

成分プロファイリングによるホップの香気特性と健康機能に関する研究

Study of hop aroma characteristics and health promoting activities
based on component profiling

2016 年 7 月

静岡県立大学大学院
薬食生命科学総合学府
食品栄養科学専攻
博士後期課程
食品分析化学研究室

乾 隆子

目次

序論	1
第1章 異なるホップ品種を用いたビールにおけるホップ由来の香気特性	5
1-1 ビールホップ香の違いに寄与する成分把握のためのワークフロー	5
1-2 異なるホップ品種を用いたビール醸造	7
-実験試料および方法-	
1-3 ビールホップ香の定量的官能評価	9
-官能評価方法-	
-官能評価結果-	
1-4 GC×GC-TOF/MS を用いた網羅的成分解析	12
-実験方法-	
1-5 網羅的成分データと官能スコアの変量解析	15
-解析結果-	
1-6 まとめと考察	18
第2章 ホップ栽培条件とホップ香気特性および成分プロファイルの関連解析	21
2-1 栽培条件に関する実験水準とワークフロー	21
2-2 ザーツホップ栽培試験（株切り日、収穫時期、収穫年、地域）	23
-栽培試験条件-	
2-3 ホップティーによる香気特性に関する定量的官能評価	27
-試料調製方法および官能評価方法-	
-官能評価結果-	
2-4 GC×GC-TOF/MS を用いた香気成分分析	31
-試料調製方法および分析条件-	
-分析結果-	

2-5	多変量解析による栽培条件と香気特性および成分との関連解析 -多変量解析結果-	39
2-6	まとめと考察	44
第3章	ホップポリフェノールの健康機能活性と栽培条件による影響	46
3-1	ホップポリフェノールの健康機能性評価と収穫時期・収穫年による違い -実験試料および方法- -実験結果-	48
3-2	単一ポリフェノールの健康機能性評価 -実験結果-	60
3-3	Orbitrap LC-MS によるホップに含まれるポリフェノール分析 -分析条件- -実験結果-	67
3-4	ポリフェノールプロファイルと健康機能活性の関連解析 -解析結果-	71
3-5	まとめと考察	73
	総括	75
	参考文献	78
	論文リスト	87
	謝辞	88

序論

ホップ (*Humulus lupulus* L.) はビールの苦味、香り、味わいにとって必要不可欠な原料である。また、ヨーロッパでは古くから民間薬としても利用され、ホップ特有のポリフェノール的一种である xanthohumol やその類縁体については更年期障害や不眠、メタボリックシンドローム、Ⅱ型糖尿病など、さまざまな慢性疾患に対し改善効果があるとされている。

本研究では、ビールに対し好ましいホップ香を付与するための技術を獲得するため、ホップ品種の違いによるビールにおけるホップ香の特徴の違いとその違いに関連する成分の把握、さらにはチェコ産のザーツホップについて栽培条件の違いによるホップ香の特性の違いと関連成分の把握を行うこととした。これらの研究には官能と成分プロファイル、それらの違いに係わる因子を関連付けするための手法として、フードメタボロミクスの研究手法を取り入れた[1-4]。

さらに、ホップの健康機能に対する有効性を探るため、ホップポリフェノールの抗酸化、抗炎症、抗肥満効果における活性と関連ポリフェノール成分を明らかにすることにした。また、それらの活性の強さとホップ収穫時期との関連性を把握することで、健康機能性において、より付加価値が高いホップを生産することにつながるデータを得ることを本研究の目的とした。次頁以降に、本研究の背景と目的を詳細に述べる。

【ホップの植物特性と産地】

ホップは高さ 10m 前後に成長する蔓性の雌雄異株の宿根多年生の植物で、ビールの原料となるのは雌株だけである。7 月頃に雌株に花が付き、これが 8 月頃に松かさ状の毬花^{まり}となり、これが通称ホップと呼ばれるものである（写真 1）。ホップの栽培地域は、世界中に幅広く点在しており、冷涼で乾燥した地域に適した栽培植物である。特にアメリカのワシントン州、ドイツのハラタウ地方、チェコのジャテッツ地方は世界の主な生産地である。また、日本でも小規模ながら岩手や福島などで栽培されている。



写真 1 ホップの外観と内部組織

世界には 100 種類近くのホップ栽培品種があるとされており、香りの良いアロマホップと、苦味の強いビターホップがある。ホップ香の特徴はフローラル（floral）、フルーティー（fruity）、スパイシー（spicy）、シトラスシー（citrusy）、ウッディー（woody）などの特徴が様々なバランスで含まれ、品種によって大きく異なっている。近年では香りと苦味の両方の特徴を兼ね備えた中間種の育種が盛んに行われている。

【ビール醸造におけるホップの役割と品質制御】

毬花の中心部にはルブリンという組織があり（写真 1）、ビールにとって重要な苦味と香りを担う成分が含まれている。また、外側の苞^{ほう}組織には、味わいに寄与するポリフェノールが多く含まれている。特に、麦汁とともに煮沸する過程でルブリンに含まれる α 酸（humulone）が異性化したイソ α 酸はビールの苦味に[5,6]、テルペン類は香りに、ポリフェノール類は味わいに対し重要な成分とされている[7]。また、ホップに含まれる脂肪酸は、発酵中に酵母によりエチルエステル化され、心地よい香気成分に変化する[8]。これらの成分プロファイルは、ホップの品種や、天候、土壌、栽培条

件による個体差、乾燥処理やペレット化などの加工条件、さらには、醸造工程における煮沸条件や発酵条件によりさまざまに変化し、ビールとしての香気に寄与している。したがって、魅力的なホップ由来の味わいと香りをビールに付与するためには、ホップ品種の違いや[9,10]、ホップ栽培条件の違い、醸造工程におけるホップ煮沸や発酵条件による違いがビールにおけるホップ香に与える影響を把握することが重要となる。

【ビールにおけるホップ香と関連成分の研究手法】

ホップ中に含まれる成分、特に精油成分に関する研究は多くなされているが、ビールにおけるホップ香を理解するうえでは、ホップそのものの香気特徴やホップ中の香気成分を把握するだけでは十分とはいえない。なぜなら、ビール醸造工程において、一部のホップ由来成分は他の成分に変化し、ビール中のホップ香は、多種多様な成分プロファイルを形成するからである[11]。これは、煮沸時の加熱や酸化、還元、加水分解[12]、発酵時のビール酵母による代謝[13–17]、すなわち、異性化やエステル化[18–20]、配糖体からのアグリコンの遊離[21]などにみられる酵素分解が挙げられる。配糖体や酸はビールの香りへの寄与がほとんどないが、これらの化学変化によりホップ香として重要な要素になりうる。このように、醸造工程を経ることで、ビールにおけるホップ香はますます魅力的なものに変化すると考えられる（図1）。

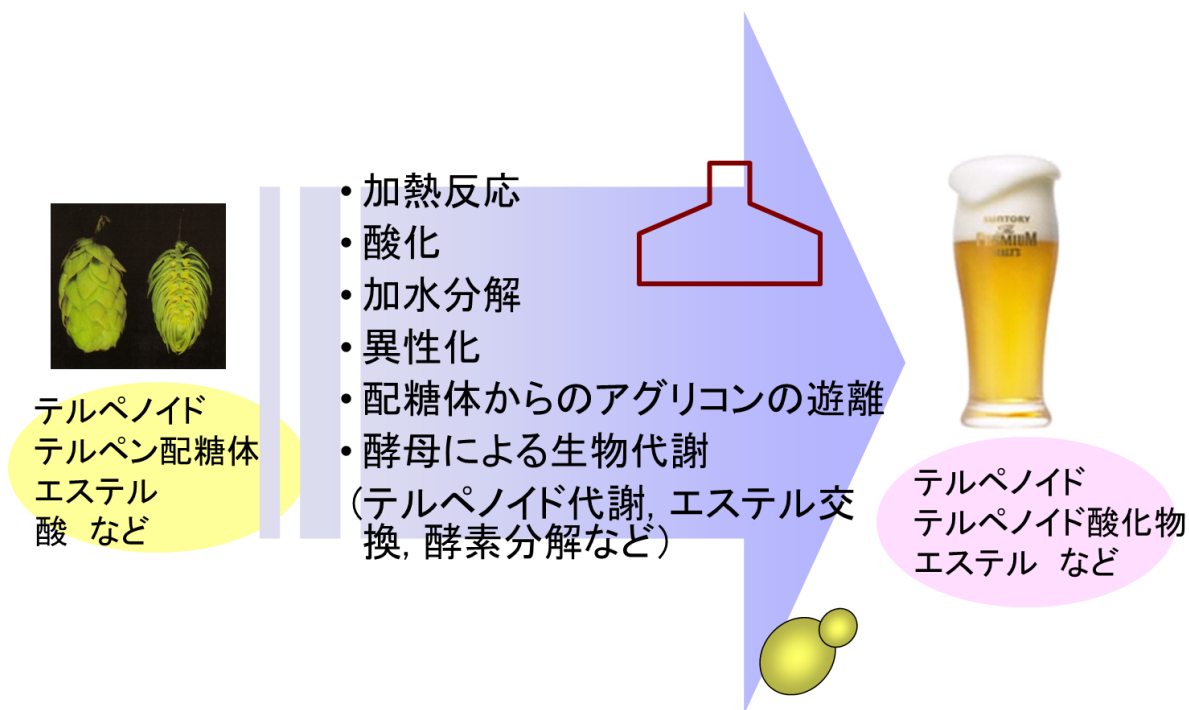


図1 ビール醸造工程におけるホップに含まれる香気成分の変化

このように、数百に及ぶ多種多様で複雑に変化するビールホップ香成分の中から、いずれの化合物がどのようなビールホップ香の特徴に寄与しているのかを把握するためには、ノンターゲット分析が必須と考えられている。また、この研究課題においては、得られたノンターゲット分析の結果を、どのようにして、さまざまな官能特徴と関連付けるかが重要な点と考える。

本研究では、ビールにおけるホップ香の特徴の違いを、いくつかの特徴香に分けて定量的官能評価（quantitative descriptive analysis : QDA 法）を実施し、それぞれの官能特徴に寄与する成分を探索するため、官能スコアと網羅的成分データとの多変量解析を行った。この手法は、フードメタボロミクスの研究手法であり、近年、食品中の栄養成分の代謝、食品偽装識別、農作物の品質と香味の関連性把握などに活用されている[1]。

【ホップの健康機能性と用途】

ホップは、その生産量のほとんど（約 95%）がビール醸造に適用され、それ以外は、抗菌物質、伝統的な医薬（植物療法）、バイオエタノールなどに適用されている。ビール醸造に適用されている品種は、長い間交配を重ねホップ香がリッチなビール醸造に適した品種に改良されてきたものであるが、睡眠導入剤としての利用においては起源種である西洋カラハナソウを混合して用いられている。これは、西洋カラハナソウはアデノシンレセプターに対し、ホップはメラトニンレセプターに対し結合することが知られているためである。また、ホップの苦味成分である α 酸（humulone）の抗炎症作用や、 β 酸（lupulon）の抗癌作用がマウスやラットで有効性が検証されている[22]。またイソ α 酸の糖尿病予防効果として、ヒト試験において、糖尿病予備軍に対し、有意な血糖値、脂肪面積、BMI の減少が認められている[23]。

ホップ特有のポリフェノールとして、xanthohumol、isoxanthohumol、8-prenylnaringenin の存在が知られている[24,25]。xanthohumol については、糖尿、癌、炎症、動脈硬化、関節炎、バクテリア、ウィルスに対する効果が *in vitro*、*in vivo* で検証されている。xanthohumol はビール醸造の煮沸工程において、異性化され isoxanthohumol に変化するが、xanthohumol は isoxanthohumol よりも抗酸化、抗癌活性が高いとされている。ビール中ではほとんどが isoxanthohumol として存在し、xanthohumol 含量はピルスナータイプで <0.2 mg/L、スタウト、ポーターなどの濃色ビールでは <1.2 mg/L とされている[24]。xanthohumol の臨床試験として、II 型糖尿病モデルマウスでの大量投与（1 g/体重 kg）において血中グルコース、トリグリセリドの低下が確認されている。また、肥満モデルラット（メス）16.9 mg/体重 kg 6 週間投与で有意な体重減少が確認されている[25]。ただし、ヒト臨床試験では、肥満や糖尿病に対する薬効としては確認できていない。8-prenylnaringenin の効果としては、女性ホルモン（エストラジオール）の活性化が大豆よりの優位であることが確認されており、生理不順、骨粗鬆症、更年期障害に効果的であることがヒト臨床試験 24 名女性において実証され、市販サプリメントがベルギーにて開発、販売されている[26]。

第1章 異なるホップ品種を用いたビールにおけるホップ由来の香気特性

ビールにおけるホップ由来の香り成分で最も重要な成分は、ホップ精油に含まれるテルペン類である **linalool** と考えられている[27]。一方で、ホップ品種が異なれば、ビールホップ香の特徴は大きく異なることから、**linalool** 以外の複数の成分がビールホップ香の特徴要因となっていることは明らかである[28,29]。本章では、異なるホップ品種を用いたビールホップ香の違いとそれに関連する要因成分を把握するためのワークフローの構築とそれによって得られた結果について考察する。

1-1 ビールホップ香の違いに寄与する成分把握のためのワークフロー

ホップ品種には、香りが華やかで 苦みの弱い「アロマホップ」と、苦みの強い「ビターホップ」があり、アロマホップの一部の品種にだけ特異的に含まれる成分として、**farnesene** や **bergamotene** などが知られているが、それ以外は、いずれのホップ品種もほぼ同じ香り成分で構成されており、構成バランスの違いが、個々のホップ品種のホップ香の特徴の違いに起因しているといえる[30–32]。そこで、本検討では、異なる品種を用いたビールホップ香における特徴の違いを、**floral**、**citrusy**、**woody** などのいくつかの要素に分けて、それぞれの特徴バランスについて定量的官能評価を実施し、各々の官能特徴に寄与する成分を探索することとした。ワークフローの概要を図 1-1 に示す。

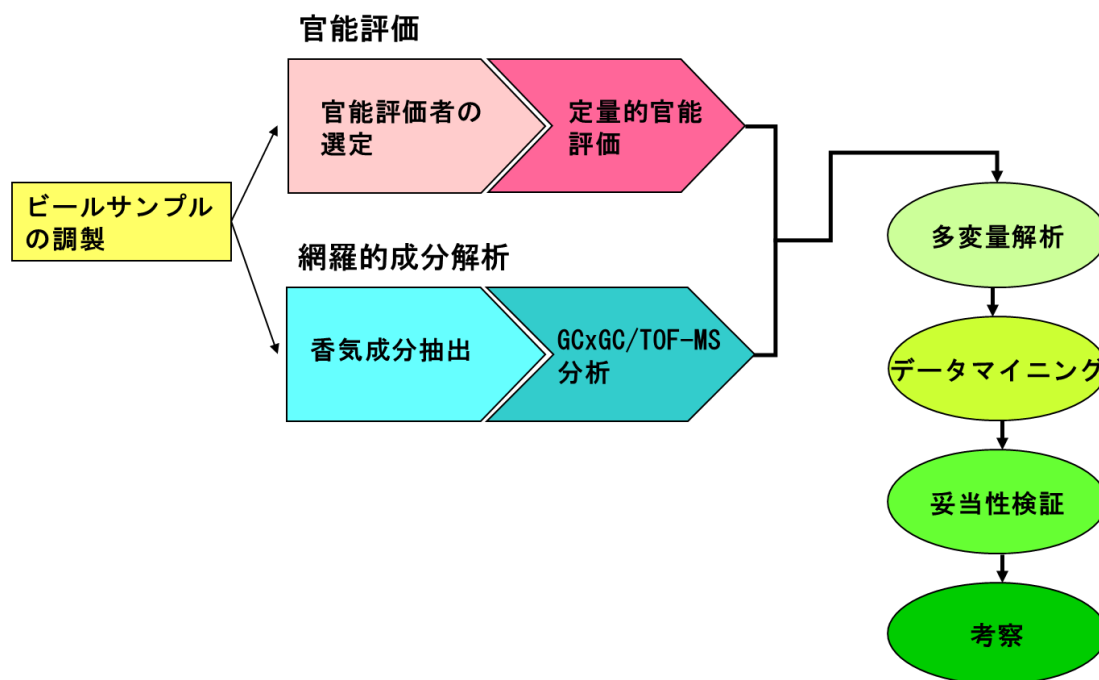


図 1-1 官能に寄与する成分把握のためのワークフロー

化合物評価にあたっては、GC×GC-TOF/MS（二次元ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析装置）を用いた網羅的成分解析を行った。検出された数千以上の化合物の中から信頼性の高い定性化合物と、ビールにおける各ホップ香の特徴に対する官能スコアを多変量解析することで、ホップ香のそれぞれの特徴に高く寄与している化合物を把握することとした。このようなデータマイニングによりビールホップ香の個々の官能特徴への関連性が推定された化合物は、それらの **odor description** との照合や、ビールへの添加官能評価などによって、実際のビールホップ香への寄与に対する妥当性を最終的に検証する必要がある。

1-2 異なるホップ品種を用いたビール醸造

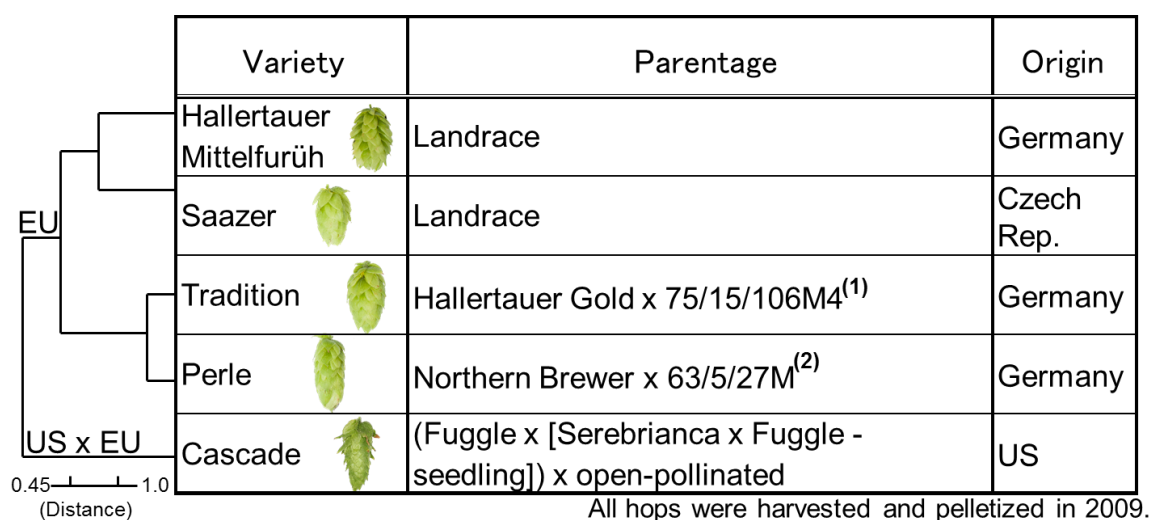
—実験試料および方法—

【評価したホップ品種】

評価対象とするビール試料は、ビールホップ香に対する官能評価においてホップ香を明確に検知でき、試料間での香りの質の差を明確に感じられるビール試料を調製する必要がある。ビールホップ香が明確に検知できない試料や、官能的に類似した試料を評価対象とした場合、ホップ香の官能特徴と成分との有意な関係性を導くことが難しくなる。

本実験では、まず、異なる質のホップ香が付与されたビールを調製するため、ホップに含まれるオイル成分データなどから、香りの質が明確に異なると予想される5品種（Hallertauer Mittelfurüh、Saazer、Tradition、Perle、Cascade）を選抜した（表1-1）。表中に示される Seefelder らによりクラス分けされた遺伝子多型解析にもとづく品種間の遺伝子的相関性が[31]、ビールホップ香の特徴の違いと関連性があるのかについても興味を示される。また、Patzak らもヨーロッパの野生ホップ種について分子遺伝学的解析と代謝物の観点から分類を行っている[34]。遺伝子的相関性と香味との関連は、梅や桃、みかんなどの果実や野菜などさまざまな農作物において研究がされており[35–37]、交配などの品種改良のための有益な情報となっており、ホップについても同様の研究展開が期待できる。

表 1-1 ビール試料の調製に用いたホップ品種と遺伝子系統樹*



(1) 7% Hallertauer, 15% Saazer, 9% Spalter, 28% wild hops, 1% Northern Brewer

(2) Hallertauer Mfr., Spalter, Saazer

* ; S. Seefelder *et al.* *Plant Breeding* 119:257–263, (2000) より引用

【ビール醸造条件】

異なるホップ品種を用いたビールの比較において考慮すべき点は、ホップそのものの香りの質が異なっていたとしても、ホップ香強度が非常に弱い場合は、質の違いを正確に評価することが難しくなる点である。そこで、同じ程度のホップ香強度を付与したビールを調製することが必要となる。そこで、本実験では、ビールホップ香の特徴として重要なフローラルノートに高い寄与を示す **linalool** 濃度をそろえることで、いずれの品種を用いたビールも、そのホップ香強度が同程度になると考え、ビールに付与される **linalool** 濃度が同程度 (=33 ppb) になるようホップの使用量とホップ煮沸時の添加タイミングを決定した。通常、ホップ添加は、爽快な苦味を引き出すため、苦味成分である α 酸を煮沸により **iso- α** 酸に異性化させるため、大半を煮沸開始時に添加するが (**first-hopping**)、一方で長時間の煮沸によりその香りのほとんどが蒸散により失われる。そこで、ホップ香を適正な強度でビール製品に残すためには、この異性化の煮沸工程が終了した直後に、狙いの **linalool** 量が付与される分だけ、それぞれのホップ原料を投入することとした。これを **late-hopping** と呼ぶ。**late-hopping** に必要なホップの投入量は、あらかじめモデル試験など小スケールで推定しておく必要がある。なお、香り付与目的で煮沸工程終了直後に添加するホップの量は、使用する全ホップ量の一部であり、また、煮沸終了以降にも余熱による α 酸の異性化が進むことから、異性化不足による苦味の質の悪化は示されなかった。

本検討では、ビール中に含まれる数千にも及ぶ多数の化合物の中から、ホップ由来の香り成分を識別して拾い出すため、ホップを全く添加せずに同じ条件で醸造したアンホップドビア (**unhopped beer**) の醸造も行った[38]。なお、5 品種のホップを添加したホップドビアとアンホップドビアの苦味価を合わせるため、アンホップドビアには、瓶詰め時に **iso- α** 酸エキスを (24 mg/L) 添加した。

本試験醸造は、100 L パイロットスケールを用いて実施した。各種の乾燥ホップを粉碎したものを煮沸開始時と、100°C、90 分の煮上がり直前の 2 回に分けて添加した。ワールプールにて 20 分静置後、ホップ粕を取り除き、冷却して冷麦汁を得た。ラガー酵母にて 10°C で 14 日間発酵させた後、0°C、3 日間貯酒を行い、未熟臭を除去した。ろ過後、上述の **iso- α** 酸エキスを添加して苦味価を調整後、瓶詰めを行った (図 1-2)。

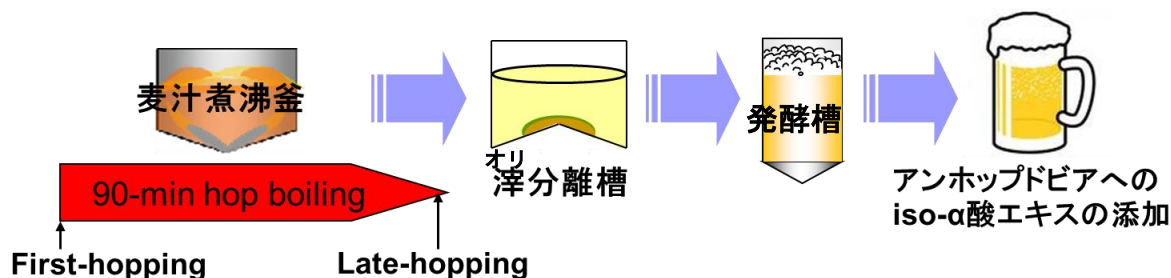


図 1-2 ホップを添加する麦汁煮沸からビール完成までの工程条件

1-2 ビールホップ香の定量的官能評価

—官能評価方法—

【ビールの官能評価方法】

官能評価では、ビールホップ香の違いを明確に感じることができる試料を評価対象とすること、適切な官能評価軸を設定すること、正しい定量官能評価ができるパネリストを識別官能試験などで選定することが重要となる。官能的に明確な差異を識別できない試料を評価対象にした場合や、パネリスト間で定量的な官能評価（QDA 法）ができないばらつきが大きくなる評価軸を設定すれば、多変量解析結果において、妥当性のある結果を導くことは難しくなる。

今回用いたビールホップ香に対する官能評価軸は、ホップから抽出されたホップオイルを、6つの異なる香気特徴画分に分画し、それぞれが示す特徴を評価軸とことにした。この分画オイルは Barth-Hass 社より天然フレーバリング剤として製造販売されている商品で Pure Hop Aromas (PHA) と呼ばれる[39]。前述したように、ビールホップ香は、ホップそのものの香り特徴とは異なるが、ビールにおけるホップ由来の本質的香りは、主としてホップオイルを原料として、いくつかの香気特徴画分に分けられた PHA に由来するものと考えられる。したがってホップ由来の本質的香りの特徴を定量的に官能評価するための手段として、PHA を用いてあらかじめパネリスト間で、それぞれの官能特徴とそれに対応する官能用語を標準化し、それら进行评估軸とすることは有効と考える。今回用いた PHA に基づく官能評価軸は、floral、herbal、citrusy、spicy、ester、sylvan (woody) の 6 軸で、6 つの特徴画分をアンホップドビアに添加して、それぞれの特徴をすべて識別できる者をパネリストとして 6 名を選定した。パネリストには、アンホップドビアを用いてプレコンディショニングを行ってもらい、官能評価において前の評価試料の影響を受けないようにしてもらった。パネリストごとにサンプル提示順を変え、2 日間でそれぞれのサンプルについて 2 回ずつ、上記 6 つのホップの特徴香の強度についてスコア付けを行ってもらった。スコアは 0 点（全く感じない）から 3 点（非常に強く感じる）で、フリースケールでスコアをつけてもらった。フリースケールの場合、パネリスト間でスコアの振れ幅が大きく異なる可能性があるため、各パネリストの全試料に対するスコアの平均が 50、標準偏差が 10 になるよう偏差値化したデータを解析に用いることとした。

—官能評価結果—

【官能評価結果】

5種の異なるホップを用いたビールに対するホップ香特徴プロファイルは、ホップ香強度の指標となる linalool 濃度が、いずれの試料もほぼ同じ濃度であるにもかかわらず、明確な差異が示された（図 1-3）。

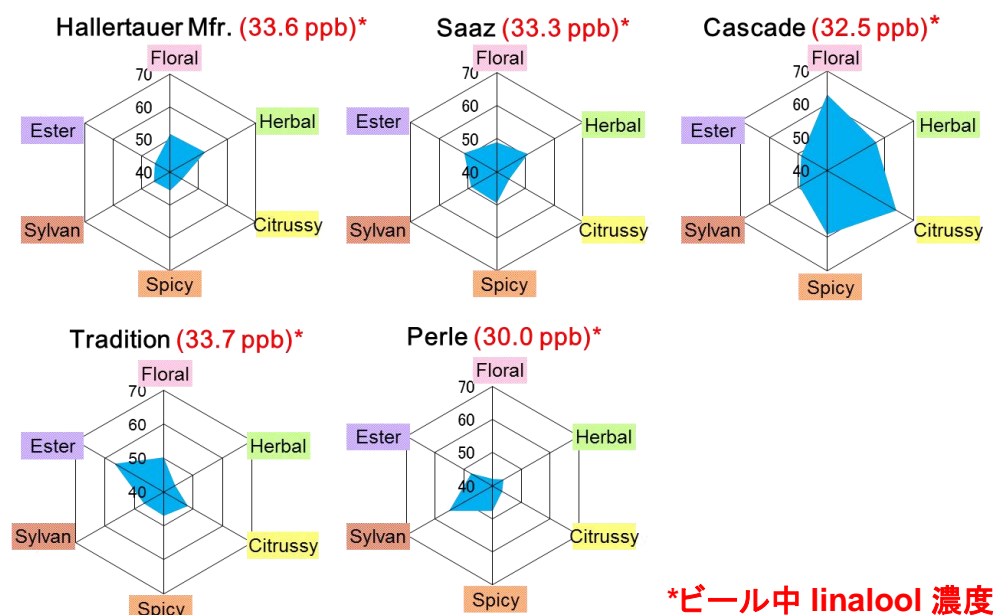


図 1-3 異なるホップ品種を用いたビールホップ香官能プロファイル (N=6)

これらのホップ香の特徴の差異は、6つのホップ香の特徴を変数とするローディングプロットと、それらのベクトルによって配置される各ホップ品種のビールの主成分得点によるスコアプロットを重ね合わせたバイプロットにより、客観的に捉えることができる（図 1-4）。また、官能評価データによる5品種のクラスター解析から、品種間でのビールホップ香の官能的特長が、遺伝子多型解析による遺伝子的相関性と関連性が高いことがわかった。この結果から、ホップ品種の遺伝子的近似性により、ホップ香の特徴をある程度推定できるのではないかと考える。

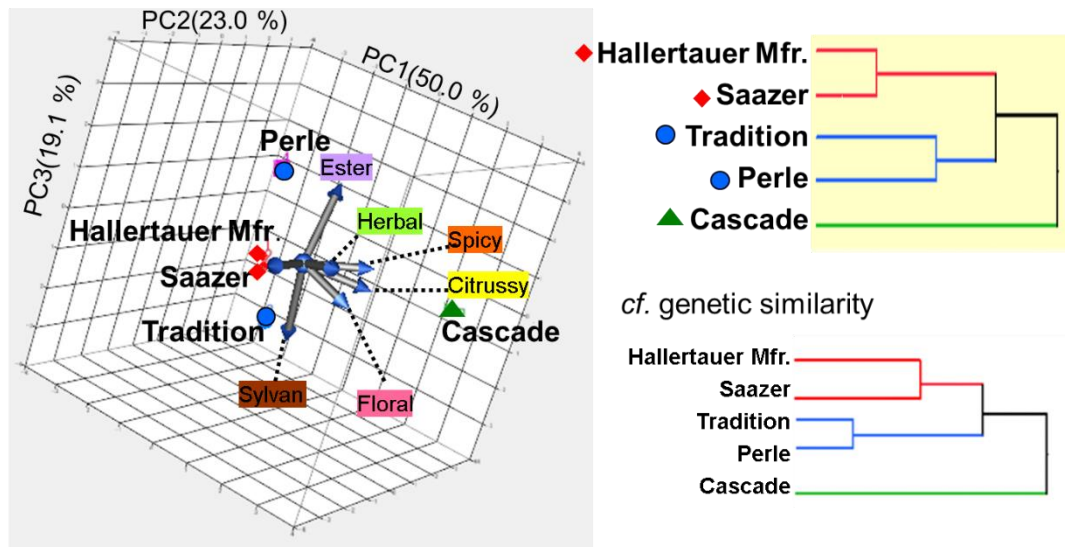


図 1-4 官能評価の主成分分析のバイプロット (左) と階層クラスター分析 (右)

1-4 GC×GC-TOF/MS を用いた網羅的成分解析

—実験方法—

【香気成分の抽出方法】

ビールの香気成分は溶媒抽出にて行った。ビール 350 g に内部標準試薬として borneol (50%メタノール溶液) を終濃度が 50 ppb となるように添加した。ここにジクロロメタン 300 g を添加し、100 rpm で 60 分間攪拌し、香気成分を抽出した。15 分間静置後、上層を取り除き、下層のジクロロメタン層に無水硫酸ナトリウム 70 g を添加し、1 時間以上攪拌し脱水処理した。ろ紙 (Whatman® no.1) をろ過により硫酸ナトリウムを除去後、ロータリーエバポレーター (冷却水温度 -3°C、サーモバス温度 25°C、減圧度 250 mmHg) にて 500 µL まで濃縮を行い、GC×GC-TOF/MS 分析に供した。

【GC×GC-TOF/MS の特徴と分析方法】

ビールにおけるホップ由来成分を網羅的に把握するため、GC×GC-TOF/MS (LECO 社製、Pegasus 4D) による成分分析を行った。ビールのような数千にも及ぶ化合物を含む試料に対する網羅的なノンターゲット分析において、網羅的二次元分離が可能な GC×GC による高分離システムと、TOF/MS による高感度でダイナミックレンジを有する検出器の組み合わせは、強力な武器となる[40]。

表 1-2 に GC×GC-TOF/MS の分析条件を示す。GC×GC に使用したカラムは、一次元目が無極性カラム、二次元目が中極性カラムの組み合わせで、極性と沸点の違いにより高分離を達成することができる。また、一次元目で分離された各成分は cryojet-modulator における繰り返し 2 回のコールドジェットガスとホットジェットガスによる focusing により、ピーク幅を狭め、ピーク強度を高くした状態で、二次元目のカラムに送り込まれることから、最終的にはピーク強度の高いシングルピークを得ることができる。さらに、二次元目で不分離となったピークでもデコンボリューションを用いた波形処理により同時に溶出された共雑スペクトルから、シングルの MS スペクトルを抽出することができる[39]。図 1-5 に 3D クロマトグラムの一例を示す。

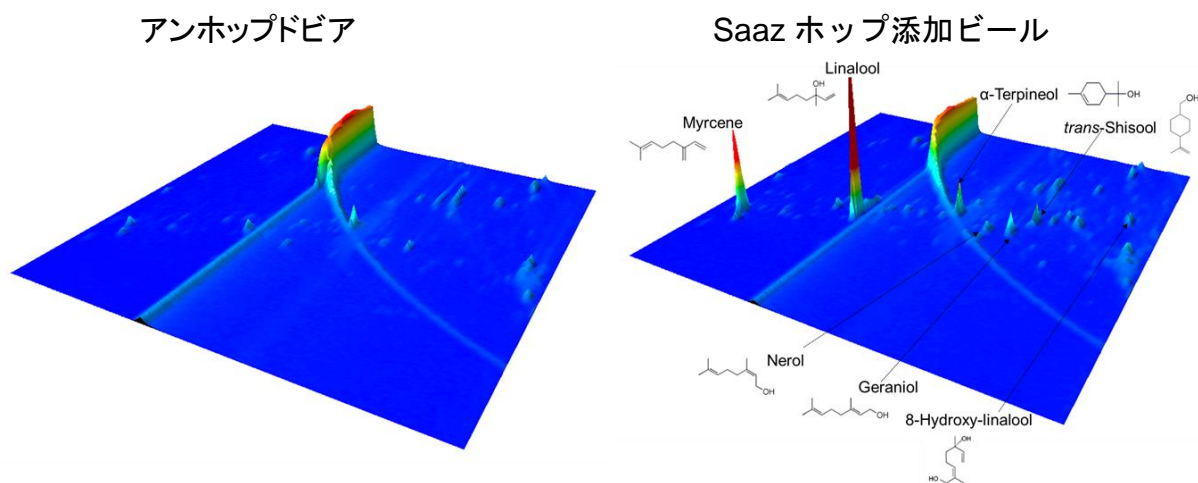


図 1-5 GC×GC/TOF-MS によるビール中ホップ成分の 3D クロマトグラム ($m/z=93$)
左 ; アンホップドビア、右 ; Saaz ホップ添加ビール

表 1-2 GC×GC-TOF/MS の分析条件およびデータ解析ソフト

GC×GC TOF-MS分析条件	
Detector	Pegasus 4D Time-of-Flight Mass Spectrometer
Acquisition Rate	200 spectra/s
Acquisition Delay	2 minutes
Stored Mass Range	m/z 33 to 400
Transfer Line Temperature	250°C
Source Temperature	250°C
Detector Voltage	-1800 Volts
Mass defect	0 unit
1st Column	Rtx-1, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m film thickness
2nd Column	InertCap 17, 1.6 m x 0.10 mm ID, 0.1 μ m film thickness
1st Column Oven	40 °C for 2 min, to 250°C at 4°C/min, hold for 5 min
2nd Column Oven	60 °C for 2 min, to 370°C at 4°C/min, hold for 5 min
Modulation Period	7 s
Modulator temperature offset	20°C
Inlet	Splitless 50:1 at 250°C
Injection	1 μ L
Carrier Gas	Helium, 1.5 mL/min corrected constant flow
データ解析条件	
Software	ChromaTOF 4.33 from LECO Corporation
Peak finding	True Signal Deconvolution from LECO Corporation
Peak identification	WILEY 08

一方、香味に寄与する成分の把握には、におい嗅ぎ GC による手法も頻繁に用いられ、特徴的な香気特徴に関与する成分を把握するためには有効策のひとつである[42-44]。しかし、ビールのような成分数が多い試料は、GC での成分分離が不十分であることから複合成分のにおい嗅ぎとなってしまう。また、閾値以下の成分は寄与のない成分として処理されてしまうなどのリスクがある。閾値以下の成分でも、他の成分と共存することで、全体的な香味の印象や強度に影響を与えることは、香料会社などで数多く研究されている。このことから、本研究では、におい嗅ぎ分析を一切行わずに、網羅的成分分析と官能評価の多変量解析により、客観的に官能に寄与する成分を拾い出すことを試みた。

1-5 網羅的成分データと官能スコアの変量解析

—解析結果—

GC×GC-TOF/MS 分析により得られたピーク数は約 2500 化合物に及んだ。そのうち MS スペクトルのライブラリーデータとの一致性が高い信頼性の高かった 840 の定性化合物を対象に、アンホップドビアと 5 種のホップドビアの比較を行った。各試料は繰り返し 4 回の測定を実施し、試料内の 4 回の分散と、アンホップドビアとホップドビアの試料間の分散との比を示す Fisher ratio[43]の大きさによって、ホップドビアにのみ存在するホップ由来の化合物を 300 化合物に絞り込んだ。

この 300 化合物のうち、いずれの化合物が、5 種の異なるホップ品種の違いを説明する 6 つの官能特徴と関連性が高いのかを調べるため、各試料の 6 つの評価軸の官能スコアと上記 300 化合物のデータをローディングプロットした (図 1-6)。最終的に、6 つの官能評価軸および preference (嗜好性) ごとに、ベクトル相関の高い化合物を拾い出すことで、それぞれの官能特徴に寄与する化合物として推定することにした。

さらに、これらの推定された化合物が、実際にそれぞれの官能評価軸を説明する要因として妥当なのかを検証するため、選ばれた個々の化合物の odor description を調べた (表 1-3)。その結果、選ばれた化合物の odor description は、6 つの官能評価軸の特徴を構成する成分として妥当であることがわかった[46]。また、6 つの官能評価軸による官能プロファイル (図 1-3) と、それぞれの官能評価軸に高い寄与を示す化合物のピーク強度を加算した化合物プロファイルは、図 1-7 に示されるように当然ながら一致することが示された。しかし、官能閾値の観点から、それぞれの化合物がビールホップ香の違いを説明する因子になっているとは限らず、単に、醸造工程での挙動が、一致していた化合物が含まれている可能性も考えられるため、現段階では代用指標と捉えるべきかもしれない。このため、添加官能試験による検証が必要であるが、単一の化合物添加では効果が示されなくても、複数の化合物との共存で効果が示される場合も考えられるため、特に閾値以下の存在量の化合物に対する厳密な検証は難しいと考えられる。このような化合物の影響については、評価対象試料を増やし、官能結果とその化合物の関係データを蓄積していくことが賢明と考える。今回は、5 品種のホップドビアから、それぞれのビールホップ香の特徴の差を説明する要因化合物を推定したが、これらの推定化合物により、他のホップ品種のビールホップ香の特徴を説明できるかを検証し、その確からしさを確認する必要がある。また、今回の 6 つの官能評価軸だけで、他のホップ品種を用いた場合のビールホップ香の特徴を十分に表現できていないと考えられる場合は、パネルに共通に評価される特徴部分を、新たな官能評価軸として設定する必要がある。

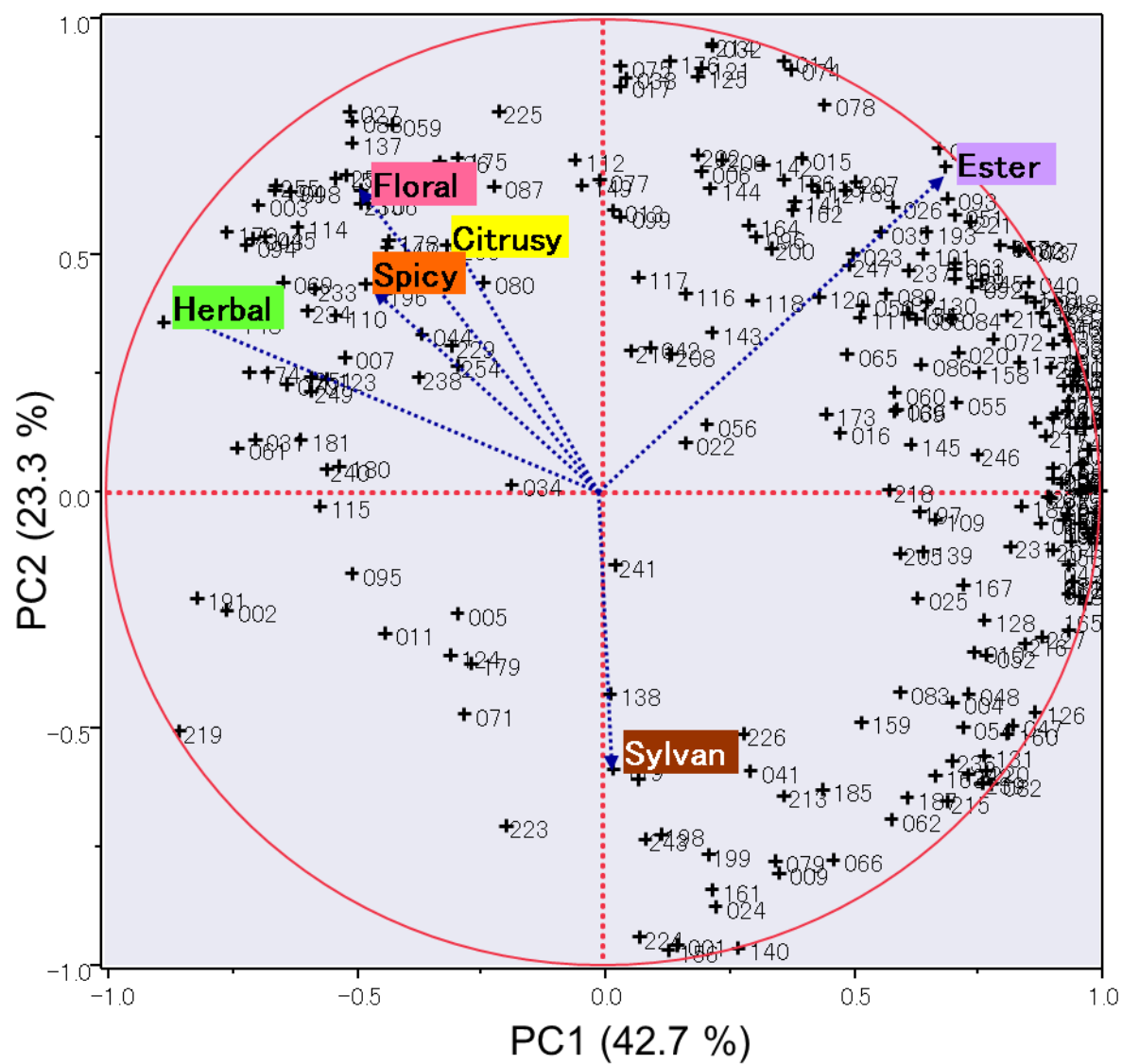
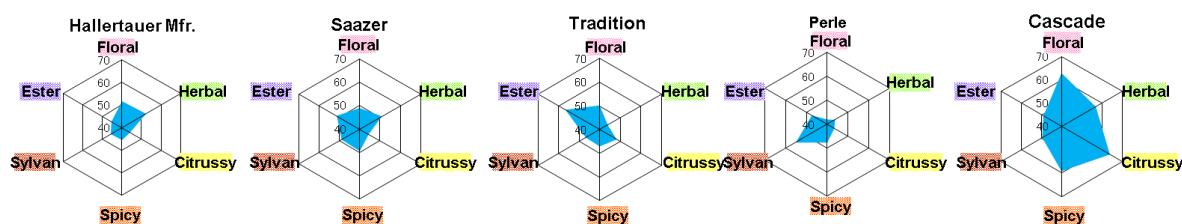


図 1-6 官能スコアとビールホップ香成分の PC ローディング

表 1-3 各ホップ香特性に寄与すると推定された化合物の odor description

官能評価軸	推定関連化合物	Odor description
Floral Herbal	8-Acetoxylinallol	Warm, fruity, woody
	8-Hydroxylinallol	Honey citrus and dill herb
	3-Nopinenone	Minty, medium
Citrusy Spicy	<i>E</i> -Geraniol	Floral, rose, green
	1,3,5-Trimethyl-cyclohexane	
	7-Hydroxy- α -terpineol	Intensively fruity, floral-rose, slightly citrus
	<i>trans</i> -Shisool	
	Acetic acid 2-pentyl ester	Ripe, fruity, apple
	β -Citronellol	Floral, leather waxy, rose bud, citrus
	Acetic acid citronellyl ester	Floral, rose, fruity, sweet
	Nerol	Citrus, rose, fresh
	<i>trans</i> -Z- α -Bisabolene epoxide	
	α -Calacorene	Woody
Sylvan	Methyl <i>E</i> -geranate	Waxy, green, fruity, flower
	Pentanoic acid ethyl ester	Sweet, fruity, apple, pineapple, green, tropical
	Acetic acid heptyl ester	Woody, citrus, pear, apricot
	α -Terpineol	Fresh, clean, woody, pine, floral, lime
	Myrcene	Peppery, terpene, spicy, balsam, plastic
	Terpinen-4-ol	Woody, ceding, mentholic, citrus terpy, spicy
	Caryophyllene oxide	Sweet, fresh, dry, woody, spicy
Ester	2-Methyl-2-propenoic acid pentyl ester	
	Propionic acid propyl ester	Sharp, chemical, pungent with sweet, fruity lift notes
	Sorelon	Sherry aroma, pleasant wine-like odor
	Benzenemethanol	Sweet, floral, fruity with chemical nuances
	Benzoic acid, ethyl ester	Fruity, dry musty, sweet, wintergreen
	Cyclohexanecarboxylic acid ethenyl ester	Fruity, cheese, winey
	<i>E</i> -2-Methyl-2-pentenoic acid	Sour, acidic, sweaty and fruity with a jammy, woody nuance
	3-Hydroxy- α -damascone	
	Dihydrojasnone	Fruity, sweet, floral, woody with a powdery nuance
	1-Hydroxy-3-methyl-2-butanone	
Preference	β -Ionone epoxide	Fruity, sweet, berry, woody, violet, orris
	Humulene oxide II	Herbal
	β -Eudesmol	Wood, green
	Toluene	Sweet

官能プロフィール



推定成分のピーク積算プロフィール

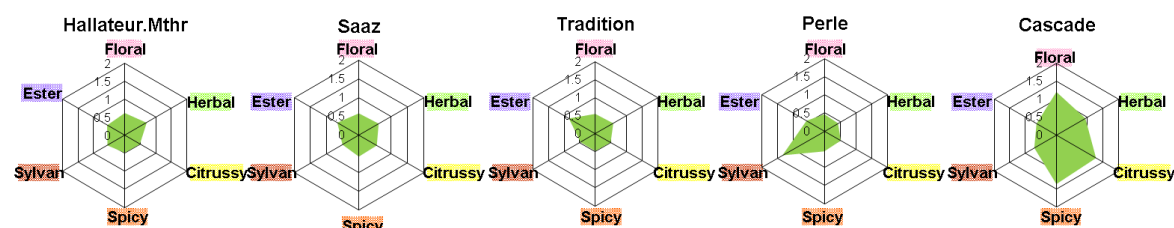


図 1-7 専門パネルによる官能評価プロフィール（上段）と多変量解析によりビールホップ香の各特徴に寄与すると推定された成分のピーク強度の積算プロフィール（下段）の対比

1-6 まとめと考察

第 1 章では、5 品種のホップを使用したビールの 6 種のホップ香の官能特性 (floral, fruity, citrusy, spicy, ester, sylvan (woody)) について定量的官能データ (quantitative descriptive analysis: QDA) を取得し、各ビールの官能プロフィールに明確な違いがあることを確認した。一方、GC×GC-TOF/MS を用いた網羅的成分分析により、ホップを使用しないビールと 5 種のホップを使用したビールの成分差から、ホップを使用したビールだけに有意に増加した成分を抽出し、それらをビール中のホップ由来成分として約 300 成分に絞り込んだ。さらに、5 種のビールに関するこれらの成分データと QDA データの主成分分析により、6 種のホップ香の官能特性と関連のある成分を推定した。これらの推定された個々の成分の官能特性 (odor description) は、それぞれ対応する 6 種のホップ香の特性と類似していたことから、推定成分の妥当性が確認できた。これらの関連成分がホップ品種ごとにどの程度含まれているかを指標にすれば、目的とするホップ香となるホップ品種を選択する際に、麦汁の仕込みや発酵、貯酒など、手間と時間のかかるビール醸造工程を要することなく、およそそのホップ香の特徴を推定でき、ホップ品種の選択をより精度よく客観的に行うことが可能となる。このよ

うな評価手法は、ビール以外のさまざまな加工食品に使用される原料の選択にも共通に適用できることが期待される。

ただし、ビール醸造においてホップ中の香気成分のうち、多くはそのまま製品に移行するが、一部の成分は煮沸や発酵工程において加水分解や酸化、異性化、エステル交換などが起き、他の成分に置き換えられて、ホップ香の特徴として寄与していることから、原料評価においては、それらの前駆体を指標とする必要がある。したがって、今後の課題としては、今回推定された関連指標成分が、ホップからそのまま移行したのか、醸造工程で何らかの変化を起こした結果、生成した成分なのかを識別する必要がある。また、こういった成分がどのようなメカニズムで醸造工程中に生成したのかを明らかにすることで、ホップ品種の選択だけでなく、煮沸条件や発酵条件を変化させることでもホップ香気をさらに戦略的に制御できるといえるであろう。

今回の検討事例は、定量的官能評価と網羅的成分分析の結果を、多変量解析することによって、評価軸とした官能特徴に寄与する要因成分をある程度推定できることを示したものである。近年の成分分析における高分離、高感度、高速化の目覚ましい発展が、この研究手法の一役を担っていることは間違いない。しかし、ノンターゲット分析により得られた膨大なデータに埋もれてしまわないよう、多変量解析において、官能との結び付けによるデータマイニングがしっかりできる実験系を組んでおくことが重要である。つまり、どのような官能特徴に対する関連成分を把握したいのかを明確にしたうえで、そのためには官能評価においてどのような官能評価軸を設定すべきか、どのような試料を評価対象とすべきかを適切に判断することが、重要なポイントとなる。ノンターゲット分析による網羅的成分解析は、これまで官能への寄与がわかっていなかった成分を新たに発見できる可能性があり、食品における香味の飛躍的向上、差別化に役立つことが期待される。

今後はこのような研究手法を用いて、狙いとするビールホップ香を獲得するための成分指標を明確にしたうえで、ホップ品種の選択、ホップ煮沸や発酵などの醸造条件の最適化を図っていき、戦略的に狙いのビールホップ香の製造に利用していきたいと考えている。

備考：

【使用試薬】

Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製：Linalool (>98%, racemic mixture) 、
methyl octanoate (>99.0%(GC))

Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)製：Dichloromethane (PRA grade >99.9%) 、無水硫酸ナトリウム (guaranteed reagent grade)

【ホップ試料】

Hallertauer Mittelfrüh, Saazer, Tradition, Perle, Cascade は Barth-Haas Group (Nuremberg, Germany)より購入。全品種 2009 年に収穫されたホップを用いた。

30% Iso- α acid extract は Steiner Hops Ltd., (Mainburg, Germany)

第2章 ホップ栽培条件とホップ香気特性および成分プロファイルの関連解析

ビールづくりにおいて原料の品質はビールの香味品質に大きな影響を与える[47–49]。本章では、ビールに好ましいホップ香気を安定的に付与するための要因としてホップの栽培条件に着目し、栽培条件とビールにおけるホップ香気特徴との関連性、さらにその関連成分を把握し、栽培条件によるビールホップ香制御の可能性を把握することとした。ホップの品質に影響を与える栽培要因には、年毎の気候変動に伴う気温、降水量の変動、ホップの株ごとの特性である樹齢、クローンタイプ、ウィルス感染性、人為的要因である施肥、農薬散布、株切り日、収穫日、栽培地域における土壌の質や気候の違いなどが挙げられる[50–53]。本研究では、人為的制御が可能な株切り日と収穫日に着目することにした。すでに Matsui らにより、ホップの樹齢や株切り日、収穫時期がホップそのものに与える影響とビールにおけるホップ香強度への違いについて報告がなされている[51]。しかし、ビールにおけるホップ香の特性と関連成分に関する評価はなされていないことから、本評価ではビールホップ香の品質の違いと関連成分を詳細に調べ、その関連性から株切り日と収穫時期によるビールホップ香の制御に対する有効性を検証することにした。

2-1 栽培条件に関する実験水準とワークフロー

本検討では、チェコ共和国ザーツ地方で栽培されているファインアロマホップの一種であるザーツホップ (Saaz Saazer) を対象に、現地の複数の圃場で4年間 (4回の収穫) に渡る栽培試験で収穫されたザーツホップを用いて評価を実施した。一般的に農産物の品質は、年毎の気候変動や地域差による影響を大きく受けるため、これらの要因を加味した上でザーツホップの株切り日と収穫日の影響を把握する必要がある。そのため、一地域において4年間 (2011～2014年) で収穫されたザーツホップと、同じ年 (2012年) に4地域で収穫されたザーツホップが評価に用いられた。図 2-1 にザーツホップの栽培履歴と本評価のワークフローを示す。本評価は栽培条件の違いによるビールにおけるホップ香の違いを見分けることを目的としているため、本来すべてのホップ試料を用いてビール醸造を行い評価するのが直接的であるが、膨大なホップ試料一つずつについてビール醸造をすべて実施することは困難である。そこで、ビールホップ香評価の代替となる簡易な評価手法としてホップティーを用いた官能評価を行うこととした。なお、事前にホップティーの特徴はビールにおけるホップ香の代表的な特徴 (floral, fruity, citrusy) と相関することを専門パネルによる官能評価により確認している。また、ホップティーの特徴に関連する成分を評価するためには、ホップティーそのものではなく、密閉容器で短時間熱水抽出した溶液を用いることにした。これは、ホップティーが開放系での煮沸により調製されるため、成分データがばらつきやすくなるため、密閉系で抽出されたばらつきの少ない溶液を用いることで精度の高い成分比較を行うためである。ホップティーおよび熱水抽出溶液の調製法は後述する。得られたホップティーの官能評価

データと熱水抽出溶液の成分データから多変量解析（分散分析（ANOVA：analysis of variance））および PLS 回帰（partial least squares regression）分析を用いて、両者の関連性の有意性や官能に関連する成分の拾い出しを行った[54–58]。



図 2-1 ザーツホップの栽培履歴と栽培条件がビールホップ香の特性に及ぼす影響と関連成分を把握するためのワークフロー

2-2 ザーツホップ栽培試験（株切り日、収穫時期、収穫年、地域）

—栽培試験条件—

前述の図 2-1 に示す通り、ザーツホップは 8 月下旬から 9 月上旬の収穫時に蔓の根元が切り落とされ、翌年の 4 月に冬の間、地中に埋まっていた株の先端を株切りし（puruning）、新芽の発芽を誘導させる。7 月上旬に毛花が開花し、8 月中旬以降に毬花が形成され収穫が始まる。一般的にホップは苦味成分の humulone 含量が最大となる 8 月下旬から 9 月上旬が収穫最盛期となるが、この時期が香りとしての品質において最も適した時期かどうかは不明である。一方、チェコでの栽培品種はザーツホップ 1 品種で大半を占めているため、作業工数の都合上、株切り日や収穫日の違いが他の品種よりも大きく、農家によって株切りの最早実施日と 20 日前後、最早収穫実施日と 25 日前後の差があることがわかっている。これが要因となっているためか明らかではないが、2011 年と 2012 年に 120 以上のチェコザーツ地方の農家で収穫されたザーツホップの humulone と linalool 含量を調べた結果（分析法はそれぞれ p31 記載の公定分析法 EBC Method 7.7、7.12 に従う）、図 2-2 に示されるように、かなり幅広い含量の分布を示すことがわかった。表 2-1 に本試験に用いた試料の水準を示す。実際の農家の株切り日や収穫日の日数差よりもより幅広い日数差を試験水準としたため、一地域 4 年間での栽培試験（Trial I）と単年度（2012 年）地域での栽培試験（Trial II）における収穫日の差は最長 40 日に設定し、株切り日の違いは最長 20 日とした。ただし、株切り日の影響評価は Trial II のみで実施し、Trial I の株切り日は 1 日ないし 5 日違いで実施した。表中に示す harvest time (days) の定義は、収穫日をいつ実施したかではなく、ホップの毛花が開花してから収穫するまでの日数を示している。これは収穫日そのままを基準にした場合、年毎の気候の変動によりホップの成長あるいは成熟状態が異なり、試験水準として意味を成さないためである。すなわち、よりホップの生長状態を指し示す指標と考えられるホップの毛花が開花してから収穫するまでの日数を収穫日の試験水準と定義することにした。ここで、開花日は、ホップの毛花の 50 % が開花したタイミングと定義した。また、株切り日（pruning date）は 4 月 1 日を基点として、それより何日後に株切りを実施したかの日数を多変量解析に用いた。チェコ農家のホップ 22 試料の株切り日と毛花の開花日を調べた結果（図 2-3）、株切り日が早い時期（4 月上旬頃）遅い時期（4 月下旬頃）によって、毛花が開花する時期はそれほど大きく変わらず、株切り日の実施日に 17 日間の差があったのに対し、毛花の開花日は 8 日間の差に短縮された。このことは、ホップが花を咲かせるまでの栄養成長期間の長さが変化することを意味していることから、株切り日は毛花開花後の成熟期間に何らかの影響を与えるのではないかと考えられた。

Trial II で実施した 4 つの栽培地域の地図を図 2-3 に示す。4 つの圃場間はおおよそ 20 km 離れており、土地の高度も若干異なる。Trial I、II の栽培土壌の種類、株の樹齢（10～20 齢）、クローンタイプ、ウィルス感染性（無し）は共通条件とした。収穫さ

れたホップはすぐに 50℃の温風で約 8 時間、水分含量が $10\pm 1\%$ となるように乾燥し、真空包装し、評価するまで -20℃下で保存した。

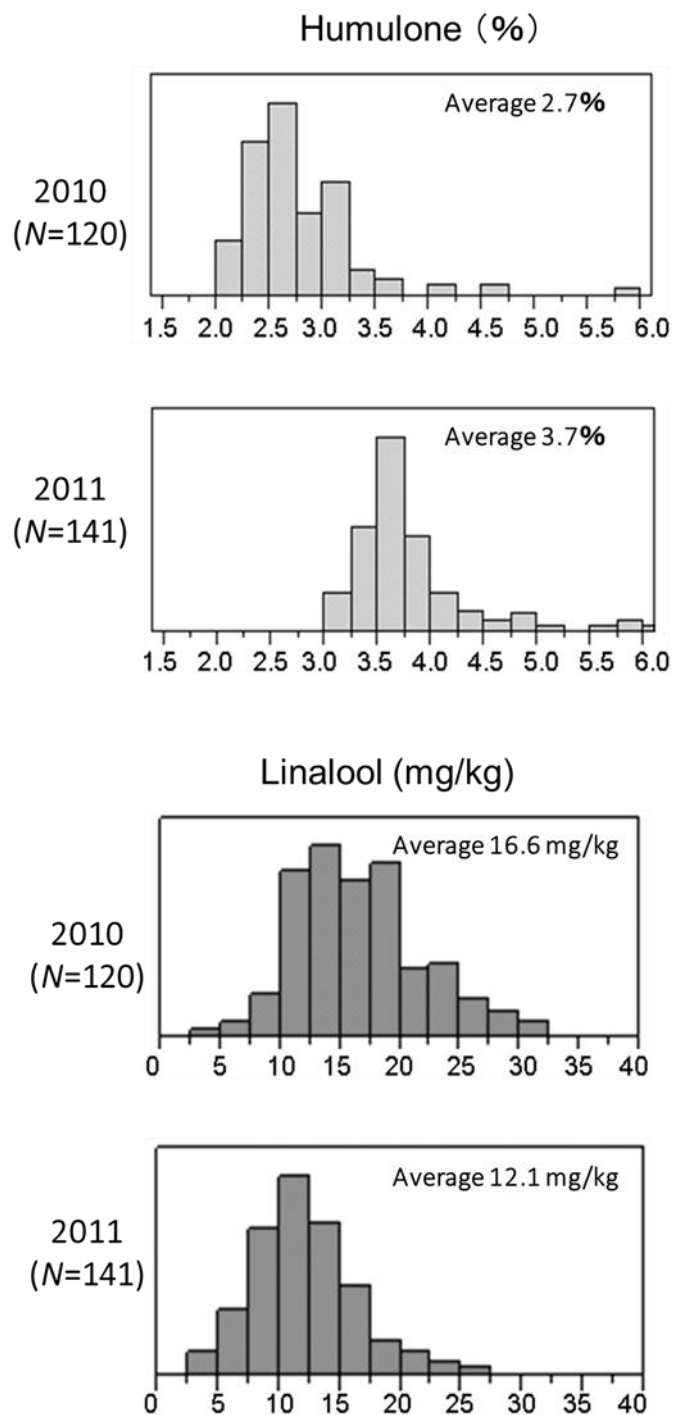


図 2-2 チェコザーツ地方の栽培農家から収穫されたザーツホップの humulone と linalool 含量の分布図

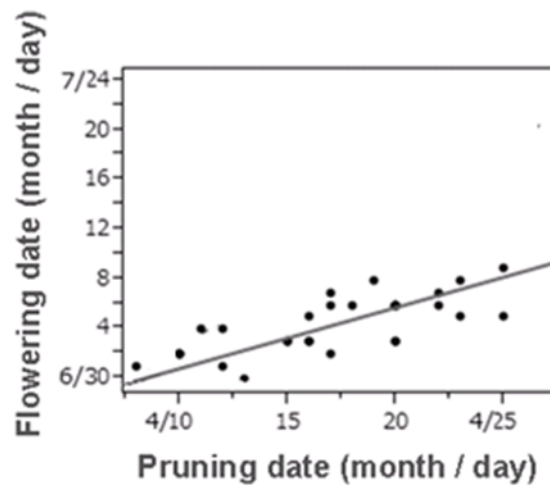


図 2-3 チェコザーツ地方の 22 栽培農家のザーツホップの株切り日と開花日の関係

表 2-1 評価対象にしたザーツホップの水準

(A); Trial I (1 地域 4 年間)、(B); Trial II (単年 4 地域)

(A) Cultivation trial I

Harvest year	2011				2012				2013				2014			
Farm	Rybnany				Rybnany				Steknik				Steknik			
Pruning date	April 15				April 16				April 20				April 15			
Harvest time (days)	22	29	50	57	23	32	51	60	26	37	53	61	29	40	57	64

(B) Cultivation trial II

Harvest year	2012																															
Farm	Lipenec								Krouvcova								Rybnany								Blsany							
Pruning date	April 4				April 14				April 4				April 24				April 6				April 16				April 25				April 14			
Harvest time (days)	41	49	69	78	30	38	58	67	30	38	58	67	16	25	44	53	30	39	58	67	23	32	51	60	16	25	44	53	38	45	63	72

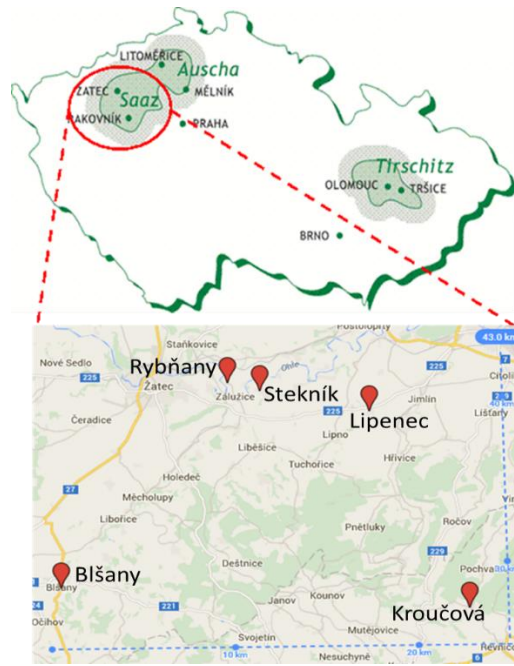


図 2-4 栽培試験を行った 5 つのザーツ圃場の地図

2-3 ホップティーによる香気特性に関する定量的官能評価 (QDA)

—試料調製方法および官能評価方法—

【ホップティーの調製方法】

前述通り、ホップティー官能評価はビールにおけるホップ香の代替評価であることから、ビールへのホップ香の移行率と同じになるようにホップティーを調製する必要がある。本評価では、前述（第1章 1-2）のホップの香りをビールにしっかりと残すため麦汁煮沸の終了間際にホップを添加する **late hopping** を模した条件で、マントルヒータを用いて開放系で短時間煮沸を行った。また、ホップは麦汁で煮沸するのではなく、麦汁と同じ pH の緩衝液で煮沸し、ホップ香の特長が明確に識別できるようにした。ホップ添加濃度は実際のビール醸造において **late hopping** する分量だけを添加した。具体的な手法を以下に記す。

(1) 乾燥ホップの粉砕

乾燥ホップ約 200 g を十分にほぐして均一にかき混ぜ、その中から約 5 g を 2 回サンプリングした。1 回につき、5 g 全量をコーヒーマルに投入し、タイマーで正確に 10 秒粉砕を 4 回繰り返した。

(2) ホップ煮沸用 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.3) の調製

無水クエン酸 1.92 g とリン酸水素 2 ナトリウム 2.8 g を超純水 1 L に溶解した。pH メータで確認しながら少量ずつリン酸水素 2 ナトリウムを添加し、pH 5.3 に調整した。

(3) ホップ煮沸

① 枝付きフラスコに室温（約 20℃）に戻した (2) のホップ煮沸用クエン酸緩衝液を 100 g 計量し、容器を含めた重量を計量した。

② マントルヒータで加温し、緩衝液の温度が 100℃ に到達した瞬間に、枝口から漏斗を用いて、粉砕ホップ 1.0 g を一気に投入した。筆で漏斗の縁に着いた粉砕ホップはきれいに払い落とした。

③ すぐにスリ栓をして、熱源を切って、5 分間保持した。

④ 5 分保持終了後、氷水にて 10 分間冷却した。

⑤ 容器の水気をふき取り、容器を含めた重量を計量し、①の容器を含めた重量と添加ホップ 1 g の合計重量より減少した分量の水を添加し、煮沸前の重量に戻した。

⑥ 茶漉しにて、ホップ粕を除いた。

⑦ 漉したホップティーをさらにポアサイズ 0.45 μm のディスクフィルターにて、約 10 mL のろ液を得た。これをホップティーの原液とした。官能専用チューリップグラスに入れ、脱イオン水 20 mL 入れ、ここにホップティー原液 5.0 mL をマイクロピペットで添加し、グラスを回してかき混ぜた。香りが飛ばないように、シャーレでふたをしておいた。

【ホップティーの官能評価方法】

官能評価は第 1 章 1-3 官能評価に記載した専門パネル 7 名を用いて行った。官能評価軸は、事前官能評価において明確に識別できた 4 つの特徴、floral、fruity、citrusy、hay-like に絞った。herbal、spicy、grassy などの特徴は専門パネルがホップティーにおいてその特徴を明確に識別できなかったことから評価軸としなかった。ホップティー全 48 試料を 12 セッション（1 セッション 4 試料評価）に分けて、ランダムに提示した。パネリストは 4 つの特徴の強度を 0；感じない、1；わずかに感じる、2；明確に感じる、3；強く感じる、としてフリースケールでスコア付けをした。スコアは第 1 章と同様に標準化スコアにし、外れ値検定を行った。その結果、floral と hay-like スコアは 7 試料から 1 つずつ、fruity スコアは 6 試料から 1 つずつ、citrusy スコアは 8 試料から 1 つずつ外れ値が除かれ、最後に平均スコアを算出した。

—官能評価結果—

【ホップティーの官能結果】

図 2-5(A)に収穫年別、図 2-5(B)に 4 地域の農家別に各 harvest time におけるホップティーの 4 つの官能特徴に関する官能パネルの平均スコアのプロット図を示した。floral、fruity、citrusy スコアは、いずれの収穫年、地域において、harvest time が長くなるにつれて高くなる傾向が認められた。また、図 2-5(C)は harvest time (days)について、16~24 days を early harvest (EH)、25~44 days を middle harvest (MH)、45~64 days を late harvest (LH)、65~78 days を very late harvest (VLH)の 4 グループに分類し、グループ別に株切り日における 4 つの官能特徴に関する平均スコアをプロットした図である。floral、fruity、citrusy スコアは、middle harvest と late harvest のグループにおいて、株切り日が遅くなるにつれ高くなる傾向が認められた。しかし、hay-like は収穫日および株切り日によるスコアの変動がいずれの収穫年、地域においても認められなかった。この結果は、後に示す成分データおよびその分散分析（表 2-4、2-5）において Hay-like と類似性の高い特徴を示す caryophyllene oxide II や humulene に有意な変動が認められなかったことに関連しているのではないかと考えられた。

QDA スコアについて分散分析（ANOVA）を行った結果を表 2-2 に示す[51–52]。harvest time は Trial I、II において floral、fruity、citrusy に対し有意な影響を与えた。また Trial II において pruning date も floral、fruity、citrusy に対し有意な影響を与えた。交互作用は認められなかった。F 値から、harvest time が floral、fruity、citrusy に対してもっとも大きな影響を与えることが分かった。

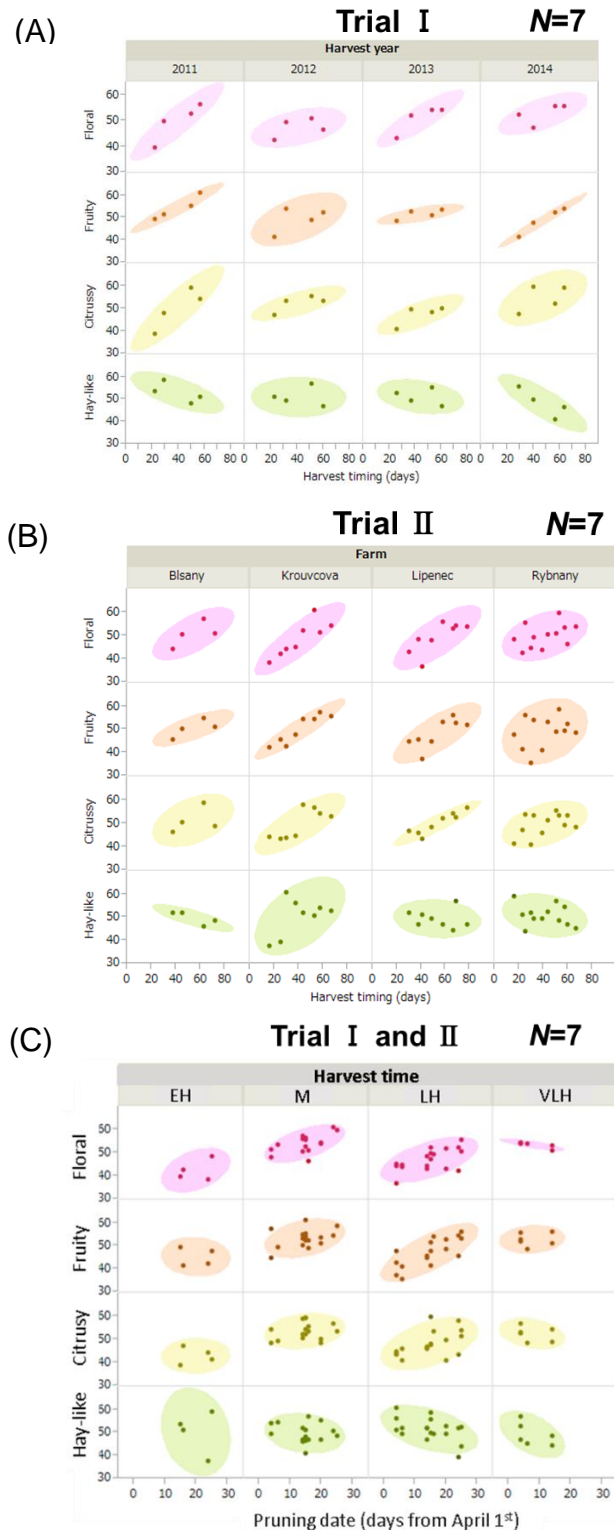


図 2-5 (A): 一地域 4 年間の各ホップ試料 (Trial I) の収穫時期ごとのホップティーの官能スコア (B): 単年 (2012 年) 4 地域の各ホップ試料 (Trial II) の収穫時期ごとのホップティーの官能スコア (C): Trial I と II のホップ試料を 4 区分した収穫時期別の株切り時期ごとのホップティーの官能スコア、(EH: 早期収穫、MH: 中期収穫、LH: 晩期収穫、VLH: 超晩期収穫) 楕円範囲は両側 95% 信頼区間。分散分結果は表 2-2 参照。

表 2-2 Trial I(A)と Trial II(B)のホップティーの官能評価に関する分散分析結果

(A)

Attribute	Harvest time	Harvest year	Harvest time X Harvest year
Floral	13.32 ^b	1.14	1.04
Fruity	15.85 ^b	4.14 ^a	0.93
Citrusy	9.87 ^a	1.63	0.86
Hay-like	3.48	0.22	0.78

(B)

Attribute	Harvest time	Farm	Pruning date	Harvest time X Farm	Harvest time X Pruning date
Floral	34.43 ^c	0.55	12.02 ^b	2.12	0.13
Fruity	34.08 ^c	1.52	22.14 ^c	1.98	0.36
Citrusy	30.19 ^c	0.53	14.38 ^b	1.44	0.46
Hay-like	0.32	0.53	3.57	1.76	1.72

^a Significance of F-values at the 95.0% level.

^b Significance of F-values at the 99.0% level.

^c Significance of F-values at the 99.9% level.

2-4 GC×GC-TOF/MS を用いた香気成分分析

—試料調製方法および分析条件—

Trial I および Trial II のホップ試料の香気成分プロファイルを調べるため密閉系でホップ熱水抽出溶液を調製した後、固相抽出により香気成分を抽出し、GC×GC-TOF/MS により定性・定量分析を行った。一般的にホップ香プロファイルを評価する場合は、ホップを水蒸気蒸留し、回収された精油成分のプロファイルを調べるが多いが、水蒸気蒸留によりホップ香成分の酸化や異性化が起き、本来のビールにおけるホップ香プロファイルと異なることが問題となる[59]。本試験では、麦汁で煮沸されることで抽出される酸やエステルなどを含むホップ香成分のプロファイルを調べるため[60]、熱水抽出による香り成分のプロファイルを調べることにした。ホップ中の humulone と oil 含量については、それぞれビール分析法の統一を目的とする組織（協会）European Brewery Convention（略称：EBC）および American Society of Brewing Chemists（略称：ASBC）により確立されたビール分析法である Analytica-EBC (7.7HPLC method) と The ASBC Methods of Analysis (Hop method13、水蒸気蒸留法) に従った。

【ホップ熱水抽出溶液の調製と固相抽出法】

前述の通り、本評価ではビールにおけるホップ香気を調べるための代替評価として、官能評価にホップティーを用い、成分評価にはよりばらつきが少なく、香り成分の蒸散が起きないように密閉系でホップから香りを熱水抽出した溶液を用いることにした。以下に手順を示す。

- ① ホップティーと同じ条件でコーヒーマルにてホップを粉碎し、ガラス製の耐圧チューブ（45 mL 容、外径 25.4 mm、高さ 203 mm）に 80 mg の粉碎ホップと 40 g のクエン酸緩衝液（pH 5.3）を加えた。このとき、容器内にはヘッドスペースはほとんどない状態にした。
- ② あらかじめ 95~100 °C に加温しておいたオートクレーブにチューブを入れ、100 °C に達してから 10 分間加熱した。その後、すぐに氷水で冷却し、ポアサイズ 0.45 μm のディスクフィルターにてろ過をした。
- ③ ろ過液に、内部標準として borneol を終濃度 50 ppb となるように添加した。10 mL エタノールと 10 mL 脱イオン水でプレコンディショニングした固相（Bond Elut Jr C18 500 mg）に調製液を 10 mL ロードし、その後 10 mL の脱イオン水で洗浄し、10 分間窒素ガスを流し、固相内部を乾燥させた。その後、10 mL のジクロロメタンで溶出した。
- ④ ジクロロメタン抽出液をロータリーエバポレーター（冷却水温度 -3 °C、サーモバス温度 25 °C、減圧度 250 mmHg）で 100 μL までメモリつき試験管を用いて濃縮した。

①のホップの熱水抽出操作は全てのホップ試料について繰り返し 2 回ずつ行った。

【GC×GC-TOF/MS による定性・定量分析】

分析条件は第 1 章 1-4 【GC×GC-TOF/MS 分析】 [40,61]に記載した条件と同じである。前述通り、1 試料につき熱水抽出を 2 回行い、それぞれについて 1 回ずつ固相抽出を行った。得られた 2 つの抽出液を GC×GC-TOF/MS にて 3 回ずつ分析を行い、合計 $n=6$ のデータを取得した。検量線は、対象化合物 33 成分をクエン酸緩衝液に溶解した混合溶液を作成し、ホップ熱水抽出溶液と同様に内部標準を加え、固相抽出を行った。検量線の水準は 50、100、150、200 $\mu\text{g/L}$ とし、原点を通過する 4 点検量線を作成した。検量線の直線性は良好であり $R^2 > 0.85$ であった。

—分析結果—

【成分分析結果】

(humulone と oil 含量の結果)

図 2-6 に Trial I(A)および Trial II(B)の harvest time (days) に伴う humulone と oil 含量の変動をプロットしたグラフを示す。いずれの収穫年および地域においても 2012 年を除き、humulone と oil 含量は harvest time が長くなるにつれて増加する傾向が得られた。また、単年（2012 年）の地域別の試験では、いずれの地域も harvest time が長くなるにつれて oil 含量は増加したが、humulone は Steknik の一地域を除き harvest time による変動は認められなかった。これは Steknik 特有の気候による影響と推察された。これらのデータを分散分析した結果を表 2-3 に示す。Trial I において harvest days と harvest year は humulone と oil 含量に対し有意な変動因子であった。また、Trial II において farm は humulone に対し、harvest time は oil に対し有意な変動因子であった。また、F 値から harvest time がどの因子よりも影響度の強い因子であることが分かった。交互作用は認められなかった。

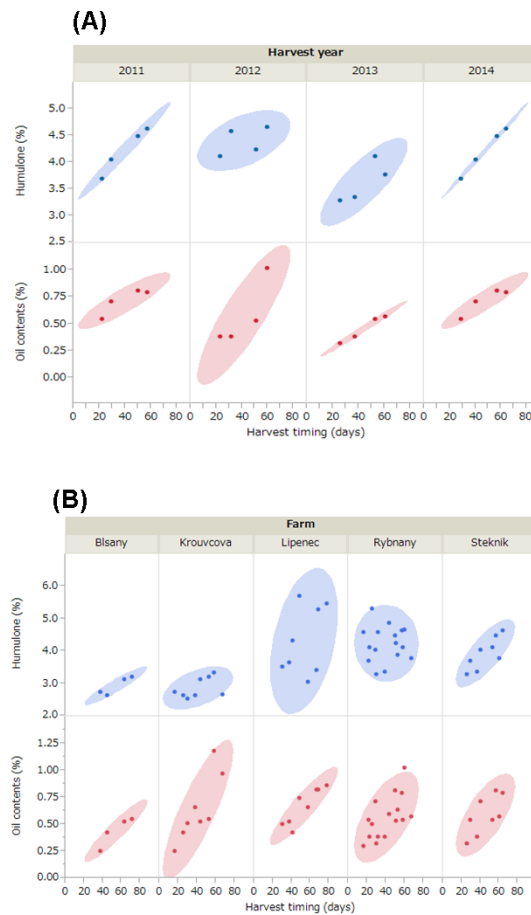


図2-6 (A): 一地域4年間の各ホップ試料 (Trial I)の収穫時期ごとのhumuloneとoil 含量、(B): 単年 (2012年) 4地域の各ホップ試料 (Trial II)の収穫時期ごとのhumuloneとoil 含量

表 2-3 Trial I(A)と Trial II(B)の humulone と oil 含量に関する分散分析結果

(A)					
Compounds	Harvest time	Harvest year	Harvest time X Harvest year		
Humulone (%)	30.45 ^o	12.12 ^b	1.45		
Oil contents (%)	23.69 ^b	5.56 ^a	1.29		
(B)					
Compounds	Harvest time	Farm	Pruning date	Harvest time X Farm	Harvest time X Pruning date
Humulone (%)	1.59	8.78 ^o	0.07	0.35	3.21
Oil contents (%)	27.24 ^o	3.89	0.07	0.95	0.21
				^a Significance of F-values at the 95.0% level.	
				^b Significance of F-values at the 99.0% level.	
				^c Significance of F-values at the 99.9% level.	

(香気成分分析の結果)

GCxGC-TOF/MS の MS スペクトル解析により 63 化合物が同定された。これらの化合物の検量線は $R^2 > 0.85$ で良好であった。しかし、ホップから抽出された 63 成分のうち 30 成分は変動係数が 20%を超え、定量性に欠けた。変動係数が大きくなる要因は、香気成分の一部は麦汁などの溶液中で加熱されると非常に不安定な状態になるためと考えられ、特に myrcene や caryophyllene、humulene、limonene などの不飽和炭化水素にその傾向が顕著であった。これらの成分はホップティーの香りを構成する成分であるが、同じ試料でも変動が大きいことから、栽培条件によるホップ香の特徴 (floral, fruity, citrusy) の違いを説明する因子とは考えにくいため、このような不安定な成分は定量成分の対象から除くことにした。したがって、33 成分について定量分析を行った。表 2-4(A)、(B)-1、(B)-2 に定量結果を、表 2-5(A)、(B)には分散分析の結果を示す。Trial I (A)では 17 成分に対し harvest time の主効果が、26 成分に対して harvest year の主効果が認められた。また 9 成分に対して harvest time/harvest year の交互作用が認められた。Trial II(B)においては harvest time、farm、pruning date の主効果がそれぞれ 13、18、9 成分に対して認められた。また、harvest time/farm と harvest time/pruning date の交互作用はそれぞれ 1、3 成分に対して認められた。これらの結果において、いくつかの成分は一方の Trial では harvest time による有意な変動が与えられ、他の Trial には有意な変動が与えられていないことが示された。これは栽培地域によって年毎の気候変動の影響度合いが異なることを示しているといえる。

表 2-4 (A) Trial I ; 地域 4 年間のホップ熱水抽出溶液中のホップ香成分定量結果 (µg/L)

(A)

RT(sec)		Harvest year	2011				2012				2013				2014			
		Farm	Rybnany				Rybnany				Steknik				Steknik			
		Pruning date	15				16				20				15			
1st Dimension	2nd Dimension	Harvest time	22	29	50	57	23	32	51	60	26	37	53	61	29	40	57	64
576	1.19	4-Methyl-2-pentanone	211.6	161.3	164.1	158.0	62.9	58.3	51.9	61.6	302.5	228.4	127.4	136.5	123.3	97.4	113.7	82.5
856	1.08	3-Methyl-2-butenal	69.4	80.8	90.8	81.1	25.1	21.0	24.6	27.9	85.5	103.3	52.8	63.1	62.3	63.9	61.8	77.9
888	1.14	2-Hexenal	10.1	9.6	9.4	8.1	4.4	2.5	1.6	2.9	19.5	28.4	12.9	13.2	29.8	13.8	8.5	6.9
968	1.41	o-Cymene	18.0	25.1	13.3	13.9	4.8	2.4	4.7	3.8	21.6	33.8	32.6	39.0	7.8	12.2	19.8	12.2
984	1.36	Heptanoic acid, methyl ester	2.5	1.3	1.3	1.4	3.5	2.1	1.5	1.8	4.0	6.7	6.3	1.2	12.0	15.8	6.0	3.4
1028	1.01	3-Methyl-2-Buten-1-ol	39.0	32.8	26.8	26.4	17.4	21.0	13.7	14.8	34.3	33.5	21.4	25.9	22.4	21.7	25.2	25.3
1112	1.04	E-3-Hexen-1-ol	3.8	2.2	0.3	1.3	5.4	1.4	0.9	2.0	5.5	3.8	3.0	2.7	4.4	5.1	2.1	0.2
1128	1.40	Octanoic acid, methyl ester	1.9	0.7	0.6	0.5	2.0	1.4	1.2	0.9	2.1	3.8	3.3	1.2	4.8	6.7	2.4	2.0
1136	1.37	Nonanal	11.9	7.6	10.7	8.5	8.7	9.3	7.9	9.3	31.4	18.8	20.7	17.9	18.5	15.6	15.7	13.0
1188	1.47	Octanoic acid, ethyl ester	2.7	2.1	2.9	3.0	8.0	4.5	7.2	9.3	9.6	8.3	2.8	5.4	4.2	6.9	5.6	4.7
1200	1.10	1-Octen-3-ol	7.9	6.7	4.8	3.8	8.0	4.1	3.8	3.9	5.4	5.1	6.5	5.7	6.0	9.8	5.3	5.6
1208	1.25	cis-Linalool oxide	25.1	30.3	38.7	43.8	23.2	21.5	25.5	29.1	21.3	25.8	38.7	38.2	20.3	31.7	43.2	36.6
1244	1.23	trans-Linalool oxide	23.5	28.0	40.1	45.2	23.7	24.4	28.7	33.9	22.2	27.3	42.2	40.5	19.5	33.3	45.0	36.5
1264	1.44	Nonanoic acid, methyl ester	1.1	0.8	0.7	1.3	0.7	1.2	0.9	0.5	2.0	3.0	3.7	1.2	2.3	3.8	2.1	1.9
1268	1.37	2-Decanone	14.7	17.0	20.7	18.9	7.3	9.7	14.2	13.3	24.9	25.6	19.6	17.8	10.7	13.5	14.5	14.6
1320	1.06	Benzaldehyde	3.1	3.6	4.2	3.8	3.6	2.0	4.4	3.4	9.2	5.4	8.3	3.1	3.3	4.9	3.0	3.5
1324	1.18	Linalool	21.3	41.8	85.9	91.8	23.2	21.9	35.7	34.0	32.8	50.8	67.5	66.9	37.9	67.0	122.9	111.7
1340	1.13	1-Octanol	2.2	0.7	1.1	1.2	1.5	1.1	1.0	2.0	1.8	2.6	2.8	3.6	2.0	2.2	2.1	3.0
1400	1.41	2-Undecanone	22.0	23.4	25.6	21.0	11.3	18.8	25.7	22.8	40.9	43.3	26.2	27.4	15.4	18.8	16.4	16.2
1448	1.53	Decanoic acid, ethyl ester	5.1	4.0	5.3	5.0	9.5	7.7	9.0	9.3	13.1	10.8	3.6	5.5	5.1	6.9	6.2	5.0
1508	1.22	Z-Citral	11.3	13.5	21.4	17.9	6.2	8.7	11.1	9.3	9.9	14.4	10.6	14.0	8.8	12.5	18.8	23.9
1516	1.32	Methyl geranate	6.4	18.2	37.2	40.6	3.7	7.5	10.1	10.2	7.3	26.5	37.7	26.7	9.9	23.5	35.0	35.1
1520	1.18	α-Terpineol	3.1	4.9	4.6	9.0	3.4	4.5	5.3	4.7	3.4	5.2	5.0	5.7	2.9	3.6	5.4	4.2
1564	1.22	E-Citral	8.3	9.5	1.3	2.1	4.1	6.7	7.7	5.9	5.9	9.3	9.2	8.8	8.8	11.5	15.2	15.7
1676	1.12	Geraniol	7.5	8.1	13.0	10.4	7.1	7.0	5.8	5.0	7.5	14.2	13.4	13.5	15.4	39.5	34.8	40.9
1720	0.98	Benzyl alcohol	5.6	6.4	6.5	6.6	3.6	6.7	12.7	6.4	7.6	9.0	7.6	7.2	5.3	7.4	4.8	4.6
1760	1.01	Phenylethyl alcohol	2.0	1.6	1.5	1.1	3.9	4.4	8.9	6.5	2.4	1.3	2.3	1.6	1.9	2.6	1.3	2.8
1792	0.98	Heptanoic acid	43.3	76.3	122.7	117.9	52.7	54.0	95.1	71.8	59.3	70.2	71.2	54.1	22.5	25.5	51.8	47.8
1860	1.44	Caryophyllene oxide	18.9	18.9	18.0	18.9	8.8	5.9	7.9	15.7	9.2	8.5	5.8	6.0	9.1	9.1	10.5	9.8
1900	0.99	Octanoic acid	27.9	40.8	44.1	45.8	33.6	23.0	49.7	42.8	22.3	37.0	28.9	31.3	16.7	24.2	26.6	24.2
1916	1.41	Humulene epoxide II	195.5	152.4	137.7	141.7	70.2	117.7	98.9	54.1	53.4	58.5	31.2	31.8	49.6	48.1	62.1	61.1
2036	1.03	2-Methoxy-4-vinylphenol	3.3	3.1	4.4	9.1	3.9	8.8	5.7	3.3	3.6	4.6	2.6	2.3	2.2	2.8	2.8	5.4
2100	1.03	Decanoic acid	12.3	17.5	15.0	17.4	12.3	12.9	20.7	18.2	7.7	12.0	13.4	12.8	7.5	5.9	8.7	7.9

表 2-4 (B) - 1、(B) - 2 Trial II ; 単年 4 地域のホップ熱水抽出溶液中のホップ香成分定量結果 (µg/L)

(B)-1

Harvest year	2012														
Farm	Lipenec								Krouvcova						
Harvest time	41	49	69	78	30	38	58	67	30	38	58	67	16	25	44
Pruning date	4	4	4	4	14	14	14	14	4	4	4	4	24	24	24
4-Methyl-2-pentanone	105.4	99.4	118.4	119.9	90.1	90.1	81.2	121.6	154.2	244.9	138.1	148.9	118.1	125.2	85.0
3-Methyl-2-butenal	53.8	65.2	72.3	68.5	56.8	56.8	57.5	65.4	80.6	58.7	52.8	65.1	67.6	92.3	68.8
2-Hexenal	12.8	36.7	26.8	18.3	10.9	10.9	5.0	7.3	9.2	4.5	3.5	11.0	8.3	7.0	5.1
o-Cymene	3.3	4.8	9.0	8.7	7.2	7.2	10.2	12.3	15.3	14.3	14.7	18.1	11.4	11.3	17.0
Heptanoic acid, methyl ester	4.8	12.9	31.7	22.1	12.1	16.3	8.4	9.4	18.4	1.6	3.1	69.5	16.2	1.4	3.7
3-Methyl-2-Buten-1-ol	22.5	32.2	34.2	30.6	25.5	25.5	26.6	41.1	30.1	30.8	23.1	38.4	31.6	42.5	29.1
E-3-Hexen-1-ol	6.6	3.3	2.7	1.6	2.1	1.4	2.2	1.4	2.6	2.0	1.6	1.7	2.8	1.2	0.7
Octanoic acid, methyl ester	3.0	3.7	8.2	6.9	13.6	18.8	9.7	10.9	8.2	6.0	1.0	42.5	18.0	6.4	1.9
Nonanal	18.6	22.1	22.5	25.2	17.6	21.2	12.5	24.1	35.1	26.8	20.9	35.6	15.8	13.6	13.1
Octanoic acid, ethyl ester	11.3	12.8	15.4	2.2	4.7	2.3	3.9	4.1	2.9	2.6	2.4	3.2	2.5	2.6	3.1
1-Octen-3-ol	8.7	10.2	4.1	5.4	8.7	8.7	5.8	6.2	9.6	3.9	7.7	8.0	10.1	4.7	8.2
cis-Linalool oxide	10.9	14.4	23.1	22.7	12.1	16.5	19.1	23.5	15.5	16.4	22.5	38.9	18.3	14.8	16.8
trans-Linalool oxide	27.3	27.4	29.4	26.3	17.8	16.2	19.6	24.4	16.6	20.9	25.1	41.9	18.1	13.5	20.7
Nonanoic acid, methyl ester	1.4	2.5	7.4	6.0	13.1	10.1	5.3	7.3	3.0	1.5	0.9	14.5	13.5	1.3	2.2
2-Decanone	7.4	13.6	18.7	15.7	10.8	12.2	10.8	10.8	13.0	17.1	19.0	25.3	12.3	15.3	18.3
Benzaldehyde	6.1	3.3	3.2	2.7	4.7	4.7	10.5	4.8	6.3	4.1	10.0	4.0	4.8	3.4	12.7
Linalool	14.9	20.2	41.2	37.2	26.6	22.6	36.5	30.6	17.5	9.4	24.9	36.7	20.1	15.8	37.3
1-Octanol	3.5	2.2	2.8	4.5	2.3	2.9	3.6	4.6	2.3	2.3	1.1	4.9	2.7	2.6	1.8
2-Undecanone	17.6	22.3	28.6	22.3	19.8	20.7	15.3	20.8	19.0	27.1	26.2	35.1	17.8	23.6	26.9
Decanoic acid, ethyl ester	9.3	8.6	10.4	6.3	19.1	7.4	6.5	8.0	5.1	5.7	5.1	5.0	5.3	5.1	2.6
Z-Citral	4.4	7.0	10.9	9.5	9.1	9.3	9.5	8.1	5.2	2.4	5.1	19.1	6.7	5.9	5.9
Methyl geranate	1.0	2.5	7.1	7.0	3.3	2.6	3.8	6.0	1.7	2.1	4.7	66.3	2.0	2.8	6.0
α-Terpineol	4.1	4.2	4.0	4.4	5.8	5.6	6.7	4.8	4.1	3.5	5.2	5.2	4.9	3.0	6.9
E-Citral	2.0	6.3	8.5	7.7	6.4	4.2	6.3	5.6	4.8	1.9	3.8	10.4	6.3	5.2	6.8
Geraniol	2.0	2.0	7.8	5.4	8.5	3.0	4.5	3.4	3.5	1.1	2.8	11.6	4.8	1.0	4.9
Benzyl alcohol	15.7	6.7	4.6	4.1	8.6	8.6	16.5	6.0	8.6	3.0	8.3	4.9	8.9	3.0	8.5
Phenylethyl alcohol	3.7	1.1	1.4	1.4	2.8	2.8	9.3	3.1	3.8	2.3	7.2	3.7	4.3	2.6	7.4
Heptanoic acid	14.2	19.5	47.9	42.8	25.6	32.3	56.2	56.6	24.9	39.1	91.0	98.3	28.5	37.6	100.3
Caryophyllene oxide	5.8	17.8	14.1	9.8	8.4	8.2	4.5	4.2	3.9	7.3	12.6	17.1	6.1	7.1	8.3
Octanoic acid	9.1	8.4	15.4	15.2	19.6	14.2	18.3	20.7	15.6	27.4	37.5	54.1	15.8	27.3	37.7
Humulene epoxide II	31.2	119.3	102.0	61.6	56.5	66.5	31.3	34.7	35.4	6.1	27.7	4.3	40.7	67.8	65.1
2-Methoxy-4-vinylphenol	6.6	7.8	8.8	9.2	3.1	4.6	5.3	3.7	8.2	5.0	3.5	4.4	6.6	5.9	3.6
Decanoic acid	5.1	19.7	23.7	6.3	22.6	24.3	16.1	14.0	6.7	12.7	13.3	16.4	6.5	11.0	16.0

(B)-2

Harvest year	2012															
Farm	Rybnany												Bisany			
Harvest time	30	39	58	67	23	32	51	60	16	25	44	53	38	45	63	72
Pruning date	6	6	6	6	16	16	16	16	25	25	25	25	14	14	14	14
4-Methyl-2-pentanone	62.4	98.8	67.9	63.2	62.9	58.3	51.9	61.6	70.1	77.7	67.4	123.8	21.5	25.4	36.9	28.9
3-Methyl-2-butenal	43.1	21.8	37.8	34.0	25.1	21.0	24.6	27.9	48.5	53.5	46.0	60.5	46.0	52.6	86.3	69.3
2-Hexenal	8.2	2.8	4.6	5.3	4.4	2.5	1.6	2.9	22.4	13.5	5.2	5.9	7.2	6.8	4.0	6.1
o-Cymene	3.2	2.5	4.9	7.2	4.8	2.4	4.7	3.8	2.6	8.0	14.2	10.3	2.1	2.8	3.8	3.9
Heptanoic acid, methyl ester	3.8	3.3	2.4	3.1	3.5	2.1	1.5	1.8	4.0	12.3	5.9	5.1	1.9	2.7	4.8	3.3
3-Methyl-2-Buten-1-ol	20.7	20.0	46.6	20.1	17.4	21.0	13.7	14.8	26.8	31.2	23.1	27.7	15.1	16.1	23.9	19.2
E-3-Hexen-1-ol	8.1	1.8	2.1	1.7	5.4	1.4	0.9	2.0	4.9	3.0	2.7	2.6	2.5	0.5	0.5	0.8
Octanoic acid, methyl ester	2.7	2.1	1.0	1.4	2.0	1.4	1.2	0.9	3.6	6.3	6.3	5.8	1.8	6.5	2.1	1.3
Nonanal	11.3	9.7	13.5	16.0	8.7	9.3	7.9	9.3	20.6	24.1	27.2	36.2	41.1	37.7	28.8	29.9
Octanoic acid, ethyl ester	1.9	2.0	2.4	2.4	8.0	4.5	7.2	9.3	3.3	2.6	1.2	2.3	2.7	2.7	3.4	3.0
1-Octen-3-ol	9.5	5.1	5.2	3.9	8.0	4.1	3.8	3.9	4.4	5.2	4.5	4.2	8.4	3.7	5.7	4.6
cis-Linalool oxide	12.4	29.3	23.1	19.1	23.2	21.5	25.5	29.1	8.0	19.0	25.7	33.9	3.7	6.4	7.6	8.1
trans-Linalool oxide	13.5	31.3	24.3	26.1	23.7	24.4	28.7	33.9	3.0	4.3	2.0	2.6	24.0	39.2	32.3	42.1
Nonanoic acid, methyl ester	1.2	1.8	0.9	1.4	0.7	1.2	0.9	0.5	2.3	7.8	3.3	4.8	0.8	0.8	1.9	1.2
2-Decanone	8.1	14.0	15.6	16.4	7.3	9.7	14.2	13.3	10.4	19.6	14.5	17.0	14.1	22.8	22.7	26.0
Benzaldehyde	6.2	1.9	4.7	2.5	3.6	2.0	4.4	3.4	2.9	3.2	6.5	3.2	4.4	1.6	12.8	1.9
Linalool	26.3	17.7	35.5	43.5	23.2	21.9	35.7	34.0	13.4	34.0	41.0	38.2	35.8	61.0	77.1	86.0
1-Octanol	1.4	1.8	2.0	2.1	1.5	1.1	1.0	2.0	1.6	2.5	2.0	2.8	0.8	2.3	1.6	2.5
2-Undecanone	16.7	28.1	29.8	29.1	11.3	18.8	25.7	22.8	35.5	46.5	30.0	32.3	45.9	46.8	46.2	49.0
Decanoic acid, ethyl ester	3.8	4.6	5.4	4.6	9.5	7.7	9.0	9.3	5.9	4.4	2.3	2.8	5.1	6.0	8.1	7.9
Z-Citral	7.0	3.9	9.7	8.8	6.2	8.7	11.1	9.3	4.5	7.5	8.4	10.0	9.9	12.8	19.4	14.1
Methyl geranate	3.2	6.1	6.6	11.6	3.7	7.5	10.1	10.2	2.5	10.0	7.4	9.8	3.9	5.2	7.4	4.9
α-Terpineol	8.1	3.1	4.9	4.7	3.4	4.5	5.3	4.7	4.4	4.0	7.2	4.6	5.0	4.7	7.3	4.7
E-Citral	1.2	2.8	4.5	3.1	4.1	6.7	7.7	5.9	3.7	2.0	5.8	5.7	3.8	5.0	6.6	7.9
Geraniol	7.9	2.7	3.6	6.0	7.1	7.0	5.8	5.0	4.0	7.2	6.8	4.3	2.9	2.4	5.5	6.1
Benzyl alcohol	8.5	4.0	10.5	6.7	3.6	6.7	12.7	6.4	3.5	3.9	13.5	6.6	5.9	2.7	5.0	3.4
Phenylethyl alcohol	4.0	1.3	3.2	1.7	3.9	4.4	8.9	6.5	1.3	1.4	3.7	2.1	2.3	1.5	6.0	1.5
Heptanoic acid	30.3	23.7	56.0	105.4	52.7	54.0	95.1	71.8	25.9	53.6	82.4	89.6	43.9	90.2	111.5	153.4
Caryophyllene oxide	9.7	6.9	12.0	27.8	8.8	5.9	7.9	15.7	15.0	19.9	9.8	8.0	10.3	11.8	12.2	9.0
Octanoic acid	25.8	31.8	34.1	39.9	33.6	23.0	49.7	42.8	17.5	27.1	40.5	46.1	42.0	50.5	56.0	65.6
Humulene epoxide II	57.3	34.6	96.2	93.3	70.2	117.7	98.9	54.1	89.2	127.6	71.7	62.6	35.9	52.1	48.5	51.2
2-Methoxy-4-vinylphenol	7.2	5.5	5.5	10.7	3.9	8.8	5.7	3.3	7.0	6.5	6.7	4.0	12.0	15.3	22.1	15.8
Decanoic acid	7.8	18.9	17.8	17.3	12.3	12.9	20.7	18.2	11.6	12.5	12.7	17.1	16.8	20.4	20.2	23.2

表 2-5 Trial I (A) および Trial II (B) の熱水抽出溶液中の成分の分散分析結果

(A)					
Attribute	Harvest time	Harvest year	Harvest time X Harvest year		
4-Methyl-2-pentanone	26.49 ^a	44.41 ^a	10.53 ^b		
3-Methyl-2-butenal	0.13	22.72 ^a	2.97		
2-Hexenal	11.21 ^a	12.34 ^b	3.21		
<i>o</i> -Cymene	1.72	31.83 ^a	3.59		
Heptanoic acid, methyl ester	6.49 ^a	11.26 ^b	2.32		
3-Methyl-2-buten-1-ol	13.23 ^a	20.46 ^a	4.58 ^a		
<i>E</i> -3-Hexen-1-ol	16.27 ^a	2.66	0.29		
Octanoic acid, methyl ester	5.90 ^b	8.07 ^b	1.06		
Nonanal	5.49 ^a	20.61 ^a	1.89		
Octanoic acid, ethyl ester	0.56	5.84 ^a	2.63		
1-Octen-3-ol	5.03	1.42	1.25		
<i>cis</i> -Linalool oxide	51.54 ^a	6.89 ^a	2.24		
<i>trans</i> -Linalool oxide	48.20 ^a	2.67	1.31		
Nonanoic acid, methyl ester	0.48	4.90 ^a	0.15		
2-Decanone	3.78	51.55 ^a	14.13 ^b		
Benzaldehyde	0.51	3.84	1.28		
Linalool	98.34 ^a	22.58 ^a	10.14 ^a		
1-Octanol	2.58	7.69 ^b	2.23		
2-Undecanone	0.54	20.25 ^a	7.56 ^c		
Decanoic acid, ethyl ester	6.68 ^a	8.48 ^b	7.75 ^c		
<i>Z</i> -Citral	29.62 ^a	10.04 ^c	4.80 ^c		
Methyl geranate	37.75 ^a	9.83 ^b	2.91		
α -Terpineol	10.83 ^a	2.13	0.90		
<i>E</i> -Citral	0.77	18.49 ^a	13.13 ^b		
Geraniol	4.61	16.89 ^a	2.14		
Benzyl alcohol	0.27	0.87	1.04		
Phenylethyl alcohol	1.29	17.71 ^a	2.78		
Heptanoic acid	19.59 ^b	17.73 ^a	4.519 ^a		
Caryophyllene oxide	0.33	23.88 ^a	2.71		
Octanoic acid	6.88 ^a	6.10 ^a	0.49		
Humulene epoxide II	2.67	23.835 ^a	1.10		
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.68	1.82	2.00		
Decanoic acid	10.47 ^a	16.06 ^a	1.13		

(B)					
Attribute	Harvest time	Farm	Pruning date	Harvest time X Farm	Harvest time X Pruning date
4-Methyl-2-pentanone	0.00	11.72 ^a	4.40 ^a	0.62	0.41
3-Methyl-2-butenal	3.31	14.33 ^a	3.26	2.19	0.10
2-Hexenal	0.41	2.90	0.63	0.43	3.69
<i>o</i> -Cymene	11.31 ^b	30.96 ^a	9.19 ^b	0.63	1.31
Heptanoic acid, methyl ester	3.17	4.53 ^a	0.46	2.35	0.56
3-Methyl-2-buten-1-ol	1.83	4.20 ^a	0.90	0.14	0.51
<i>E</i> -3-Hexen-1-ol	7.06 ^b	1.36	3.69	0.94	0.40
Octanoic acid, methyl ester	0.38	4.63 ^a	1.09	1.95	1.13
Nonanal	0.00	5.63 ^b	0.11	1.03	0.02
Octanoic acid, ethyl ester	0.00	1.75	0.71	0.01	0.00
1-Octen-3-ol	7.39 ^b	3.56 ^a	1.95	0.43	0.17
<i>cis</i> -Linalool oxide	17.52 ^a	12.22 ^a	2.42	0.80	0.49
<i>trans</i> -Linalool oxide	5.51 ^a	2.04	5.26 ^c	0.29	0.05
Nonanoic acid, methyl ester	1.41	2.88	6.45 ^c	0.92	0.74
2-Decanone	29.09 ^a	10.50 ^a	1.92	1.85	3.23
Benzaldehyde	0.48	1.23	0.52	0.17	1.14
Linalool	67.40 ^a	9.37 ^a	15.19 ^a	2.76	0.05
1-Octanol	7.71 ^a	5.42 ^b	4.13	0.48	0.07
2-Undecanone	3.62	11.84 ^a	2.35	1.56	4.04
Decanoic acid, ethyl ester	0.44	5.86 ^b	0.47	1.94	0.40
<i>Z</i> -Citral	13.25 ^b	1.62	5.25 ^c	1.63	0.04
Methyl geranate	7.74 ^a	4.68 ^a	3.08	4.60 ^a	0.02
α -Terpineol	1.39	0.14	3.04	0.50	1.64
<i>E</i> -Citral	10.58 ^b	3.02	10.07 ^b	0.63	0.34
Geraniol	4.24	1.32	4.03	2.07	0.25
Benzyl alcohol	0.11	2.10	0.15	1.01	1.07
Phenylethyl alcohol	1.05	0.76	1.37	0.03	1.86
Heptanoic acid	125.45 ^a	11.95 ^a	27.58 ^a	5.78 ^b	0.02
Caryophyllene oxide	2.06	0.94	0.14	2.61	10.53 ^b
Octanoic acid	79.87 ^a	40.14 ^a	21.37 ^a	7.68 ^b	1.88
Humulene epoxide II	0.24	1.58	2.54	0.02	0.57
2-Methoxy-4-vinylphenol	1.19	19.37 ^a	4.24	3.07	1.88
Decanoic acid	3.29	1.72	1.43	2.63	0.04

^a Significance level F value at the 95.0% level.

^b Significance level F value at the 99.0% level.

^c Significance level F value at the 99.9% level.

2-5 多変量解析による栽培条件と香気特性および成分との関連解析

—多変量解析結果—

【PLS 回帰モデルの構築】

ホップティーの官能特性 (floral、fruity、citrusy) の違いがどのような成分と関連し、その関連成分が harvest days や pruning date とどのような関係があるのかを明らかにするため、ホップティーの QDA スコアと熱水抽出用液の香気成分データを用いて PLS (partial least squares regression) 回帰分析を行った。図 2-7 に non-linear iterative partial least squares (NIPALS) の手法に基づき作成した floral、fruity、citrusy に関する PLS 予測回帰プロットを示す。実際に取得された QDA 実スコアと PLS モデル回帰によって導かれた QDA 予測スコアは良い相関性を示した。モデル式の妥当性を示す指標として、 R^2 と Q^2 が使われるが、 R^2 は実スコアと予測スコアの一致性を示す指標であり、 Q^2 はモデル式の予測性の高さを示す指標である。図 2-7 に示される通り、 R^2 が 0.65 より大きく、 Q^2 は 0.5 より大きい場合、得られたモデルは十分な予測性があると捉えることができる。したがって、今回得られた floral、fruity、citrusy に関する回帰モデルは、熱水溶液中のいくつかの成分によって十分に予測可能であったといえる。前述した通り、本評価においては、ホップの主要な成分である myrcene や caryophyllene、humulene、limonene は安定的に抽出されないため、PLS 回帰分析のパラメーターから除外したが、予測性の高いモデル式が得られたことから、今回の試料間の違いを説明する因子ではない可能性が示唆された。

PLS 回帰はモデル構築に寄与する重要な成分を把握することにも用いられ、VIP (variable importance in projection) 値が指標に用いられる。VIP 値が大きいほど応答変数、すなわち、QDA スコアに対する寄与が高いといえ、一般的に 1.0 より大きいと十分な寄与があると捉えられる。さらに、モデル式の係数がプラスかマイナスかによって、応答変数に対しポジティブに寄与するのか、ネガティブに寄与するのかを知ることができる。表 2-6 に floral、fruity、citrusy の PLS モデル回帰において、VIP が 1.0 以上を示した成分と VIP 値、中心化、尺度化されたデータに対するモデル係数を示す。今回得られた成分データは、成分間の濃度範囲の違いが大きいため、モデル構築において、数値が大きい成分の影響が強く出ないようにデータを中心化、尺度化した。

さらに、VIP 値が大きく、プラスの係数を示す成分が各ホップ香特徴と実際に関連性がありそうかを検証するため、それらの odor description を調べた結果、個々の成分の odor description は関連が高いと推定されたホップ香の特徴を想起させる特徴であることが分かり、その関連性がある程度妥当であると考えられた。また、VIP 値が大きく、マイナスの係数を示す成分である 1-octen-3-ol (mushroom-like) や E-3-hexen-1-ol (green、grassy) は fruity、citrusy に対しネガティブに作用していると推定されたことも妥当であると考えられる。

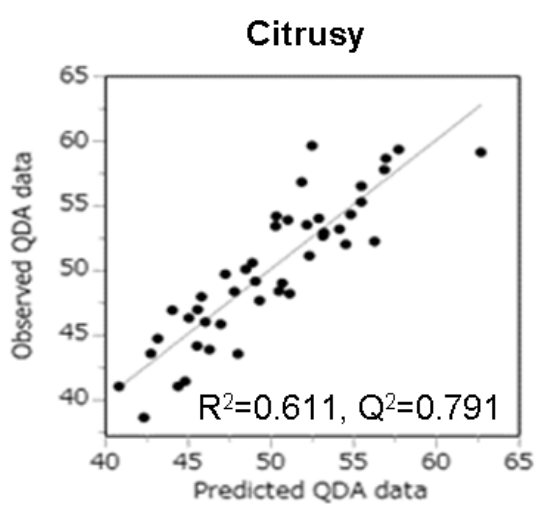
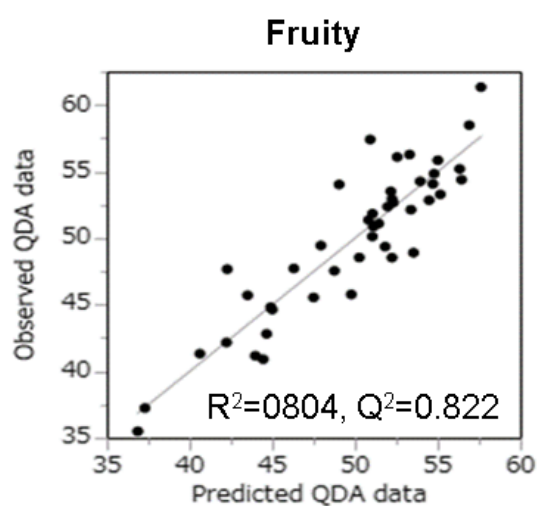
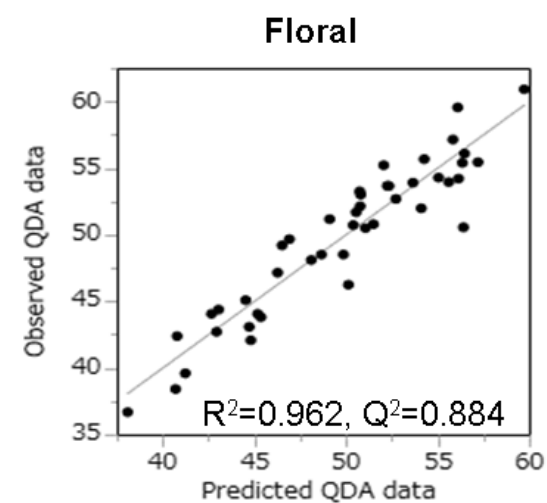


図 2-7 PLS 回帰による QDA 予測回帰プロット

表 2-6 各ホップ香の特徴に関連性が高いと推定される成分の VIP 値 (> 1.0) と係数および odor description

官能評価軸	化合物	VIP 値	係数	参照番号 / Odor description
Floral	1-Octen-3-ol	1.57	-0.35	1. Mushroom earthy green, oily, fungal, raw chicken
	Z-Citral	1.45	0.07	2. Sweet, citra, lemon peel
	Heptanoic acid	1.43	0.16	3. Cheesy, waxy, sweaty, fermented, pineapple and fruity
	Linalool	1.40	0.21	4. Citrus, orange, floral, terpy, waxy and rose
	Methyl geranate	1.37	0.06	5. Waxy, green, fruity, flower
	Octanoic acid	1.33	-0.15	6. Fatty, waxy, rancid, oily, vegetable, cheesy
	2-Decanone	1.24	0.01	7. Orange, floral, fatty, peach
	α -Terpineol	1.21	0.18	8. Pine, terpene, lilac, citrus, woody, floral
	2-Hexenal	1.21	0.36	9. Sweet, almond, fruity, green, leafy, apple, plum, vegetable
	E-3-Hexen-1-ol	1.20	-0.16	10. Green, grassy, melon, rind-like with a pungent, freshness
	trans-Linalool oxide	1.19	-0.19	11. Floral
	cis-Linalool oxide	1.14	0.26	12. Earthy, floral, sweet, woody
	E-Citral	1.05	0.03	13. Citrus, lemon
	Decanoic acid, ethyl ester	1.02	-0.18	14. Sweet, waxy, fruity, apple
Fruity	Heptanoic acid	1.72	0.18	3
	E-3-Hexen-1-ol	1.68	-0.34	10
	1-Octen-3-ol	1.49	-0.31	1
	2-Decanone	1.47	0.04	7
	Z-Citral	1.41	0.03	2
	Octanoic acid	1.39	-0.10	6
	cis-Linalool oxide	1.36	0.28	12
	Methyl geranate	1.29	-0.01	5
	Linalool	1.27	0.08	4
	trans-Linalool oxide	1.07	-0.19	11
Citrusy	α -Cymene	1.02	0.05	15. Cider-like, clove-like, phenolic, barnyard
	E-3-Hexen-1-ol	1.73	-0.49	10
	Z-Citral	1.53	0.04	2
	Linalool	1.52	0.11	4
	Heptanoic acid	1.42	0.19	3
	Geraniol	1.29	0.29	16. Sweet, floral, fruity, rose, waxy, citrus
	cis-Linalool oxide	1.29	0.34	12
	Methyl geranate	1.29	0.02	5
	E-Citral	1.28	-0.13	13
	Octanoic acid	1.24	-0.07	6
	trans-Linalool oxide	1.17	-0.16	11
	Phenylethyl alcohol	1.15	0.23	17. Floral, rose, dried rose, flower, rose water
	4-Methyl-2-Pentanone	1.08	-0.25	18. Sharp, solvent, green, herbal, fruity, dairy, spice
	2-Decanone	1.06	0.05	7

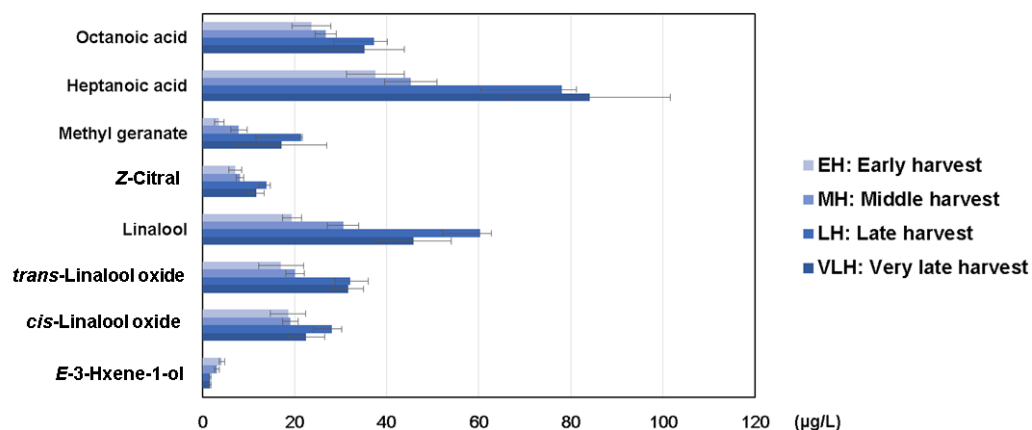
【各ホップ特徴に寄与度が高い成分の栽培条件による挙動】

本検討の最後に、ホップティーの官能スコアと成分の PLS 回帰分析から各官能特性 (floral、fruity、citrusy) に高く寄与すると推定された成分 (表 2-6) のうち、harvest time および pruning date により有意に変動した成分 (表 2-5) について、harvest time と pruning date によりどのような挙動を示すのかを図 2-8 により確認した。グラフ (A) は評価試料を harvest time (days) が 16~23、25~44、45~64、65~78 日の 4 つのグループ、EH (early harvest)、MH (middle harvest)、LH (late harvest)、VLH (very late harvest) に分けて、それぞれの成分について収穫時期による挙動を示したグラフである。グラフ (B) は評価試料を pruning date (days) が 4/1~9、4/10~19、4/20~30 の 3 つのグループ、EP (early pruning)、MP (middle pruning)、LP (late pruning) に分けて、それぞれの成分について株切り時期による挙動を示したグラフである。

その結果 Floral、Fruity、Citrusy にポジティブに寄与する heptanoic acid、Z-citral、linalool、cis-linalool oxide は late harvest に最大となり、ネガティブに寄与する octanoic acid、trans-linalool oxide も late harvest に最大となった。一方、floral、fruity、citrusy にネガティブに寄与する E-3-hexen-1-ol は harvest time が長くなるほど減少した。また、octanoic acid、heptanoic acid、Z-citral、linalool、trans-linalool oxide は middle pruning date で最大となり、o-cymene は early pruning date で最大となった。これらの結果から、ザーツホップのホップティー、あるいはその香気特性と関連付けできるビールにおけるホップ香の特徴を harvest time および pruning date により制御できることがわかった。

本研究ではチェコ産のザーツ種において栽培条件の検討を行ったが、Skinner らによりドイツ産のホップ品種 Hallertauer Mittelfueh やアメリカ産のホップ品種 Cascade、Willamete について収穫時期に関する研究が行われている[62-64]。彼らの研究によれば総じて収穫後期にホップ香気が強まる傾向にあるとしているが、ビールとして好ましいホップ香を呈するのは品種や、ビールの種類によって異なると考えられる。しかし、品種共通に収穫時期がホップ香の品質にとって重要であることが確かめられた。

(A) 収穫時期ごとのFloral、Fruity、Citrusyの関連成分濃度



(B) 株切り日ごとのFloral、Fruity、Citrusyの関連成分濃度

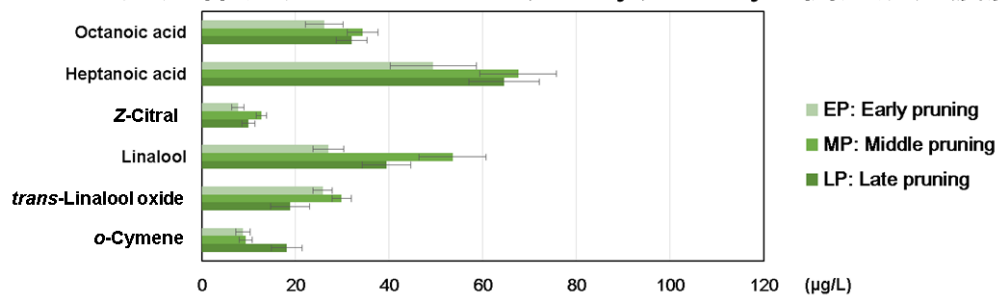


図 2-8 (A) : 4 区分した収穫時期ごとの floral、fruity、citrusy の関連成分のホップ溶液中の平均濃度と標準誤差 (SD) (EH : 早期収穫、MH : 中期収穫、LH: 晩期収穫、VLH: 超晩期収穫)

(B): 3 区分した株切り時期ごとの floral、fruity、citrusy の関連成分のホップ溶液中の平均濃度と標準誤差 (SD) (EP : 早期株切り、MP : 中期株切り、LP: 晩期株切り)

2-6 まとめと考察

第2章では、ザーツホップに関して、人為的な栽培制御が可能なホップ株切り時期と収穫時期（開花から収穫までの日数）が香気特徴に与える影響を評価した。チェコのザーツ地方の単一圃場にて2011年から2014年の4年間の栽培において、収穫時期を変えた栽培試験と、2012年単年の異なる4地域での栽培において、収穫時期と株切り時期を変えた栽培試験を実施した。

本評価では、収穫されたホップのビールにおける香気特徴を評価するために、全てのホップ試料についてビール醸造評価を実施するのは現実的でないため、代替評価法として、ホップの香りが蒸散し過ぎない程度に、小型のマントルヒータで短時間煮沸して、ビールと同程度のホップ濃度に調製したホップティーの官能評価を実施した。また、ホップ中の香気成分分析においては、精油分析の常套手段である水蒸気蒸留ではなく、醸造工程で、麦汁と煮沸されることでホップから抽出される成分のプロファイルを指標とすることが重要と考え、耐圧性チューブを用いた密閉系で、粉碎した乾燥ホップの熱水抽出溶液を調製し、香気成分を固相抽出した。

両者の栽培試験に共通して *floral*、*fruity*、*citrusy* の特徴が収穫時期後半にかけて有意に増加した。また、中期に株切りを行った場合に *floral*、*fruity*、*citrusy* の特徴が有意に増加した。さらに、*partial least squares regression (PLS)* 分析により *floral*、*fruity*、*citrusy* にポジティブに寄与する成分は *heptanoic acid*、*Z-citral*、*linalool*、*cis-linalool oxide* であり、ネガティブに寄与する成分は *octanoic acid*、*trans-linalool oxide* であると推定され、これらの成分は全て収穫後期にかけて有意に増加した。一方、ネガティブに寄与する *E-3-hexen-1-ol* は収穫後期にかけて減少した。また、*octanoic acid*、*heptanoic acid*、*Z-citral*、*linalool*、*trans-linalool oxide* は株切り中期で最大となり、*o-cymene* は株切り早期で最大となった。以上の結果から、ホップ香気特性に関連性のある成分は、収穫時期と株切り時期により制御可能であることが示され、最適なホップ香の品質を生産するための重要な栽培要因であることがわかった。

【使用試薬】

以下の GC グレードの市販試薬を用いた。

Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)製 : methyl heptanoate (> 95.0%)、nonanal (> 95.0%)、2-decanone (> 99.0%)、*E*-citral (> 95.0%)、*Z*-citral (> 95.0%)、borneol (> 70.0%, containing ca. 20% isoborneol)、3-methyl-2-butenal (> 95.0%)、1-octen-3-ol、decanoic acid ethyl ester (≥ 98.0%)、2-phenylethyl alcohol (> 98.0%)、3-decenoic acid (> 90.0%)、3-methyl-2-buten-1-ol (> 99.0%)、benzaldehyde (≥ 99.0%)、disodium hydrogen phosphate (98.5-101%)

Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)製 : 1-octanol (≥ 98.0%)、4-methyl-2-pentanone (≥ 98.0%)、1-undecanol (≥ 98.0%)、benzoyl alcohol (≥ 99.0%)、heptanoic acid (> 97.0%)、octanoic acid (> 99.0%)、decanoic acid (> 99.0%)、methanol (Guaranteed Reagent, 99.8%)、dichloromethane (濃縮 5000)、sodium sulfate (99%)

Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)製 : octanoic acid ethyl ester (≥ 98.0%)、isobutyl isobutyrate (≥ 95.0%)、octanoic acid methyl ester (≥ 98.0%)、nonanoic acid methyl ester (≥ 97.0%)、2-undecanone (≥ 98.0%)、geraniol (≥ 90.0%)、2-hexanal (≥ 97.0%)、*trans*-2-nonenal (> 95.0%)

Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan)製 : α-terpineol (≥ 90.0%)、*E*-3-hexen-1-ol (≥ 98.0%)、*trans*- and *cis*-linalool oxide (> 97.0%)、o-cymene (> 99.0%)、humulone (> 96.0%)、caryophyllene oxide (> 99.0%)

Lancaster Synthesis Ltd. (Lancashire, UK)製 : 2-methoxy-4-vinylphenol (> 97.0%)

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie (Buchs, Switzerland)製 : R-linalool

Funakoshi Corporation (Tokyo, Japan)製 : humulene epoxide II

第3章 ホップポリフェノールの健康機能活性と栽培条件による影響

第1, 2章はホップの品種や栽培条件によるビールにおけるホップ香の制御に関する研究であったが、本章はホップの別の用途である健康機能に関するものである。ヨーロッパではホップは昔から民間薬としての用途があり、ホップにのみ存在が確認されている xanthohumol、isoxanthohumol、8-prenylnaringenin などの prenylflavonoid には、それらの抗酸化活性やエストロゲン様活性により[65]、更年期障害、メタボリックシンドローム、インシュリン抵抗性Ⅱ型糖尿病、不眠、骨粗鬆症などに改善効果があるとされている[66–75]。多くの研究はホップ中の含有量が高い xanthohumol を中心とし、prenylflavonoid をターゲットにした研究が多い。また、ホップから抽出されたポリフェノールの効能として抗酸化活性に関する報告は複数あるが、その他の健康機能に関する報告は少ない。そこで、本章ではホップから粗抽出したポリフェノールについて抗酸化活性の他に、抗炎症、抗肥満に対する活性を調べることにした。さらに、その活性の強さがホップの栽培条件によりどのように変動するのか、またその変動要因はどのようなポリフェノールが関連しているのかを検討した。すでに Krofta らは、栽培条件以外の要因として、ホップ品種やホップの加工や保管過程で抗酸化活性が変動することを報告している[76]。また、Psenakova や Ceh らはホップの栄養成長期における水分制限や栄養成長剤によるホップ苞由来のポリフェノールへの影響について報告している[77–79]。本研究では、第2章での香りに対する栽培条件の影響を把握するための栽培試験 Trial Iにおいて1地域4年間に渡って栽培・収穫されたザーツホップを用い、それらの健康機能に関する活性の強さを比較した。また、粗抽出ポリフェノールに含まれる個々のポリフェノール化合物の含量をフーリエ変換型精密質量分析装置 Orbitrap LC-MS[80]で定性・定量評価し、活性の違いに関連するポリフェノールを多変量解析により推定することにした。図3-1に本研究のイメージを示す。

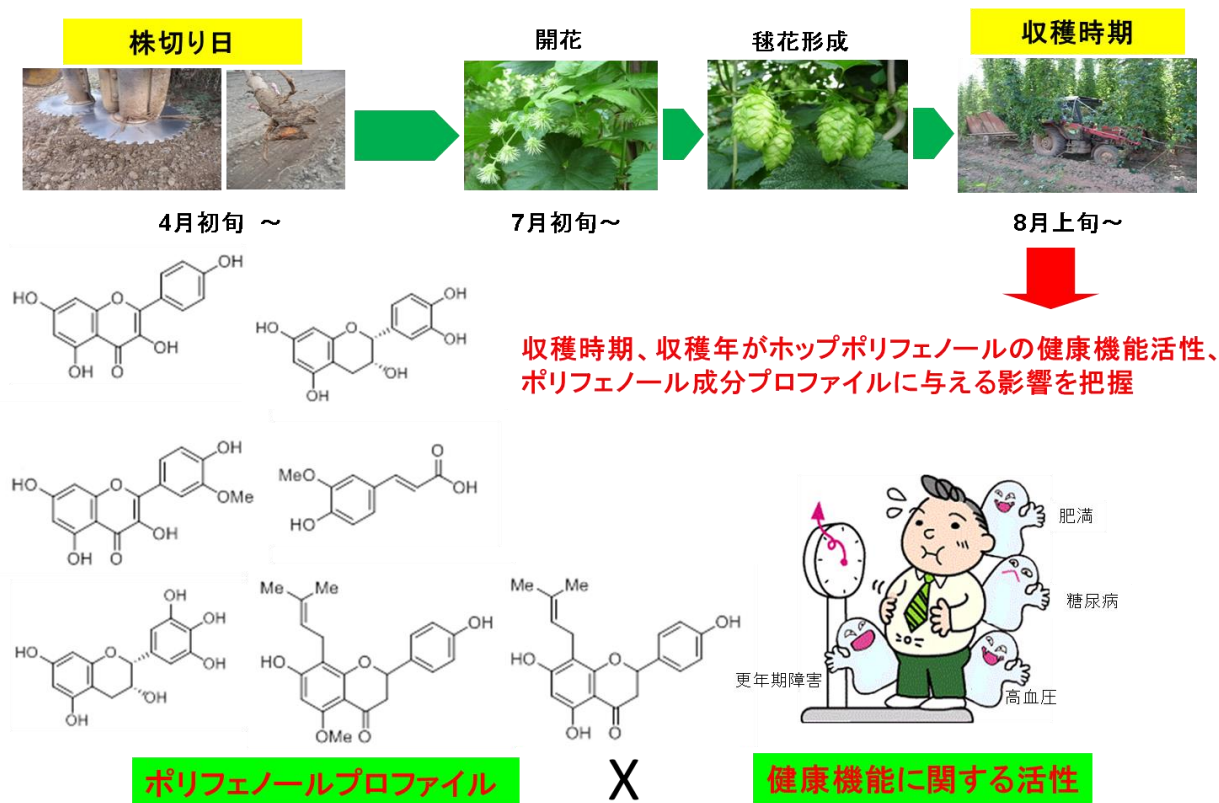


図 3-1 ホップポリフェノールの健康機能性に関する研究イメージ図

3-1 ホップポリフェノールの健康機能性評価と収穫時期・収穫年による違い

—実験試料および方法—

【評価したホップ試料】

第2章 Trial I の一地域4年間に渡って、収穫時期を変えて収穫し、乾燥させたザーツホップを使用した。水準詳細は表 2-1 (A)を参照。

【乾燥ホップからのポリフェノールの抽出方法】

Taylor らの手法を参考にした[81]。図 3-2 に抽出手順を示す。まず、ホップに含まれる色素、脂質、精油成分などを取り除くため 50 g の乾燥ホップを 1 L のジクロロメタンで 1 時間攪拌し、その後ジクロロメタンを除去した。新たにジクロロメタンを 1 L 加え 1 時間攪拌した。この操作を合計 3 回繰り返し行った。ジクロロメタンで洗浄したホップを、一晚ドラフト内で乾燥した。このうち 5 g をコーヒーマルで 10 秒間×3 回粉碎した。粉碎ホップ 0.7 g にアセトン/水溶液(70:30、v/v)を 10 mL 加え、2 時間攪拌した。Whatman no.1 ろ紙で固形分を除去し、残渣に再度アセトン/水溶液(70:30、v/v)を 10 mL 加え、抽出を行う操作を 2 回繰り返した。得られたアセトン抽出液約 30 mL から、35 °C 下のエバポレータによりアセトンを除去した。アセトンを除去した抽出液を事前に MeOH 10 mL と脱イオン水 10 mL でプレコンディショニングした Oasis HLB plus cartridge (225 mg)にロードした。ホップ抽出液をロードした方向とは逆向きで、7 mL の 1.0% ギ酸メタノールにて抽出を行った。溶出液は凍結乾燥により粉末化し、重量を計量した。ホップポリフェノールの回収率は試料間で差がなく、ほぼ 100% として、この計量値からホップ重量 (kg) 当たりに含まれるポリフェノール総量を算出し、試料間の比較を行った。また、粉末ホップポリフェノールは適宜溶媒で既知濃度に溶解し、Orbitrap LC-MS によるポリフェノール 23 成分の定量分析と上記 3 つの機能性評価に供した。なお、抽出に用いた固相 Oasis HLB Plus Short cartridge (Waters 社製)は逆相で、親水性と親油性の独自のバランスを持つ、親水性で湿潤性のある汎用性の高いポリマーからなるため、コンディショニング後に乾燥しても高い保持能とキャパシティを維持する。また、酸性、塩基性、および中性の分析種を幅広く保持でき、非選択的であることからこの固相カートリッジを選択した。また固相抽出において、1.0% ギ酸メタノールを使用した。ギ酸濃度については事前に検討を行い、ポリフェノールの回収率が最も高かった 1.0% ギ酸メタノールを使用した。

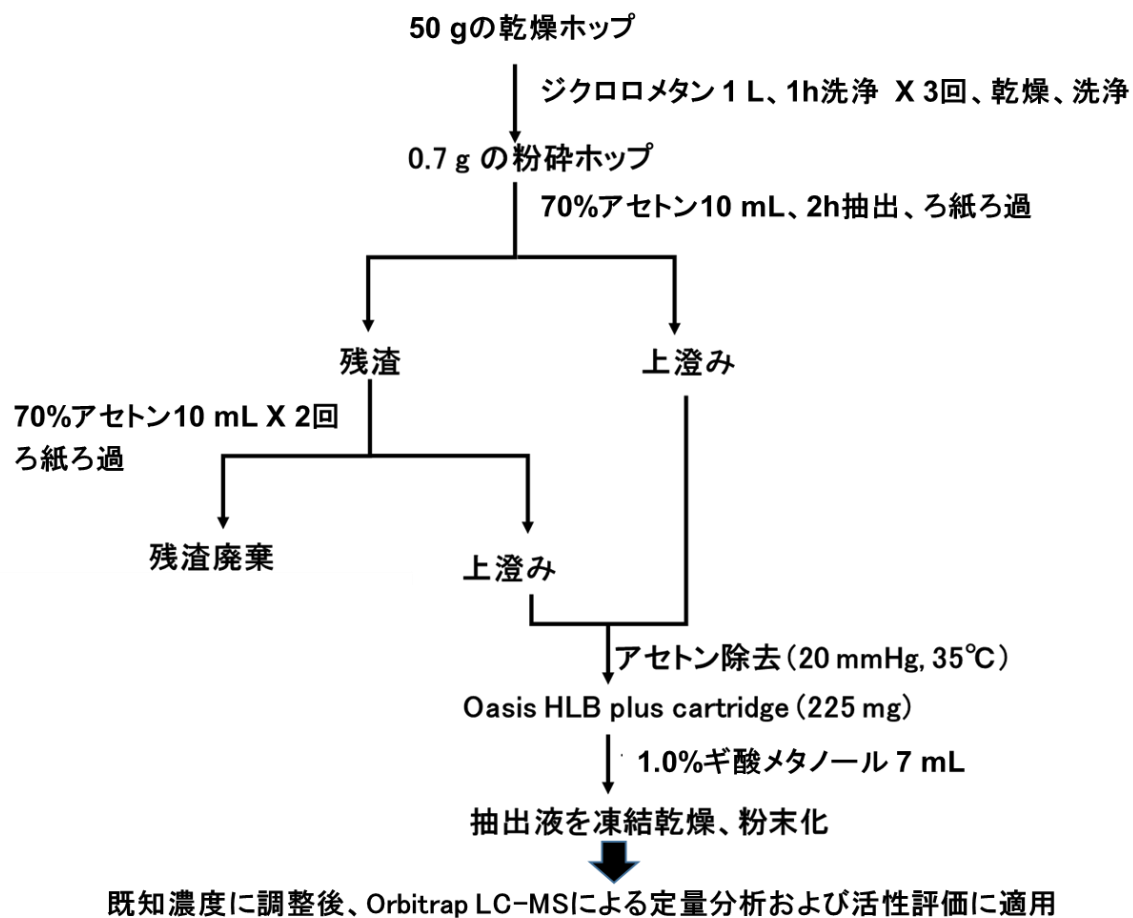


図 3-2 ホップからのポリフェノールの抽出フロー

【機能性評価方法】

抗酸化活性は①DPPH(2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl)ラジカル消去活性 (%)を、抗炎症作用はマウスマクロファージ様細胞株を用いた②NO 産生抑制率 (%)を、抗肥満効果はマウス胎児由来の脂肪前駆細胞を用いた③脂肪蓄積抑制率 (%)を指標として活性評価を行った。以下に各々の評価の原理と具体的試験方法を記す。なお、全アッセイにおいて、ホップポリフェノール抽出物 (HPP) およびポリフェノール標準試薬をそれぞれ DMSO で 50 mg/mL および 50 mM に調製したものを使用した。

①DPPH ラジカル消去活性 (%)

(測定原理)

図 3-3 に示すように活性酸素種はストレスや紫外線、喫煙、激しい運動などにより体内に発生し、その強い酸化力により体の構成成分である核酸やタンパク質、脂質などの酸化により正常な機能を失わせる[82]。結果として動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病、癌など様々な病気の原因になると考えられている。本評価は Okada らの方法に従った[83]。図 3-4 に示すように DPPH は不対電子を持つラジカルで、活性酸素ではないが、活性酸素よりも安定なラジカルで、活性酸素と同様に他の物質と反応し、酸化させる作用を持っている。DPPH ラジカルは「紫色」を示すが、抗酸化物質によりラジカルが消去されると無色の非ラジカル体に変化する。この褪色反応を利用し、抗酸化活性を測定する。



図 3-3 活性酸素種による健康への被害

②NO 産生抑制率 (%) (測定原理)

マクロファージは生体内に侵入した病原菌などの異物に対し、生体防御機構の中心的役割を果たす免疫細胞の一種である。体内のマクロファージは活性化されて炎症性マクロファージになると、nitric oxide (NO) などをはじめとする炎症性メディエーターを産生する。これらの炎症性メディエーターの産生亢進は、慢性炎症による組織障害を引き起こし、リウマチおよび癌などの生活習慣病を誘導する [84-89]。

マクロファージが微生物成分などによって刺激を加えられると、inducible nitric oxide synthase (iNOS) が誘導されて、L-アルギニンから NO が合成される (図 3-5) [90]。放出された NO は、スルファニルアミドとのジアゾ化反応、その後、N-1-ナフチルエチレンジアミンとのカップリング反応によりアゾ色素を生成する。本実験では、グリース試薬によるこの反応系を利用してホップポリフェノールによる NO 産生抑制率を評価した (図 3-6) [91]。

また同時に、MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole) 法を用いて細胞生存率の測定を行う。テトラゾリウム塩 MTT は、非水溶性ホルマザンを生成する発色基質であり、細胞内脱水素酵素によって還元され発色する。この時の吸光度を測定することにより、生きている細胞数を測定する。

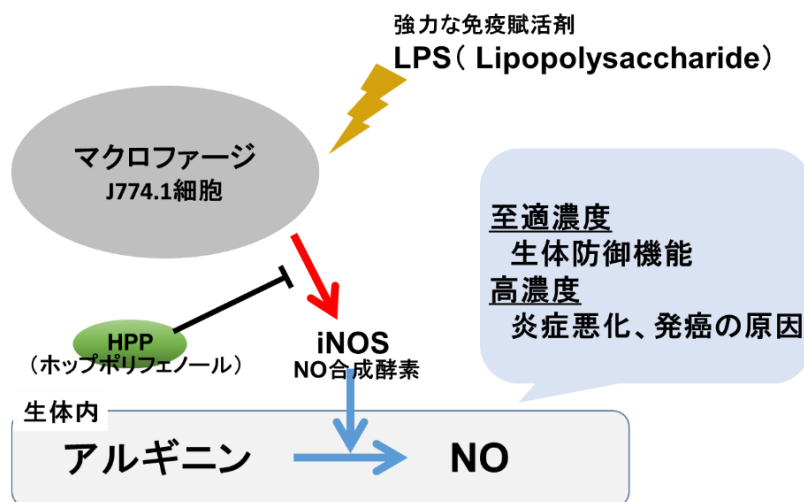


図 3-5 NO 産生による弊害と NO 産生抑制活性の測定原理

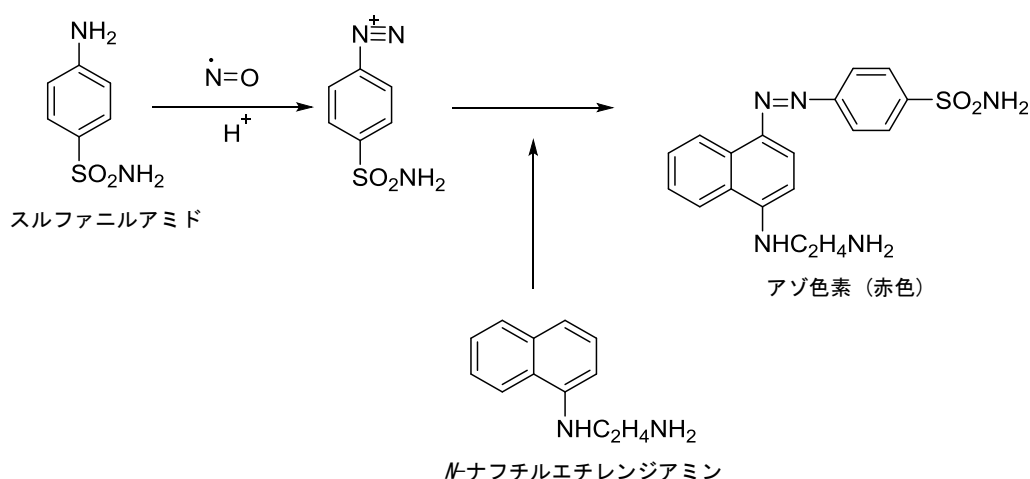


図 3-6 NO によるグリース試薬のアゾ化反応による赤色発色の原理

(試薬)

- RPMI-1640 培地 ; 10% FBS (ウシ胎児血清)) と 1% penicillin/streptomycin を添加した。
- LPS(lipopolysaccharide) ; 超純水で 20 mg/mL になるように調製し、0.2 μ m のフィルターに通して滅菌した。
- グリース試薬 ; 1% スルファニルアミド、0.1% *N*-1-ナフチルエチレンジアミン、2.5% H₃PO₄ となるように超純水で調製した。
- MTT 試薬 ; 超純水で 5 mg/mL になるように調製し、0.2 μ m のフィルターに通して滅菌した。

(試験方法)

図 3-7 に試験方法のフローを簡単に示す。

- 1 日目 : あらかじめ J774.1 細胞を RPMI-1640 培地で培養しコンフルエントの状態にした。細胞数が 1.0×10^6 cell/mL となるように RPMI 培地で調製し、96 穴プレートに 100 μ L/well ずつ播種した。5% CO₂、37°C で 24 時間培養した。
- 2 日目 : DMSO に溶解した HPP (50 mg/mL) およびポリフェノール標準試薬 (50 mM) を 0.1% LPS 入り RPMI 培地で希釈し、最終濃度の 2 倍になるように調製した。これらの評価対象試料入り培地を上記の培養細胞に 100 μ L 入れ、5 % CO₂、37°C で 24 時間培養した。
- 3 日目 : 各ウェルの培養液の上清 100 μ L を、新しい 96 穴プレートに移した後、グリース試薬 100 μ L を添加し、吸光度 (550 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。評価対象試料を添加していないブランク試験 (100%) に対する相対値から、NO 産生抑制率(%)を算出した。

細胞生存率(%)は MTT アッセイを用いた。3 日目の培養細胞から培地を除き、5% MTT 試薬入り RPMI 培地を 100 μ L 加え、37°C、2 時間インキュベーションした。培地を除去し、細胞中の formazan を 100 μ L の DMSO に溶解させ、吸光度 (570 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。ブランク試験 (100%) に対する相対値から、細胞生存率 (%) を算出した。

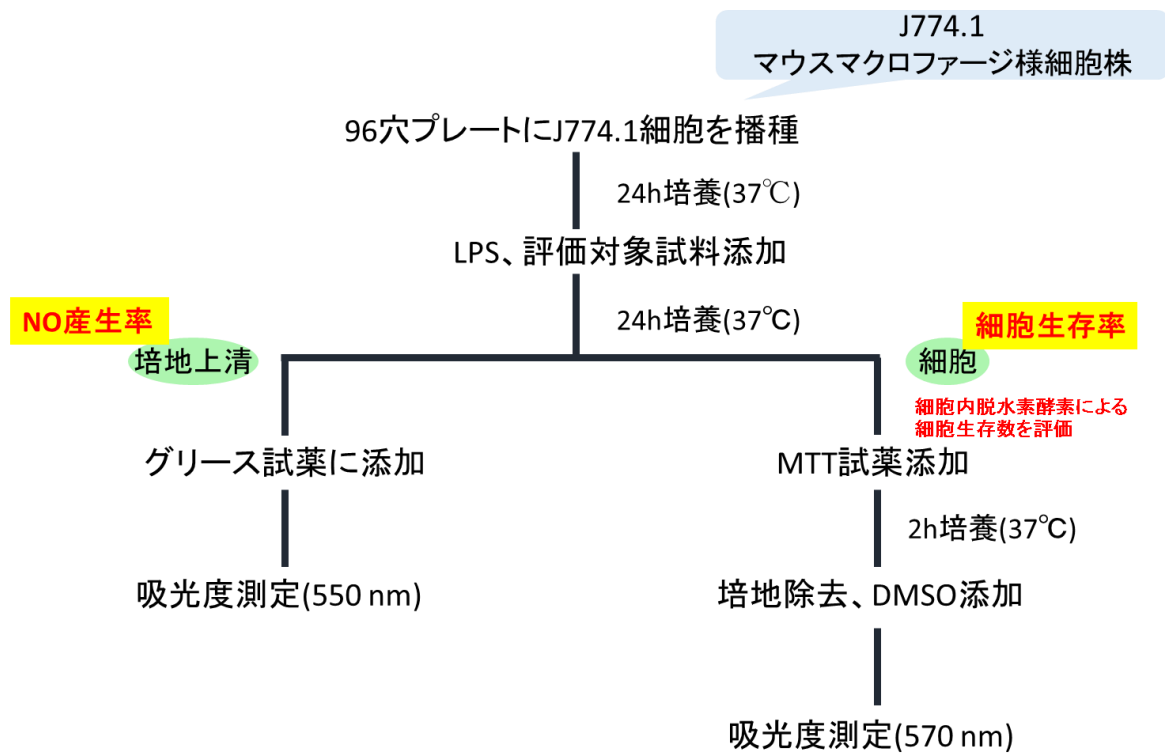


図 3-7 NO 産生抑制率と細胞生存率の評価手順

③脂肪蓄積抑制率 (%)

(測定原理)

図 3-8 に示すように、3T3-L1 前駆脂肪細胞はマウス胎児由来の 3T3 繊維芽細胞株により分離されたもので、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、デキサメタゾン (DEX) およびインスリンによる刺激を受け脂肪細胞へと分化する。IBMX は細胞内の cAMP を増加させ、DEX は糖質コルチコイドレセプターと結合し、インスリンはインスリンレセプターと結合する。この 3 つの経路は、PPAR γ および C/EBP α ファミリー遺伝子を活性化する。PPAR γ および C/EBP α は脂肪細胞内に存在し、ap2 や GLUT4 などの脂肪合成に関わるタンパク質の遺伝子発現を活性化させる転写因子である。分化すると細胞内に微細な多くの脂肪滴が見られるようになる。そのまま分化が進むと脂肪滴は大きくなるが単房とはならず多房性のままである。脂肪滴は、Oil red O solution で赤色に染色されるので、この反応を利用して脂肪蓄積率を評価する。

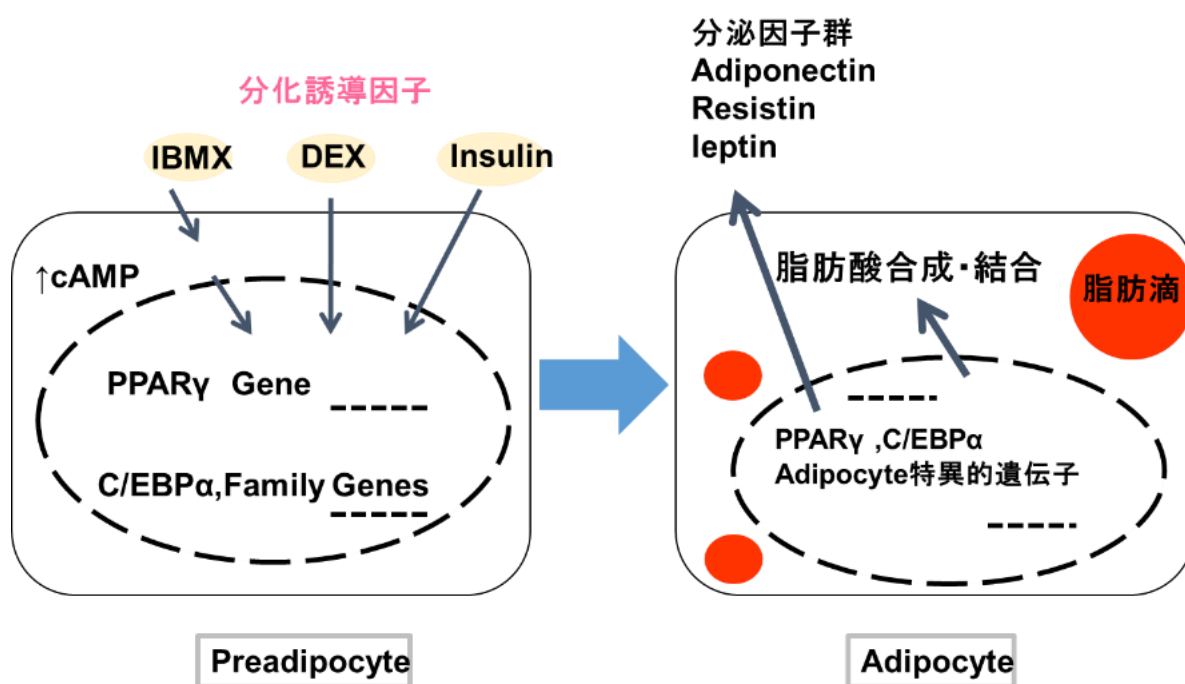


図 3-8 脂肪蓄積抑制評価の原理

(試薬)

- ・ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) ; 10% FBS (ウシ胎児血清)と 1% penicillin/streptomycin を添加した。
- ・TrypLE™Select (1×)
- ・IBMX ; DMSO で 0.5 mM となるように調製した。
- ・DEX ; DMSO で 1 μ M となるように調製した。
- ・Insulin solution human
- ・WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) ; 使用時に DMEM 培地で 2% WST-8 となるように希釈した。
- ・Oil Red O ; isoPrOH で 5 mg/mL となるように調製した。使用時に、Oil Red O in 60% isoPrOH 溶液となるように純水で希釈した。

(試験方法)

図 3-9 に試験方法の簡単なフローを示す。

1 日目 : あらかじめ、3T3-L1 細胞を 10 cm ディッシュで培養し、7~8 割コンフルエントの状態にした。TrypLE™Select を用いて 3T3-L1 細胞を剥離し、DMEM 培地で 1.0×10^5 cells/mL に希釈した後、96 穴プレートに 100 μ L ずつ入れ、37°C、5% CO₂ で培養した。

3 日目 : 分化誘導培地 (0.1% IBMX, 0.01% DEX 入り DMEM 培地)に、DMSO に溶解した HPP (50 mg/mL) およびポリフェノール標準試薬 (50 mM) を添加し、既知濃度に調製した。コンフルエントになった細胞の培地を除去し、前述の評価対象試料入り分化誘導培地 100 μ L に交換した後、37°C、5% CO₂ で 2 日間培養した。

5 日目 : 分化培地 (0.2% insulin 入り DMEM 培地) に、DMSO に溶解した HPP (50 mg/mL) およびポリフェノール標準試薬 (50 mM) を添加し、既知濃度に調製した。分化誘導培地を除去し、前述の評価対象試料入り分化培地 100 μ L に交換し、37°C、5% CO₂ で 3 日間培養した。

8 日目 : 分化培地 50 μ L を除去し、新たな分化培地 100 μ L を添加し、37°C、5% CO₂ で 3 日間培養した。

11 日目 : 培養培地に 2% WST-8 を 50 μ L ずつ添加し、37°C、5% CO₂ で 3 時間培養した。新しい 96 穴プレートに培地 100 μ L を移し、吸光度 (450 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。評価対象試料を入れていないブランク試験 (100%) に対する相対値から、細胞生存率 (%) を算出した。残りの培地を除去した後、ホルマリンを 100 μ L ずつ添加し 4 °C で一晩静置した。

12 日目 : ホルマリンを除去した後、60% isoPrOH を 100 μ L 添加し、細胞を洗浄した後除去した。60% Oil Red O 試薬 50 μ L を添加し室温で 10 分静置した。60% Oil Red O 試薬を除去した後、超純水で各ウェルを洗浄した。96 穴プレートが乾燥した後、100% isoPrOH を 50 μ L 添加し室温で 10 分静置した後、吸光度 (520 nm) を測定した。ブランク試験 (100%) に対する相対値として、脂肪蓄積抑制率 (%) を算出した。

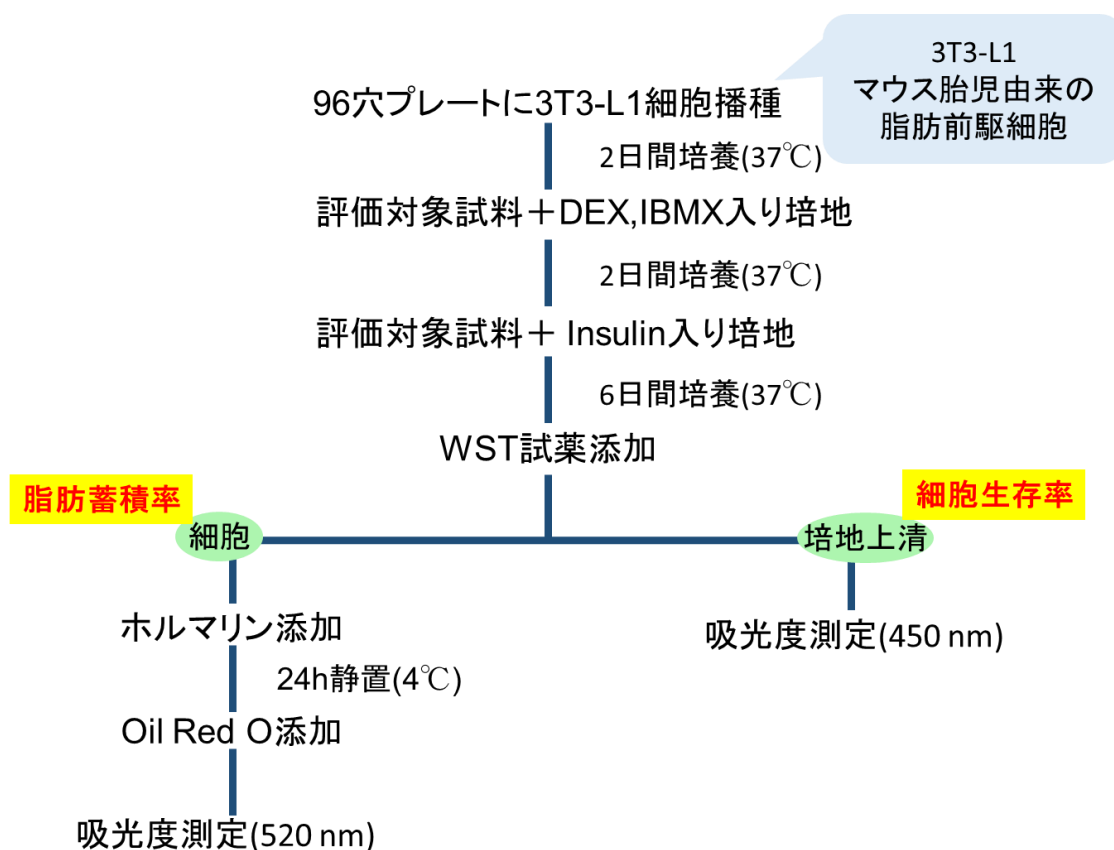


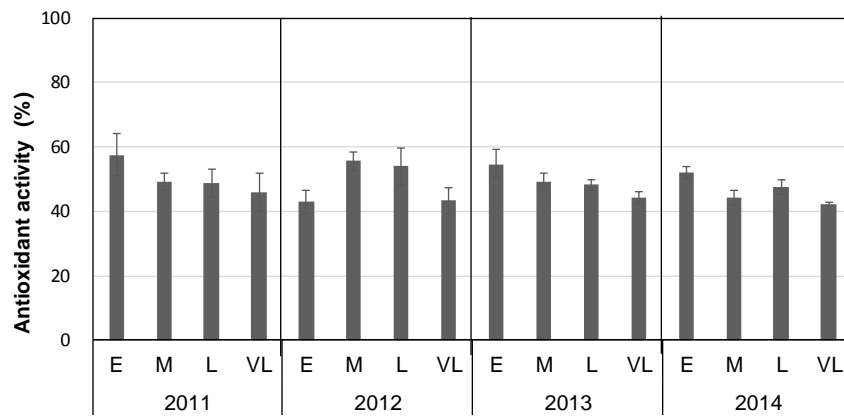
図 3-9 脂肪蓄積抑制評価の原理

—実験結果—

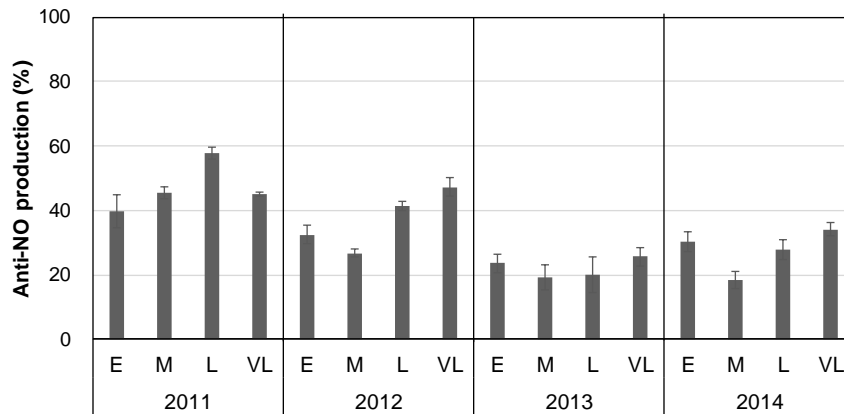
【ホップポリフェノール (HPP) の機能性評価結果】

図 3-10 (A)、(B)、(C)に栽培時期および収穫年が異なるホップから抽出されたポリフェノール (HPP) 重量あたりの抗酸化活性 (%), NO 産生抑制活性 (%), 脂肪蓄積抑制活性 (%)を示す。HPP は低濃度 (25~75 $\mu\text{g/mL}$)で活性を示すことがわかった。HPP 25~75 μg はホップ 0.7~2.1 g から抽出される量に相当し、ビール 1 L (350 mL 缶約 3 本分) に含まれる量に相当する。また、表 3-1 に得られた活性データに関する分散分析結果から、これらの活性のうち、抗酸化活性は harvest time が早いほど高い傾向が示され、脂肪蓄積抑制率は有意に harvest time が早いほど高い結果が示された。また、NO 産生抑制は収穫年による有意な差が示された。harvest time/harvest year の交互作用はなかった。

(A)



(B)



(C)

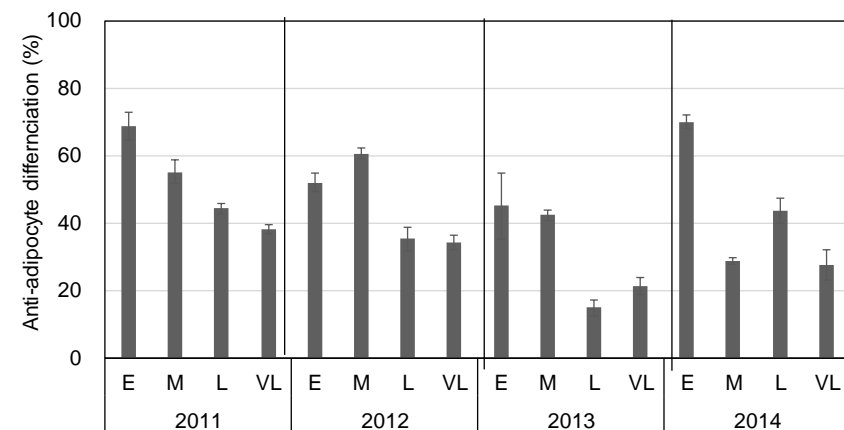


図 3-10 4 年間の収穫時期ごとのホップから抽出したホップポリフェノール (HPP) の重量あたりの健康機能活性 (A) : 25 $\mu\text{g/mL}$ HPP の抗酸化活性 (%) (B) : 75 $\mu\text{g/mL}$ HPP の NO 産生抑制 (%) (C) : 75 $\mu\text{g/mL}$ HPP 脂肪蓄積抑制 (%) (E : 早期収穫、M : 中期収穫、L : 晩期収穫、VL : 超晩期収穫)

表 3-1 収穫時期、収穫年が異なる HPP の活性に関する分散分析結果における F 値と有意水準

Assays	Harvest time (days)	Harvest year	Harvest time X Harvest year
Antioxidant activity at 25 µg/mL HPP	4.07	0.15	0.46
Anti-NO production at 75 µg/mL HPP	4.83	13.37 ^a	0.69
Anti-adipocyte differentiation at 75 µg/mL HPP	17.09 ^a	1.92	0.06

^a Significance of F-values at the 99.0% level.

3-2 単一ポリフェノールの健康機能性評価

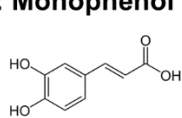
—実験結果—

HPP の機能性に対する活性との対比として、ホップ中に存在が確認できたポリフェノール 23 成分（図 3-11）について、低濃度と高濃度で個々のポリフェノールの活性を調べた結果を表 3-2 に示す。さらに、それぞれの機能性評価ごとに活性の高かった成分については、多段階に濃度を変えて活性評価を行い、同時に NO 産生抑制と脂肪蓄積抑制評価については細胞生存率を調べ、活性の強さが細胞死滅によるものかどうかを確認した。その結果を図 3-12 に示す。図 3-12 (C)の脂肪蓄積抑制評価結果において、kaempferol、(-)-epigallocatechin、xanthohumol、isoxanthohumol は 80 μ M 以上で低い細胞生存率を示したことから、この濃度における高い脂肪蓄積抑制効果は意味がないと判断した。したがって、脂肪蓄積抑制についてはこれらの成分を除いて、それぞれの活性に対する IC₅₀ を算出した。また、HPP の活性と対比させるため、それぞれの機能性に活性を示した HPP 濃度において、個々のポリフェノールが含まれている濃度を算出した（HPP 中のポリフェノールの定量分析については本章 3-3 に後述する）。その結果を表 3-3 に示す。

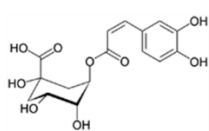
23 成分中、抗酸化活性に対しては 13 成分、NO 産生抑制に対しては 5 成分、脂肪蓄積抑制に対しては 3 成分が、活性があることが示された。また、quercetine のみが全ての機能性に対し活性があることが分かった。しかし、xanthohumol、isoxanthohumol などの prenylflavonoid の抗肥満効果に関する報告は多いものの[92-96]、本評価では、細胞毒性が高く示されたことから、*in vivo* での検証が今後必要である。

一方、活性を示す HPP 濃度に含まれる個々のポリフェノール濃度は、単一ポリフェノールの活性濃度よりもはるかに低い含量であり、活性のあるポリフェノール総量としても少ないにも係わらず活性を示したことから、HPP の活性の強さは、複数のポリフェノールの相乗効果によるものか、より活性の高い未知のポリフェノールが存在している可能性があると考えられる。

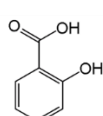
A: Monophenol



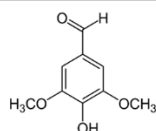
Caffeic acid



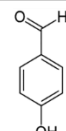
Chlorogenic acid



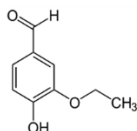
Salicylic acid



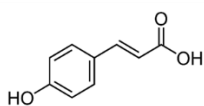
Syringaldehyde



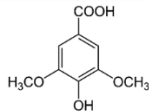
4-Hydroxybenzaldehyde



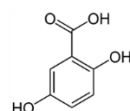
Ethyl vanillin



p-Coumaric acid

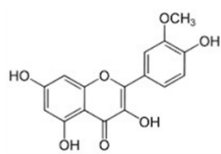


Syringic acid

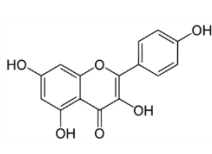


Gentisic acid

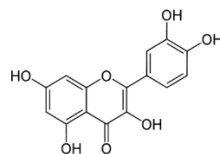
B: Flavonol



Isorhamnetin

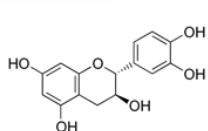


Kaempferol

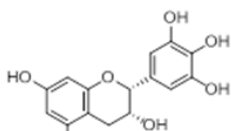


Quercetin

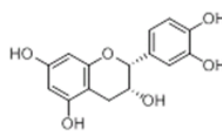
C: Flavanol



(+)-Catechin

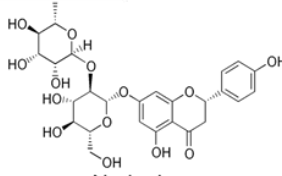


(-)-Epigallocatechin

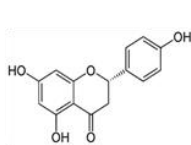


(-)-Epicatechin

D: Flavanone

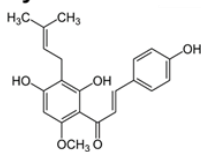


Naringin

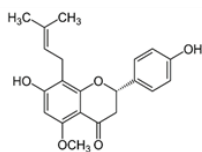


Naringenin

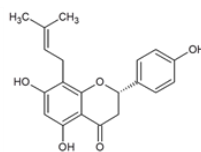
E: Prenylflavonoid



Xanthohumol

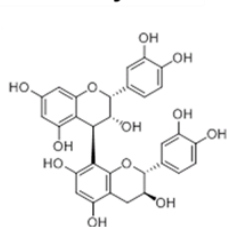


Isoxanthohumol

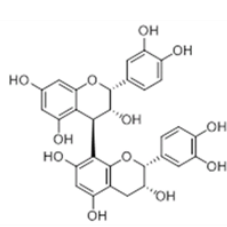


8-Prenylnaringenin

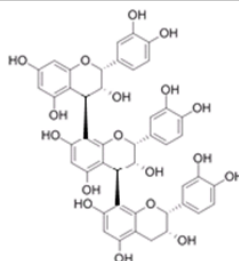
F: Proanthocyanidin



Procyanidin B1



Procyanidin B2



Procyanidin C1

図 3-11 ホップに存在が確認できたポリフェノール 23 成分の構造式

表 3-2 ポリフェノール 23 成分の 3 つの機能性に対する活性

	Antioxidant activity (%)		Anti-NO production (%)		Anti-adipocyte differentiation (%)	
	12.5 μ M	50 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
Caffeic acid	40.3	70.6	0.0	26.6	0.0	0.0
Chlorogenic acid	42.3	78.0	0.0	7.0	0.0	0.0
Salicylic acid	2.5	2.6	0.0	9.5	20.7	26.0
Syringaldehyde	0.0	6.6	3.6	26.4	0.0	0.0
4-Hydroxybenzaldehyde	0.9	0.0	0.0	10.5	0.0	0.0
Ethyl vanillin	0.0	0.9	0.2	22.3	0.3	0.0
<i>p</i> -Coumaric acid	0.9	0.9	0.0	25.8	13.0	41.1
Syringic acid	32.0	59.1	0.0	14.7	0.0	0.0
Gentisic acid	54.3	81.8	1.5	2.0	0.0	0.0
Isorhamnetin	35.2	73.1	0.0	23.8	2.6	73.4
Kaempferol	46.3	73.9	42.9	74.5	0.0	98.1
Quercetin	49.9	81.1	37.8	77.0	0.0	59.2
(+)-Catechin	45.9	78.4	0.0	27.4	0.0	3.9
(-)-Epigallocatechin	56.6	81.0	0.0	15.9	7.0	103.6
(-)-Epicatechin	47.8	76.2	0.0	16.0	0.0	12.7
Naringin	2.2	2.3	0.0	1.7	0.0	0.0
Naringenin	0.9	0.0	4.1	47.8	9.7	43.0
Xanthohumol	8.5	16.0	84.8	100.0	8.8	101.0
Isoxanthohumol	1.0	1.9	52.9	93.7	0.0	90.4
8-Prenylnaringenin	0.0	1.1	49.2	98.5	0.0	102.3
Procyanidin B1	49.5	76.4	0.0	1.5	0.8	10.0
Procyanidin B2	50.4	79.4	0.0	22.0	0.0	9.8
Procyanidin C1	43.1	78.1	0.0	13.4	0.0	0.0

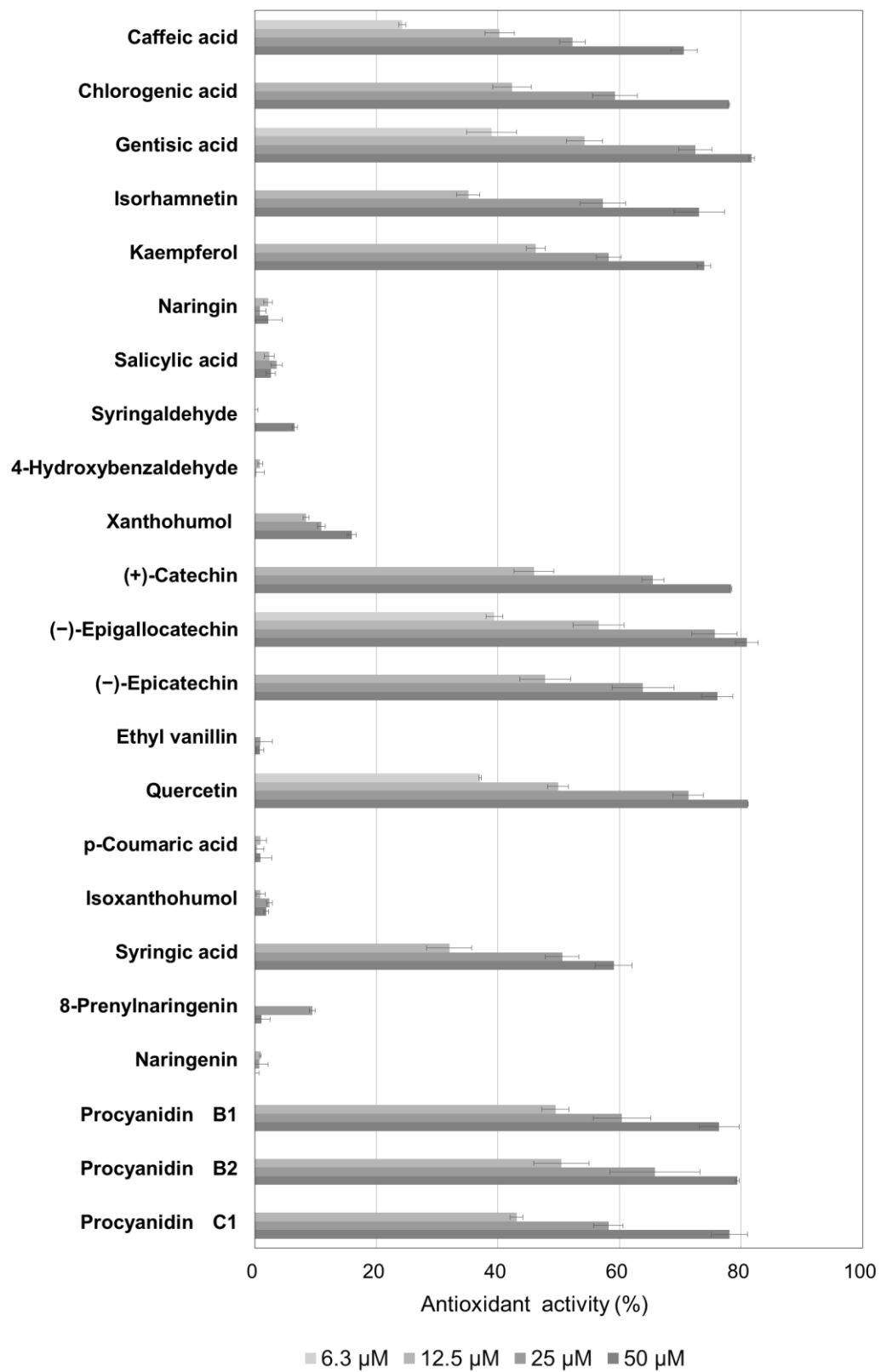


図 3-12 (A) 単一ポリフェノールの抗酸化活性

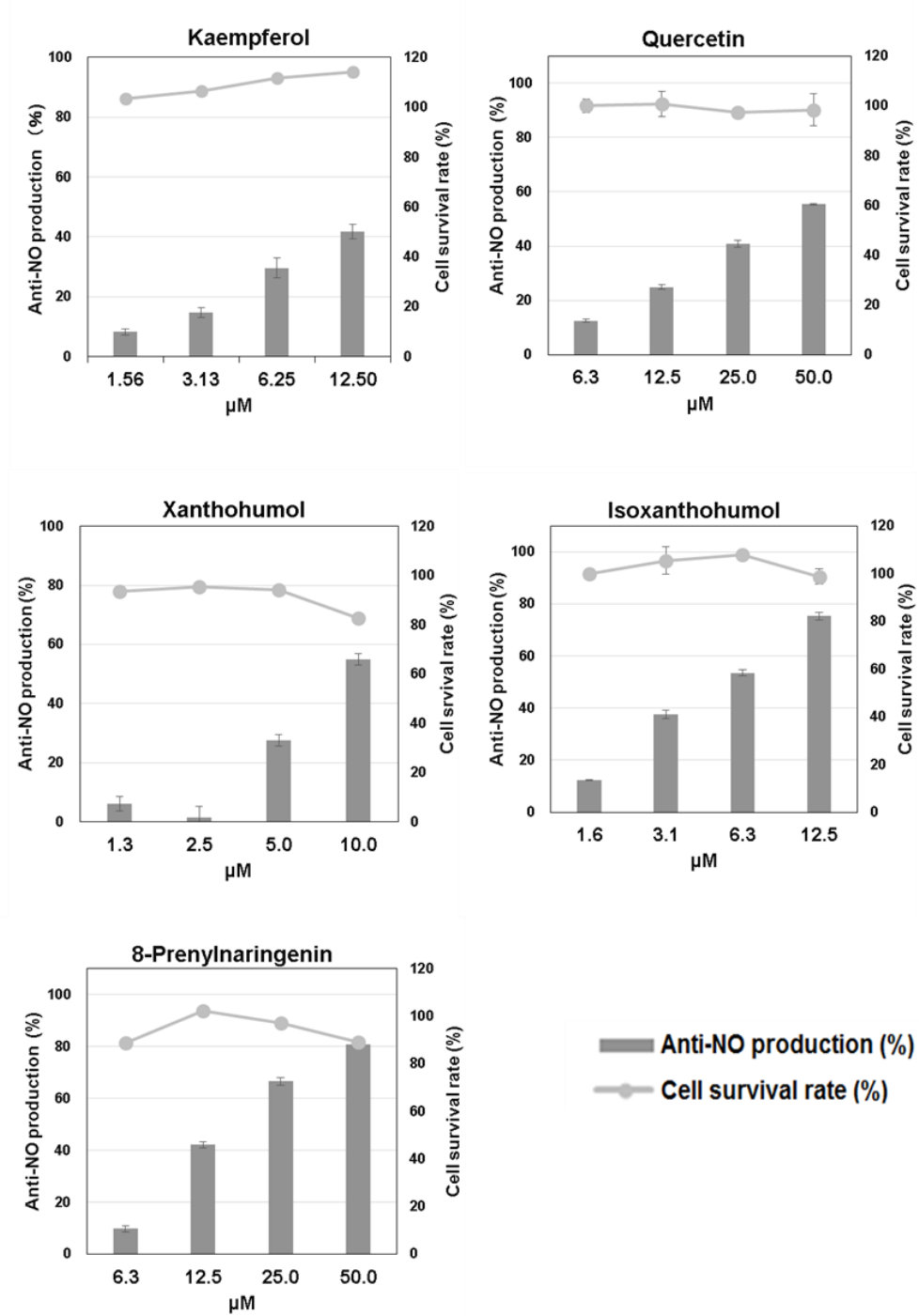


図 3-12 (B) 単一ポリフェノールの NO 産生抑制率

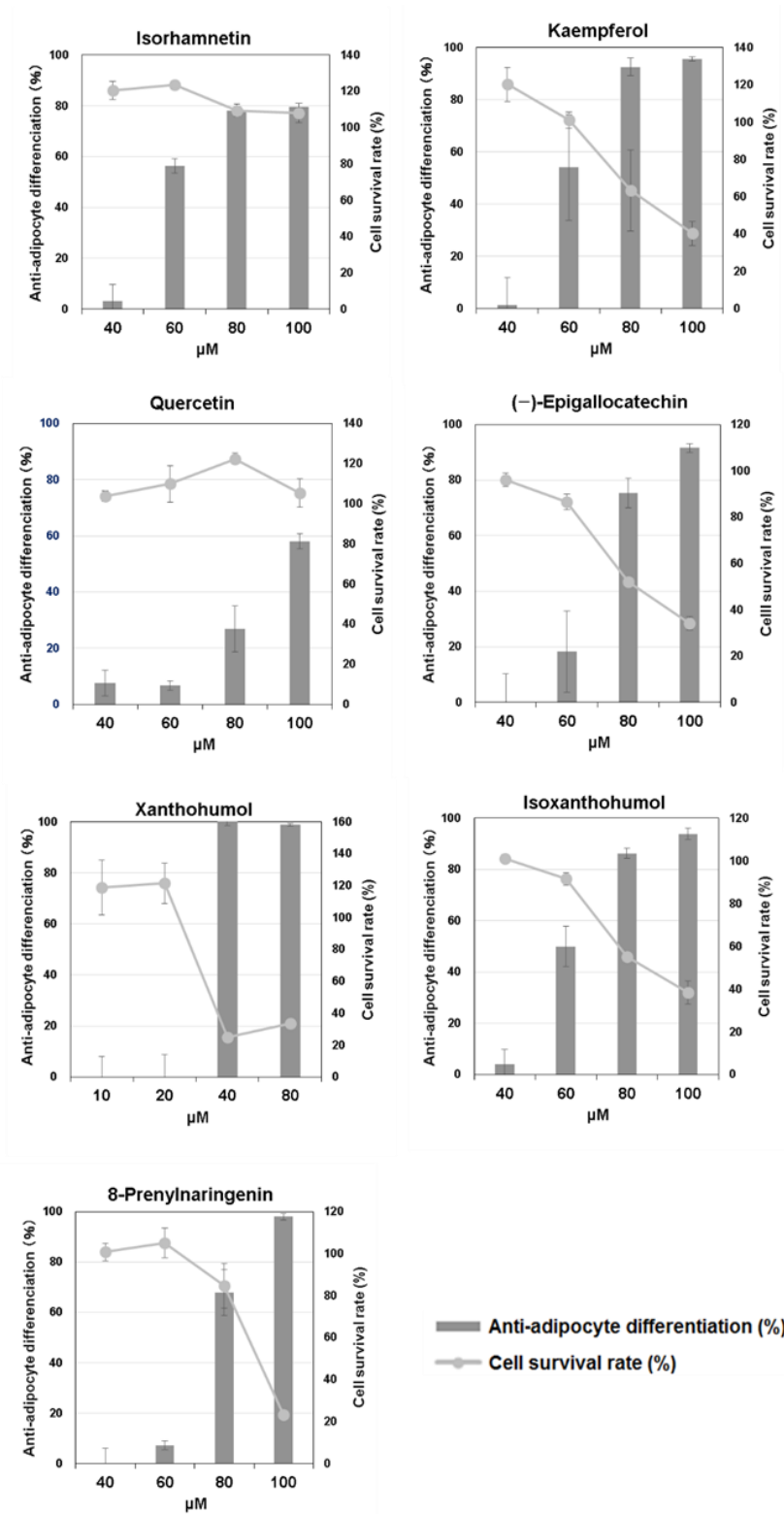


図 3-12 (C) 単一ポリフェノールの脂肪蓄積抑制率

表 3-3 各ポリフェノールの IC₅₀ (μM) と HPP 活性濃度中に含まれる各ポリフェノール含量 (μM)

	IC ₅₀ (μM) for antioxidant activity	IC ₅₀ (μM) for anti-NO production	IC ₅₀ (μM) for anti-adipocyte differentiation	Mean cocentration (μM) of each PP in active concetration of HPP	
				HPP=25 μg/mL	HPP=75 μg/mL
Caffeic acid	23.7	—	—	0.012	0.036
Chlorogenic acid	18.5	—	—	0.053	0.158
Syringic acid	33.3	—	—	0.766	2.299
Gentisic acid	11.6	—	—	0.007	0.020
Isorhamnetin	23.7	—	56.8	0.001	0.003
Kaempferol	16.0	38.4	NA*	0.017	0.052
Quercetin	13.1	41.3	90.2	0.035	0.105
(+)-Catechin	12.9	—	—	3.474	10.421
(-)-Epigallocatechin	10.7	—	NA*	0.012	0.035
(-)-Epicatechin	11.6	—	—	0.481	1.442
Xanthohumol	—	11.7	NA*	0.190	0.569
Isoxanthohumol	—	27.5	NA*	0.018	0.053
8-Prenylnaringenin	—	37.4	76.4	0.011	0.034
Procyanidin B1	12.0	—	—	1.301	3.904
Procyanidin B2	8.6	—	—	0.454	1.361
Procyanidin C1	18.4	—	—	0.232	0.696
Total content				7.18	21.55

*: Non-active

3-3 Orbitrap LC-MS によるホップに含まれるポリフェノール成分分析

—分析条件—

【HPP 溶液の調製および検量線の作成】

本章 3-1 に記載のホップから抽出したポリフェノール粉末 (HPP) 20 mg を MeOH 10 mL に溶解させ、LC/MS 分析に供した。また、ホップ中に存在が確認できた 23 個のポリフェノールについて定量分析を行うため検量線を作成した。23 個のポリフェノール混合溶液を脱イオン水で各々の成分濃度が 0.05、0.5、5、50 mg/mL になるよう調整し、HPP の抽出法と同じように、混合溶液を 10 mL を固相カートリッジ (Oasis HLB plus cartridge) にロードし、10 mL の MeOH で溶出した。この溶出液を LC/MS で分析し、原点を通過する 4 点検量線を作成した。全 23 成分の検量線は高い直線性を示した ($R^2 > 0.99$)。

【Orbitrap LC-MS 分析条件】

カラム : Phenomenex Luna C18(2) (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)

流速 : 700 μ L/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 5.0 μ L

移動相 : A) H₂O (0.1% ギ酸), B) Acetonitrile (0.1% ギ酸), C) IsoPrOH

Time	A%	B%	C%
0.0	90	10	0
1.0	90	10	0
31.0	2	98	0
36.0	2	98	0
36.1	0	0	100
41.0	0	0	100

MS イオン化法・イオンモード: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)・ネガティブモード

質量スキャン範囲: m/z 100–1000 (分解能 70,000)

—実験結果—

【定量分析および分散分析の結果】

表 3-4 に収穫時期、収穫年が異なるホップから抽出されたホップ重量あたりの **HPP** 重量と、**HPP** 重量あたりに含まれる各ポリフェノール量を示す。また、これらの結果を分散分析した結果を表 3-5 に示す。ホップ重量あたりの **HPP** 重量と 13 成分において開花から収穫までの日数を表す **harvest time (days)**による主効果が、12 成分において収穫年による主効果が認められた。また、5 成分に両者の交互作用が認められた。

表 3-4 ホップ重量あたりの HPP (mg/kg) 量と HPP 重量あたりの各ポリフェノール含量 (μmol/kg)

	Harvest Year	2011 Crop				2012 Crop				2013 Crop				2014 Crop			
	Farm	Rybnany				Rybnany				Steknik				Steknik			
	Date of root cut	April 15				April 16				April 20				April 15			
	Harvest time (days)	22	29	50	57	23	32	51	60	26	37	53	61	29	40	57	64
	Total content of HPP	34033	26591	27412	28604	30361	37363	29403	27784	26821	29163	24578	21796	30636	24376	26849	24215
A	Caffeic acid	282	363	542	567	442	294	879	814	277	307	667	589	182	472	354	571
	Chlorogenic acid	655	1424	3110	4621	700	1302	1765	2270	1265	1408	2321	3162	1019	1361	3269	3956
	Salicylic acid	944	983	824	696	1149	807	1206	1140	855	724	1003	963	746	952	671	693
	Syringaldehyde	398	519	1284	845	455	509	948	936	630	378	633	760	295	627	721	857
	4-Hydroxybenzaldehyde	611	952	710	755	517	685	790	701	427	400	358	527	347	366	543	646
	Ethyl vanillin	1039	1053	786	693	1325	572	1062	934	1179	1030	1455	976	810	1254	692	917
	p-Coumaric acid	1427	1444	1132	949	1674	930	1755	1347	1126	1095	1373	1244	1009	1404	843	1217
	Syringic acid	25390	32756	64922	37226	23077	19639	28956	35108	32025	23418	31338	32396	14507	34775	29645	25248
B	Gentisic acid	97	155	177	141	313	424	177	329	347	227	437	358	244	194	257	329
	Isorhamnetin	26	47	65	66	19	26	104	85	34	22	35	39	17	26	47	58
	Kaempferol	592	577	921	1133	324	408	1726	1627	522	497	436	620	234	330	488	704
C	Quercetin	703	888	2267	2310	602	1178	3699	3394	856	575	1047	1129	399	695	1045	1647
	(+)-Catechin	152403	161012	149862	141316	133360	132651	75761	85175	169352	140989	136195	129165	193349	147815	139506	135325
	(-)-Epigallocatechin	558	529	493	503	427	568	225	319	489	362	410	466	460	385	606	624
D	(-)-Epicatechin	13922	17506	24713	26661	13762	15583	13407	14747	14685	14223	19905	24919	17196	19388	28900	28095
	Naringin	31	33	35	35	41	41	29	33	67	53	41	38	61	43	39	38
	Naringenin	142	219	213	263	271	188	392	343	171	131	212	186	174	404	189	253
E	Xanthohumol	5655	8112	7574	7533	6066	3960	10329	8483	7840	6275	8091	10218	5142	10079	7171	8918
	Isoxanthohumol	488	828	962	944	555	391	994	886	574	520	787	752	412	694	694	799
	8-Prenylnaringenin	317	452	429	426	430	195	699	364	408	339	534	586	343	674	466	547
F	Procyanidin B1	46955	38361	39980	37948	45256	49924	31756	31746	66189	57546	58266	49196	87451	57430	68342	67022
	Procyanidin B2	19930	16752	18244	16386	17016	16547	15621	14559	19334	16820	16316	15323	25291	19817	20989	21537
	Procyanidin C1	8446	6435	4773	4422	7827	8070	5944	5279	11810	10187	9258	8272	19552	12234	13010	12974

A: Monophenol, B: Flavonol, C: Flavanol, D: Flavanone, E: Prenylflavonoid, F: Proanthocyanidin

表 3-5 ホップ重量あたりの HPP 含量と HPP 重量あたりの 23 種ポリフェノール成分含量に関する分散分析結果における F 値と有意水準

	Harvest time (days)	Harvest year	Harvest time X Harvest year
Total content of HPP	5.31^a	1.89	0.05
Caffeic acid	22.48^b	3.17	0.51
Chlorogenic acid	169.72^c	11.20^b	7.99^b
Salicylic acid	0.03	3.48	1.63
Syringaldehyde	17.91^b	1.84	0.79
4-Hydroxybenzaldehyde	4.02	9.10^b	0.99
Ethyl vanillin	0.77	0.89	0.22
<i>p</i>-Coumaric acid	0.14	0.88	0.77
Syringic acid	3.47	2.28	0.47
Gentisic acid	0.46	4.30^a	0.68
Isorhamnetin	29.94^c	6.31^a	3.77
Kaempferol	38.66^c	14.96^b	9.28^b
Quercetin	59.04^c	18.98^c	7.60^b
(+)-Catechin	28.44^c	16.45^c	1.90
(-)-Epigallocatechin	0.09	2.23	2.98
(-)-Epicatechin	74.33^c	18.33^c	9.21^b
Naringin	34.45^c	18.08^c	8.27^b
Naringenin	1.65	2.00	0.41
Xanthohumol	4.56	0.11	0.33
Isoxanthohumol	18.17^b	2.20	0.35
8-Prenylnaringenin	1.92	0.21	0.11
Procyanidin B1	6.90^a	15.57^b	0.26
Procyanidin B2	7.91^a	12.92^b	0.14
Procyanidin C1	15.35^b	28.20^c	0.34

^a Significance of F-values at the 95.0% level.

^b Significance of F-values at the 99.0% level.

^c Significance of F-values at the 99.9% level.

3-4 ポリフェノールプロファイルと健康機能活性の関連解析

—解析結果—

収穫時期および収穫年により **HPP** の機能性に対する活性が有意に変動したことから、これらの活性の違いがいずれのポリフェノール成分と関連しているのかを推定するため、各ポリフェノール含量と活性について多変量相関解析を行った。表 3-6 に各ホップから抽出された 3 つの機能性の活性と 23 個のポリフェノール成分含量の相関係数を示す。抗酸化活性および脂肪蓄積抑制ともっとも高い相関があったのは 23 成分の総量であり、単一ポリフェノールのうち相関の高いものはなかった。また、**NO** 産生抑制率と相関性が高かった成分は 4-hydroxybenzaldehyde であったが、この成分単独では **NO** 産生抑制が認められていないため、単独での関連性は低いと考えられる。したがって、**HPP** の 3 つの機能性に対する活性の強さは複数のポリフェノールの相乗効果によるものか、あるいは **HPP** に含まれるより活性の高い未知のポリフェノール[97]が関与している可能性が示唆された。

本研究により、**HPP** は単独ポリフェノールよりも 3 つの機能性に対し強い活性を有すること、抗酸化、抗肥満に対する活性の強さは収穫時期が早い方が高くなる傾向にあることが明確になり、ホップを機能性素材としてより付加価値の高い素材にするための有益な情報が得られた。

表 3-6 23 種ポリフェノール成分およびその総量と 3 つの機能性に対する活性との相関係数

Compounds	Antioxidant activity at 25 µg/mL HPP	Anti-NO production at 75 µg/mL HPP	Anti-adipocyte differentiation at 75 µg/mL HPP
Caffeic acid	-0.4143	0.3421	-0.7090
Chlorogenic acid	-0.5008	0.2845	-0.5541
Salicylic acid	-0.0448	0.1703	-0.1707
Syringaldehyde	-0.3056	0.5925	-0.5075
4-Hydroxybenzaldehyde	0.0586	0.7855	0.1438
Ethyl vanillin	-0.1627	-0.3637	-0.3703
<i>p</i> -Coumaric acid	-0.0890	0.1486	-0.1676
Syringic acid	-0.2009	0.5692	-0.3231
Gentisic acid	-0.1806	-0.4980	-0.3686
Isorhamnetin	-0.1310	0.6385	-0.3662
Kaempferol	-0.0608	0.6295	-0.2780
Quercetin	-0.1087	0.6238	-0.3327
(+)-Catechin	0.2262	-0.2213	0.4735
(-)-Epigallocatechin	0.0658	0.0205	0.3113
(-)-Epicatechin	-0.4852	0.1084	-0.4114
Naringin	0.1896	-0.5865	0.1955
Naringenin	-0.4043	0.1910	-0.4137
Xanthohumol	-0.4581	0.0504	-0.7783
Isoxanthohumol	-0.4071	0.5832	-0.6043
8-Prenylnaringenin	-0.4057	-0.1010	-0.6956
Procyanidin B1	0.0768	-0.6161	0.1572
Procyanidin B2	0.1562	-0.1851	0.4257
Procyanidin C1	0.0703	-0.5894	0.2101
Total polyphenol content	0.6492	0.1394	0.7807

3-5 まとめと考察

第3章では、ホップポリフェノールの健康機能を評価するとともに、第2章で検討に用いた収穫時期が異なるザーツホップについて活性の比較を行った。本章ではホップポリフェノールの抗酸化活性、抗炎症作用、抗肥満作用に対するポテンシャルを評価するため、DPPH ラジカル消去活性、マウスマクロファージ様株化細胞 J774.1 およびマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いた *in vitro* での NO 産生抑制率、脂肪蓄積抑制率の3種類のアッセイを行った。その結果、ザーツホップからは 2.5~4.0 重量%のポリフェノールが回収され、その抗酸化活性はアスコルビン酸と同程度の強い活性を示すことがわかった。また、細胞毒性を示すことなく、低濃度で NO 産生抑制および脂肪蓄積抑制効果が認められた。さらに、収穫早期ほど抗酸化活性が高い傾向を示し、脂肪蓄積効果も有意に高い結果が示された。一方、NO 産生抑制効果は収穫時期との関連性は示されなかったが、収穫年によって有意に変動することがわかった。これは年毎の気候変動がホップのポリフェノールの代謝に影響しているためと考えられる。次に、これらの活性を示す濃度に含まれる 23 種のポリフェノール成分について含量を調べた。これらの活性の強さと 23 種のポリフェノール成分の含量を多相関解析した結果、NO 産生抑制率と 4-hydroxybenzaldehyde との間に高い相関が示された。しかしながら、4-hydroxybenzaldehyde 単独では高い NO 産生抑制効果は示されなかった。一方、抗酸化活性および脂肪蓄積抑制効果とポリフェノール総量との間には比較的高い相関が認められた。以上の結果から、収穫時期による活性の違いは複数のポリフェノール成分の相乗効果が関与しているか、今回定量対象としなかった未知のポリフェノール成分が関与している可能性も考えられる。

今後は、これらの関連成分を探索するため、ホップポリフェノールを極性ごとに粗分画し、画分ごとに活性比較を行い、活性の違いがもっとも大きい画分について成分プロファイルを網羅的に調べることで収穫時期とともに変動する活性に関連した成分を明確にできると考えている。これにより、健康機能性に対しより付加価値の高いホップの品種探索や、栽培法の最適化が可能になると期待できる。

【使用試薬】

本試験に用いたポリフェノール試薬のグレードはすべて 95%以上である。

Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan), Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan), Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), or Funakoshi Corporation (Tokyo, Japan). より購入した。

Methanol (Guaranteed Reagent, 99.8%) は Nacalai Tesque, Inc.より購入した。

総括

ホップ (*Humulus lupulus*) はビールの香味にとって必要不可欠な原料であり、その品質の違いは製品ビールの香味品質に大きく影響する。本研究は、ホップ品種や栽培条件の違いによるホップ株の個体差から生じるビールのホップ香気の違いを知ることが目的とした。さらに、ホップの香気成分のプロファイリングから多変量解析によって香気特性の違いに関わる重要成分を明らかにし、得られた結果は、目的とする香気特性を付与できるホップ品種の選択や収穫時期などの栽培条件を適正化するための客観的判断指標として役立たせることを目指した。

一方、ホップは産業上、そのほとんどがビール原料として使用されているが、ホップに含まれるポリフェノールや樹脂成分が有する機能性に着目し、抗菌剤や不眠、肥満、骨粗鬆症、更年期障害などに対する改善薬としても使用されている。そこで、本研究では、ホップのビール原料としての香りの価値だけでなく、健康機能についても着目し、収穫時期が異なるザーツホップについてその生理活性の強さを比較評価し、より活性の高いホップを生産するための最適な収穫時期を検討した。

第 1 章では、5 品種のホップを使用したビールの 6 種のホップ香の官能特性 (floral, fruity, citrusy, spicy, ester, sylvan (woody)) について定量的官能データ (quantitative descriptive analysis: QDA) を取得し、各ビールの官能プロファイルに明確な違いがあることを確認した。一方、GC×GC-TOF/MS を用いた網羅的成分分析により、ホップを使用しないビールと 5 種のホップを使用したビールの成分差から、ホップを使用したビールだけに有意に増加した成分を抽出し、それらをビール中のホップ由来成分として約 300 成分に絞り込んだ。さらに、5 種のビールに関するこれらの成分データと QDA データの主成分分析により、6 種のホップ香の官能特性と関連のある成分を推定した。これらの推定された個々の成分の官能特性 (odor description) は、それぞれ対応する 6 種のホップ香の特性と類似していたことから、推定成分の妥当性が確認できた。これらの関連成分がホップ品種ごとにどの程度含まれているかを指標にすれば、目的とするホップ香となるホップ品種を選択する際に、麦汁の仕込みや発酵、貯酒など、手間と時間のかかるビール醸造工程を要することなく、およそそのホップ香の特徴を推定でき、ホップ品種の選択をより精度よく客観的に行うことが可能となる。このような評価手法は、ビール以外のさまざまな加工食品に使用される原料の選択にも共通に適用できることが期待される。

第 2 章では、ザーツホップに関して、人為的な栽培制御が可能なホップ株切り時期と収穫時期 (開花から収穫までの日数) が香気特徴に与える影響を評価した。チェコのザーツ地方の単一圃場にて 2011 年から 2014 年の 4 年間の栽培において、収穫時期を変えた栽培試験と、2012 年単年の異なる 4 地域での栽培において、収穫時期と株切り時期を変えた栽培試験を実施した。両者の栽培試験に共通して floral, fruity, citrusy の

特徴が収穫時期後半にかけて有意に増加した。また、中期に株切りを行った場合に floral、fruity、citrusy の特徴が有意に増加した。さらに、partial least squares regression (PLS) 分析により、floral、fruity、citrusy にポジティブに寄与する成分は heptanoic acid、Z-citral、linalool、cis-linalool oxide であり、ネガティブに寄与する成分は octanoic acid、trans-linalool oxide であると推定され、これらの成分は全て収穫後期にかけて有意に増加した。一方、ネガティブに寄与する E-3-hexen-1-ol は収穫後期にかけて減少した。また、octanoic acid、heptanoic acid、Z-citral、linalool、trans-linalool oxide は株切り中期で最大となり、o-cymene は株切り早期で最大となった。以上の結果から、ホップ香気特性に関連性のある成分は、収穫時期と株切り時期により制御可能であることが示され、最適なホップ香の品質を生産するための重要な栽培要因であることがわかった。

第3章では、ホップポリフェノールの健康機能を評価するとともに、第2章で検討に用いた収穫時期が異なるザーツホップについて活性の比較を行った。本章ではホップポリフェノールの抗酸化活性、抗炎症作用、抗肥満作用に対するポテンシャルを評価するため、DPPH ラジカル消去活性、マウスマクロファージ様株化細胞 J774.1 およびマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いた *in vitro* での NO 産生抑制率、脂肪蓄積抑制率の3種類のアッセイを行った。その結果、ザーツホップからは 2.5~4.0 重量%のポリフェノールが回収され、その抗酸化活性はアスコルビン酸と同程度の強い活性を示すことがわかった。また、細胞毒性を示すことなく、低濃度で NO 産生抑制および脂肪蓄積抑制効果が認められた。さらに、収穫早期ほど抗酸化活性が高い傾向を示し、脂肪蓄積効果も有意に高い結果が示された。一方、NO 産生抑制効果は収穫時期との関連性は示されなかったが、収穫年によって有意に変動することがわかった。これは年毎の気候変動がホップのポリフェノールの代謝に影響しているためと考えられる。次に、これらの活性を示す濃度に含まれる 23 種のポリフェノール成分について含量を調べた。その結果、その含有量は 23 種の単独ポリフェノールの IC₅₀ 濃度の数分の一から数百分の一に相当する量しか含まれていないことが分かった。また、これらの活性の強さと 23 種のポリフェノール成分の含量を多変量相関解析した結果、NO 産生抑制率と 4-hydroxybenzaldehyde との間に高い相関が示された。しかしながら、4-hydroxybenzaldehyde 単独では高い NO 産生抑制効果は示されなかった。一方、抗酸化活性および脂肪蓄積抑制効果とポリフェノール総量との間には比較的高い相関が認められた。以上の結果から、収穫時期による活性の違いは複数のポリフェノール成分の相乗効果が関与しているか、今回定量対象としなかった未知のポリフェノール成分が関与している可能性も考えられ、今後の検討課題としたい。

本研究により、収穫時期や株切り時期など的人為的に変動可能なホップの栽培条件を制御することで、ホップの香気品質や健康機能に関する付加価値を高められる可能性が得られ、そのための栽培条件や関連成分を明らかにすることができた。

最後に、本研究ではホップの香りと健康機能に関し、官能特性あるいは機能性の違いと成分プロファイルとの関係性や、その違いに関わる因子を紐解くため、フードメタボロミクスの研究手法を用いた。この手法は食品の香味特性や機能性などに関連した指標成分を、網羅的成分データから多変量解析により抽出するための有力な手法であることが明らかとなった。したがって、本手法は、今後一層、付加価値の高い農産物を識別するための品質評価、栽培条件や育種の最適化、食品の加工条件の最適化などに活用されていく研究手法であると考えられる。本研究を通して、この研究手法にとって必要不可欠な点は、違い（アウトプット）が明確な試料の入手・選択、精度良くアウトプットを評価できる評価系の構築、違いに関連する成分（要因）を探索するための高感度、高分離、高精度なノンターゲット分析技術の適用であると結論付けることができる。

参考文献

- [1] Coulier, L., Tas, A. and Thissen, U.: Food Metabolomics: Fact or Fiction? *LG·GC Asia Pacific March*, 8–14 (2011).
- [2] Herderich, M., Siebert, T., Parke, M., Curtin, C. and Mercurio, M.: Metabolomics and the quest for understanding quality in flavor chemistry and wine research. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Chapter 1, 1–11 (2012).
- [3] Beleggia, R., Platani, C., Papa, R., Chio, A., Barros, E., Mashaba, C., Wirth, J., Fammartino, A., Sautter, C., Conner, S., Rauscher, J., Stewart, D. and Cattivelli, L.: Metabolomics and food processing: from semolina to pasta. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 9366–9377 (2011).
- [4] Yoshida, H., Yamazaki, J., Ozawa, S., Mizukoshi, T. and Miyano, H.: Advantage of LC-MS metabolomics methodology targeting hydrophilic compounds in the studies of fermented food samples. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1119–1126 (2009).
- [5] Haseleu, G., Intelmann, D. and Hofmann, T.: Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS quantitation of bitter-tasting β -acid transformation products in beer. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 7480–7489 (2009).
- [6] Algazzali, V. and Shellhammer, T.: Bitterness intensity of oxidized hop acids: Humulinones and hulupones. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **74**, 36–43 (2016).
- [8] Steinhaus, M., Wilhelm, W. and 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.*, **226**, 45–55 (2007).
- [7] Sharp, D. and Shellhammer, T.: Chemical investigations of hop-derived aroma and flavor in beer. 2014, 69th NORM of the Am. Chem. Soc., Missoula, MT, United States, June 22–25, Pages NORM-115
- [9] Inui, T., Tsuchiya, F., Ishimaru, M., Oka, K. and Komura, H.: Different beers with different hops. Relevant compounds for their aroma characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 4758–4764 (2013).
- [10] Donaldson, B., Bamforth, C. and Heymann, H.: Sensory descriptive analysis and free-choice profiling of thirteen hop varieties as whole cones and after dry hopping of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **70**, 176–181 (2012).
- [11] Daniel, S., Katalin, N., Mariann, C., Kornel, K. and Maria, A.: Investigation of the aroma components of hop and beer. *Elelmiszervizsgalati Kozl.*, **56**, 102–109 (2010).

- [12] Smith, R., Mahiou, B. and Deinzer, M.: Hydrolysis products of humulene diepoxide A. *Tetrahedron*, **47**, 933–940 (1991).
- [13] King, J., and Dickinson, J.: Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res.*, **3**, 53–62 (2003).
- [14] Praet, T., Opstaele, F., Batbara J., Giris, B., and Cooman, L.: Biotransformation of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. *Cerevisia*, **36**, 125–132 (2012).
- [15] Takoi K., Koie K., Itoga Y., Katayama Y., Shimase M., Nakayama Y. and Watari J.: Biotransformation of hop-derives monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5050–5058 (2010).
- [16] Takoi, K., Koie, K., Itoga, Y., Katayama, Y., Shimase, M., Kosugi, T., Nakayama, Y. and Watari, J.: Impact of terpene alcohol metabolism to beer flavor - flavor characteristics of Citra hop. *Nippon Aji to Nioi Gakkaishi*, **16**, 641–644 (2009) (in Japanese).
- [17] Asakawa Y., Noma Y.: Biotransformation of sesquiterpenoids. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*; Elsevier Ltd: Vol.3, 803–892 (2010).
- [18] Gros, J., Nizet s. and Collin S.: Occurrence of odorant polyfunctional thiols in the super alpha Tomahawk hop cultivar. Comparison with the thiol-rich Nelson Sauvignon bitter variety. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8853–8865 (2011).
- [19] Lukić, I., Miličević B., Banović, M., Tomas, S., Radeka, S. and Peršurić, D.: Characterization and differentiation of monovarietal grape Marc distillates on the basis of varietal aroma compound composition. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7351–7360 (2010).
- [20] Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T. and Collin S.: Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5061–5068 (2006).
- [21] Kollmannsberger, T., Biendl, M. and Nits, S.: Occurrence of glycosidically bound flavour compounds in hops, hop products and beer. *Monats. Brauwissenschaft* May/June, 83–89 (2007).
- [22] Lamy, V., Roussi, S., Chaabi, M., Gosse, F., Schall, N., Lobstein, A. and Raul, F.: Chemopreventive effects of lupulone, a hop β -acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **28**, 1575–1581 (2007).
- [23] Yoshida, A. Edited by Preedy, V.: Isohumulones from beer modulate blood lipid status. *Beer in Health and Disease Prevention*, 815–829 (2009).

- [24] Stevens, J. and Page, J.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, **65**, 317–1330 (2004).
- [25] Legette, L., Arlyn, Y., Luna, M., Reed, T., Miranda, C., Bobe, G., Proteau, R. and Stevens, J.: Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry*, **91**, 236–241(2013).
- [26] Coldham, N. and Sauer, M.: Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 1211–1224 (2001).
- [27] Hanke, S.: Linalool – A Key Contributor to Hop Aroma. *MBAA· Global Emerging Issues·www.mbaa.com·November* (2009).
- [28] Fritsch, H., and 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.* **53**, 7544–7551 (2005).
- [29] Opstaele, F., Rouck, G., Clippeleer, J., Aerts G., and Cooman, L.: Analytical and sensory assessment of hoppy aroma and bitterness of conventionally hopped and advanced hopped pilsner beers. *J. Inst. Brew.*, **116**, 445–458 (2010).
- [30] Jelínek L., Šneberger M., Karabín M. and Dostálek P.: Comparison of Czeck hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. *Czech J. Food Sci.*, **28**, 309–316 (2010).
- [31] Kovačević, M. and Kač, M.: Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chem.*, **77**, 489–494 (2002).
- [32] Eri, S., Khoo, B., Lech, J. and Hartman, T.: Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography –mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) Essential oils in support of varietal characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1140–1149 (2000).
- [33] Seefelder, S., Hermaier, H., Schweizer, G. and Seigner, E.: Genetic diversity and phylogenetic relationships among accessions of hop, *Humulus lupulus*, as determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting compared with pedigree data. *Plant Breeding*, **119**, 257–263 (2000).
- [34] Patzak, J., Nesvadba, V., Henychová, A. and Krofta, K.: Assessment of the genetic diversity of wild hops (*Humulus lupulus* L.) in Europe using chemical and molecular analyses. *Biochem. Syst. Ecol.*, **38**, 136–145 (2010).

- [35] Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., Varcárcel, M., Serrano, E., Beltrán, J. and Nuez, F.: Evaluation of genotype and environment effects on taste and aroma flavor components of Spanish fresh tomato varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 2440–2450 (2011).
- [36] Gil, A., Baren, C., Lira, P. and Bandoni, A.: Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon Verbena (*Aloysia citriodora Palau*). *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8664–8669 (2007).
- [37] Pattee, H., Isleib, T., Gorbet, D., Moore, K., Lopez, Y., Baring, M. and Simpson, C.: Effects of high-oleic trait on roasted peanut flavor in backcross-derived breeding lines. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7362–7365 (2002).
- [38] Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., Shibata, K.: Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8855–8861 (2006).
- [39] Marriott, R.: Flavor and aroma characteristics of Pure Hop Aroma in different beer styles. HOP FLAVOR AND AROMA Proceedings of the 1st International Brewers Symposium, ASBC·MBAA, 79–89 (2009).
- [40] Shellie, R., Marriott, P. and Morrison, P.: Concepts and preliminary observations on the triple-dimensional analysis of complex volatile samples by using GCxGC-TOFMS. *Anal. Chem.*, **73**, 1336–1344 (2001).
- [41] Lu, H. and Liang, Y.: Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS. *Trends Anal. Chem.*, **27**, 215–227 (2008).
- [42] Steinhaus, M. and Schieberle, P.: Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1776–1783 (2000).
- [43] Lermusieau G., Bulens, M. and Collin, S.: Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3867–3874 (2001).
- [44] Opstaele F., Causmaecker B., Aerts, G. and Cooman, L.: Characterization of novel varietal floral hop aromas by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. *Agric. Food Chem.*, **60**, 12270–12281 (2012).
- [45] Karisa, P., Jamin, H., Janiece, H., Petrie R. Andrew, H., Rhona, J., Bob, W., and Robert, S.: Fisher ratio method applied to third-order separation data to identify significant chemical components of metabolite extracts. *Anal. Chem.*, **78**, 5068–5075 (2006)
- [46] The Good Scents Company. <http://www.thegoodscentscompany.com/> (Mar. 14, 2016)

- [47] Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kagami, N. and Kawatsura, K.: Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4701–4707 (2005).
- [48] Rezac, J., Cepicka, J. and Viden, I.: The influence of the main terpene components of hop oil on the beer aroma. *Czech J. Food Sci.*, **16**, 19–24 (1998).
- [49] Rezac, J., Cepicka, J. and Viden, I.: Composition of essential oils in hops and hop products. *Potravinarske Vedy*, **14**, 81–89 (1996).
- [50] Matsui, H., Inui, T., Oka, K. and Fukui, N.: The influence of pruning and harvest timing on hop aroma, cone appearance, and yield. *Food Chem.*, **202**, 15–22 (2016).
- [51] Matsui, H., Inui, T., Ishimaru, M., Hida, Y. and Oka, K.: The Influence of the age of hop plant on the quality of hop aromas in beer. Proc. Third Internat. Humulus Symposium, 171–182 (2013).
- [52] Jelinek, L., Doleckova, M., Karabin, M., Hudcova, T., Kotlikova, B. and Dostalek, P.: Influence of growing area, plant age, and virus infection on the contents of hop secondary metabolites. *Czech J. Food Sci.*, **30**, 541–547 (2012).
- [53] Krofta, K. and Kucera, J.: Mathematical Model for Prediction of Alpha Acid Contents from Meteorological Data for ‘Saaz’ Aroma variety. Proc. Second Internat. Humulus Symposium 848, 14 (2009).
- [54] Herderich, M. J., Siebert, T. E., Parke, M., Curtin, C. and Mercurio, M.: Metabolomics and the quest for understanding quality in flavor chemistry and wine research. ACS Symposium Series; *Am. Chem. Soc.*, Chapter 1, 1–11 (2012).
- [55] Yun, Y., Liang, F., Deng, B., Lai, G., Vicente, G., Lu, H., Yan, J., Huang, X., Yi, L. and Liang, Y.: Informative metabolites identification by variable importance analysis based on random variable combination. *Metabolomics*, **11**, 1573–3882 (2015).
- [56] Procopio, S., Krause, D., Hofmann, T. and Becker, T.: Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. *LWT – Food Sci. Technol.*, **51**, 423–432 (2013).
- [57] Williams, P. C. (1987) Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. In: Near-Infrared Technol. Agric. Food Ind. (Williams, P. C. and Norris, K. eds.), American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, pp. 143–167.
- [58] Eriksson, L. and Johansson, E.: Multi- and megavariable data analysis principles and applications, p. 4370. Umetrics AB, Umea (2001).

- [59] Rettberg, N., Thorner, S. and Garbe, L.: Bugging hop analysis - on the isomerization and oxidation of terpene alcohols during steam distillation. *Brewing Science - Monatsschrift für Brauwissenschaft* **65**, July/Aug., 112–117 (2012).
- [60] Sakuma, S., Hayashi, S. and Kobayashi, K.: Analytical methods for beer flavor control. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **49**, 1–3 (1991).
- [61] Roberts M., Dufour J. and Lewis A.: Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC×C-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *J. Sep. Sci.*, **27**, 473–478 (2004).
- [62] Skinner, R., Kavanagh, T. and Hughes, G., Hildebrand, R. and Clarke, B.: Hop maturation and resin formation. Effects of extended harvestings on subsequent hop crops. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1037-1046 (1975).
- [63] Sharp, D., Townsend, M., Qian, Y. and Shellhammer, T.: Effect of harvest maturity on the chemical composition of Cascade and Willamette hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **72**, 231–238 (2014).
- [64] Bailey, B., Schonberger, C., Drexler, G. and Gahr, A., Newman, R., Poschl, M. and Geiger, E.: The influence of hop harvest date on hop aroma in dry-hopped beers. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, **40**, 1–4 (2009).
- [65] Kurec, M., Hofta, P. and Dostalek, P.: Hop constituents with estrogenic effects and their use. *Kvasny Prumysl*, **51**, 342–347 (2005).
- [66] Stracke, D.; Schulz, T.; Prehm, P.: Inhibitors of hyaluronan export from hops prevent osteoarthritic reactions. *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 485–494 (2011).
- [67] Liu, M., Hansen, P., Wang, G., Qiu, L., Dong, J., Yin, H., Qian, Z., Yang, M. and Miao, J.: Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules*, **20**, 754–779 (2015).
- [68] Magalhaes, J., Carvalho, O., Cruz, M., Guido, F. and Barros, A.: Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat. Prod. Commun.*, **4**, 591–610 (2009).
- [69] Ho, Y., Liu, C., Chen, C., Duan, K. and Lin, M.: Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Phytother. Res.*, **22**, 1465–1468 (2008).

- [70] Pang, Y., Nikolic, D., Zhu, D., Chadwick, L., Pauli, G., Farnsworth, N. and Van, R.: Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *Mol. Nutr. Food. Res.*, **51**, 872–879 (2007).
- [71] Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Van, V., Stevens, J., Deinzer, M., Rong, H., and De Keukeleire, D.: The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 4912–4915 (2000).
- [72] Tan, K., Cooney, J., Jensen, D., Li, Y., Paxton, J., Birch, N. and Scheepens, A.: Hop-derived prenylflavonoids are substrates and inhibitors of the efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**, 2099–2110 (2014).
- [73] Keiler, A., Zierau, O., and Kretzschmar, G.: Hop extracts and hop substances in treatment of menopausal complaints. *Planta Med.*, **79**, 576–579 (2013).
- [74] Effenberger, E., and Westendorf, J.: Hop-derived phytoestrogens alter osteoblastic phenotype and gene expression. In *Beer in Health and Disease Prevention*, Preedy, R. Ed. Academic Press: London, U.K. 2009; pp. 735–745.
- [75] Bowe, J., Li, X., Kinsey-Jones, J., Heyerick, A., Brain, S., Milligan, S. and O'Byrne, K.: The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes. *J. Endocrinol.*, **191**, 399–405 (2006).
- [76] Krofta, K., Mikyška, A. and Hašková, D.: Antioxidant characteristics of hops and hop products. *J. Inst. Brew.*, **114**, 160–166 (2008).
- [77] Psenakova, I., Hetesova, L., Nemecek, P., Farago, J. and Kraic, J.: Genotype and seasonal variation in antioxidant activity of hop extracts. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, **56**, 106–113 (2010).
- [78] Ceh, B., Kac, M., Kosir, I. and Abram, V.: Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *Int. J. Mol. Sci.*, **8**, 989–1000 (2007).
- [79] Kavalier, A., Ma, C., Figueroa, M., Kincaid, D., Matthews, P. and Kennelly, E.: Targeted analysis of polyphenol metabolism during development of hop (*Humulus lupulus* L.) cones following treatment with prohexadione-calcium. *Food Chem.*, **145**, 254–263 (2014).
- [80] Peterson, A., Hauschild, J., Quarmby, S., Krumwiede, D., Lange, O., Lemke, R., Grosse-Coosmann, F., Horning, S., Donohue, T., Westphall, M., Coon, J. and Griep-Raming, J.: Development of a GC/Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer, Part I: design and characterization. *Anal. Chem.*, **86**, 10036–10043 (2014).

- [81] Taylor, A., Barofsky, E., Kennedy, J. and Deinzer, M.: Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4101–4110 (2003).
- [82] Finley, J.: Phenolic antioxidants and prevention of chronic inflammation. *Food Technol.*, **58**, 42–46 (2004).
- [83] Okada Y. And Okada M.: Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 401–406 (1998).
- [84] Reyes, M., Quintanilla, C., Burrows, R., Blanco, E., Cifuentes, M. and Gahagan, S.: Obesity is associated with acute inflammation in a sample of adolescents. *Pediatr. Diabetes*, **16**, 109–116 (2015).
- [85] Eguchi, K., Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T. and Nagai, R.: Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.*, **15**, 518–33 (2012).
- [86] Luft, V. C, Schmidt, M., Pankow, J., Couper, D., Ballantyne, C., Young, J. and Duncan, B.: Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. *Diabetol. Metab. Syndr.*, **5**, 31 (2013).
- [87] Monteiro, R. and Azevedo, I.: Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.*, Volume 2010, Article ID 289645, 1–10 (2010).
- [88] Chai, E., Siveen, K., Shanmugam, M., Arfuso, F. and Sethi, G.: Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochem. J.*, **468**, 1–15 (2015).
- [89] Baniyash, M., Sade-Feldman, M. and Kanterman, J.: Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. *Cancer Immunol. Immunotherap.*, **63**, 11–20 (2014).
- [90] Kim, HK., Gheon, BS., Kim, YH., Kim, SY. And Kim, HP.: Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.*, **58**, 759–65 (1999)
- [91] Ivanov, M.: The 125th anniversary of the Griess reagent. *Ivanov, J. Anal. Chem.*, **59**, 1002 (2004)
- [92] Yui K., Kiyofuji, A. and Osada K.: Effects of xanthohumol-rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J. Oleo Sci.*, **63**, 159–168 (2014).

- [93] Legette L., Luna A., Reed R., Miranda C., Bobe G., Proteau R. and Stevens J.: Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry*, **91**, 236–241 (2013).
- [94] Kirkwood J., Legette L., Miranda C., Jiang Y. And Stevens J.: A metabolomics-driven elucidation of the anti-obesity mechanisms of xanthohumol. *J. Biol. Chem.* **288**, 19000–19013 (2013).
- [95] Miyata S., Inoue J., Shimizu M. and Sato R.: Xanthohumol improves diet-induced obesity and fatty liver by suppressing sterol regulatory element-binding protein (SREBP) activation. *J. Biol. Chem.*, **290**, 20565–20579 (2015).
- [96] Yang, J., Della-Fera, M., Rayalam, S. and Baile, C.: Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis*, **12**, 1953–1963 (2007).
- [97] Forino, M., Pace, S., Chianese, G., Santagostini, L., Werner, M., Weinigel, C., Rummler, S., Fico, G., Werz, O. and Taglialatela-Scafati, O.: Humudifucol and bioactive prenylated polyphenols from hops (*Humulus lupulus* cv. “Cascade”). *J. Nat. Prod.*, **79**, 590–597 (2016).

論文リスト

主論文

1. Inui, T., Tsuchiya, F., Ishimaru, M., Oka, K. and Komura, H.: Different beers with different hops. Relevant compounds for their aroma characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 4758–4764 (2013).
2. Inui, T., Matsui, H., Hosoya, T., Kumazawa, S., Oka, K. and Fukui, N.: Effect of harvest time and pruning date on aroma characteristics of hop teas and related compounds of Saaz hops. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, DOI: 10.1094/ASBCJ-2016-4628-01.
3. Inui, T., Okumura K., Matsui, H., Hosoya, T. and Kumazawa, S.: A role of the harvest time of hops in health-promoting activities of hop polyphenols. Submitted.

参考論文

1. Matsui, H., Inui, T., Oka, K. and Fukui, N.: The influence of pruning and harvest timing on hop aroma, cone appearance, and yield. *Food Chem.*, **202**, 15–22 (2016).

謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました指導教員である食品分析化学研究室 熊澤 茂則 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本論文作成に当り細やかな実験のご指導、論文の校閲等、ご助言を賜りました同研究室 細谷 孝博助教に厚く感謝申し上げます。

また、本研究データを取得するにあたり、妥協することなく熱心に実験を続け、多大なるご支援を頂きました同研究室、修士2年 奥村 小春さんに深く感謝いたします。また、同研究室の学生諸氏、研究員、事務の方々に心から感謝の意を表します。

また、会社業務の中でお時間を頂き成長の機会を与えていただきましたサントリービール(株)岡 賀根雄常務に深く感謝いたします。また、本研究の切欠をいただきましたサントリーグローバルイノベーション(株)福井 宣之取締役、長期チェコに滞在しホップ栽培試験に携わり貴重なホップ試料や関連情報をご提供頂いた松井 宏夫氏、チェコの Hop Reserch Institute Co., Ltd. および Zatec Hop Company Ltd. に深く感謝いたします。

また、研究推進にあたり必要な試薬、資材、試料をご提供いただきました静岡県立大学、サントリービール(株)に感謝の意を表します。

最後に、これまで常に支え続けてくれた家族、同僚、友人無くして本研究は成し得なかったことを付記致します。