

ホップ由来のイソフムロンが泡の表面構造に及ぼす影響

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	宮前, 孝行
発行元	日本醸造協会
巻/号	115巻1号
掲載ページ	p. 12-18
発行年月	2020年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ホップ由来のイソフムロンが泡の表面構造に及ぼす影響

ビールの外観品質において「泡」を欠かすことはできず、近年でもビールの価値として広告等でも大々的に訴求されている。ビールの泡の形成には、麦由来のタンパク質、ホップ由来の苦味成分、ポリフェノール、多糖類、ミネラルなどが寄与することは良く知られており、そのタンパク質の濃度やイソフムロンの濃度を上げれば泡持ち（NIBEM 値）が良くなることはよく知られている。しかし、それらの成分がどのように結びついて泡を構成しているかについては全く不明であった。本項では、著者が振動分光法を用いて、「イソフムロンが泡の構造にどのように寄与しているか」を解析した、非常に興味深い知見を紹介する。

宮前 孝行

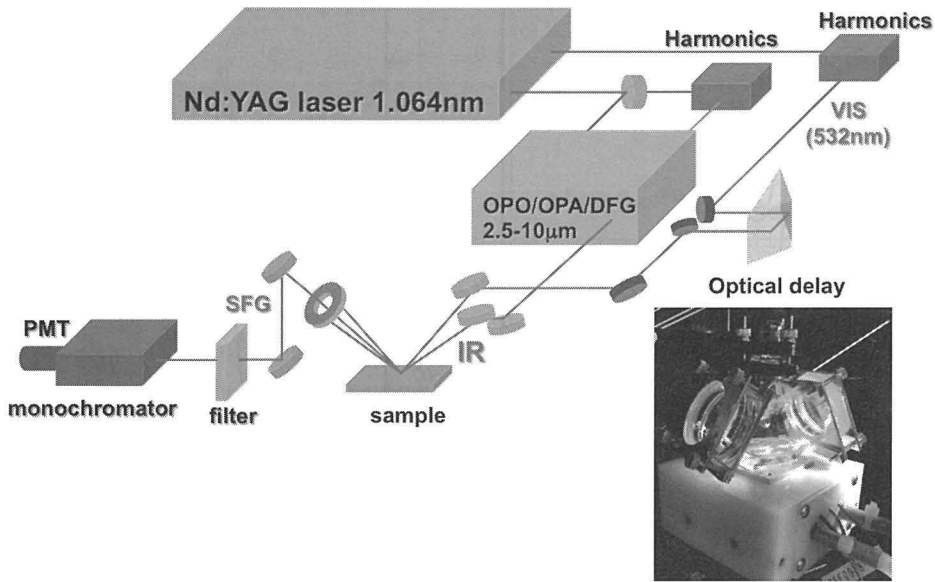
1. はじめに

ビールの原料にホップ（学名：*Humulus lupulus*）が用いられるようになったのは11世紀ごろのドイツが発祥と言われている。ホップはアサ科のつる性多年草で、その毬花に含まれる成分はビールに独特の苦味や香り、清涼感を加え、また雑菌の繁殖を抑えてビールの保存性を高める働きがある^{1,2)}。ビール独特の苦味は毬花に含まれる α 酸と呼ばれるフムロン類が異性化したisohumuloneと呼ばれる分子群によるものである。一方でホップに含まれる成分は、味だけでなくビールにとって重要な要素である泡の形成にも重要な役割を果たしている。ビールにとって「泡」は見た目だけでなく商品価値を高める重要な要素であり、泡が長時間安定していること（泡持ち）はビールの品質や商品価値の向上にとって必要不可欠である。ここで一般的に、「泡」とは気体と液体から構成され、親水性部分と疎水性部分をあわせ持つ分子がその境界面、つまり気液界面に存在している状態をとっている。ビールの場合、この泡の形成や安定化には液体中に含まれる分子が重要な役割を果たしていると考えられ、これまでも液体そのものの組成を調べて、効率的に泡を形成するタンパク質の解明やタンパク質の作用と泡の形

成や安定性との関連を調べる研究が数多く行われてきた。泡は液体の表面で形成するため、泡の形成過程やその安定性を調べるには液体としてのビールの表面に存在する分子の情報が必要である。しかしながら、ビールのような多様な分子が存在する液体は複雑で調べること自体が難しく、またそもそも液体表面だけを分子レベルで調べる手法がほとんどなかったため、ビール表面の分子の構成が液体内部と同じなのかどうかは全く不明であった。

和周波発生（sum frequency generation, SFG）分光は、周波数の異なる2つの強力なパルスレーザー光を試料に同時に入射することで起こる「2次の非線形光学効果」を利用した表面敏感な振動分光法である³⁾。2次の非線形光学効果は、「反転中心の存在しない」系で発生する高次の光学現象であり、等方的な配向をもったバルク（例えば液体のバルクの水など）は、反転中心を持つためにSFGは発生しないが、その表面や界面（例えば気液界面など）は反転中心のない場となるため、液体のような通常の表面分析手法では測定困難な表面でもSFGで界面の情報を選択的に取得することができる。得られたスペクトルは赤外吸収と同様の分子振動スペクトルであり、表面、界面での分子の配向、秩序性、相互作用などを調べることができる。

Relationship between Beer Foam and Hop-derived Isohumulones
Takayuki MIYAMAE (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
t-miyamae@aist.go.jp



第 1 図 SFG 分光装置の概略と、ビール測定用の液体セル。

ビールの表面でどのような分子が泡の形成過程や安定化に関わっているのかを明らかにするため、SFG 分光を用いたビール表面の研究に着手した⁴⁾。

2. 和周波発生分光

通常の可視紫外吸収分光や赤外吸収などは入射する光強度 E に応じて物質の分極 P が線形応答 ($P = \chi^{(1)} E$) を示すのに対して、パルスレーザー光のような強い光を照射した場合には、物質内部に生じる非線形分極とは異なる非線形分極が表面（界面）に生じる。SFG の光学過程の非線形分極は次式で表される。

$$P^{(2)}(\omega_{\text{SF}} = \omega_{\text{VIS}} + \omega_{\text{IR}}) = \chi^{(2)} : E(\omega_{\text{VIS}}) E(\omega_{\text{IR}}) \quad (1)$$

$\chi^{(2)}$ は二次の非線形感受率で三階のテンソル、 E は入射光の光電場ベクトルである。さらに 2 次の非線形感受率は、

$$\chi^{(2)} = \chi_{\text{R}}^{(2)} + \chi_{\text{NR}}^{(2)} \quad (2)$$

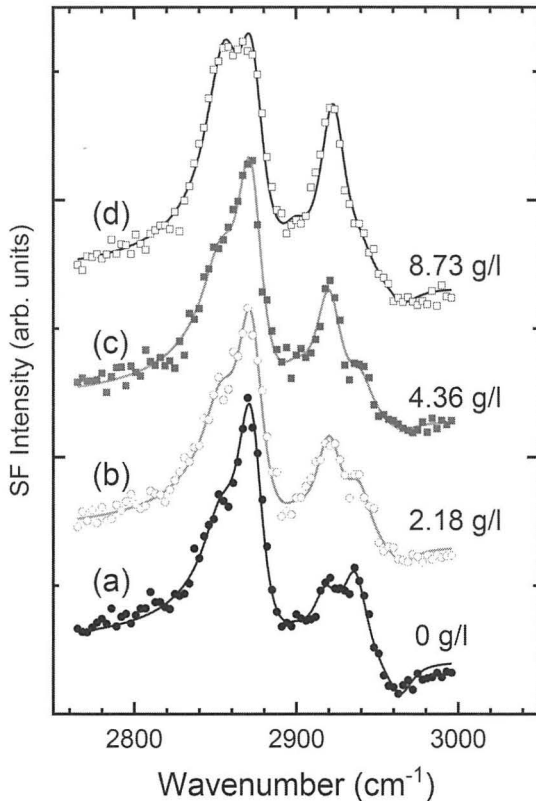
と表され、右辺第 1 項は共鳴項、第 2 項は非共鳴項と呼ばれる。 $\chi_{\text{R}}^{(2)}$ は振動スペクトルを与える項であり、

$$\chi_{\text{R,ijk}}^{(2)} = \frac{N A_{\text{k}} M_{\text{ij}} \Delta \rho}{\hbar(\omega_{\text{IR}} - \omega_{\text{q}} + i\Gamma_{\text{q}})} \quad (3)$$

と表される。 N は SFG 信号に寄与する表面分子数密度、 i, j, k はデカルト座標軸 x, y, z 、 ω_{q} と Γ_{q} はそれぞれ

振動共鳴周波数及び消衰定数、 M_{ij} は振動励起状態 $|v\rangle$ から振動基底状態 $|g\rangle$ への遷移に対応するラマン散乱テンソル、 A_{k} は $|g\rangle$ から $|v\rangle$ への遷移に対応する赤外遷移モーメント、 $\Delta \rho$ は $\langle v|$ と $\langle g|$ との占有率の差である。また (3) 式より、SFG で振動ピークを与える $\chi_{\text{R,ijk}}^{(2)}$ は分子の数だけでなく、分子配向、すなわち表面に存在する官能基の向きに大きく影響されることが分かる。つまり SFG で観測されるピーク強度は通常赤外分光などのように官能基の数に比例して信号強度が強くなるだけでなく、官能基の配向（度）によって大きく影響を受ける。

第 1 図に SFG 分光に用いる典型的な測定装置の概略を示す⁵⁾。SFG の測定装置は、大きく分けて (1) 励起用レーザー、(2) 赤外レーザー光と可視レーザー光発生部、(3) 試料部、(4) SFG 光検出部から構成される。励起用光源としてパルス幅 25 ps のモードロック Nd:YAG レーザーを使用し、ここから 2 つの出力 (1064 nm) を取り出す。一方の光を 532 nm の可視光に波長変換して試料に照射する可視光として使用する。もう一方は光パラメトリック発振/増幅 (OPO/OPA) および AgGaS₂ の非線形結晶上での差周波発生 (DFG) を利用することで 1000 から 4000 cm⁻¹ の範囲で波長可変の赤外光を得る。赤外パルスと可視パルスは光学的遅延回路を通し、試料表面上で空間的及び



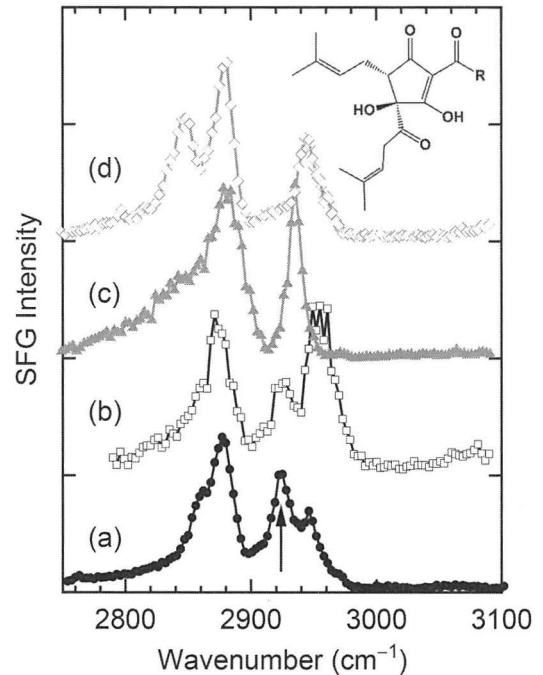
第2図 ホップ添加量を変えたビール表面のSFGスペクトル。(a)ホップ添加量 0 g/l, (b)2.18g/l, (c)4.36 g/l, (d)8.73 g/l。

時間的に重ね合わせる。試料表面から発生するSFG光は位相整合条件 $\omega_{\text{SF}} \sin \theta_{\text{SF}} = \omega_{\text{VIS}} \sin \theta_{\text{VIS}} + \omega_{\text{IR}} \sin \theta_{\text{IR}}$ (θ は表面法線方向からの角度)を満足する方向に指向性を持って発生する。SFG光は偏光子と励起光除去フィルター、分光器を通し、光電子増倍管で検出する。

ビール表面の測定には、試料ステージにペルチェ素子を用いた温度調節器を組み込み、第1図にあるようなビールを入れた容器をその上に静置して、ステージ温度を3℃に固定した状態で測定した。

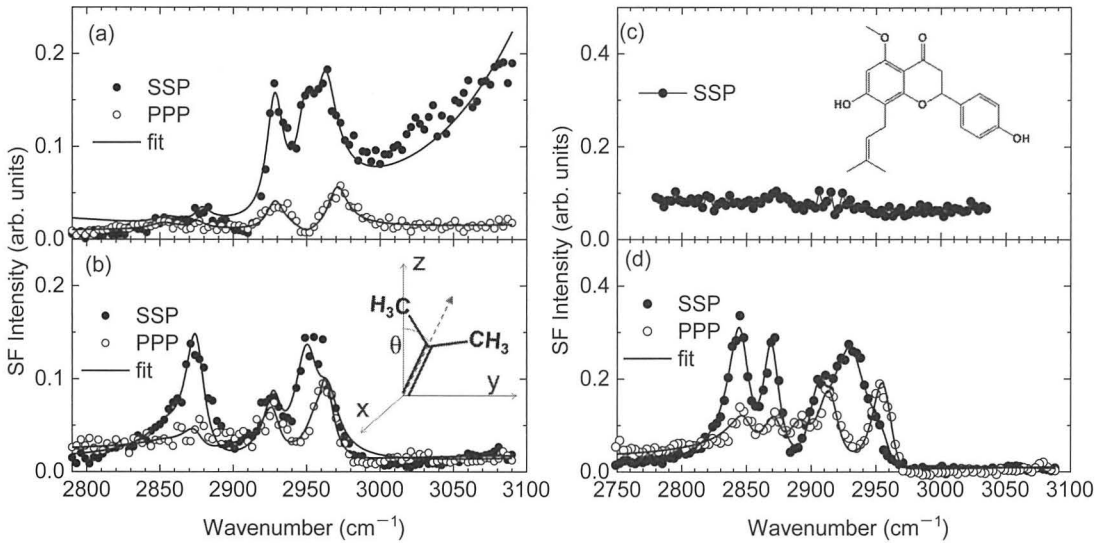
3. ビール表面の分子種の特定

第2図に、醸造時に加えるホップ添加量を、通常のピルスナービールの0~2倍まで変えたビール表面のSFGスペクトルを示す。通常市販されているビールに対するホップ添加量は第2図cに相当する。この波数領域で見られている振動モードはCH伸縮振動に由



第3図 ビール表面、および構成成分のSSP偏光組み合わせによるSFGスペクトル。(a)ビール表面, (b)ホップエキス水溶液(pH = 4.0), (c)エタノール5 vol%水溶液, (d)ビールから抽出した6 kDa以上のタンパク質水溶液。図中の矢印は2926 cm⁻¹に見られるピーク。図中の分子構造はtrans-isohumulone。

来する振動である。ホップが添加されている通常のビール(第2図c)には2926 cm⁻¹の波数位置に明瞭に振動ピークが観測されているのに対し、ホップが添加されていないビール(第2図a)ではこの位置に振動ピークが明瞭には現れていないことがわかる。さらにこの2926 cm⁻¹のピーク強度はホップの添加量に伴い増加していることがわかった。SFG分光では、表面の分子の量の変化によって起こるピーク強度の増減だけでなく、官能基の配向変化によってもピーク強度が変化することは前節で述べたが、SFGで光の偏光組み合わせ(第2図はSFG光と可視光がS偏光、赤外光がP偏光のSSPの偏光組み合わせでの測定)を変えた測定を同一試料に対して行うことで官能基の配向挙動を調べることができる。偏光組み合わせを変えた測定から、ホップ添加量の増加に伴う2926 cm⁻¹



第 4 図 (a) ホップエキス水溶液の SFG, (b) pH4.0 でのホップエキス水溶液の SFG, (c) isoxanthohumol—重水素化エタノール溶液の SFG, (d) isoxanthohumol—重水素化エタノール—重水溶液の SFG スペクトル。(b) 中の挿入図はプレニル基の分子配向の模式図。(c) 中の化学構造式は isoxanthohumol。

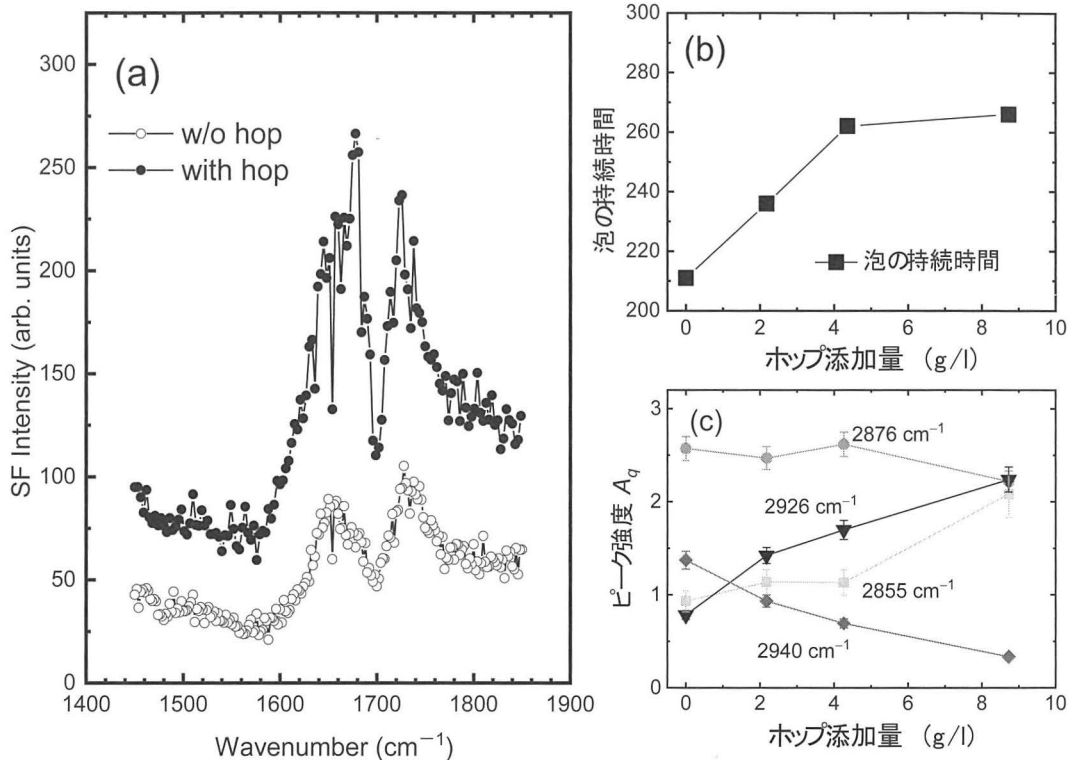
のピーク強度増加は、官能基の配向変化ではなく、主に表面の分子の量の増加に起因することが確認できた。つまり、第 2 図はホップを添加することで表面に何かしら偏析する分子が存在しており、その偏析量はホップ添加量に伴い増加することを示している。

この 2926 cm^{-1} のピークの起源を調べるために、ビールの構成要素であるホップエキス (Hopsteiner 製) 主要な成分として *trans*-isohumulone, (第 3 図), エタノール, およびビールから抽出したタンパク質成分を、それぞれビールと同濃度に調整した水溶液を作成し、各々の SFG スペクトルを測定した結果を第 3 図に示す。ホップエキスの酸性水溶液では、ビール表面と同じ 2926 cm^{-1} の波数位置に SFG の振動ピークが見られたのに対し、タンパク質水溶液やエタノール水溶液ではこの波数位置にピークは見られなかった。このことからビール表面の SFG スペクトルの 2926 cm^{-1} の振動ピークはホップ由来の isohumulone に由来すると帰属した。Isohumulone には特徴的なプレニル基と呼ばれる、2つのメチル基を有する官能基が存在するが、この 2926 cm^{-1} の振動ピークは、このプレニル基のメチル対称伸縮振動に由来すると考えられる。このことは同じくプレニル基を有する 2-methyl-1-phenyl-1-propene の表面を SFG で測定するとほぼ同じ波

数位置にピークが現れることから確認できた。

4. ビール表面のイソフムロンの分子配向

ビールの表面にホップ由来の isohumulone が存在していることが分かったが、ではこの分子はどのような配向状態を取っているのでしょうか。第 4 図に、SSP, および PPP 偏光組み合わせで測定した isohumulone 水溶液およびホップに含まれるポリフェノールである isoxanthohumol—エタノール水溶液の SFG スペクトルを示す。Isohumulone を含むホップエキスはアルカリ性であり、その水溶液は弱アルカリ性を示す。ホップエキスの水溶液の SFG スペクトル (第 4 図 a) は pH4.0 に調整したときの SFG スペクトル (第 4 図 b) とは大きく異なった形状を取っている。これは、isohumulone が溶液の pH により表面での分子配向を大きく変化させていることを示している。ちなみに、純水で希釈した水溶液の SSP 偏光のスペクトルで SFG 信号強度が 3000 cm^{-1} 以上の高波数側が右上がりに強くなっているのは表面に存在する水分子の OH 伸縮振動に由来する。両者のスペクトルで見られている 2926 cm^{-1} のピークを用いて、isohumulone のプレニル基の表面配向を算出したところ、プレニル基はホップエキスの水溶液の場合、表面法線方向から約



第5図 (a)ホップ添加したビールと添加なしビールのアミドC=O領域のSFGスペクトル。(b)ビールの泡の持続時間のホップ添加量依存性。(c)CH伸縮領域のSFGスペクトルの強度のホップ添加量依存性。

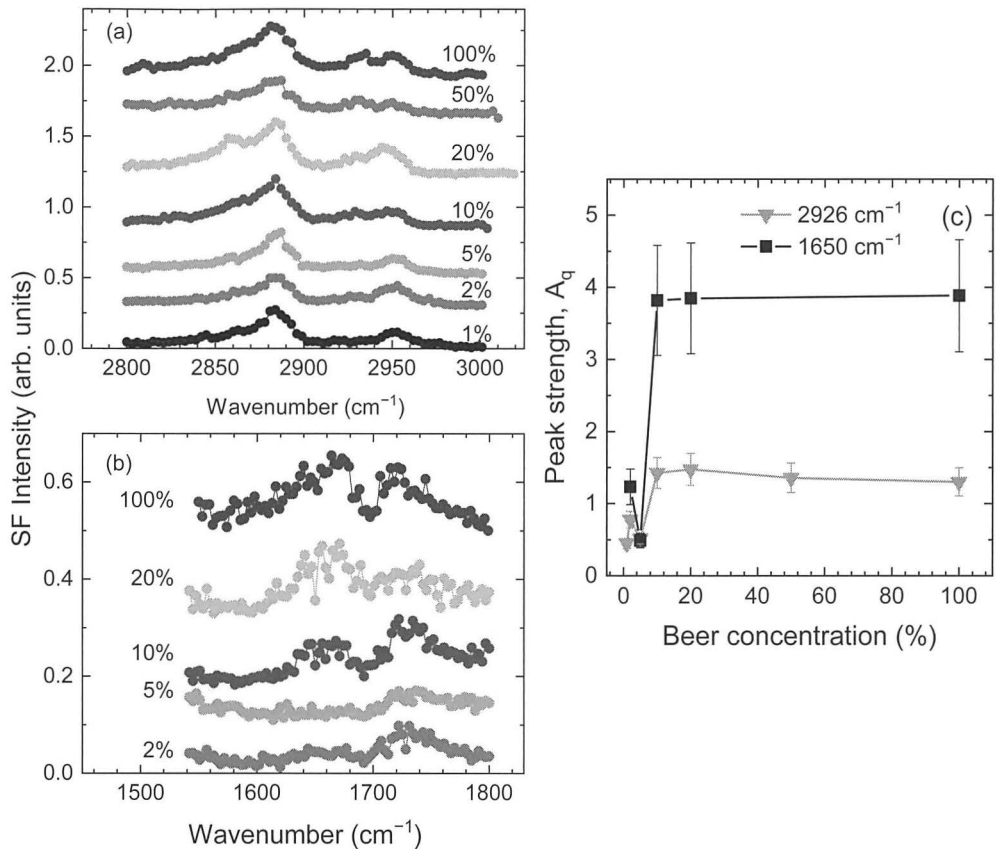
76°, pH 4.0の場合、 $\theta = 33^\circ$ となり、中性～アルカリ性水溶液ではプレニル基はやや水平に配向しているのに対し、酸性水溶液ではプレニル基がより立ち上がった状態になっていることがわかった。Isohumuloneの酸解離定数は2.82-4.04とされており⁶⁾、酸性条件下では isohumulone は解離していない状態をとる。実際、ビールは炭酸を含むため酸性であり、ビール表面においても isohumulone はプレニル基を空気側に突き出した形で配向していると考えられる。

ビール中に含まれるポリフェノールはほとんどが麦芽由来のものであるが、一部ホップ由来のポリフェノールも存在する。ホップ由来のポリフェノールの代表として、isoxanthohumol 溶液のSFGスペクトルを第4図に示す。第4図cはエタノール溶液、第4図dはエタノール-水溶液に溶解させたものである。Isoxanthohumol は水に不溶性分子であるため、重水素化したエタノールに溶解させた。エタノール溶液の場合、

SFGスペクトルには何もピークが現れていないが、これは isoxanthohumol がエタノールに完全に溶解しており、表面に表れていないためであると考えられる。一方で重水素化エタノール-重水混合溶液にした場合、SFGではスペクトルが現れる。Isoxanthohumol も isohumulone と同じくプレニル基を有するため、第4図dのSFGスペクトルでは、2926 cm⁻¹にSFGのピークが現れているのが確認できる。重水混合溶液にした場合、水に不溶性の isoxanthohumol は液体表面に析出しやすくなるため、SFGで信号が検出されるようになったと考えられる。実際のビールにおいても、エタノール混合溶液であるために、isoxanthohumol が表面に析出している可能性がある。

5. ビールの泡持ちとイソフムロン

ビール醸造時に加えるホップの添加量を増やしたビールのSFGスペクトルでは、2926 cm⁻¹の isohumu-



第6図 水で希釈したビール表面のSFGスペクトル, (a)CH伸縮領域, (b)C = O伸縮領域, (c) 2926 cm^{-1} および C = Oのピーク強度の濃度依存性。

lone由来のピーク強度がホップ添加量の増加とともに増していく傾向を示した(第2図)。このSFGの結果から、ホップ由来のisohumuloneはビール表面に集まる傾向にあることがわかる。一方でホップの添加量の増加に伴い、第5図bに示すようにビールの泡の安定性(持続時間)は長くなる傾向にあり、両者は良い相関を示している。さらに我々はこの傾向がSFGで観測されるisohumulone由来のピーク強度の増加とも対応していることを見出した。つまりisohumuloneがビール表面に多いほど、ビールの泡の安定性が向上することが示唆された。ここで、ビールに限らず一般に泡の安定性には液体の表面粘性が関連しており、表面粘性が高いほど泡の持続時間が長くなる傾向にあることが知られている⁷⁾。ただし、isohumuloneは低分子であり、それ自身が液体の表面粘性を

上げていることは極めて考えにくい。他に表面粘性を高めるものとしてはビール中に存在する高分子量のタンパク質の存在が考えられるが、同時に取得したビール表面のアミド領域のSFGスペクトルでは、1650 cm^{-1} 付近に、ビールに含まれるタンパク質由来のアミドC = O伸縮振動が確認できる(第5図a)。つまりタンパク質も同様に表面に偏析しているのである。しかもこのアミドのピーク強度やピーク位置もホップ添加の有無で明確な差があることがわかる。

Isohumuloneとタンパク質との相互作用を調べるために、ビールを水で希釈していった際のビール表面のCH伸縮及びC = O伸縮領域のSFGスペクトルを第6図に示す。2926 cm^{-1} のSFGのピーク強度とアミドC = Oのピーク強度の希釈濃度依存性を第6図cに合わせて示すが、アミドC = Oのピーク強度は、希

積濃度5%程度までは一定であるが、更に希釈すると消失する。2926 cm⁻¹の isohumulone 由来の振動モードでも全く同じ挙動が見られている。このことからタンパク質と isohumulone がビール表面では強く相互作用して共存していることが示唆された。ビールの泡の安定化には、表面のタンパク質の存在と共にホップ由来の分子の介在が重要であることは従来から提唱されてきたが、今回の研究から、ビールの表面ではタンパク質とホップ由来の isohumulone が結びついており、ビールの表面に緻密なネットワークを形成している。このネットワークにより表面の粘性が高くなり、泡の持続時間の向上に大きく作用している要因の一つであると結論付けた。

6. おわりに

本稿では、SFG 分光を用いたビール表面における isohumulone とタンパク質の挙動解析について簡単に紹介した。Isohumulone はビールの苦みや防腐作用だけでなく、ビールの最表面に存在して泡の持続性に具体的に作用していることが実験的に明らかになった。ビールの苦み成分である isohumulone は、ビールの味に貢献しているだけでなく、酸性の炭酸液体表面に配列し、しかもタンパク質と強い相互作用を形成して泡の持続時間を向上させる働きをしていたのである。飲料の中でもビールは特異的な泡を持ち、泡が他にはないビールの特徴でもある。木目細かい、クリーミー、腰がある、艶のある、など泡を形容する官能用語は多数存在するが、そこには必ず分子が存在し、何らかの働きをしているはずである。表面を分子レベルで調べ

ることで、様々な「泡」を形作る分子の働きがより明確になることが期待される。またビールに限らず、例えばウイスキーは水を数滴たらずと味が美味しくなるといわれているが、ウイスキーに含まれる guaiacol は水を垂らすことで表面に浮き上がってくることによるという研究が最近報告されており⁸⁾、アルコール飲料にとっても「液体表面」の研究の重要性は今後増していくことが期待される。〈産業技術総合研究所〉

引用文献

- 1) H. M. Eßlinger, *et al.* : Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2009).
- 2) Beer : A quality Perspective, edited by C. W. Bamforth. Academic Press 2009.
- 3) Y. R. Shen and V. Ostroverkhov, *Chem. Rev.*, **106**, 1140-1154 (2006).
- 4) T. Miyamae, H. Kato, and M. Kato, *Chem. Lett.*, **47**, 1139-1142 (2018).
- 5) T. Miyamae, K. Tsukagoshi, O. Matsuoka, S. Yamamoto, H. Nozoye : *Langmuir*, **17**, 8125, (2001).
- 6) W. J. Simpson, *J. Inst. Brew.*, **99**, 317-326 (1993).
- 7) 小山内州一：泡の化学，オレオサイエンス，**1**，863-870 (2001).
- 8) B. C. G. Karlsson and R. Friendman, *Sci. Rep.*, **7**, 6489 (2017).

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

宮前孝行 < Takayuki MIYAMAE >

昭和42年5月25日生まれ<勤務地と所在地>産業技術総合研究所 〒305-8565 茨城県つくば市東1-1-1 <略歴>平成7年名古屋大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了，平成7年日本学術振興会特別研究員PD，平成9年分子科学研究所IMSフェロー，平成

11年工業技術院物質工学工業技術研究所入所，平成13年独立研究法人産業技術総合研究所研究員，現在に至る<抱負>表面や界面に存在する分子が織りなす多様な機能を見出し，引き出していきたい<趣味>気が向いた時にやる掃除