酵過程でほとんど減少しなかった。また、ホップ添加のタイミングを変えた場合 (kettle-hopping、late-hopping、dry-hopping)、kettle-hopping では多くの香気成分が煮沸によって揮散したが、geranic acid は高濃度で残存していた。これは geranic acid がカルボキシ基を含むため、部分的にイオン化し、煮沸中でも揮発しにくいと考えられた。官能検査では、late-hopping と dry-hopping のビールは、kettle-hopping のビールに比べて、フラワリー、フルーティ、トロピカル、レモン様の官能特性が有意に高く評価されたことから、geranic acid と他のホップ由来の香気成分との共存による Sorachi Ace ビールの品種特有香の形成メカニズムを検証する結果となった。

5. Sorachi Ace ホップと他のホップ品種をブレンドした際のビールの香りへの影響を調査した。Sorachi Ace と Kazbek、Hallertau Blanc、Cascade の組み合わせでは、香りが低下する傾向がみられた。一方、Citra や Mosaic とのブレンドでは、特にトロピカルな香りが増加した。さらに、Mosaic 単独のビールと比較し、Sorachi Ace と Mosaic を組み合わせた試醸ビールでは、レモン様とグリーンの官能特性が増加した。これらの結果より、Sorachi Ace と特定のホップ品種を組み合わせることで、双方の特徴を活かしたビールを醸造できることが示唆された。

6. Sorachi Ace とその娘品種である Hokuto Ace、Furano Special、および他の代表的なホップ品種を用いて、収穫時期を遅らせた際の geranic acid とその類縁体である geraniol、geranial、methyl geranate の含有量の変化を観察した。その結果、Sorachi Ace では、収穫が遅くなるにつれて geraniol と geranial の含有量は減少し、geranic acid は増加した。一方、methyl geranate はほとんど検出されなかった。これらの化合物の挙動から、Sorachi Ace ホップは geranic acid を蓄積しやすい特異的な品種であることが推察された。

本研究成果は、これまでの「品種特有香へ寄与する成分は、匂いかぎ分析で匂いを検出し、閾値が低く、それ自身が香って全体の香りへ影響する成分」という常識を覆し、既知成分でこれまでは香りや味に寄与しないと思われていた成分であっても、新たな効果や機能をもつ可能性を示唆するものである。今後の香気研究における視点を広げ、品種特有香をより立体的に理解するための足がかりとなる知見を示すものである。

謝辞

本論文はサッポロビール（株）価値創造フロンティア研究所において行ったものであり、その間、終始ご指導ご鞭撻いただいた蛸井潔博士に対して深く感謝の意を表します。

また、本研究の取りまとめに当たり適切なご指導、ご助言を賜った岡山大学大学院環境生命自然科学学域研究科の清田洋正教授に感謝の意を表します。

さらに、本研究の実施に当たり、ご理解とご助言をいただいた同社の谷川篤史氏、土屋陽一博士、中村剛氏、中山康行氏、松本一郎氏、金子剛氏、またサンプルの収集や試験醸造、実験の一部を共同で行っていただいた同社の糸賀裕氏、高澄耕次氏、上本允大氏、並びに官能検査パネルや分析でご協力いただいた方々にも感謝いたします。

参考論文

- (1) **Sanekata, A.**; Tanigawa, A.; Takoi, K.; Nakayama, Y.; Tsuchiya, Y.: Identification and Characterization of Geranic acid as Unique Flavor Compound of Hops (*Humulus lupulus* L.) Variety Sorachi Ace. *J. Agric. Food Chem.*, 2018, **66(46)**, 12285-12295.
- (2) Tanigawa, A.; **Sanekata, A.**; Takoi, K.; Takazumi, K.; Matsumoto, I.; Nakayama Y.: Hypothesis of synergy between Sorachi Ace-derived geranic acid and various flavour compounds contributing to characteristic beer aroma. *BrewingSci.*, 2022, **75(11/12)**, 120-132.
- (3) **Sanekata, A.**; Tanigawa, A.; Takoi, K.; Nakayama, Y.; Tsuchiya, Y.: Interesting Behavior of Geranic Acid during Beer Brewing Process: Why Could Geranic Acid Remain at Higher Level only in the Beer using Sorachi Ace Hops? *J. Agric. Food Chem.*, 2023, **71(47)**, 18489-18498.
- (4) **Sanekata A.**; Tanigawa A.; Takoi; K.; Uemoto M.; Kaneko T.; Tsuchiya Y.: Behavior of geranic acid and related compounds during hop cone maturation comparing between Sorachi Ace and her daughter hops *J. Agric. Food Chem.*, 2025, **73(9)**, 5477-5484.

引用文献

- (1) 日本醸造協会：「醸造物の成分」ビール 1999, pp 180-289.
- (2) 森義忠：「ホップ」第1章 ホップとその近縁種の植物学的特徴 1995, pp 1-92.
- (3) 森義忠：「ホップ」第2章 ホップの科学 1995, pp 93-208.
- (4) 日本醸造協会：「ビールの基本技術（三版改訂）」第2章 ホップ 2010, pp 18-28.
- (5) Foster, A.; Schmidt, R.: The characterization and classification of hop varieties.
Brauwelt International 1994, II, 108-124.
- (6) Perpète, P.; Mélotte, L.; Dupire, S.; Collin, S.: Varietal discrimination of hop pellets by essential oil analysis I. Comparison of fresh samples. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1998, **56**, 104-108.
- (7) Lermusieau, G.; Collin, S.: Varietal discrimination of hop pellets. II. Comparison between fresh and aged samples. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2001, **59**, 39-43.
- (8) Steinihaus, M.; Schieberle, P.: Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. cultivar spatter select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, 1776-1783.
- (9) Fritsch, H.T.; Schieberle, P.: Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer. *J. Agric. Food Chem.* 2005, **53**, 7544-7551.
- (10) Kishimoto, T.; Wanikawa, A.; Kagami, N.; Kawatsura, K.: Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2005, **53**, 4701-4707.
- (11) Kishimoto, T.; Wanikawa, A.; Kono, K.; Shibata, K.: Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**, 8855-8861.
- (12) 松山茂助：「麦酒醸造学」第5章 麦汁の製造 1970, pp 261-330.
- (13) 松山茂助：「麦酒醸造学」第6章 醗酵 1970, pp 331-378.
- (14) 松山茂助：「麦酒醸造学」第7章 ビールの濾過 樽詰 缶詰 1970, pp 379-438.
- (15) Takoi, K.: “Flavor Hops” Varieties and Various Flavor Compounds Contributing to Their “Varietal Aromas”: A Review. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 2019, **56** (1), 113-123.
- (16) Peacock, V. E.; Deinzer, M. L.; Likens, S. T.; Nickerson, G. B.; McGill, L. A.: Floral hop aroma in beer. *J. Agric. Food Chem.* 1981, **29**, 1265-1269.

- (17) Murakami, A. A.; Goldstein, H.; Navarro, A.; Seabrooks, J. R.; Ryder, D. S.: Investigation of beer flavor by gas chromatography-olfactometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2003, **61**, 23-32.
- (18) Eyres, G. T.; Marriott, P. J.; Dufour, J.-P.: Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, 6252-6261.
- (19) Lutz, A.; Kammerhuber, K.; Seigner, E.: New trend in hop breeding at the Hop Research Center Huell. *BrewingSci.-Monatsschr. Brauwiss.* 2012, **65**, 24-32.
- (20) Schönberger, C. Unnachahmliche Noten.: Flavour Hops - Herausstellungsmerkmal Hopfen. *Brauindustrie* 2012, **97**, 28 – 30.
- (21) Hieronymus, S.: A Taste for Hops – Exploring the History and Mystery of Flavor Hops. *All About Beer Magazine* 2013, **34**. <http://allaboutbeer.com/article/flavor-hops/>.
- (22) Beatson, R. A.; Ansell, K. A.; Graham, L. T.: Breeding, development, and characteristics of the hop (*Humulus lupulus*) cultivar 'Nelson Sauvin'. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 2003, **31**, 303-309.
- (23) Graves, I. R.; Brier, M. B.; Chandra, G. S.; Alspach, P. A.: Kettle hop flavour from New Zealand hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Proceedings of the 27th Convention of the Institute and Guild of Brewing; Asia Pacific Section: Adelaide, Australia, 17-22 Mar, 2002* (CDROM).
- (24) Probasco, G.; Varnum, S.; Perrault, J.; Hysert, D.: Citra - a new special aroma hop variety. *Tech. Q. - Master Brew. Assoc. Am.* 2010, **47**, 17 – 22.
- (25) Steyer, D.; Clayeux, C.; Laugel, B.: Characterization of the terpenoids composition of beers made with the French hop varieties: Strisselspalt, Aramis, Triskel and Bouclier. *BrewingSci.-Monatsschr. Brauwiss.* 2013, **66**, 192-197.
- (26) Probasco, G.; Perrault, J.; Varnum, S.; Hysert, D.: Mosaic (HBC369): A new flavor hop variety. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2017, **75**, 6-10.
- (27) Takoi, K.; Tominaga, T.; Degueil, M.; Sakata, D.; Kurihara, T.; Shinkaruk, S.; Nakamura, T.; Maeda, K.; Akiyama, H.; Watari, J.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D. : Identification of novel unique flavor compounds derived from Nelson Sauvin hop and development of new product using this hop. *Proc. 31st EBC Congr.*, 2007; pp 241-251 (CDROM).
- (28) Takoi, K.; Degueil, M.; Shinkaruk, S.; Thibon, C.; Maeda, K.; Ito, K.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D.; Tominaga, T.: Identification and characteristics of new volatile thiols

- derived from the hop (*Humulus lupulus* L.) cultivar Nelson Sauvin. *J. Agric. Food Chem.* 2009, **57**, 2493-2502.
- (29) Takoi, K.; Degueil, M.; Shinkaruk, S.; Thibon, C.; Kurihara, T.; Toyoshima, K.; Ito, K.; Bennetau, B.; Dubourdieu, D.; Tominaga, T.: Specific flavor compounds derived from Nelson Sauvin hop and synergy of these compounds. *BrewingSci.-Monatsschr. Brauwiss.* 2009, **62**, 108-118.
- (30) Takoi, K.; Koie, K.; Itoga, Y.; Katayama, K.; Shimase, M.; Nakayama, Y.; Watari, J.: Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. *J. Agric. Food Chem.* 2010, **58**, 5050-5058.
- (31) Takoi, K.; Itoga, Y.; Koie, K.; Kosugi, T.; Shimase, M.; Katayama, K.; Nakayama, Y.; Watari, J.: Contribution of geraniol metabolism to citrus flavour of beer: Synergy of geraniol and β -citronellol under coexistence with excess linalool. *J. Inst. Brew.* 2010, **116**, 251-260.
- (32) Takoi, K.; Itoga, Y.; Takayanagi, J.; Kosugi, T.; Shioi, T.; Nakamura, T.; Watari, J.: Screening of geraniol-rich flavor hop and interesting behavior of β -citronellol during fermentation under various hop-addition timings. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2014, **72**, 22-29.
- (33) Takoi, K.; Tokita, K.; Sanekata, A.; Usami, Y.; Itoga, Y.; Koie, K.; Matsumoto, I.; Nakayama, Y.: Varietal difference of hop-derived flavour compounds in late-hopped/dry-hopped beers. *BrewingSci.-Monatsschr. Brauwiss.* 2016, **69**, 1 – 7.
- (34) Takoi, K.; Itoga, Y.; Takayangi, J.; Matsumoto, I.; Nakayama, Y.: Control of hop aroma impression of beer with blend-hopping using geraniol-rich hop and new hypothesis of synergy among hop-derived flavour compounds. *BrewingScience-Monatsschr. Brauwiss.* 2016, **69**, 85-93.
- (35) Takoi, K.; Itoga, Y.; Koie, K.; Takayanagi, J.; Kaneko, T.; Watanabe, T.; Matsumoto, I.; Nomura, M.: Systematic analysis of behavior of hop-derived monoterpene alcohols during fermentation and new classification of geraniol-rich flavor hops. *BrewingSci.-Monatsschr. Brauwiss.* 2017, **70**, 177-186.
- (36) Sakuma, S.; Rikimaru, Y.; Kobayashi, K.; Kowaka, M.: Sunstruck flavor formation in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1991, **49**, 162-165.
- (37) Masuda, S.; Kikuchi, K.; Harayama, K.: Determination of lightstruck character in beer by gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2000, **58**, 152-154.

- (38) Kishimoto, T.; Kobayashi, M.; Yano, N.; Iida, A.; Wanikawa, A.: Comparison of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**, 1051-1057.
- (39) Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P.: Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food. Res. Technol.* 1999, **209**, 237-241.
- (40) Steinhaus, M.; Fritsch, H. T.; Schieberle, P.: Quantitation of (*R*)- and (*S*)-linalool in beer using solid phase microextraction (SPME) in combination with a stable isotope dilution assay (SIDA). *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 7100-7105.
- (41) Ullrich, F.; Grosch, W.: Identification of most intense volatile flavour compounds formed during autooxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1987, **184**, 277-282.
- (42) Acree, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G.: The analysis of odor-active volatiles in gas chromatography effluents. In *Analysis of Volatiles*; Schreier, P., Ed.; de Gruyter: New York, 1984; pp 251-267.
- (43) McDaniel, M. R.; Miranda-Lopez, R.; Watson, B. T.; Micheals, N. J.; Libbey, L. M.: Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach, flavor and off-flavors. In *Flavors and Off-flavors*; Charalambous, G., Ed; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1992; pp 23-36.
- (44) Ong, P. K. C.; Acree, T. E.: Gas chromatography/olfactory analysis of lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) *J. Agric. Food Chem.* 1998, **46**, 2282-2286.
- (45) Ong, P. K. C.; Acree, T. E.: Similarities in the aroma chemistry of Gewürstraminer variety wines and lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 1999, **47**, 665-670.
- (46) Sapporo Breweries, Ltd. *Humulus lupulus* L., Sorachi Ace, Japan Variety Registration No. 613; Sapporo Breweries, Ltd.: Shizuoka, Japan, 1984.
- (47) Dresel, M.; Praet, T.; Van Opstaele, F.; Van Holle, A.; Naudts, D.; De Keukeleire, D.; De Cooman, L.; Aerts, G.: Comparison of the analytical profiles of volatiles in single-hopped worts and beers as a function of the hop variety. *BrewingSci. -Monatsschr. Brauwiss.* 2015, **68**, 8-28.
- (48) Kankolongo Cibaka, M.-L.; Gros, J.; Nizet, S.; Collin, S.: Quantitation of selected terpenoids and mercaptans in the dual-purpose hop varieties Amarillo, Citra, Hallertau Blanc, Mosaic, and Sorachi Ace. *J. Agric. Food Chem.* 2015, **63**, 3022-3030.

- (49) Reglitz, K.; Steinhaus, M.: Quantitation of 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) in hops by a stable isotope dilution assay in combination with GCxGC-TOFMS: Method development and application to study the influence of variety, provenance, harvest year, and processing on 4MSP concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 2017, **65**, 2364-2372.
- (50) Cibaka, M.-L. K.; Ferreira, C. S.; Decourrière, L.; Lorenzo-Alonso, C.-J.; Bodart, E.; Collin, S.: Dry Hopping with the dual-purpose varieties Amarillo, Citra, Hallertau Blanc, Mosaic, and Sorachi Ace.: Minor contribution of hop terpenol glucoside to beer flavor. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2017, **75**, 122-129.
- (51) Tokita, K.; Takazumi, K.; Oshima, T.; Shigyo, T.: A new method for analyzing the characteristic flavor of beer using selectable onedimensional or two-dimensional gas chromatography-olfactometry/mass spectrometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2014, **72**, 154-161.
- (52) Peacock, V. E.; Deinzer, M. L.: Fate of hop oil components in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1988, **46**, 104-107.
- (53) Roberts, J. B.: Hop oil I. Preliminary investigations of the oxygenated fraction. *J. Inst. Brew.* 1962, **68**, 197-200.
- (54) Roberts, J. B.; Stevens, R.: Compositions and biogenesis of essential oil of hops. *J. Inst. Brew.* 1962, **68**, 420-427.
- (55) Bede, J.; Teal, P.; Goodman, W.; Tobe, S.: Biosynthetic pathway of Insect Juvenile Hormone III in cell suspension cultures of the Sedge *Cyperus iria*. *Plant Physiol.* 2001, **127**, 584-593.
- (56) Versini, G.; Rapp, A.; Dalla Serra, A.; Pichler, U.; Ramponi, M.: Methyl trans geranate and farnesoate as markers for Gewürztraminer grape skins and related distillates. *Vitis* 1994, **33**, 139-142.
- (57) Morimoto, M.; Kishimoto, T.; Kobayashi, M.; Yako, N.; Wanikawa, A.; et al.: Effects of Bordeaux mixture (copper sulfate) treatment on blackcurrant/muscat-like odors in hops and beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2010, **68**, 30-33.
- (58) Ohno, Y.; Tanaka, S.: On the Constituents of a Chinese Rose Oil. *Agric. Biol. Chem.* 1977, **41**, 399-401.
- (59) Onyenekwe, P.; Hashimoto, S.: The composition of the essential oil of dried Nigerian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Eur. Food Res. Technol.* 1999, **209**, 407-410.
- (60) Davidovich-Rikanati, R.; Sitrit, Y.; Tadmor, Y.; Iijima, Y.; Bilenko, N.; Bar, E.; Carmona, B.; Fallik, E.; Dudai, N.; Simon, J.; Pichersky, E.; Lewinsohn, E.: Enrichment

- of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nat. Biotechnol.* 2007, **25**, 899-901.
- (61) Lamorte, S.; Gambuti, A.; Fenovese, A.; Selicato, S.; Moio, L.: Free and glycoconjugated volatiles of *V. vinifera* grape 'Falanghina7'. *Vitis* 2008, **47**, 241-243.
- (62) Masuda, T.; Odaka, Y.; Ogawa, N.; Nakamoto, K.; Kuninaga, H.: Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**, 597-601.
- (63) Nguyen, H.; Campi, E.; Jackson, W.; Patti, A.: Effect of oxidative deterioration on flavour and aroma components of lemon oil. *Food Chem.* 2009, **112**, 388-393.
- (64) Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Okano, S.; Burr, H. K.: Additive effect of sub-threshold concentrations of some organic compounds associated with food aromas. *Nature* 1963, **200**, 1288-1289.
- (65) Sarrazin, E.; Shinkaruk, S.; Tominaga, T.; Bennetau, B.; Frérot, E.; Dubourdieu, D.: Odorous impact of volatile thiols on the aroma of young botrytized sweet wines: Identification and quantification of new sulfanyl alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**, 1437-1444.
- (66) Miyazawa, T.; Gallagher, M.; Preti, G.; Wise, P. M.: Synergistic mixture interactions in detection of perithreshold odors by humans. *Chem. Senses* 2008, **33**, 363-369.
- (67) Miyazawa, T.; Gallagher, M.; Preti, G.; Wise, P. M.: Odor detection of mixtures of homologous carboxylic acids and coffee aroma compounds by Humans. *J. Agric. Food Chem.* 2009, **57**, 9895-9901.
- (68) 日本醸造協会：「改訂 第2版 BCOJ 官能評価法」ビール酒造組合 国際技術委員会〔分析委員会〕編 9.添加物質の閾値-極限法（上昇系列）pp 69-75
- (69) Seaton, J. C.; Moir, M.; Sugget, A.: The refinement of hop flavour by yeast action. *Proceedings of the 17th Convention of the Institute of Brewing, Australia and New Zealand Section*; Perth, Australia, 1982; pp 117-124.
- (70) Lam, K. C.; Foster, R. T., II; Deinzer, M. L.: Aging of hops and their contribution to beer flavor. *J. Agric. Food Chem.* 1986, **34**, 763-770.
- (71) Steinhaus, M.; Wilhelm, W.; Schieberle, P.: Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 2007, **226**, 45-55.
- (72) King, A.; Dickinson, J. R.: Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2003, **3**, 53-62.

- (73) Vaudano, E.; Moruno, E. G.; Stefano, R. D.: Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermentation. *J. Inst. Brew.* 2004, **110**, 213-219.
- (74) Ali, A.; Cantrell, C. L.; Khan, I. A.: A New In Vitro Bioassay System for the Discovery and Quantitative Evaluation of Mosquito Repellents. *J. Med. Entomol.* 2017, **54** (5), 1328-1336.
- (75) Buttery, R. G.; Teranishi, R.; Flath, R. A. and Ling, L. C.: Fresh tomato volatiles composition and sensory studies. *Flavor Chemistry*. 1989, Chapter 17, pp 213-222.
- (76) Takazumi K.; Takoi, K.; Koichiro Koie, Tsuchiya, Y.: Quantitation Method for Polyfunctional Thiols in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer using Specific Extraction of Thiols and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, (21), 11598-11604.
- (77) Ellman, G. L.: Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, **82**, 70-77.
- (78) Takoi, K.: Behaviour of hop-derived branched-chain fatty acids during fermentation and their sensory effect on hopped beer flavours, *BrewingScience*. 2019, **72** (11/12), 196-206.
- (79) Tamura, H.; Boonbumrung, S.; Yoshizawa, T. and Varanyanond, W.: The volatile constituents in the peel and pulp of a green Thai mango, Khieo Sawoei cultivar (*Mangifera indica* L.), *Food Sci. Technol. Res.*, 2001, **7** (1), 72-77.
- (80) Tominaga, T.; Murat, M.-L. and Dubourdieu, D.: Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46** (3), 1044-1048.
- (81) Sapporo Breweries Ltd. *Humulus lupulus* L. Hokuto Ace, Japan Variety Registration No. 4776. 1995.
- (82) Sapporo breweries Ltd. *Humulus lupulus* L. Furano Special, Japan Variety Registration No. 153956. 2007.
- (83) Howard, G. A.; Tatchell, A. R.: Development of resins during the ripening of hops. *J. Inst. Brew.* 1956, **62**, 251-256.
- (84) Murphy, J. M.; Probasco, G.: The development of brewing quality characteristics in hops during maturation. *Tech. Q.* 1996, **33**, 149-159.
- (85) Bailey, B.; Schönberger, C.; Drexler, G.; Gahr, A.; Newman, R.; Pöschl, M.; Geiger, E.: The influence of hop harvest date on hop aroma in dry-hopped beers. *Tech. Q.* 2009, **46**, 1-7.
- (86) Howard, G. A.; Slater, C. A.: Effect of ripeness and drying of hops on the essential oil. *J. Inst. Brew.* 1958, **64**, 234-237.

- (87) Sharp, D. C.; Townsend, M. S.; Qian, Y.; Shellhammer, T. H.: Effect of harvest maturity on the chemical composition of Cascade and Willamette hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2014, **72**, 231-238.
- (88) Matsui, H.; Inui, T.; Oka, K.; Fukui, N.: The Influence of pruning and harvest timing on hop aroma, cone appearance, and yield. *Food Chem.* 2016, **202**, 15-22.
- (89) Lafontaine, S.; Varnum, S.; Roland, A.; Delpech, S.; Dagan, L.; Vollmer, D.; Kishimoto, T.; Shellhammer, T. Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. *Food Chem.* 2019, **278**, 228-239.
- (90) Lafontaine, S.; Caffrey, A.; Dailey, J.; Varnum, S.; Hale, A.; Eichler, B.; Dennenlöhner, J.; Schubert, C.; Knoke, L.; Lerno, L.; Dagan, L.; Schönberger, C.; Rettberg, N.; Heymann, H.; Ebeler, S. E.: Evaluation of variety, maturity, and farm on the concentrations of monoterpene diglycosides and hop volatile/nonvolatile composition in five *Humulus Lupulus* cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2021, **69**, 4356-4370.
- (91) Inui, T.; Matsui, H.; Hosoya, T.; Kumazawa, S.; Fukui, N.; Oka, K.: Effect of harvest time and pruning date on aroma characteristics of hop teas and related compounds of Saaz hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2016, **74**, 231-241.
- (92) Kammhuber, K.; Hundhammer, M.; Weihrauch, S.: Influence of the Date of Harvest on the Sulphur Compounds of the “Special Flavour Hop” Varieties Cascade, Mandarina Bavaria, Hallertau Blanc, Huell Melon and Polaris. *BrewingSci.* 2017, **70**, 124-130.
- (93) Uemoto, M.; Takoi, K.; Tanigawa, A.; Takazumi, K.; Ogushi, K.; Koie, K.; Suda, N.: Effect of “Late Harvest” of Hops (*Humulus lupulus* L.) on the Contents of Volatile Thiols in Furano Beauty, Furano Magical, and Cascade Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2022, **70**, 607-614.
- (94) American Society of Brewing Chemists α and β -Acids in Hops and Hop Pellets ASBC Methods Analyses Method Hops 2009; Vol. 6.
- (95) Ferreira, C. S.; Collin, S.: Fate of hop and fermentation odorants in commercial Belgian dry-hopped beers over 2 years of bottle storage: Key-role of oxidation and hop esterases. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2021, **79**, 259-271.
- (96) Willemart, G.; Tanriverdi, Y.; Collin, S.: Impact of Contact Time, Temperature, and Ethanol Content on Hop Creep-Related Enzymatic Activities in Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2025, **83**, 215-221.