

ビールの泡持ちに関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2017-12-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横井, 成尚 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00024366

静岡大学博士論文

ビールの泡持ちに関する研究

横井成尚

大学院自然科学系教育部

2017年6月

目次

第1章. 緒言

1-1. はじめに.....	4
1-2. 泡の安定性に関する物理学的研究.....	5
1-3. 泡の測定法に関する研究.....	9
1-4. 泡持ちにプラスに作用する成分の研究.....	12
1-5. 泡持ちにマイナスに作用する成分の研究.....	19
1-6. 原料に関する研究.....	20
1-7. 醸造工程に関する研究.....	20
1-8. 本研究の目的.....	23

第2章. ビール中に含まれる主要蛋白質の分析

2-1. 緒論.....	24
2-2. 実験材料および実験方法.....	24
2-3. 結果および考察.....	26
2-4. 小括.....	33

第3章. 醸造工程中の蛋白質の挙動

3-1. 緒論.....	35
3-2. 実験材料および実験方法.....	35
3-3. 結果および考察.....	39
3-4. 小括.....	45

第4章. ビールの泡持ちと表面粘度の関係

4-1. 緒論.....	47
4-2. 実験材料および実験方法.....	47
4-3. 結果および考察.....	50
4-4. 小括.....	54

第5章. ビールの泡持ちに寄与する蛋白質の性質

5-1. 緒論.....	55
5-2. 実験材料および実験方法.....	55
5-3. 結果および考察.....	57

5-4. 小括.....	66
第6章. 疎水性蛋白質の泡持ちへの寄与の検証	
6-1. 緒論.....	68
6-2. 実験材料および実験方法.....	68
6-3. 結果および考察.....	70
6-4. 小括.....	77
第7章. 酵母由来蛋白質分解酵素の泡持ちに与える影響と高感度活性測定法の開発	
7-1. 緒論.....	79
7-2. 実験材料および実験方法.....	79
7-3. 結果および考察.....	82
7-4. 小括.....	89
第8章. 消費者の視覚をシミュレートした泡持ち評価法の開発	
8-1. 緒論.....	91
8-2. 実験材料および実験方法.....	91
8-3. 結果および考察.....	92
8-4. 小括.....	108
第9章. 総括.....	110
学位論文の基礎となる論文.....	115
謝 辞.....	116
引用文献.....	117

第1章. 緒言

1-1. はじめに

ビールの泡はドイツ語でブルーメ (Blume) つまり「花」と言われる。厳選された原料 (麦芽、ホップ) とビール職人の匠の技術があつて泡がビールの花となつて、視覚や味覚を通してビールを飲む人の心をとらえ、楽しませることをドイツ人は古くから認識していた。この事は、泡は味や香りと並んでビールの重要な品質のひとつであることが歴史的に認識されてきた証とも言える。日本においては、かつてビールの泡が司法の場で争われた事実がある。昭和15年、戦時下の物価統制下の日本において、「ビアホールの生ビールの泡が不当に多い」との告発で争われた裁判において、東京大学農学部 故 坂口謹一郎教授は、泡を液体に戻すと、その液体に含まれる成分は元のビールより濃いことを証明し、すなわち泡には何らかのビール成分が濃縮されることを証明し、「泡はビールである」との判決が下った [1]。泡がビールの一部であることを示した坂口博士の見解は、今日においても一定の拘束力を持つとされている [2]。また、和食が世界文化遺産に登録されたが、日本人が料理において、味と共に大切にする「美しさ」は言うを待たない。黄金食の液体に浮かぶ純白の泡は富士山を髣髴させる。ビールの美しさとしての泡は、日本人にとって観念的にも定着していると言って過言ではない。

ビールの泡に関する研究には、大きく下記のように分類される (なお、本論文では、以降、泡の安定性を「泡持ち」と表記する)。

- ・泡の安定性に関する物理学的研究 [1-2]
- ・泡の測定法に関する研究 (泡持ち、泡のグラスへの付着性) [1-3]
- ・泡持ちにプラスに作用する成分の研究 (高分子蛋白質、高分子多糖類、ホップ由来苦味物質、等々に関するもの) [1-4]
- ・泡持ちにマイナスに作用する成分の研究 (脂肪酸や脂質、酵母から分泌される蛋白質分解酵素に関するもの) [1-5]
- ・原料に関する研究 [1-6]
- ・醸造工程に関する研究 [1-7]

また、本緒言では触れないが、容器やグラスの開発に関する研究、流通過程に関する研究、飲食店で使用されるビールサーバーの開発に関する研究等も消費者との接点において重要となる。

ビールの泡に関する総説としては Bamforth [3] ならびに Evans ら [4]がその著書にまとめている。

1-2. 泡の安定性に関する物理学的研究

泡の物理学的考察は小山内の総説 [5]にまとめられており、ビールの泡の物理的考察としては Evans らが著書 [4]に総括している。

1-2-1. 気泡の形成とサイズ (Bubble formation and size)

泡を論ずる際には、気泡 (Bubble) と泡沫 (Foam) を区別する必要がある。気泡は気体が液体または固体中に包まれた状態を表し、泡沫は気泡が多数集まって薄膜を隔てて密接に存在する状態を表す。泡立ち現象には2つのパラメータ、すなわち「泡立ちやすさ (気泡力)」と「泡の消えやすさ (泡の安定度)」が関与している。泡沫の形成のためには気/液界面の拡張を伴い、その仕事は (表面張力×表面積) で示される。表面張力の小さい多くの有機溶媒は水と比較して泡立ちやすいが、安定した泡沫を形成するためには界面活性成分の存在が必要である。

ビールの泡立ちには炭酸ガスの存在が不可欠である。通常のビールは炭酸ガスが過飽和状態で溶け込んでいる。これが壺や缶からグラス等の容器に注がれるときの衝撃や、生ビールの場合には加圧下でディスペンサーの注ぎ口ノズルの細い導管を通過した直後に大気圧下に解放される衝撃で泡立ちが生じ、この気泡表面や気泡間の薄膜に、高分子蛋白質や、それとホップ苦味質の複合体が集積する事によって安定した泡沫が形成される。

容器に注がれて出来た泡の安定性には、ビール中に含まれる不溶性の粒子、もしくはビールが接する容器表面の凹凸も影響を及ぼす。これら泡の発生の起点となる部分を「核」と表現する。Fig. 1-1 に、容器表面の核を起点にした泡の形成を模式的に示した。

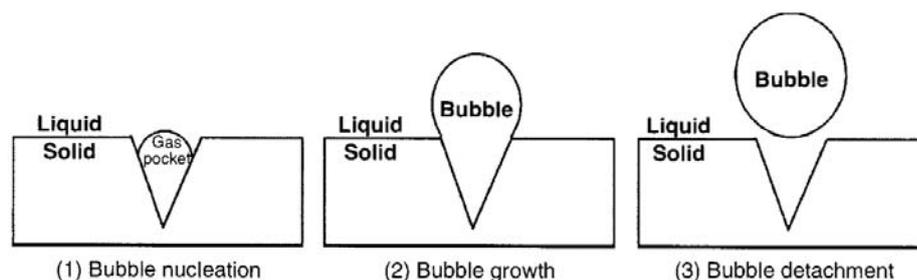


Fig. 1-1 Schematic representation of the bubble formation sequence [4] (Ronteltap et al., 1991 [6]).

この原理を応用して、ガラスの底面に意図的に核となる凹凸をつけて、ガラスの底から連続的に泡が立ち上がるようにして、視覚的にも楽しめるようにした飲用容器もある。この原理で、陶器に注いだビールは、陶器表面のざらつきが核となって、連続的に泡が発生し、安定した細かい泡が楽しめることは経験的に知られている。一方で、洗浄不良のガラスは、表面の汚れが核となってガラス内面に泡が付着し、ビール品質としては問題となる場合がある。さらに、この泡立ちが過剰な状態に至ると「噴き」という現象が発生する。

「噴き」は主として壺ビールや缶ビールにおいて生じ、開栓と同時に核を起点とした気泡発生が瞬間的に多数発生し、内容物が壺や缶から噴きこぼれる品質異常である。

核に誘引されて形成される気泡のサイズは下記の数式に依存する。

$$\text{Bubble radius} = \left[\frac{3R_m\gamma}{2\rho g} \right]^{1/3}$$

R_m = radius of nucleation site (m) : 核となる部位の大きさ

γ = surface tension (mN m^{-1}) : 表面張力

ρ = relative density of the beer (kg m^{-3}) : 当該ビールの密度

g = acceleration due to gravity (9.8 ms^{-2}) : 重力加速度

ビールの密度や表面張力に比して、核となる部位の大きさの影響が大きいとされる。

1-2-2. 泡沫からの排液 (Drainage)

ビールの場合を含めて泡沫は基本的に湿潤であり、Fig. 1-2 に示した泡沫から気泡と気泡の間の隔壁を伝って重力によって液体が下方に流れる排液 (Drainage) が生じる。

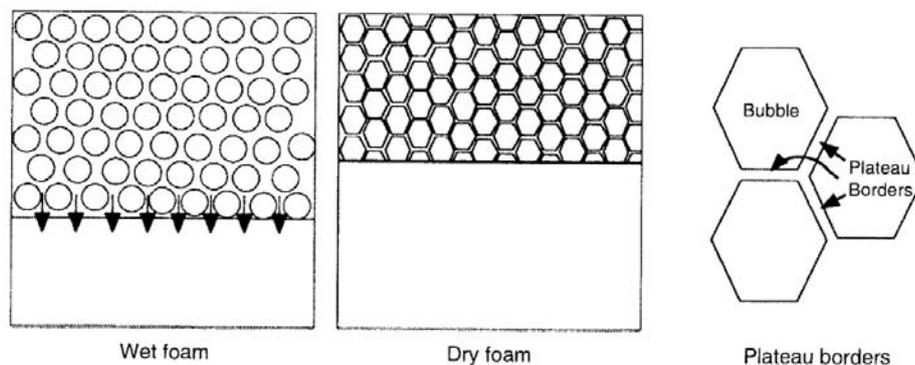


Fig. 1-2 Schematic representation of drainage. In dry foam the bubbles take on a honeycombe-like polyhedric structure showing well defined plateau borders between bubbles [4] (Prins and Marle, 1999 [7]).

この際に、3つの気泡から形成される界面においては、Fig. 1-2 に模式したように、薄膜内の液体は3つの気泡が接する部分に向かって移動する“Plateau border suction”という力が働き、薄膜はより薄くなる方向に変化する。これに抗する力としては、ビールのバルク粘度、キャピラリー効果、ビールの表面粘度があるが、Bamforth [8]は表面粘度の寄与が最も大きとしており、Lusk [9]らは、ビールのバルク粘度を上昇させる β グルカンのような高分子多糖類の効果は無視できるレベルであるとした。著者らもこれを裏付ける結果を得ており、本論に記述する。泡沫からの排液速度は下の式で定義される。

$$Q = \frac{2\rho g q \delta}{3\eta}$$

Q = flow rate ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$): 排液速度

η = viscosity of film liquid (Pa s): 薄膜中の液体のバルク粘度

ρ = relative density of the beer: 当該ビールの密度

q = length of Plateau border (m): プラトーボーダー長

g = acceleration due to gravity: 重力加速度

δ = thickness of film (m): 薄膜厚

1-2-3. 泡の供給と集積 (Creaming, Beading)

ガラスの底の核から気泡が発生して泡沫に供給される現象を **Creaming** もしくは **Beading** と称される。核からの気泡の発生活性（下式）は、炭酸ガス濃度、表面張力、ビール密度によって決定されるが、専ら炭酸ガス濃度の寄与が大きい。

$$a_n^0 = 3.11C + 0.0962 \gamma - 218 \rho + 216$$

a_n^0 = 核からの気泡の発生活性

γ = surface tension : 表面張力

ρ = density : 密度

C = carbon dioxide content (vol. CO₂/vol. beer) : 炭酸ガス濃度

1-2-4. 気泡の合体 (Coalescence)

気泡の合体 (Coalescence) は、二つの気泡が隔壁の破壊により合体し、粗い不安定な泡沫を形成する事を意味する。品質に問題のないビールは、この現象によって著しい品質問題を引き起こす事は稀だが、疎水性の極めて高い物質、例えば脂質（スナック菓子やリップスティック等に起因する）や洗剤、またはこれらの物質が付着した洗浄不良のグラスに注がれたビールはこの現象が顕著となる場合がある。

1-2-5. 泡沫の不均一化

泡沫の不均一化は「オストワルド熟成 (Ostwald ripening)」とも言われる現象で、過飽和の液体から発生した気泡同士が接する場合に、その粒径に差がある場合は、小粒径の気泡の蒸気圧は、大粒径のそれより大きいため、含まれる気体（ビールの場合は炭酸ガス）は隔壁を通過して小粒径気泡から大粒径気泡に移動する。その結果、小さい気泡はより小さく、大きい気泡はより大きくなり、泡沫が粗い状態へと変化する。含まれる気体が例えば窒素ガスの場合、炭酸ガスの場合に比べて液体への溶解度が低いために、このガスの移動が起こりにくく、泡沫が不均一になりにくい。この現象を利用して、例えばギネス等は、樽からディスペンスする際に窒素ガスの細かい泡が形成されるサーバーを用いる

か、あるいは缶ビールの中に窒素ガスを封入したプラスチック容器を入れて、缶の開栓と同時に破裂して細かい泡が発生するようにして、安定した細かい泡が発生するようにした例がある。

不均一化は下記の式で定義される。

$$r_t^2 = r_0^2 - \frac{4RTDS\gamma t}{P\theta}$$

r_t = the bubble radius at time t : 時間 t における気泡径

r_0 = bubble radius at time 0 : 時間 0 における気泡径

R = the gas constant ($8.3 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) : 気体定数

T = absolute temperature : 絶対温度 ($^{\circ} \text{K}$)

D = the gas diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) : ガス拡散係数

S = the solubility of the gas ($\text{mol m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$) : ガスの溶解度

γ = the surface tension : 表面張力

t = time (s) : 時間

P = pressure : 圧力

θ = the film thickness between bubbles : 気泡間の隔壁の厚さ

この中で気泡間の隔壁の厚さは前述した排液速度にも影響を与える重要な因子であり、この薄膜を形成する、または薄膜に濃縮される成分が泡沫安定性（泡持ち）に重要な影響を及ぼし、著者はこれについて本論文で述べる。

1 - 3. 泡の測定法に関する研究

泡の研究において泡の状態を定量的に（場合によっては定性的に）測定する事は極めて重要である。これまで報告されている主要な泡の測定法を Table 1-1 に示した。

Table 1-1 Foam analysis methods

方法 (名)	測定対象	測定手段	文献
目視測定	総合的泡品質	試料を飲用容器へ注ぎ、パネリストが目視測定（主に製造工程における品質チェックの際に行われる）	
Blom 法	泡安定性	ガス抜きビールへの CO ₂ 吹き込みで起泡し、泡沫からの排液速度を測定	Blom [10]
Ross&Clark 法	泡安定性	ガス抜きビールを測定用機に注ぎ、泡沫からの排液を速度	Ross and Clark [11]
Rudin 法	泡安定性	ガス抜きビールへの CO ₂ 吹き込み起泡し、泡沫からの排液速度（市販装置あり）	Rudin [12]
Micro Scale 法	泡安定性	ホモジナイズにより起泡し、排液速度を測定	St John-Coghlan <i>et al.</i> [13], Hung <i>et al.</i> [14]
Sigma (Σ) Head Value 法	泡安定性	製品を専用測定容器に注ぎ、排液速度を測定	ASBC [15]
LG Automatic 法	泡安定性	ガス抜きビールへの CO ₂ 吹き込み、排液速度を測定	Rasmussen [16]
NIBEM (NIBEM-T) 法	泡安定性	CO ₂ フラッシングにより起泡し、泡沫の崩壊時間（電導度センサーによる。市販装置あり）	Klopper [17]
Constant 注ぎ法	泡安定性	試料を専用測定容器に注ぎ、画像解析	Constant [18]
光ファイバー法	泡安定性、泡沫均一性	CO ₂ フラッシングにより起泡し、光ファイバーによる泡沫内の気泡径および泡密度	Ronteltap [6]
FCT 法	泡安定性	試料を専用測定容器に注ぎ、液表面露出までの泡表面を画像解析	Yasui <i>et al.</i> [19] Ferreira <i>et al.</i> [20]
振とう法	泡安定性	ガス抜きビールの振とうにより起泡し、泡崩壊速度	Knapp and Bamforth [21]
Lacing 測定法	泡付着性	ガス抜きビールへの CO ₂ 吹き込みにより起泡し、付着物質量の吸光度による測定	Jackson and Bamforth [22]
NIBEM-CLM 法	泡付着性	NIBEM (NIBEM-T) 法に準じて起泡し、測定用ガラス側面の画像解析	Bamforth [3]

泡持ち測定法として、現在、世界標準となっているのは Klopper [17]によって提唱された NIBEM 法で、現在、Haffmans 社から Foam Stability Tester NIBEM-TPH という商品名で専用装置が市販されている。Fig. 1-3 にその外観を示した。



Fig. 1-3 The NIBEM foam analyzer [3].

実際の測定において、最初のステップである「起泡」には、炭酸ガス加圧化で起泡用ノズルを通過させることにより再現性良く起泡する事ができる専用装置を使用する。続いて、起泡後の容器を泡面の低下速度を測定する測定ユニットに移して計測を開始する。導電度計を備えたセンサーが経時的に低下する泡の表面を追従する。測定開始時から泡面が 10 mm、20 mm、30 mm 低下するのに要する時間を測定する。通常は 10 mm 低下時から 30 mm 低下まで掛かる時間を NIBEM 値とする。この方法の最大の利点は、専用装置を使用するため、測定者や測定室間誤差が少なく、高い再現性が得られることである。

一方で、市場において最終的に泡の良し悪しを判断するのは消費者の目であり、泡の測

定は極力消費者が実際にビールをグラスに注いで出来る泡を視覚に近い形で解析して数値化するべきであるという考え方があり、安井と著者らは、人間の動きをシミュレートしたビール注ぎ機を開発し、複数回の注ぎから得られた画像を統計的に処理して数値化する試みを行い、これについては本論文で記述する [19]。

1-4. 泡持ちにプラスに作用する成分の研究

古くから泡持ちに関連するビール成分の研究がなされており、その中心を成すのが泡持ちにプラスに寄与するビール中の高分子蛋白質に関する研究である。原料大麦中の蛋白質は、製麦工程および仕込工程において、大麦の発芽によって活性化する自らの蛋白分解酵素の作用により分解を受け、酵母の栄養素となるアミノ酸に分解される。また、製麦工程における焙燥工程や、醸造工程における麦汁煮沸という著しい高温にさらされる工程があり、蛋白質分子は高度に変性され、一定量の蛋白質は凝固・不溶化して除去される。また、醸造工程の熟成（貯酒）工程では 0°C 以下の低温に一定期間置かれる。その目的は製品になった後の保存中の混濁発生を防止するために、低温で余剰な蛋白質を凝固させて取り除くことである。また、熟成後の濾過工程ではシリカゲル等により、やはり混濁に関与する蛋白質を吸着除去する工程もある。このような一連のビール製造工程の中で、高分子構造を維持した特定の蛋白質（ただし、酵素活性など、生物学的な活性は失われている）のみが最終的に製品ビール中に移行し、物理的な起泡性や泡沫安定性といった性質を有したものがビールの泡持ちに寄与するとされる [23-25]。

泡持ちに寄与する蛋白質の詳細については 1-4-1 項から 1-4-6 項に記述する。高分子蛋白質以外に、泡持ちにプラスに作用する物質としてホップ由来の苦味物質イソフムロン（別名：イソ α 酸、Fig. 1-4）が挙げられる [26]。

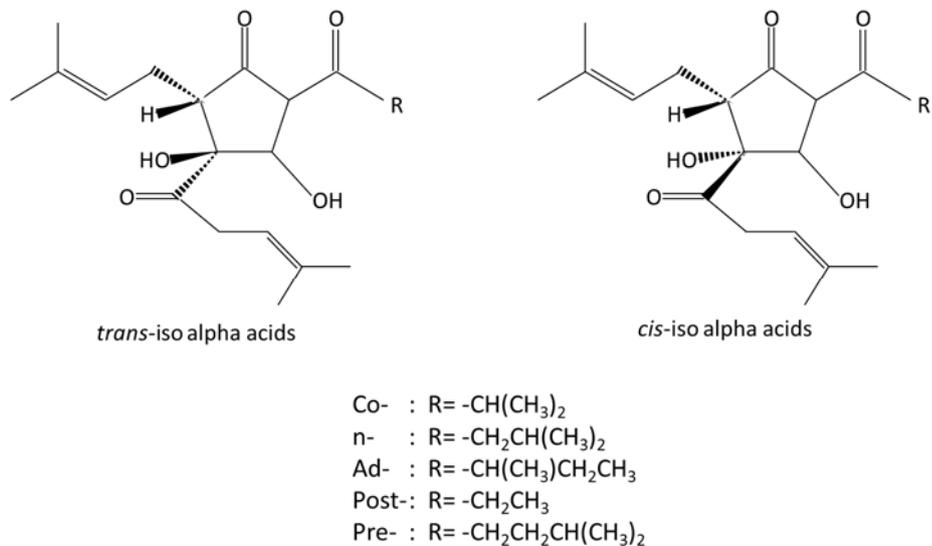


Fig. 1-4 Iso-alpha acids.

これらは高分子蛋白質と結合して界面活性の高い複合体を形成すること [27]、さらに二価の金属イオンがこの複合体同士を架橋する事で泡持ちへの寄与度が高まるモデルが提唱されている [28]。イソ α 酸にはシス体とトランス体があり、トランス体がより泡に濃縮され、泡持ちへの寄与度が高いとされている。イソフムロンはホップ中のフムロンが麦汁煮沸工程でイソ化されて苦味を有するイソフムロンに変換されてビールの苦みの源となり、さらにホップ苦味質の中では、その疎水性の度合いの違いからイソコフムロンに比べてイソフムロンの泡持ちへの寄与度が高いことが知られている [29]。ホップ苦味質の加工品の中には、塩製品が日光に暴露されることで、イソ α 酸が紫外線によって分解し、これが硫化水素と反応して強い日光臭を有する 3-methyl-2-buten-1-thiol (Fig. 1-5) を生じるために起きる日光臭の発生を抑止するために、イソフムロンが持つ二重結合を還元した還元イソ α 酸が添加物として使用されることがあり (商品名 “Tetra Hop”)、これがその強い疎水性ゆえ泡持ちへの寄与度が高いことも知られている。

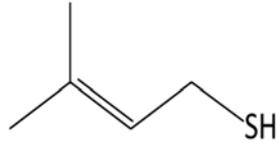


Fig. 1-5 3-methyl-2-butane-1-thiol.

金属イオンの泡持ちへの寄与は古くから知られており、特に Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 $\text{Fe}^{2+/3+}$ の効果が大きいとされるが、安全性やビール品質（噴きや混濁耐久性）の観点からは重大な問題を引き起こすとされる [12] [30]。

ビール中の多糖類で、泡持ちに寄与する可能性を有しているのは、高分子の β グルカン、アラビノキシランであるが、その寄与に関しては諸説がある。これらの物質は、ビールのバルク粘度を高め、泡沫からの排液速度を低下させることで泡を安定化させるとされるが [31-34]、一方で、 β グルカンは泡持ちへの影響が少ないことや、醸造工程における麦汁濾過性の改善のために β グルカナーゼを使用した試験醸造において、ビールの粘度は低下したものの、泡持ちは低下しなかった事も報告されている [35, 36]。また、ある種のアラビノキシランは、バルク粘度を上昇させるだけでなく、蛋白質と相互作用する事で泡を安定化させるという報告もある [37]。多糖類がもたらすバルク粘度の上昇は、泡の付着性にも寄与する事も報告されている [38]。一方、麦芽由来の低分子のオリゴ糖の泡持ちへの寄与は少ないとされている [20]。これらの諸説は採用する泡持ち測定法の原理によって左右され、すなわちバルク粘度に影響される泡沫からの排液速度を原理とする方法を採用した場合に寄与が認められるが、実際の醸造においてはバルク粘度が高いことは麦汁濾過やビール濾過で問題を引き起こし、分解を促進させることが工程管理上も必要であり、実質的にバルク粘度が泡を左右する要因とはなりにくい [39]。

また、海外では泡持ちを良くするための添加物として多糖類であるアルギン酸プロピレングリコールが使用されることがある。これはそのマイナス電荷と蛋白質のプラス電荷によって高粘度の高分子複合体を形成し、気泡周辺の泡膜の粘度を高めることがその原理とされる。

窒素ガスは溶解度が低く気泡と気泡の間の透過性が低いことから、1-2-5項で述べたように、樽製品や缶製品において、例えばギネスのように特徴的に泡持ちの良い製品において利用されている。

本論文では、泡持ちに寄与する蛋白質を研究の主たる対象にしており、以下にこれまで報告されているビール中の泡持ち寄与蛋白質について報告されている知見を記述する。

1-4-1. 脂質結合性蛋白質 (Lipid Transfer Protein: LTP)

大麦の LTP ファミリーには表現型の異なる 2 タイプ、LTP1 と LTP2 が存在する事が知られている [40]。LTP2 は大麦穀粒の発育の初期段階にアロイロン層に生じ、麦芽中には少量検出されるのみで、泡持ちへの寄与は限定的とされる。一方、LTP1 は PAPI (Probable Amylase/Protease Inhibitor) と称されていた時期があり [41, 42]、ビール中に移行する分子量約 9.7 kDa の疎水性蛋白質で、ビールの泡に濃縮される性質を持つとされる [33, 43]。

醸造工程の煮沸工程中に、LTP1 は不可逆的に変性 (熱変性およびメイラード反応) し、より起泡性のある蛋白質へ性質を変えるとされている [44, 45]。大麦中でのネイティブな状態の二次構造までが調べられているが、熱変性により、その生物学的機能や免疫抗原性を失うとされている [46]。蛋白休止段階の最高濃度と比較して未変性の LTP1 は麦汁煮沸直前には 5%~20%に低下するが、麦汁煮沸中に変性 LTP1 が増加し、結果的に約 25%の変性 LTP1 が冷麦汁に移行する [47]が、その一方で、その変性の度合いが泡の安定化能に影響し、すなわち麦汁煮沸中の熱変性が進むほど脂質との結合力が弱まり泡の安定化能が弱まるとしている [48]。また、ビール中の LTP1 は低分子の hordein (後出) /glutelin や、高分子の Protein Z (後出) を含む画分と複合体を形成する事で泡の安定化能が高まることが報告されている [49]。

1-4-2. ホルデイン (Hordeins)

主要な大麦穀粒中の貯蔵蛋白質である Hordein は、電気泳動により分子量的に、B、C、

D および γ と称する複雑な多形から成り立っている [50]。Hordein 自体は不溶性の蛋白質であるが、製麦や仕込工程における酵素分解で可溶化される。構成アミノ酸としてプロリンとグルタミンを多く含み、そのため「噴き」や「混濁」の発生に深く関わりとされている [51]。ビールの泡から検出された分子量 23 kDa の Hordein は、元の液体に比較して 2.7 倍の濃度で泡に濃縮されており、その泡持ちへの寄与が推測されている [52]。分子量 17 kDa の Hordein もビールの泡に濃縮されると報告されており [53]、この蛋白質は 23 kDa の蛋白質と類似のアミノ酸配列を有し、LTP1 との共存化において泡に寄与するとされている。さらに分子量の小さい 3-33 kDa の分子量を有する Hordein 由来のポリペプチドも、その疎水性の高さ故、泡持ちへの寄与が示唆されている [54, 55]。以上のように、Hordein およびその分解物の泡持ちへの寄与については多岐にわたる研究が成されているが、その複雑さ故、未だ統一的な結論には至っていない。

1-4-3. プロテイン Z (Protein Z)

Protein Z は大麦の胚乳中に含まれるアルブミン様の貯蔵タンパク質で、製麦や醸造工程で、蛋白分解酵素や熱負荷、また低温貯蔵やビール濾過等の工程を経ても、分子量約 40 kDa の一次構造をほぼ保持したままビールに移行する蛋白質で、その分子量から 40 kDa beer protein とも称される。Protein Z は泡持ちへの関与が最初に示唆されたビール中の蛋白であり [56, 57]、Protein Z4, Z7, Zx というアイソフォームから成ると報告されている [58, 59]。大麦・麦芽中では Protein Z4 の比率が高く、全 Protein Z の 80% を占め [60]、最終の製品ビール中では高分子蛋白質のうちの 10~20% を占めるとされている [57, 61]。著者らはこのビール中 40 kDa 蛋白質が高い表面粘度特性を有する事を見出し [62]、同様に高い弾性も報告されている [63]。また、Protein Z と LTP1 等の他の蛋白質との相互作用が泡持ちにとって重要であるとの報告もある [64]。その一方で、Protein Z の泡持ちに関しては懐疑的な報告もある。小スケール (600-800 mL) およびパイロットスケール (50 L) の醸造試験において、その効果の再現性は確認できなかった [60, 65-67]、あるいは Protein Z 抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィーを用いて Protein Z を

選択的に除去したビールは泡持ちの低下を示さなかったとの報告もある [68]。この矛盾の説明として、Protein Z の泡持ちへの寄与は、麦芽の“溶け”（製麦中の蛋白・多糖類分解程度）に影響されるとの知見がある。すなわち、麦芽の溶けが十分でない（i.e.: Kolbach Index<40）の場合は Protein Z 以外の蛋白質が多くビールに移行し、相対的に Protein Z の泡への寄与が限定的であるのに対して、溶けが十分である（i.e.: Kolbach Index>40）場合に Protein Z の寄与は大きくなり [69]、更にホルデイン由来の蛋白質が多い場合は、その寄与が Protein Z に勝るといふ考察もある [8]。大麦育種において、Protein Z は泡持ちを良くするための醸造用大麦分子育種に活用され、著者らは、高 Protein Z 含有大麦の交配系統を用いて Protein Z の構造遺伝子多型を調査し、得られた分子マーカー（RFLP marker）が選抜マーカーとして利用可能であることを報告している [70]。

1-4-4. 脂質結合性蛋白質

脂質はビールの泡持ちにマイナスの影響を及ぼすことが良く知られているが、その影響はビールを 24 時間保存すると、完全にもしくは部分的に回復する事が報告されており、その現象はビール中に含まれる脂質結合性蛋白質が脂質を分子内に取り込むことによって泡持ちが回復するためと報告されている [48, 71-74]。これらの蛋白質は、麦芽、小麦、副原料大麦に由来するとされるが、その性質は良く明らかにはされていない。候補として考えられているのは LTP1 [75]、および小麦や大麦中の puroindoline/holdoindoline 蛋白質である [76]。LTP1 の脂質の取込能については、その変性の度合いが関係し、LTP1 の変性が大きいほど脂質の結合能が小さくなり、泡を保護する能力が乏しくなるとの報告がある [48]。冷麦汁中の脂質含量は、例えば麦汁濾過におけるマイシェフィルターを採用など、特定の醸造条件で増加する事が知られているが [77, 78]、このような麦汁は酵母の浮遊性を高めて旺盛な発酵を引き起こすことで結果的には逆に脂質の除去を促進し、また健全な発酵は泡持ち阻害要因である酵母由来 Proteinase A の漏出を低下させることで、間接的に泡持ちに寄与するという報告もある [79]。

1-4-5. 疎水性蛋白質 (画分)

ここで述べる疎水性蛋白質とは、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィー等で分画される一定レベル以上の疎水性を示す蛋白質の画分 (複数種の蛋白質から成る) の事を示す [80-82]。いずれの報告も、蛋白質の疎水性部分とホップ苦味質が水素結合もしくは疎水性相互作用により複合体を形成し、また著者らは本論文に示したように、疎水性蛋白質自体が表面粘度を有する事で泡膜を強化し、泡持ちへ寄与することを報告した [82]。

1-4-6. 泡持ち関連蛋白質の定量分析法

大別すると泡持ちに寄与する蛋白質を特異的に定量する方法と、高分子蛋白質総量や、疎水性蛋白質等画分を数値化する方法に大別される。前者は、Protein Z や LTP1 に着目して、Protein Z の古典的なロケット免疫電気泳動による定量 [61] や、Protein Z4, Protein Z7, LTP1 の ELISA 法による定量などが泡持ちの研究に使われる [60]。マスペクトルの解析によって、Protein Z4 の分解断片が 7-17 kDa 画分に検出されたという知見もある [83]。

一方で、高分子蛋白質総量を定量する方法としては Coomassie Brilliant Blue 色素結合法 (CBB Assay) が使われている [84]。この色素は分子量 5 kDa 以上の蛋白質と結合するため、定量結果は泡持ちに寄与する蛋白質を良く反映しているが [85-87]、その結果は蛋白質のアミノ酸組成、とりわけアルギニン残基の影響を受け [87]、結果としてアルギニン残基の比率が低いホルデイン由来の蛋白質の含量が相対的に低く定量されるという特性を有する [88]。Pyrogallol redmolybdate (PRM) を用いた方法も、低分子の蛋白質やアミノ酸の影響を受けない方法として報告されている [89]。ビールの泡持ちに強く関与する疎水性蛋白質画分の濃度を測定する試みとして CBB assay と Phenyl-Sepharose 疎水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせた方法や [90, 91]、1-anilino-8-naphthalenesulfonate が疎水性蛋白質と相互作用する際に蛍光強度が高まることを利用した定量方法が提唱されているが、この方法にはビール中の蛍光夾雑物質の影響を受けやすいという欠点がある [92]。

1-5. 泡持ちにマイナスに作用する成分の研究

1-5-1. 脂質

脂質はビールの泡にとって決定的なダメージを与える物質と認識されている。ビールに含まれる、あるいは影響を及ぼすものとして、脂肪酸、グリセリド、リン脂質、糖脂質、ステロールに大別される [93]。ビールに含まれる脂質は、その大部分が麦芽由来で、一部はホップに [93-95]、また一定の条件下で酵母から漏出し、その多くは C₆ もしくは C₈ の炭素鎖を有する脂肪酸であるとの報告がある [96]。どのような脂質が泡に悪影響を及ぼすかについては多くの研究がある。リン脂質や中性脂質と比較して糖脂質の影響が大きく、炭素鎖 C₆ から C₁₀ までの脂質と比較して、C₁₆ や C₁₈ といった長鎖の脂肪酸の影響が大きいとの報告もある [97]。一方で、短鎖の脂肪酸は泡の付着性に悪影響を及ぼすとされる [98]。ビール製造中の脂質酸化反応の生成物であるヒドロキシ脂肪酸は泡品質に悪影響を及ぼすことが明らかとなっている [99]。このヒドロキシ脂肪酸は麦芽中のリポキシゲナーゼ等の酵素が関与する反応経路が詳細に調べられており [100]、生成の抑制法が報告されている [101, 102]。また泡持ちに有利な原料を確保する目的でリポキシゲナーゼを発現させない原料大麦の育種に関する取り組みがなされているが、これについては原料の項で記述する。

1-5-2. 酵母由来蛋白質分解酵素

非熱処理ビールには酵母に由来する蛋白質分解酵素の作用で泡持ちが劣化する事が古くから知られている [103]。中でも酵母の液胞中に存在する Proteinase A (PrA) [104] による泡持ちの影響が顕著で、ビール酵母から精製された PrA をビールに添加して実際に泡持ちが低下する事が確認され [105]、パン酵母由来の PrA については、そのアミノ酸配列も明らかとなっている [106]。ビール中の酵母由来蛋白分解酵素に関する研究において課題とされたのは微弱な活性を再現性良く測定する酵素活性測定法の開発であり [107-110]、著者らは本論文に記載したように、蛍光性のペプチド基質を用いてビール中の蛍光物質の影響を受けずに微弱な酵素活性を測定する方法を開発した [111]。酵母細胞外への PrA 排出

の挙動も明らかになりつつあり、使用する酵母株や、発酵・熟成中の栄養条件や、その温度・期間によって最終製品の PrA 活性は大きく変化するとされる [112]。従って、実際のビール製造においては、PrA 排出の少ない酵母株の選択、酵母の弱化を起こしにくい発酵・熟成管理が重要である。ただし、PrA がビール中の蛋白質にどのように作用し、泡持ちの低下に結びつくかは必ずしも明確になっておらず、PrA による Protein Z のような主要な蛋白質の明らかな一次構造の変化や、著しい有利アミノ態窒素の増加は認められないが、疎水性蛋白質画分への若干の作用が認められ、酵素作用によって疎水性蛋白質の物理的・質的变化が泡持ち低下を引き起こすとされている [113]。

1-6. 原料に関する研究

近年のプロテオミクスの発展に伴い、大麦やビールのプロテオーム解析によって泡持ちに寄与する蛋白質の網羅的な解析が可能になり、新たな知見が見出され、ビール大麦の育種に応用されている。二次元電気泳動と質量解析により同定した蛋白質情報リストを含むビール・麦汁プロテオームマップが作成され、本マップと泡持ちの異なるサンプル間の蛋白質組成の差が比較できるようになり [114, 115]、その結果、Protein Z4 [116, 117]、Bホルデイン、大麦由来の Barley dimeric α -amylase inhibitor-1 (BDAI-1) [118, 119]、酵母由来の Thioredoxin [120]が新たな泡持ち寄与蛋白質の候補として同定されている。

Protein Z4 および Z7、BDAI-1、Bホルデインについては、各遺伝子の遺伝子型を簡便に判別可能な DNA マーカーが開発され [116]、これらの技術を利用して、大麦一粒から出た葉より抽出した DNA を用いて泡持ちの良し悪しを判定する事が可能になるなど [115, 121-125]、泡品質を高めるための大麦選抜技術の開発が進められている。

1-7. 醸造工程に関する研究

泡持ちを最適化するための醸造工程条件に関する知見は数多く報告されているが、ここでは泡持ち関連蛋白質および脂質酸化酵素に関連する醸造工程との関連の報告を記載する。仕込開始（アインマイシェ）時における粉碎原料の濃度は蛋白質の可溶化の観点で重

要であり、高濃度醸造仕込条件は、疎水性蛋白質の可溶化が抑制される点で不利とされる [126, 127]。低温（55° C 以下）での蛋白休止工程は蛋白分解が過度に促進され [128-130]、また遊離アミノ酸窒素（特に、酵母によって資化されにくく、泡持ちにネガティブに作用するアルギニン）の増加が泡の付着性を阻害するという報告がある [131]。低温での蛋白休止は、麦芽由来のリポキシゲナーゼの反応を促進し、生成物のヒドロキシ脂肪酸増加が泡持ちを悪化させることを報告している [132-135]。その一方で、高温での仕込開始は蛋白分解酵素およびリポキシゲナーゼの反応を抑制する事で泡持ちに有効とされ [136]、それがホルデン由来のポリペプチドに起因するとの報告 [52]や、糖蛋白の生成によるとの報告がある [137, 138]。また、湿式麦芽粉碎が 40 kDa 蛋白質のビールへの移行を促進するとの報告もある [139]。

麦汁煮沸は、ホップ由来苦味物質のイソ化、酵素活性の消失、麦汁濃度調整、色や香味の付与等の機能を有する工程だが、泡持ちとの関係でも、蛋白質の熱変性と不溶化、脂質のトルーブへの吸着による除去など、重要な要素を含んでいる。泡持ち寄与蛋白質として上述した LTP1 は熱変性によって泡持ち性が高まり [33, 44, 49, 140]、4 つのジスルフィド結合による立体構造が破壊されることが、気液界面への吸着力が高まることや [140]、還元物質の存在によってその変性が進行する事が報告されている [47]。また蛋白質-糖類のメイラード反応生成物も泡持ちに寄与するとされ [141]、蛋白質分子自体のフレキシビリティが高まることがその理由とされている [142, 143]。Protein Z についても製麦・仕込中に糖タンパク化されることで泡持ち性が高まることも報告されている [144]。麦汁煮沸中の蛋白質の挙動が調べられ、LTP1 が麦汁煮沸開始直後に急激に減少するのに対して、Protein Z は比較的緩やかに減少していくことが分かっている [145]。また、近年は円偏光二色性分光計やフーリエ変換赤外分光光度計を用いて Protein Z の醸造工程中の二次構造の解析が行われている [146]。

実際の醸造工程では、麦汁煮沸工程がとりわけ重要視されており、外部煮沸器を用いた醸造試験において、カウンタープレッシャーを掛けて内圧を高め、温度を上昇させることで、103-110°C において蛋白凝固、DMS の揮散、苦味質のイソ化が効率よく進行するも

の、103°C を越える高温での煮沸条件は蛋白凝固が過度に進み、泡持ちには不利であると注意喚起している [96]。これらを改善するための麦汁煮沸装置の改良も進められている [147]。麦汁煮沸器の過熱器表面の温度が、過剰な蛋白凝固を防ぐために特に重要であるとの報告もある [148]。

発酵工程との関連では高濃度醸造が泡持ちに与える影響が論じられており、高濃度醸造の多くの要素が泡持ちにとって、特に酵母に対する種々のストレスを発生させる点でマイナスに作用する事が報告されている [127]。その対策のひとつとして、主発酵終了後に速やかに酵母を除くことが泡持ちにとって有利に作用する事も報告されている [107, 109, 149, 150]。

発酵・貯蔵中に漏出する酵母由来 Proteinase A に関する研究については 1 - 5 - 2 項に記載したが、醸造工程の要因との関連については、発酵が進行する過程における窒素飢餓、アルコール濃度の影響、炭酸ガスの発生に起因する圧力などが本酵素の酵母細胞からの漏出に影響する事が報告されている [110, 150]。

1-8. 本研究の目的

ビールの泡に関する研究の最終目的は、消費者に提供する優れた泡品質を有する製品・商品の実現である。そのためには泡持ちに寄与する成分を特定し、最終製品の味や香り、また物的耐久性（混濁や噴き）に問題を起こすことなくその成分を制御し、より具体的には、原料を厳選し、製麦・醸造条件を最適化するべく製造プロセスを最適化する事が必要となる。また、そのような知見を新たな製品の開発に反映させることにも意義がある。本研究においては、まず、泡持ちプラス要素の代表であるビール中の高分子蛋白質に着目して、その蛋白質化学的性質の解明、ビール醸造工程中の挙動、物理化学的性質の解明（とりわけ蛋白質の疎水性に着目）を行い、ビール泡持ちに寄与する蛋白質を特定する事を試みた。次いで、泡持ちマイナス要素である酵母由来蛋白分解酵素（Proteinase A）に着目し、ビール中の成分に影響される事なく微弱な活性を精度よく測定する方法の確立を試み、Proteinase A の泡持ち阻害効果を確認する事を試みた。また、ビールの泡持ちの評価方法について、従来から伝統的に用いられてきた方法と比較してより人間の視覚に近い泡持ち測定方法の確立を試みた。ビール自動注ぎ機を開発し、終点判定結果を統計処理する事で方法を確立した。視覚パネルを用いた結果と、新規に確立した方法で得られたデータを統計処理することで確立した方法の評価を試みた。

第2章. ビール中に含まれる主要蛋白質の分析

2-1. 緒論

これまでもビール中の蛋白質を分離して性質を調べる試みがなされており、泡立ち蛋白質は異なる分子量分布を持つ3つの画分より成り、より高分子の2画分が ϵ アミノ基を介してイソフムロンと結合し泡立ち特性を有する事が報告されている [27]。また、その中でも分子量 40 kDa を有する蛋白質は大麦の胚乳に含まれる Protein Z 由来であることが示され、その蛋白質化学的性質が報告されている [158]。また、分子量 9.6kDa の塩基性蛋白質 LTP1 も大麦胚乳に由来し、ビールの泡持ちへの寄与が論じられている [44]。

本章では、ビールに含まれる蛋白質を、SDS ポリアクリルアミド電気泳動後のゲルからスポットを切り出し、アミノ酸組成や、アミノ末端、カルボキシ末端のアミノ酸配列の情報を得ることで、その蛋白質化学的な性質を明らかにする事を試みた。

2-2. 実験材料および実験方法

2-2-1. 実験材料

蛋白質分析用のビールはサッポロビール静岡工場製の黒ラベルを用いた。

2-2-2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli [151]の方法に従い、16.5% (W/V) Acrylamide / 0.47% (W/V) *N, N*-methylene-bis-acrylamide ゲルを用いて行った。電気泳動後のゲルは、0.1% (W/V) Coomassie Blue R (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) で染色、25% (V/V) methanol, 7% (V/V) 酢酸溶液で脱色した。SDS-PAGE に用いた試薬は全て和光純薬製のものを用いた。分子量の推定は分子量標準蛋白質を用いて行い、標準蛋白質は Serva Feinbiochemica 社 (Heidelberg, Germany)の、bovine serum albumin (67 kDa) , ovalbumin (43 kDa), chymotrypsinogen (25 kDa), myoglobin (17 kDa), cytochrome C (12 kDa) を用いた。

2-2-3. 蛋白質の精製

SDS-PAGE の染色後のゲルから蛋白質を精製する Tsugita らの方法 [152]を用いて行った。ビール、および発酵前の麦汁は、これに含まれる低分子の糖類などが濃縮の妨げとなるため、透析膜を用いて 0°C、16 時間、イオン交換水に対して透析を行い、ロータリーエバポレーターで濃縮後、SDS-PAGE に供した。染色後のゲルから目的とするバンドを切り出し、25 倍量の 70% (V/V) ギ酸溶液を用いて室温中で穏やかに回転攪拌により蛋白質を溶解し、ロータリーエバポレーターで濃縮・乾燥した。残渣を 100 μ l の 70% (V/V) ギ酸溶液に溶解し、70% (V/V) ギ酸溶液で平衡化した Bio-Gel P-10 (100-200 mesh, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)に供して塩類、SDS、色素を除き、ボイドボリューム画分を再度ロータリーエバポレーターで濃縮・乾燥し下記の分析に供した。

2-2-4. アミノ酸組成分析

Tsugita らの方法 [153]を用いて加水分解の後、アミノ酸分析に供した。2-2-3 項に示した方法で得られた蛋白質は、0.005% (V/V) フェノールを含む塩酸/トリフルオロ酢酸の 2:1 (V/V) 混合溶液、100 μ l に溶解、ガラスチューブに真空封止し、166°C、25 分間および 50 分間加水分解を行った。開封後の残渣を乾燥後、0.01N 塩酸溶液に溶解し、アミノ酸分析計 Irica A-5500 (Irica Equipment Products, Kyoto, Japan) に供した。アミノ酸組成は、2.5 nmol の標準アミノ酸標品 (和光純薬) を標準とし、スレオニンとセリンは 25 分および 50 分加水分解品の値から加水分解 0 分に相当する値を求め、バリンとイソロイシンは 50 分加水分解品の値を用いた。それ以外のアミノ酸は 25 分と 50 分の加水分解品の平均値を用いて求めた。

2-2-5. アミノ酸配列分析

アミノ末端配列は、マニュアルのエドマン分解法により行った [154]。

Phenylthiohydantoin (PTH)-アミノ酸分析は Hunkapiller らの方法 [155]に準じて、

Zorbax CN (4.6 mm×250 mm, 5- μ m, DuPont Company, Wilmington, DE) を装着した逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて、異動相 0.01 N 酢酸ナトリウム (pH 4.9) : アセトニトリル (62.2 : 37.8)、流速 1ml/min、カラム温度 40°C のイソクラティック溶出、UV254nm 紫外部吸収検出にて行った。Phenyl isothiocyanate は和光純薬製 (Osaka, Japan) を用いた。エドマン分解で使った試薬は Pierce 社 (Rockford, IL) を用いた。

カルボキシ末端配列は、0.1 M pyrimidine acetate-collidine 緩衝液 (pH 8.2) 中で、carboxypeptidase A (Cpase A) および carboxypeptidase B (Cpase B) を作用させ、遊離するアミノ酸をアミノ酸分析計にて分析する事で行った。Cpase A

(phenylmethylsulfonyl fluoride 処理済) および Cpase B (diisopropyl fluorophosphate 処理済) は Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) を用いた。

2-3. 結果および考察

2-3-1. ビール中の蛋白質の性質

ビールの蛋白質の SDS-PAGE 結果を Fig. 2-1 のレーン 1 に示した。分子量標準蛋白質を供したレーン S においてシャープな泳動結果が観測されるように、高い分解能を有する SDS-PAGE において、レーン 1 が示すように分子量 40 kDa 近辺にややブロードながら比較的明瞭なバンドを、また 15 kDa より低分子側に連続したブロードなバンドが検出され、10 kDa および 8 kDa に相当する位置に、比較的濃いバンドが観測された。第 1 章 1-4 項に記述したように、原料大麦中の蛋白質は、製麦工程および仕込工程において、大麦の発芽によって活性化する自らの蛋白分解酵素の作用により分解を受け、酵母の栄養素となるアミノ酸に分解される。また、製麦工程における焙燥工程や、醸造工程における麦汁煮沸という著しい高温にさらされる工程があり、蛋白質分子は高度に変性されることが容易に推察できるが、この電気泳動結果はその変性が分子的に分布をもたらす形で生じていることを示している。分子量 40 kDa、10 kDa および 8 kDa に相当する位置のバンドを切り取り、2-2-3 項で示した方法で精製を行ったものを再電気泳動したのが各々レーン 2、3、4 である。ビールの泳動結果で得られたのと同じ位置にブロードな状態のま

まバンドが検出され、この結果は、SDS-PAGE ゲル上に観察されるゾーン状のバンドが、その分子量分布を保持したまま分画されていることを示しており、以降、この SDS-PAGE で検出された 3 つの蛋白質を、40 kDa 蛋白質、10 kDa 蛋白質、8 kDa 蛋白質と称する事とする。

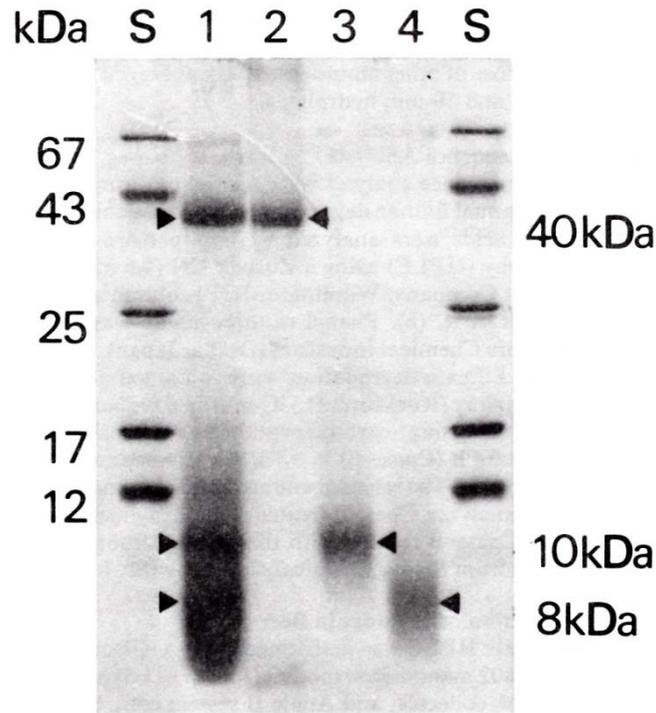


Fig. 2-1. Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of the proteins in beer before and after electrophoretic purification. Beer before purification (lane 1), purified 40 kDa protein (lane 2), 10 kDa protein (lane 3), and 8 kDa protein (lane 4). S: the standard protein mixture. bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), chymotrypsinogen (25 kDa), myoglobin (17 kDa), cytochrome C (12 kDa) Arrows indicate the protein of 40, 10, and 8 kDa proteins.

2-3-2. 40 kDa 蛋白質のアミノ酸組成とアミノ酸配列

ビールより SDS-PAGE で分画・精製した 40 kDa 蛋白質のアミノ酸組成を Table 2-1 に示した。これまでにカラムクロマトによりビールおよび大麦から精製された Beer Antigen I と Barley Protein Z のアミノ酸組成が Hejgaard と Kaersgaard [61] によって報告され

ており、その値も同表に示した。ビール 40 kDa 蛋白質のアミノ酸組成から得られたデータと SDS-PAGE 上の分子量推定から全アミノ酸残基を 370 から 380 と推定し、またアミノ酸分析において最も安定したピーク面積処理のできるアラニンを基準として用い、Hejgaard と Kaersgaard らの報告にある Beer Antigen I のアラニン残基 38 に当てはめて 1 分子当たりのアミノ酸残基数を算出した。Table 2-1 に示したように、40 kDa 蛋白質のアミノ酸組成は Beer Antigen 1 と Barley Protein Z のそれと良く類似していた。

Table 2-1 Amino Acid Composition (residue per molecule)
of the 40 kDa Proteins in beer

Amino acid	The 40 kDa Protein		
	Beer (in this study)	Beer Antigen I [61] ^a	Barley Protein Z [61] ^a
Aspartic acid and asparagine	34	33.1	32.8
Threonine	21	18.7	19.9
Serine	40	35.8	35.9
Glutamic acid and glutamine	47	45.6	44.4
Proline	16	14.5	13.8
Glycine	34	27.6	27.0
Alanine ^b	38	38.0	38.6
Valine	24	30.4	30.1
Methionine	3	4.4	4.2
Isoleucine	15	16.2	16.5
Leucine	41	41.4	42.0
Tyrosine	6	6.8	6.7
Phenylalanine	18	21.9	21.8
Histidine	20	17.3	20.5
Lysine	11	8.6	9.0
Arginine	11	9.7	10.1
Cysteine	n.d.	n.d.	2.0
Tryptophane	n.d.	n.d.	n.d.
Total	377	370.0	375.3

^a From the amino acid analyses of beer Antigen 1 and Barley Protein Z. [61]

^b In order to compare the composition of the 40 kDa proteins (Beer Antigen I^a) in beer, Alanine was assumed to be 38 residues.

^c n.d., Not detected.

本方法で精製したビール 40 kDa 蛋白質についてマニュアルでのエドマン分解による N 末端配列解析、およびカルボキシペプチダーゼによる C 末端配列解析を実施した結果 Table 2-2 に示した。N 末端残基は全く検出されずブロックされていると考えられ、また C 末端残基はアラニンのみが検出された。これらのアミノ酸情報は Hejgaard らによる報告 [156] とほぼ一致した。SDS-PAGE からのバンドを切り取るというワンステップの精製方法で固有の蛋白質の情報と一致したことから、少なくとも分子量 40 kDa 近辺の蛋白質は大麦の Protein Z に由来するものに限定されることが示された。

Table 2-2 Carboxypeptidase Digestion of Proteins in Beer 40kDa protein

Protein	Carboxy-peptidase	Time (hr)	Amino Acids ^a
			Ala
Beer 40 kDa	A	16	0.65
	A+B	16	0.59

^a Values are given as a molar ratio of amino acid per protein.

2-3-3. 10 kDa および 8kDa 蛋白質のアミノ酸組成とアミノ酸配列

Fig. 2-1 に示した分子量 10 kDa および 8 kDa の蛋白質について、アミノ酸組成およびアミノ酸配列分析を行った。アミノ酸組成分析結果を Table 2-3 に示した。なお、アミノ酸組成（モル比）の算出において、双方ともアラニンを 6 残基と仮定した場合に、各々の分子量に最も近い総アミノ酸残基数、すなわち 10 kDa 蛋白質は 91 アミノ酸残基、8 kDa 蛋白質は 79 アミノ酸残基と算出できた。また、参考としてこれまでの研究から、分子量 10 kDa 付近で主要な蛋白質として報告されている大麦およびビール由来の Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) のアミノ酸組成を同表に併記した。双方の比較においてアミノ酸組成は、特にアスパラギン酸/アスパラギン、グルタミン酸/グルタミン、アラニン、ヒスチジン、リジンにおいて相互に大きく異なっていた。

Table 2-3 Amino Acid Composition (residue per molecule)
of the 10 kDa and 8 kDa Proteins in beer

Amino acid	10 kDa Protein			Beer 8 kDa Protein (in this study)
	Beer 10 kDa Protein (in this study)	Barley LTP1 as the Probable Amylase/Protease Inhibitor (PAPI) [42]	Beer LTP1 (in mol %) [157]	
Aspartic acid and asparagine	12	15.0	16.1	9
Threonine	4	3.0	3.4	3
Serine	9	8.2	8.3	6
Glutamic acid and glutamine	9	6.1	8.7	11
Proline	6	6.3	8.8	5
Glycine	10	9.1	11.0	9
Alanine ^a	6 ^a	4.3	4.7	6 ^a
Valine	7	5.9	6.6	5
Methionine	1	1.1	1.0	1
Isoleucine	6	6.1	5.8	4
Leucine	6	6.3	6.8	6
Tyrosine	2	2.6	1.3	2
Phenylalanine	1	0.0	n.d.	1
Histidine	5	1.9	1.5	4
Lysine	2	3.5	3.5	2
Arginine	5	3.9	3.5	5
Cysteine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tryptophane	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	91	91	91	79

^a In order to consider their total molecular weight, Alanine was assumed to be 6 residues.

^b n.d., Not detected.

本方法で精製したビール 10 kDa および 8 kDa 蛋白質についてマニュアルでのエドマン分解による N 末端配列解析を Table 2-4 に、カルボキシペプチダーゼによる C 末端配列解析を実施した結果を Table 2-5 に、以上の結果から類推されるアミノ酸配列を Fig. 2-3. に示した。

Table 2-4 Sequence Analysis of Proteins in Beer

Cycle	Beer 10 kDa protein (1nmol)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PTH-amino acids								
Asp	17	23**	13
Asn	tr ^b	51** ^c	10
Ser
Pro	...	tr	23**	13
Gly	43	88**	43*	65*	40	...
Ala	56 ^d	24
Val	36	89**	65	...
Ile	19	38*	22	...	tr	18**
Leu	120**	9	tr	13**	tr
Tyr	tr	12*
Cycle	Beer 8 kDa protein (1nmol)							
	1	2	3	4	5	6		
PTH-amino acids								
Asp		
Asn	tr	63**	17		
Ser	...	tr	30*	17	25**	11		
Pro	...	tr	32*		
Gly	57	87**	59**	46		
Ala	75*	48		
Val	33	88**		
Ile	201**	62		
Leu	98*	30		
Tyr	...	17	40**	20		

^a Picomole amount of phenylthiohydantoin (PTH) -amino acid.

^b Trace amount (less than 10 pmol) of PTH -amino acid.

^c **: Major residue

^d **: Minor residue

Table 2-5 Carboxypeptidase Digestion of Proteins in Beer and Barley

Protein	Carboxy-peptidase	Time (hr)	Amino Acid ^a			
			Ala	Ile	Tyr	Arg
Beer 10 kDa	A	2	0	0.73	0.45	0
		16	0	0.89	0.75	0
	A+B	16	0	0.89	0.75	1.00
Beer 8 kDa	A	2		0.41	0.25	0
		16		0.88	0.70	0
	A+B	16		0.83	0.75	0.89

^a Values are given as a molar ratio of amino acid per protein.

Beer 10 kDa protein: Leu-Asn-Pro-Gly-Asp-Val-Leu-Ile-----Arg-Tyr-Ile
 (Ala) (Ile)(Gly)(Gly) (Tyr) (Ile)(Tyr)

Beer 8 kDa protein: Leu-Asn-Tyr-Gly-Ser-Val-----Arg-Tyr-Ile
 (Ala) (Pro) (Gly) (Ile)(Tyr)
 (Leu) (Ser)

Fig. 2-3. Partial amino acid sequences of proteins in beer and barley. N-termini were detected by manual Edman degradation and C-termini with carboxypeptidase digestion. The observed minor peaks of phenylthiohydantoin amino acids are in parentheses.

アミノ末端 (N 末端) には 10 kDa、8 kDa 蛋白質ともに、類似のアミノ酸配列 (Leu-Asn-) ならびにカッコ内に示したマイナーなアミノ酸残基が複数検出された。また同様にカルボキシ末端 (C 末端) にも共通する -Arg-Tyr-Ile の配列が認められたが、同時に Ile, Tyr の残基も検出された。

また、これらの結果は、報告されている LTP1 (かつては PAPI と称されていた) のアミノ酸配列 [41] [42]、すなわちアミノ末端 (Leu-Asn-Cys-Gly-Gln-Val-Asp-Ser---) およびカルボキシ末端 (---Arg-Ile-Tyr) 配列と部分的に一致しているが、複数のアミノ酸残基も同時に検出されている。

SDS-PAGE において明らかに異なる分子量分布を有するにも関わらずアミノ末端およびカルボキシ末端に類似の配列が認められたこと、およびアミノ末端、カルボキシ末端ともにマイナーな残基が複数検出された結果を総合的に考察すると、幾つかの可能性が類推できる。ひとつは今回検出された 10 kDa 蛋白質、8 kDa 蛋白質は、製麦および/または仕込工程にて作用する蛋白分解酵素による分解を受けた結果生じた LTP1 の断片であること。もしくは LTP1 の特にアミノ末端部分が不規則に酵素消化を受けたために分子量に分布を持つヘテロな分子の集団として存在していること (10 kDa 蛋白質、8 kDa 蛋白質ともに Fig. 2-1 に示したように SDS-PAGE においてブロードなバンドを示している)。また、特に麦汁煮沸工程で進行しているであろう糖との共存化で、メイラード反応等を伴う熱変性が分子表面で不規則に進行し、これがアミノ末端、カルボキシ末端の不揃いな配列を引き起こしている可能性が考えられる。また、当然、LTP1 以外の複数の蛋白質の混在も考えられる。

2-4. 小括

泡持ちにプラスに関与すると報告されているビール中の高分子蛋白質の性質を調べるために、SDS ポリアクリルアミド電気泳動でビール中の蛋白質を分離し、泳動後のゲルから 70%ギ酸で蛋白質を抽出し、ゲル濾過クロマトで蛋白質から色素および低分子物質を除くことで精製を行い、マニュアルエドマン分解法およびカルボキシペプチダーゼによる酵素消化法を用いてアミノ末端およびカルボキシ末端の配列分析を行った。SDS-PAGE では分子量 40 kDa 近辺に独立したバンドを、10 kDa、8 kDa 近辺に双方が連続するようなブロードなバンドを検出した。40 kDa 蛋白質については、アミノ酸組成、アミノ末端、カルボキシ末端の分析結果から、既に報告されている大麦 Protein Z に由来する蛋白質の情報とほぼ一致し、この分子量近傍で単独の蛋白質として存在している可能性を示唆した。一方、15 kDa あたりから低分子に掛けて連続したブロードなバンドが存在し、10 kDa、8 kDa あたりに比較的濃いバンドが検出された。これらの蛋白質のアミノ酸組成は、これに

近い分子量を有してビール中への移行が報告されている大麦 LTP1 蛋白質とは異なるアミノ酸組成を有していた。アミノ末端、カルボキシ末端配列分析からは LTP1 と一部重複するも、その他の複数のアミノ酸配列が検出され、麦芽由来の蛋白分解酵素が製麦・仕込中に LTP1 を部分的に酵素反応することで、断片化もしくはアミノ末端、カルボキシ末端が不揃いに酵素消化されたこと、さらにおもに麦汁煮沸中に当該蛋白質にメイラード反応が進行し、分子量的にも分布を持つ形で反応生成物が生じた結果とも考えられる。このような蛋白質のいずれがビールの泡持ちに関与していくかを明らかにする必要がある。

第3章. 醸造工程中の蛋白質の挙動

3-1. 緒論

前章ではビール中の蛋白質の基本的な性質の解析を試み、分子量 40 kDa 近辺に大麦 Protein Z 由来と類推される分子的に単一の蛋白質を、また分子量 15 kDa より低分子域には分子量 10 kDa の蛋白質をはじめ、電気泳動 (SDS-PAGE) 的にブロードで、不均一なアミノ末端、カルボキシ末端を有する蛋白質群を検出した。次章以降では泡持ちに関与する蛋白質を特定していくが、そのためには原料のビール大麦に含まれる蛋白質が、製麦に始まって、仕込・発酵工程を経て最終ビールに至る醸造工程においてどのように移行していくかを把握する事が必要となる。

3-2. 実験材料および実験方法

3-2-1. 実験材料

蛋白質分析用のビールはサッポロビール静岡工場製の黒ラベルを用いた。ビール大麦はニューゴールデン種を用いた。麦芽はカナダ産ハリントン種を用いた。糖化開始時マイシェ上澄、糖化終了時マイシェ上澄、煮沸釜満量時麦汁、煮沸終了時麦汁、冷麦汁は静岡工場の仕込工程よりサンプリングした。

3-2-2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli [151]の方法で行った。

3-2-3. アミノ酸組成分析

蛋白質のアミノ酸組成分析は Tsugita らの方法 [153]を用いて行った。

3-2-4. 総蛋白質

Bradford の方法 [84]を用いて、Bio-Rad 社の Protein assay キットを用いて行った、標準蛋白質として牛血清アルブミンを用いた。

3-2-5. 大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) の精製

Hejgaard [158]の方法を改変し、下記の方法で行った。大麦を簡易粉碎機で粉碎し、その 1.5 kg を 5 L の 50 mM β -メルカプトエタノール溶液で 1 時間 0°C で攪拌し、0°C で一夜整置し、12.000g で 15 分間遠心分離して上澄を得た。上澄に 40%飽和度となるように硫酸アンモニウムを加え、pH を水酸化ナトリウム溶液で 6.1 に調整し、常温で一夜整置、遠心分離により沈殿を除去した。次いで 60%飽和度となるように硫酸アンモニウムを加え、攪拌後常温で一夜整置した。沈殿を遠心分離により回収し、100 ml の 10 mM β -メルカプトエタノール溶液に再溶解し、10 mM β -メルカプトエタノールを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に対して 0°C、3 日間透析を行った。この透析内液を、10 mM β -メルカプトエタノールを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia)イオン交換クロマトカラム (25×350 mm) に供した。同緩衝液を 700 ml 流したのち、同緩衝液 1,500 ml の NaCl 濃度を 0 から 0.4 M に高めるグラジエント溶出で蛋白質を脱着し、15 ml ずつフラクションを回収した。流速は全て 5 ml/min にて行った。各フラクションは SDS-PAGE により分析し、分子量 40 kDa の蛋白質を含む画分を回収した。次いで、40 kDa 蛋白質を含む画分を集め、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 0.6 M となるように添加・溶解した。この溶液を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) , 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で平衡化した Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia) 疎水性相互作用クロマトカラム (直径 25mm×長さ 350 mm) に供した。同緩衝液を 700ml 流したのち、同緩衝液 1,500 ml の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度を 0.6 M から 0 M に低下させるグラジエント溶出で蛋白質を脱着し、15 ml ずつフラクションを回収した。流速は全て 5ml/min にて行った。各フラクションは SDS-PAGE により分析し、分子量 40

kDa の蛋白質を単一で含む画分を回収した。当該画分はイオン交換水に対して 24 時間、0°C で透析を行い、凍結乾燥を行った。

3-2-6. ゲル濾過クロマトグラフィー

Parmacia 社製 Sephacryl S-200 superfine (直径 32 mm×長さ 600 mm) を用いた。試料としてビール 10 ml を負荷した。溶離液は、50 mM NaCl+0.02% NaN₃ を用いた。流速は 0.5 ml/分、分画は 6.6 ml、検出は、3-2-4 項に示した総蛋白質、ならびに各画分から 3-2-8 項に示したロケット免疫電気泳動に供し、大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) を特異的に定量した。

3-2-7. 大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 抗体の作成

3-2-5 項に示した方法で調整した大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) を抗原として、ウサギ三羽に対して、各々一回の免疫注射あたり、標品 0.5 mg を生理食塩水に溶解、Freund's complete adjuvant (Difco) と混合、初回・14 日目・21 日目・28 日目の計 4 回に渡り注射、30 日目に全採血を行って抗血清約 100 ml を得た。作成は (株) 日本生物材料センターに委託した。

3-2-8. 免疫二重拡散法 (Ouchterlony 法)

Ouchterlony の方法 [159] を用いて行った。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にアガロース (Pharmacia 社、Agarose A) 1% (W/W) を加えて沸騰水浴中で溶かし、ガラス板とシリコンゴム枠を用いて厚さ 1 mm のゲルを作成した。直径 5 mm の穴を 5 mm 間隔で 3 か所あけ、大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 抗血清、大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 標品溶液 (1 mg/ml)、大麦抽出液 (粉碎大麦 10 g に 50 mM β-メルカプトエタノール 50 ml を加え、4°C で 1 時間抽出) を加え、一夜静置、拡散反応させ、沈降線の生成を確認して、写真撮影を行った。

3-2-9. ロケット免疫電気泳動

Laurell の方法 [160]により行った。0.03 M バルビタール緩衝液 (pH 8.6) 18 ml にアガロース (Pharmacia 社、Agarose A) 0.18 g を加えて沸騰水浴中で溶かした後、55°C に保った。大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 抗血清 100 μ l を加え、攪拌後、直ちにガラス板とシリコンゴム枠を用いて、14 cm \times 10 cm \times 1 mm のゲルを作成した。ゲルの片側に直径 3 mm の穴を 25 個作り、これに試料 9 μ l を注入した。ゲルの両端を、ろ紙を介して 0.03 M バルビタール緩衝液 (pH 8.6) に接触させ、冷却板を用いてゲルの温度を 4°C に保ちながら、試料側を陰極として 24 mA 定電流で電気泳動を行った。泳動後はゲルを温風で乾燥し、0.1%クマシーブリリアントブルー (25%メタノール、7%酢酸溶液) で染色し、沈降線を確認した。また、定量を行う場合には大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) の標準液 (4~50 mg/l) の複数段階の標準液を同時に泳動し、沈降線の高さから検量線 (最小二乗法による二次曲線) を作成して定量値を算出した。

3-3 結果および考察

3-3-1. 醸造工程中の蛋白質の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) による分析

原料大麦から製品ビールに至るまでの蛋白質の挙動を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により解析した結果を Fig. 3-1 に示した。供試した試料は、大麦抽出液 (粉碎大麦 10 g に 50 mM β -メルカプトエタノール 50ml を加え、4°C で 1 時間抽出)、麦芽抽出液 (粉碎麦芽 10 g にイオン交換水 50 ml を加え、4°C で 1 時間抽出)、糖化開始時マイシェ上澄、糖化終了時マイシェ上澄、煮沸釜満量時麦汁、煮沸終了時麦汁、冷麦汁、ビールである。

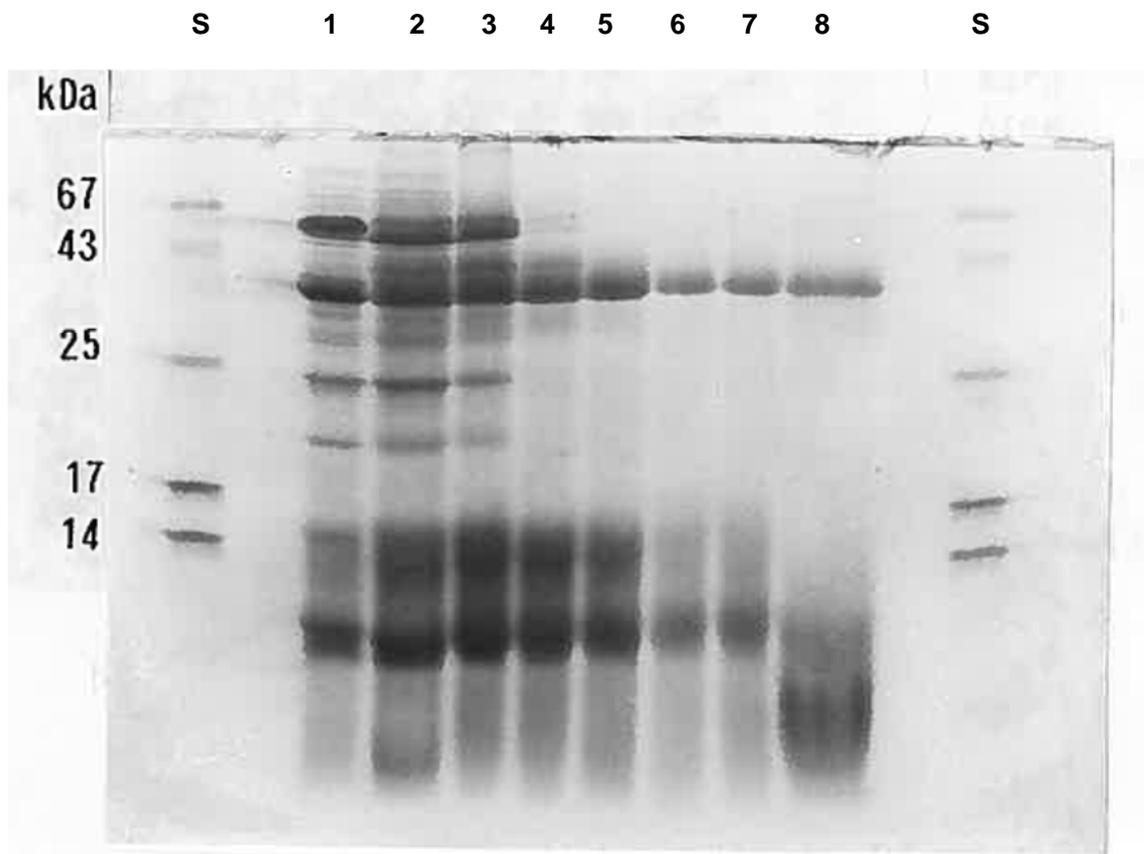


Fig. 3-1 Electrophoretic characterization of proteins during malting and brewing processes.

Lane 1: Extract from barley. Lane 2: Extract from malt. Lane 3: Supernatant of the mash just after mashing-in. Lane 4: Supernatant of the mash just after mashing-out. Lane 5: Wort before wort-boiling process. Lane 6: Wort after wort-boiling process. Lane 7: Cooled wort Lane 8: Final beer

S: The standard protein mixture. bovine serum albumin (67 kDa) , ovalbumin (43 kDa), chymotrypsinogen (25 kDa), myoglobin (17 kDa), cytochrome C (12 kDa).

大麦抽出液 (Lane 1) には幅広い分子量のバンドが多数検出された。一般的に、大麦から発芽や焙燥工程を経て麦芽に至る間は、澱粉、 β グルカン等の多糖類、高分子蛋白質の分解と遊離アミノ態窒素の増加が進行するとされるが、今回検出されたバンドのパターンは、大麦 (Lane 1) と麦芽 (Lane 2) で大きくは変わっていなかった。また、そのパターンは糖化開始時のマイシェ上澄 (Lane 3) まで維持されていた。糖化終了時マイシェ上澄 (Lane 4) では 20 kDa 以上の高分子領域において複数のバンドが消失している様子が観察されたが、40 kDa 付近の蛋白質は安定的に仕込工程を経て後工程に移行していた。

また 14 kDa 以下の低分子のブロードなバンドも移行していた。煮沸満量時 (Lane 5) から煮沸終了時 (Lane 6) に掛けては、全体のバンドが薄くなり、100°C、90 分の麦汁煮沸工程において熱凝固で蛋白質が除去されていることが推察された。冷麦汁 (Lane 7) から最終ビール (Lane 8) に至る過程では、酵母による発酵と、0°C 以下の低温での貯蔵中に、酵母由来蛋白質分解酵素の作用や、低温による蛋白質凝固が促進するとされ、また一般的にはろ過工程においては製品化後の保存中の混濁を引き起こす蛋白質を除去するためにシリカゲル等の濾過助剤を使用するが、そのような過酷な条件を経て 40 kDa 蛋白質が選択的に移行している様子が観察され、また低分子領域の蛋白質の以降も認められ、さらにブロードなゾーンがより低分子側に移行している様子が観察された。

以上をまとめると、大麦中に存在していた複数の蛋白質は、麦汁煮沸による熱変性 (凝固)、発酵工程中の酵母由来蛋白質分解酵素の作用、貯酒中における低温での凝固、ろ過工程における濾過助剤との接触といった蛋白質にとって過酷な条件を経て、特定の蛋白質が最終ビールへ移行する、特に電気泳動的に分子量 40 kDa および 14 kDa 以下の比較的 low molecular weight の蛋白質が選択的に移行していることが明らかとなった。

3-3-2. 大麦 40 kDa 蛋白質の精製結果

前述の方法（3-2-5項）に示した方法により、粉碎大麦 1.5 kg から大麦 40 kDa 蛋白質凍結乾燥標品約 150 g を得た。Fig. 3-2 に得られた蛋白質標品の SDS ポリアクリルアミド電気泳動結果を示した（Lane 2）。比較対照として、大麦抽出液およびビールの濃縮液を各々 Lane 1 と Lane 3 に供した。

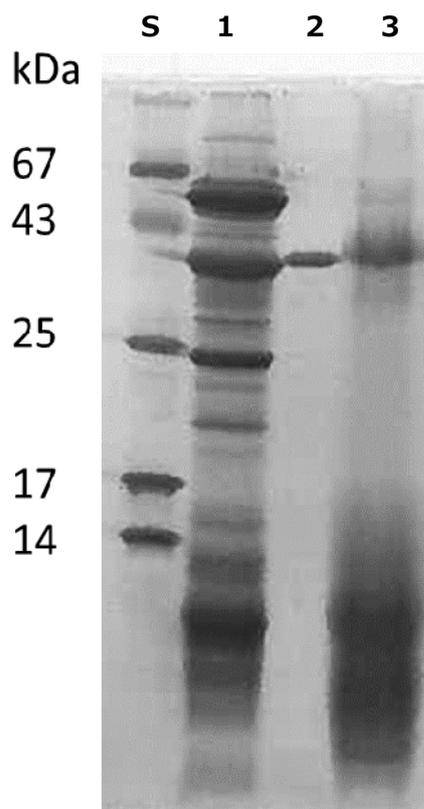


Fig. 3-2 SDS polyacrylamide gel electrophoresis of purified barley 40 kDa protein
Lane 1: Extract from barley. Lane 2: Purified barley 40 kDa protein. Lane 3: Beer
S: The standard protein mixture. bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa),
chymotrypsinogen (25 kDa), myoglobin (17 kDa), cytochrome C (12 kDa).

レーン2に示したように、得られた蛋白質標品は単一のバンドを示し、分子量標準蛋白質の移動度から分子量も 40,000 と推定できた。同時に泳動した大麦抽出液（Lane1）には高分子から低分子に掛けて多数のバンドが検出されたが、精製された大麦 40 kDa 蛋白質とほぼ同じ移動度に色の濃いバンドが検出された。また、同時に泳動した濃縮ビール

(Lane 3) には前章の Fig. 2.1 で検出されたのと同様にビールに特徴的なバンドの中に分子量 40 kDa の位置にバンドが検出された。大麦 40 kDa 蛋白質とビール 40 kDa 蛋白質のバンドは、前者が単一でシャープなバンド形状を示したのに対して、後者はブロードなバンド形状を示し、醸造工程中で変性が進行し分子量 40 kDa の一次構造を保持しながらも分子量的に若干の不均一性を伴っていることを示唆している。

精製した大麦 40 kDa 蛋白質のアミノ酸組成分析結果を Table 3-1 に示した。得られたアミノ酸組成は Hejgaard によって報告されたもの [158] とほぼ完全に一致し、目的の通り大麦 Protein Z が精製されたと判断した。

Table 3-1 Amino Acid Composition (residue per molecule)
of the purified 40 kDa Proteins in Barley

Amino acid	Purified Barley 40 kDa Protein	Reported Barley Protein Z [158] by J. Hejgaard
Aspartic acid and asparagine	33.1	32
Threonine	18.6	19
Serine	33.5	34
Glutamic acid and glutamine	44.0	44
Proline	15.2	14
Glycine	28.4	27
Alanine	39.8	38
Valine	32.2	31
Methionine	3.4	4
Isoleucine	16.4	18
Leucine	43.4	44
Tyrosine	4.7	9
Phenylalanine	22.1	24
Histidine	9.4	9
Lysine	21.3	20
Arginine	10.6	10
Cysteine	n.d.	2
Tryptophane	n.d.	4
Total	376.1	383

3-3-3. 抗大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 血清の性質

前述した 3-2-7 項の方法により作成した抗大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 血清の性質を調べるために Ouchterlony 法により免疫反応性を調べた。結果を Fig. 3-3 に示した。

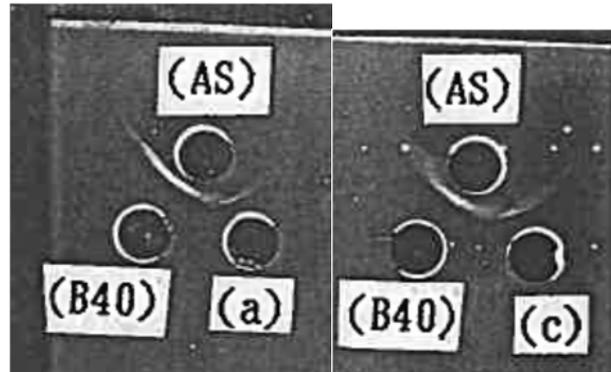


Fig. 3-3 The results of Ouchterlony test

AS: Anti-serum against the barley 40 kDa protein (Protein Z)

B40: Purified barley 40 kDa protein (Protein Z).

a: Extract from barley.

c: Beer

抗大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 血清と 3-3-2 項に記述した電気泳動的性質を有する精製大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) との間には明瞭な沈降線が確認され、同抗血清に含まれる抗体と、抗原として用いた大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) が免疫的に特異的に反応する事を確認した。また、その沈降線は大麦抽出液 (左図) およびビール (右図) と同抗体との間にも検出され、その沈降線が各々融合していることから、本血清が大麦抽出液やビールのような蛋白質の混合物中の大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) の検出や定量 (ロケット免疫電気泳動等による) に用いることが出来ることを確認した。

ビール中の蛋白質と抗大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 血清との反応をさらに詳しく調べるために、ビール蛋白質をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、各画分の総蛋白質とともに、ロケット免疫電気泳動により、本抗血清と反応する蛋白質の量を調べた。

Fig. 3-4, Fig. 3-5 に示したように、ロケット免疫電気泳動において形成された沈降線の高さ (40 kDa 蛋白質 (Protein Z) の濃度を反映している) は蛋白質溶出曲線の 40 kDa 蛋

白質に相当するピーク形と一致しており、また他の画分に対する反応が認められないことから、本抗血清はビール中の 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) に特異的に反応する抗体から成ることを確認した。また、総蛋白質のピーク形状について、ボイドボリューム (画分番号 21~28) には分子量 100 kDa 以上の蛋白質がわずかに検出され、画分番号 38 をピークにした 40 kDa 蛋白質、その後、画分番号 44~70 に掛けてブロードなピークが溶出するパターンは、Fig. 3-2 に示した電気泳動パターンと良く一致していた。なお、画分番号 83 以降に溶出しているピークはゲル濾過担体との相互作用で遅れて溶出してきた低分子蛋白質と考えられるが、成分の同定などは行っていない。

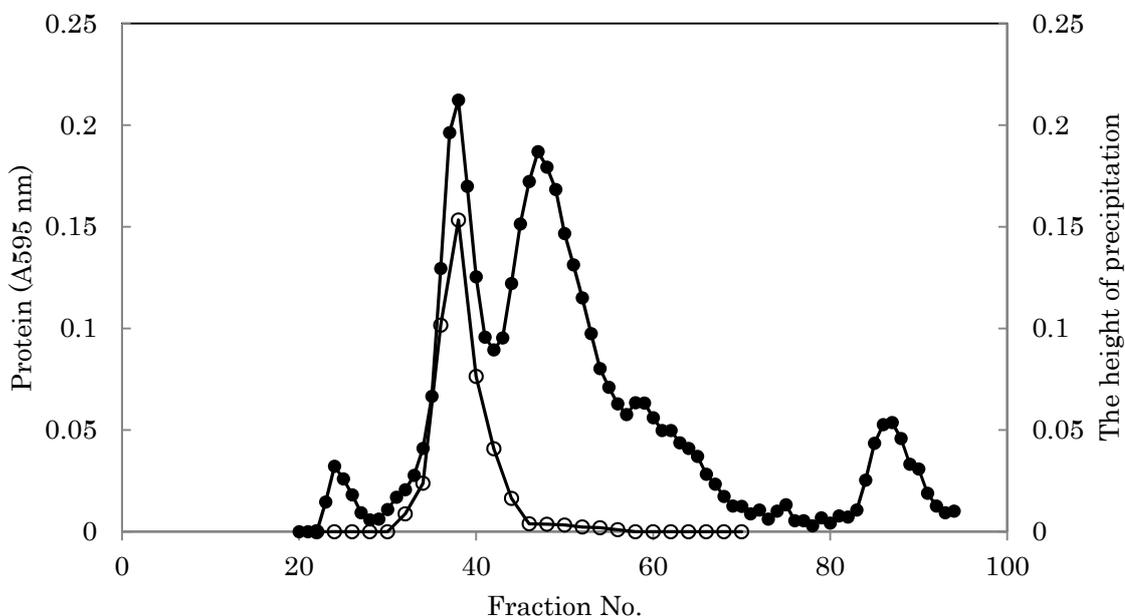


Fig. 3-4 Gel filtration chromatography on Sephacryl S-200 of beer proteins.

●: Concentration of high molecular protein measured by Bradford method.

○: Concentration of 40 kDa beer protein derived from barley Protein Z represented as the height of precipitation on rocket immunoelectrophoresis by using anti-Protein Z serum.

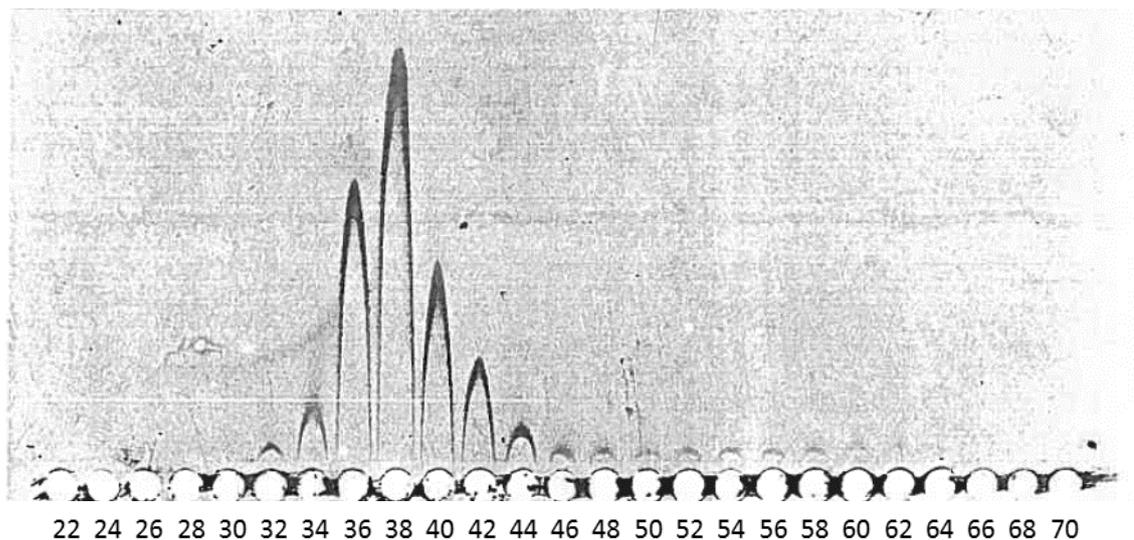


Fig. 3-5 Rocket immunoelectrophoresis by using anti-Protein Z serum in the fraction of gel filtration chromatography of beer proteins.

3-4. 小括

泡持ちに関与する蛋白質を特定していくためには、原料のビール大麦に含まれる蛋白質が、製麦・仕込・発酵工程を経て最終ビールに至る醸造工程においてどのように移行していくかを把握する事が必要となる。SDS・ポリアクリルアミド電気泳動を用いて調べたところ、大麦抽出液中には幅広い分子量分布に渡って多数のバンドが検出されたが、仕込・発酵工程を経るにしたがって特定の蛋白質がビールに移行していく様子が観察された。とりわけ、40 kDa 付近の蛋白質は安定的に仕込工程を経て後工程に移行していた。また 14 kDa 以下の低分子のブロードなバンドもビールへ移行していた。ビール醸造工程には麦汁煮沸のように 100°C 以上で 90 分前後の麦汁煮沸工程における熱変性、熟成工程では 0°C 以下の低温における蛋白質凝固、またろ過工程ではシリカゲルのような濾過助剤による吸着など、蛋白質を系外に除去するように作用する条件が複数存在するが、これらの工程を経て特定の蛋白質がビールへ移行していると考えられる。また、その中でも分子量 40 kDa の蛋白質は、そのアミノ酸組成や、免疫反応により大麦 Protein Z に由来することが

確認された。今後はこれらの蛋白質について泡持ちへの関与を確認していくことがビールの泡持ちに関する研究において必須要件となる。

第4章. ビールの泡持ちと表面粘度の関係

4-1. 緒論

前章では原料の大麦から、製麦・仕込・発酵・貯酒・濾過などの醸造工程を経て、どのような蛋白質がビール中に移行してくるかを調べた。これまでビールの泡持ちに関する研究において、関与物質を化学的に捉える研究が数多くなされているが、物理的な視点で検討されたものは少ない。泡持ちに関与すると考えられる代表的な物理的特性は、泡の液膜のガス透過性、液膜の電気二乗層の厚さ、表面弾性、液膜からの水分の蒸発、表面張力、バルク粘度、表面粘度等である。泡持ちに関係する物理的特性を把握し、それに関与する物質を特定していくことが泡持ちの解明や泡持ち向上の対策に繋がると考えられる。本章においては、上述した物理的特性のうち、ビールの表面粘度に着目し、泡持ちとの関係を調べた。

4-2. 実験材料および実験方法

4-2-1. 実験材料

ビールはサッポロビール黒ラベル、および国内他社のピルスナータイプの大塚製品（市販品）を用いた。

4-2-2 泡持ち

シグマ法による泡持ち測定は ASBC 公定法に従った [15]。

4-2-3 界面活性剤

ドデシル硫酸ナトリウムは Sigma 社製、ラウリルアルコールは和光純薬社製を用いた。

4-2-4 表面粘度の測定

協和界面化学社製の表面粘度計 SVR-S を用いた。

表面粘度 (μs) はバルクの粘度 (μ) とは異なる物性であり、液体表面の粘りを示す (単位: $\mu s: g/sec$, $\mu: g/cm/sec (=poise)$)。表面粘度は液体表面に接線方向のせん断速度を与えた際の抵抗力として得られる。表面粘度の測定には減衰振動法、回転法、細隙流動法の三つがあるが、本実験では予備的な検討の結果、ビールの μs の測定に適した方法として回転法を採用し、Fig. 4-1 に示した原理により下記の方法で行った。

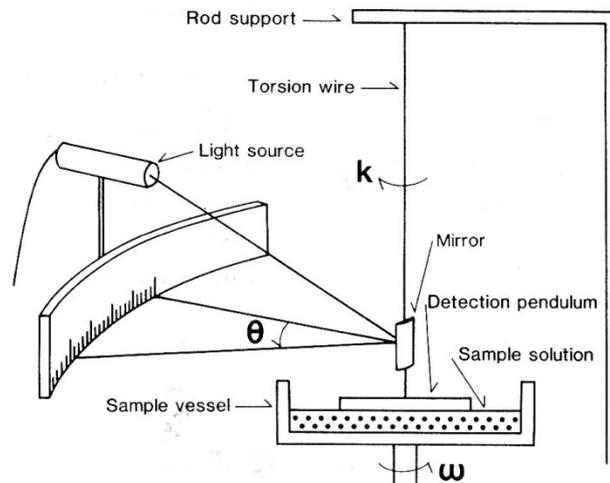


Fig. 4-1 Schematic diagram of the rotational viscometer.

ガス抜きしたビール 200 ml を泡のない状態で、表面粘度計の試料皿 (半径: $r_1=7.5$ cm) に静かに注ぎ入れ (時間 $t=0min$)、次いでねじり定数 $k=173.8$ ($g \cdot cm^2/sec^2$) のピアノ線で吊り下げられた円盤状のテフロンコーティングを施した検出体 ($r_2=2.5$ cm) を試料皿内のビール表面に接触させた ($t=5min$)。静置後、試料皿を一定角速度 ω (rad/sec) で等速回転させた ($t=5min$)。検出体とビール表面との間の粘りに基づく抵抗 (表面粘度) のために検出体は試料皿の回転方向と同じ方向に振れ、ピアノ線のトルクと釣り合った角度 θ (rad) で停止する。この振れ角を反射光で読み取った。 θ より次式を用いて μs が、また非ニュートン流体の場合は見かけの表面降伏値 ($f_s: dyne/cm$) が算出できる。

$$\mu s = k (\theta - \theta_w - \theta_0) (1/r_1^2 - 1/r_2^2) / 4\pi \omega \quad (1)$$

$$f s = k \theta_0 (1/r_1^2 - 1/r_2^2) / 4\pi \ln (r_2/r_1) \quad (2)$$

θ_w : 清浄な水を試料とした場合の振れ角

θ_0 : 非ニュートン流体を示す $\omega - \theta$ 曲線の直線部分を $\omega=0$ に補外した時の値

しかし、後述のようにビールの表面は経時的にニュートン性から非ニュートン性へと変化する複雑な挙動を示すため、ここでは (1) 式については、 θ_w と θ_0 を含む見かけの表面粘度 ($\mu s a$) として次のように表した。

$$\mu s a = k \theta_0 (1/r_1^2 - 1/r_2^2) / 4\pi \omega \quad (3)$$

(3) 式において ω で回転した時の θ 以外は定数となるため、 $\mu s a$ は θ で表すことが出来る。

$$\mu s a = m \theta \quad (\text{但し、} m \text{ は定数}) \quad (4)$$

よって、以下では表面粘度を見かけの表面粘度 ($\mu s a$) で表し、その値を振れ角 θ で代表して表すこととした。

用いた表面粘度計 (SVR-S、協和界面化学) の外観を Fig. 4-2 に示した。

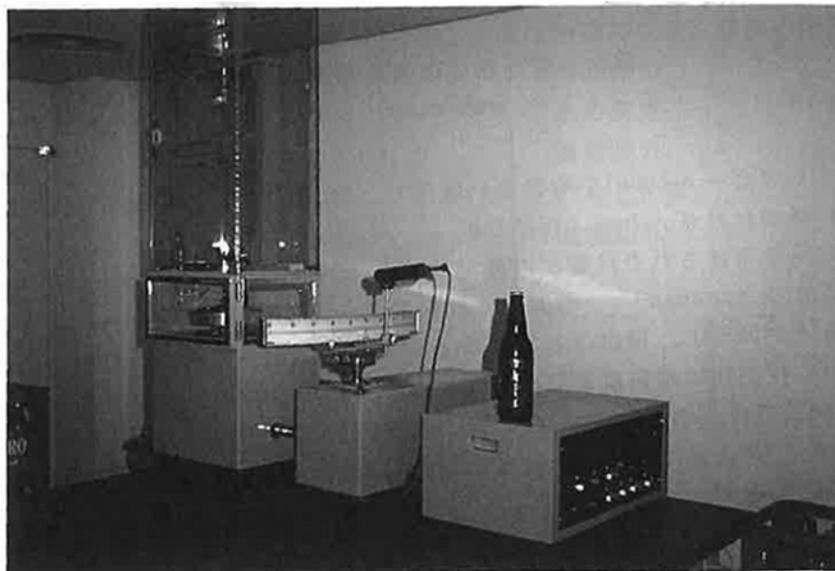


Fig. 4-2 SVR-S Rotational surface viscometer (Kyowa Interface Science Co., Tokyo).

装置はアンプ、駆動部、検出部から構成される。測定は 20°C の恒温室で、振動、循環空気の影響を排除して行った。また、経時的に測定する場合は、表面の乱れを避けるために、検出体とビール表面を連続的に接触した状態にして、各時間における反射光を読み取った。

4-3 結果および考察

4-3-1. ビール表面粘度の経時的变化

予めシグマ法 [15]によって泡持ちを測定した 8 種類の国産ピルスナータイプ (Σ 110~127、 Σ 値が大きいほど泡持ちが良い) のビールのみかけの表面粘度 (μ s a) を表す振れ角 θ を経時的に測定した結果を Fig. 4-3 に示した。データは示さないが、水やドデシル硫酸ナトリウム+ラウリル硫酸ナトリウム溶液は経時的な表面粘度の経時的变化は全く生じなかったのに対して、ビールの表面粘度は時間と共に増加し、その増加の度合いはビールによって異なることが判明した。すなわち、泡持ちの良い (Σ 値が大きい) ビールほど経時的な表面粘度の増加が大きい事が明らかとなった。また、低分子界面活性剤の溶液等の

表面と比較して、ビールの場合には平衡状態に達するまで長時間を要する事も明らかとなった。

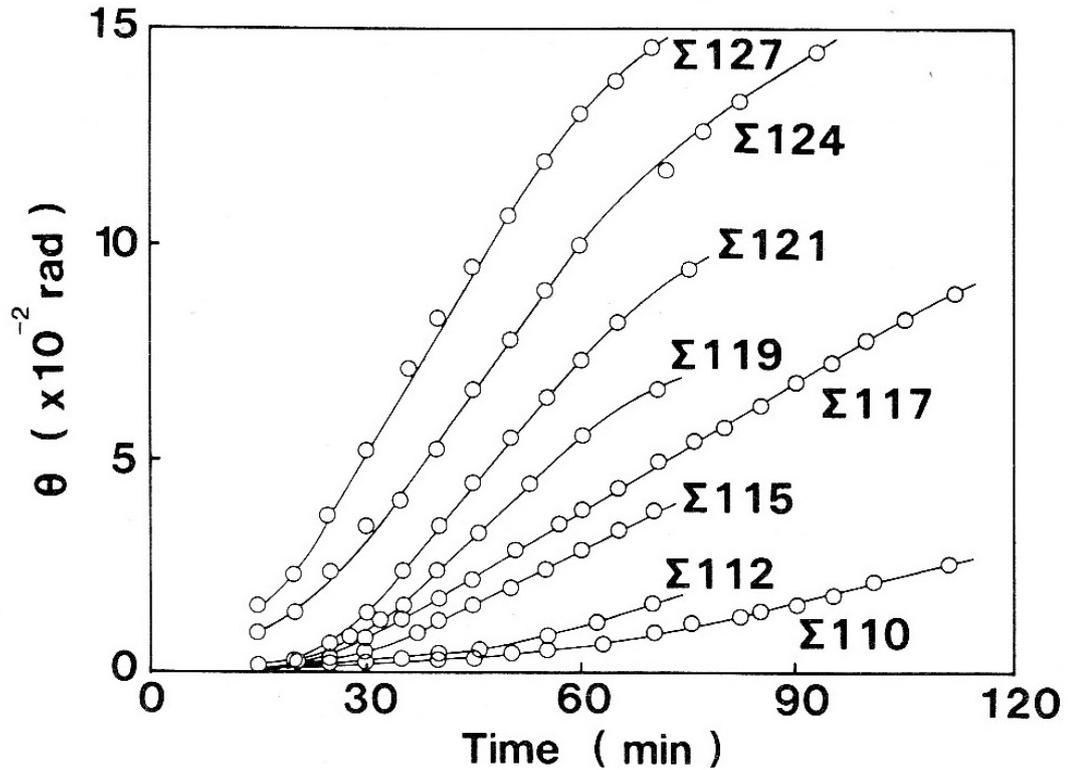


Fig. 4-3 Changes in apparent surface viscosity of beer with time.
Angular velocity (ω)=0.10 rad/sec.

4-3-2. ビール表面粘度増加速度と泡持ちΣ値との関係

ビール表面粘度増加速度と泡持ちΣ値との関係を明らかにするために、表面粘度がほぼ直線的に増加する測定開始後 30 分から 50 分の間の表面粘度増加速度を V_θ と定義し、両者の関係 ($n=50$) をプロットした (Fig. 4-4)。両者の間には強い相関関係が認められ、表面粘度がビールの泡持ちを表す物性のひとつであることが明らかとなったとともに、泡持ちの良否の判定の指標となることも明らかとなった。

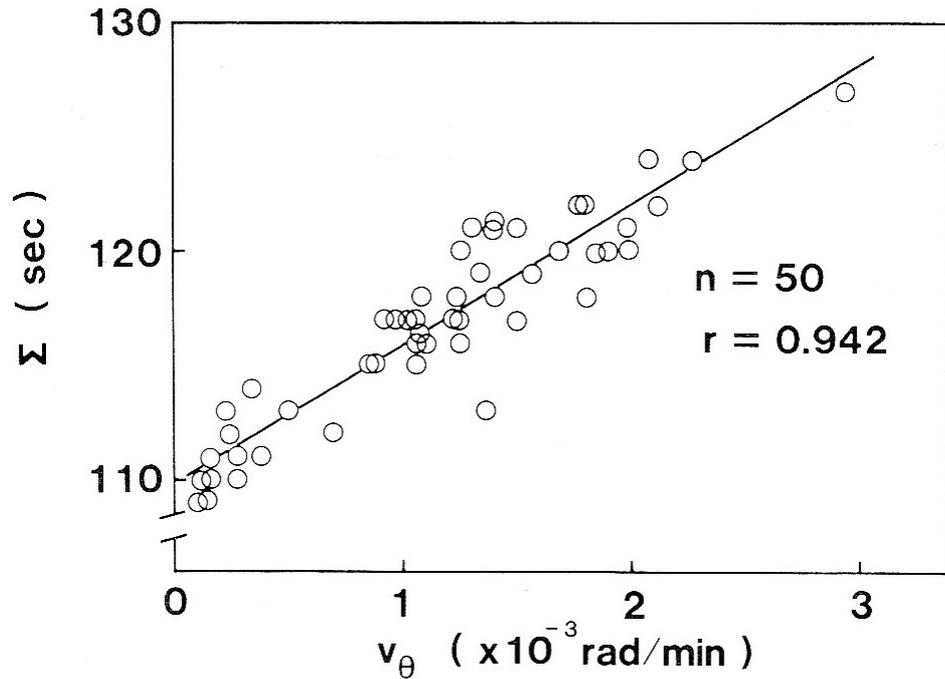


Fig. 4-4 Relationship between velocity of increase in apparent surface viscosity and Σ -value. Angular velocity (ω)=0.10 rad/sec.

4-3-3. ビールの表面特性

ビール表面の変化を流動曲線 (ω - θ 曲線) により更に検討した。Fig. 4-5 に泡持ちの異なる2種類のビール ($\Sigma 123$, $\Sigma 110$) の流動曲線を、表面形成後の時間 t をパラメータとして示した。流動曲線の傾きや曲線の形状 (f_s 値の出現の有無) により μ_s の値のほか、表面がニュートン性か非ニュートン性か、すなわち流体の粘性および(擬)塑性の強さが判断できる。

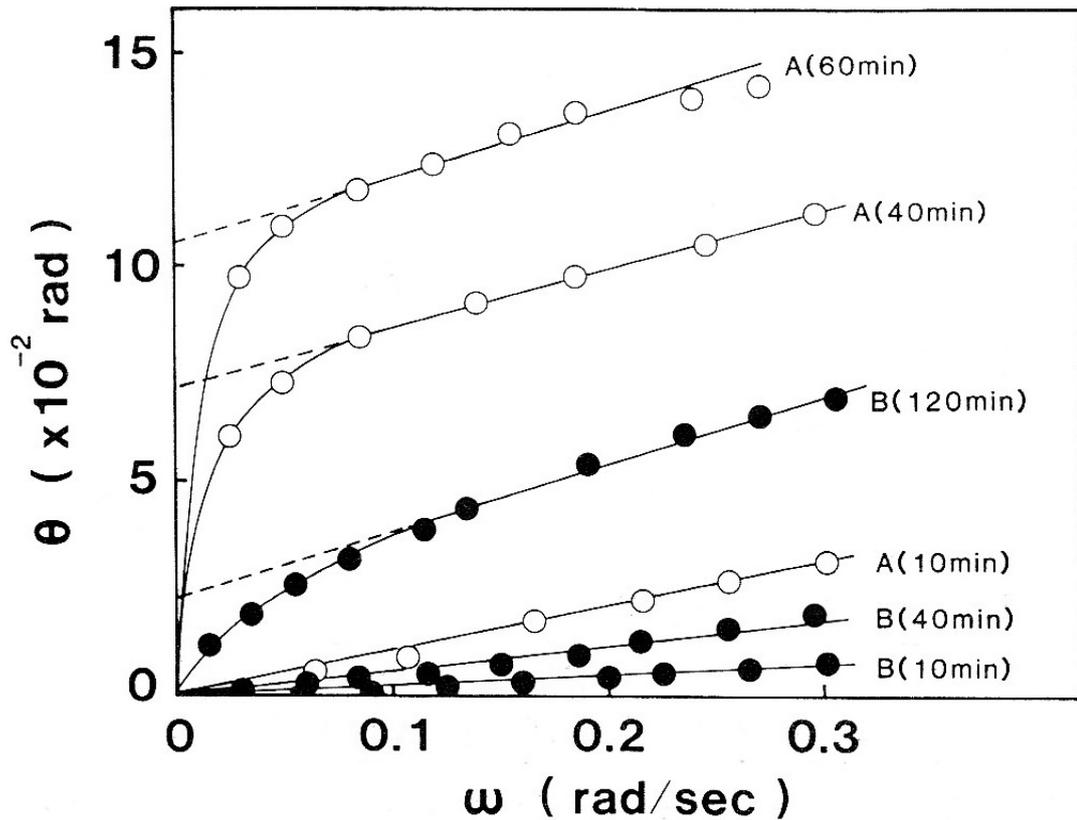


Fig. 4-5 Force-flow curves of beers having different foam stabilities.

Beer A: ○, $\Sigma=123$

Beer B: ●, $\Sigma=110$

泡持ちの良い $\Sigma 123$ のビール (A) の表面は、 $t=10 \text{ min}$ において、与えたせん断速度と生じた応力とが比例関係で表されるニュートン性を示した。この関係では θ/ω が一定であり、(3) 式から $\mu s a$ が ω (あるいは θ) にかかわらず一定であることが示される。しかし、 $t=40, 60$ では比例関係から外れた流動曲線となった。すなわち、与えたせん断速度によって $\mu s a$ が変化する非ニュートン性を示し、直線部分を $\omega=0$ に補外した $\theta 0$ から

(2) 式を用いて算出される $f s$ 値が Table 4-1 に示したように次第に増加した。一方、泡持ちの劣る $\Sigma 110$ のビール (B) の表面は、 $t=10, 40$ でニュートン性を示し、長時間を経過して ($t=120$) ようやく非ニュートン性を示した。

Table 4-1 Surface Viscometric Properties of Beers

Beer	Time (min)	Surface Viscosity	Surface Yield Value
		Ms (g/sec)	f s (dyn/cm)
A (Σ 123)	10	0.12	0
	40	0.28	0.13
	60	0.30	0.19
B (Σ 110)	10	0.05	0
	40	0.11	0
	120	0.31	0.04

このように $\mu s a$ が経時的に変化する事は、ビールの表面がニュートン性から非ニュートン性へ変化する事を示しており、降伏値の出現により表面の構造が強い粘性（あるいは擬塑性）を次第に帯びてくる、つまり経時的にビール表面が固体に近い性質を帯びてくる事が明らかとなった。また、泡持ちの異なるビールの比較から、この経時的に強い粘性を帯びる性質の程度が泡持ちの良否と対応することも示された。

4-4. 小括

泡持ちに関与すると考えられる代表的な物理的特性の中から、表面粘度に着目した解析を行った。表面粘度計を用いた検討の結果、ビールの見かけの表面粘度 ($\mu s a$) は表面を形成してから経時的に増加することが判明し、泡持ちの良いビールほどその増加速度は大であった。またこの $\mu s a$ 増加速度と泡持ち (Σ) との間には強い相関関係が認められ、表面粘度が泡持ちを表す物性のひとつであることが明らかとなった。さらに $\mu s a$ の経時的増加は、ビールの表面がニュートン性から非ニュートン性へ変化する事を示しており、この程度が大きいほど、すなわち表面粘度を経時的に増加させる性質を強く持つビールほど泡持ちが良いことが示された。

第5章. ビールの泡持ちに寄与する蛋白質の性質

5-1. 緒論

前章では表面粘度計を用いた検討の結果、表面粘度が泡持ちを表す物性のひとつであることが明らかとなり、表面粘度を経時的に増加させる性質を強く持つビールほど泡持ちが良いことが示された。泡持ちの良いビールを醸造する、あるいは泡持ちを改善するためには、明らかとなった表面粘度を増加させる要因となる物質を特定することが重要と考えられる。そこで、本章では従来から泡持ちに深く関わりとされる大麦由来の高分子蛋白質と表面粘度との関係に着目して検討を行う事とした。ビール中に含まれる高分子蛋白質の性質については第2章で、また醸造工程中の高分子蛋白質の挙動については第3章で述べた。本章では蛋白質の物性に影響を与えないように、酵素精製に多用されるようなカラムクロマト等の方法を組み合わせて分画を行い、ビールの表面粘度の上昇を司る蛋白質が存在するかどうかに関心を当てて検討を行った。

5-2. 実験材料および実験方法

5-2-1. 実験材料

ビールはサッポロビール黒ラベル（市販品）を用いた。

5-2-2. 分画方法

ガス抜きしたビール 6 L を硫酸アンモニウムで塩析処理を行った。飽和度 40% から 60% の間に析出する区分を 20 mM 硫酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) に溶解したのち、同緩衝液に対して 0°C、一夜透析を行った。不溶物は遠心分離により除去した。この透析内液を同緩衝液で平衡化処理を行った陽イオン交換クロマト担体 S-Sepharose Fast Flow（ファルマシア社製、直径 3.2×長さ 16.0 cm）を充てんしたカラムに供した。同緩衝液で洗浄したのち、1.0 M NaCl 溶液で吸着された蛋白質を溶出させた。得られた溶出液を 20 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.8) に対して透析し、この透析内液を同緩衝液で平衡化処理を行っ

た陰イオン交換クロマト担体 Q-Sepharose Fast Flow (ファルマシア社製、直径 2.6×長さ 25 cm) を充てんしたカラムに供した。同緩衝液で洗浄したのち、1.0 ml/分の流速で 0 ~ 0.6 M NaCl 溶液 (1,200 ml) でグラジエント溶出を行い、4 ml ずつ分画した。なお、上記のカラムクロマトは全て 0°C にて行った。得られた画分は 280 nm の紫外外部吸収を測定し、また一部を加水分解しアミノ酸濃度を測定した。その溶出ピークから蛋白質が溶出されていると判断される画分 (後述する F1、F2、F3、F4 画分) はイオン交換水に対して透析処理を行い、限外濾過膜 (アミコン社製、分子量カット 10,000) で濃縮した。

5-2-3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli [151]の方法で行った。

5-2-4. ポリアクリルアミド等電点電気泳動

Pharmalyte pH 3-10 (ファルマシア社製) を含む 5%ポリアクリルアミドゲルを用いて 12° C でファルマシア社製フラットベッド電気泳動装置を用いて行った。操作は全てファルマシア社の **Manufacturer's Instruction** に従って行った。泳動後のゲルは 15%トリクロロ酢酸に浸漬し、析出した白いバンドを写真撮影した。

5-2-5. アミノ酸分析

第2章 2-2-4項に示した方法で行った。

5-2-6. 炭水化物

フェノール硫酸法を用いて、グルコースを標準物質として定量した。

5-2-7. 疎水性相互作用クロマトグラフィーによる蛋白質の疎水性度分析

Slack と Bamforth の方法 [80]に従って、Octyl-Sepharose CL-4B (ファルマシア社製) カラムを用いて行った。

5-2-8. 免疫二重拡散法 (Ouchterlony 法)

第3章 3-2-7項に記述した方法で作成した大麦 40 kDa 蛋白質 (Protein Z) 抗血清を用いて、第3章 3-2-8項に示した Ouchterlony の方法 [159]を用いて行った。

5-2-9. 蛋白質画分の泡持ちの測定

Rudin の方法 [12]を基本とし、直径 4 cm×長さ 60 cm の Rudin チューブ (Porosity 3 のガラスフィルター装着) を用いた。200 ml の試験溶液を穏やかに Rudin チューブに注ぎ入れ、炭酸ガスで 5 秒間でチューブトップまで起泡し、10 秒後の外観を写真撮影する事で行った。

5-2-10. 表面粘度の測定

第4章 4-2-4項に示した協和界面化学社製の SVR-S を用いた方法で行った。

5-2-11. 泡持ち

シグマ法による泡持ち測定は ASBC 公定法に従った [15]。

5-3. 結果および考察

5-3-1. ビール蛋白質の分画

Q-Sepharose 陰イオン交換クロマトグラフィーの蛋白質溶出パターンを Fig. 5-1 に、また得られた画分の SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 結果を Fig. 5-2 に示した。

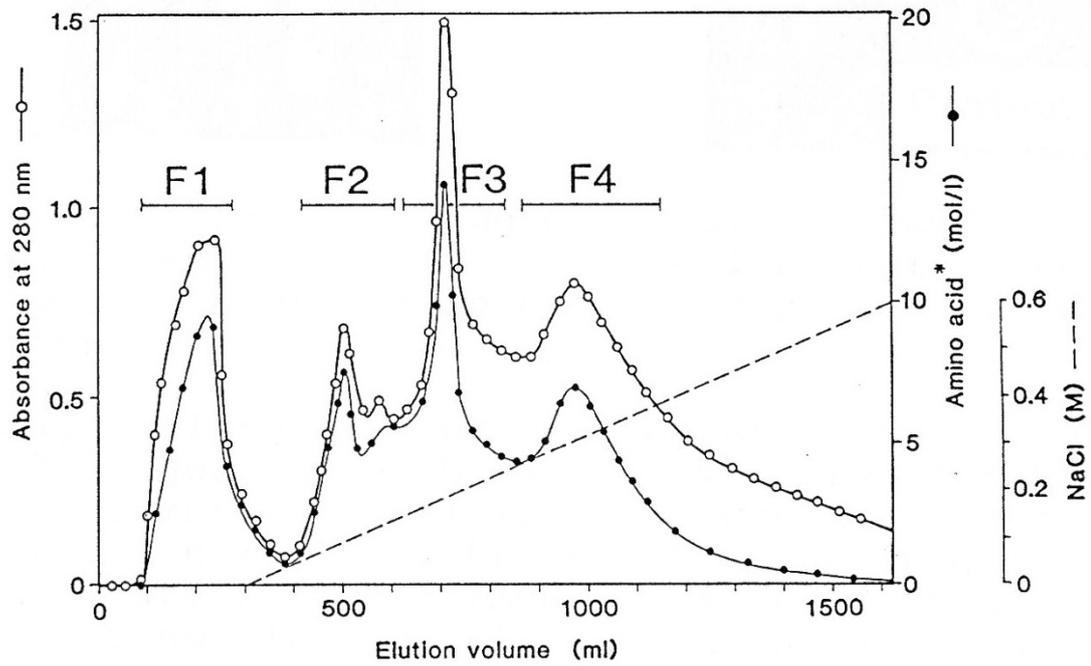


Fig. 5-1 Chromatographic profile of beer protein on Q-Sepharose anion exchange column.
*Amino acid contents after hydrolysis.

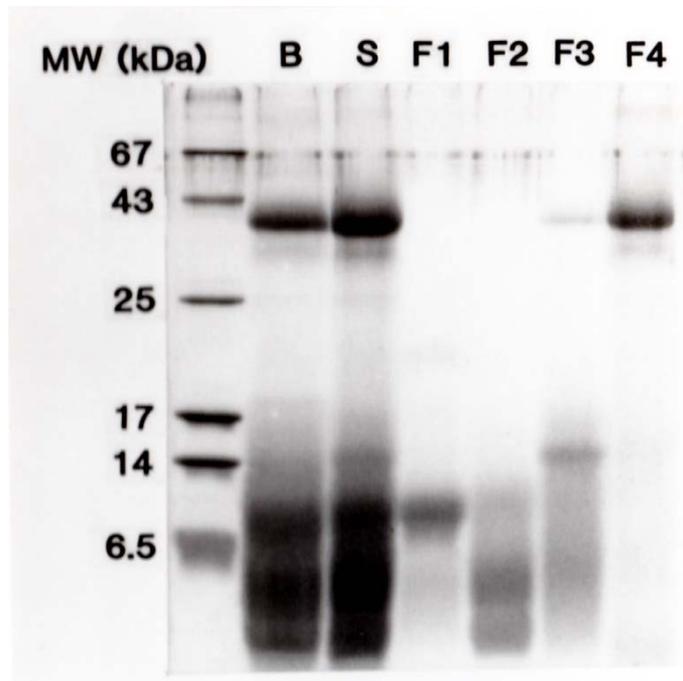


Fig. 5-2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of beer protein fractions obtained.
B: Original beer.
S: Sample prior to Q-Sepharose chromatography.

Fig. 5-2 に示した通り、分画に供した元のビール (Lane B) と S-Sepharose を用いて蛋白質の吸着、溶出処理によって濃縮された Q-Sepharose カラムクロマトに掛ける直前のサンプル (Lane S) の SDS-PAGE でのバンドパターンはほとんど差がなく、S-Sepharose を用いた前処理によって蛋白質は濃縮され、透析と塩析によって、電荷を有しない高分子の炭水化物や低分子化合物が除かれていると判断した。Q-Sepharose から溶出された蛋白質は、その溶出曲線から F1、F2、F3、F4 画分の 4 つに分画した。それぞれの画分の SDS-PAGE 分析結果 (Fig. 5-2) は F1 画分が 10 kDa 近辺に比較的明瞭なバンドを示した一方、F2、F3 画分は其々 10 kDa、15 kDa 以下の分子量ゾーンにブロードな分布を示した。また F4 画分は 40 kDa の分子量を持つ明瞭なバンドを示し、第 2 章において明らかになっている大麦 Protein Z 由来の蛋白質であると考えられた。

Fig. 5-3 に抗大麦 Protein Z 抗体を用いて行った免疫二重拡散法 (Ouchterlony 法) による各画分の免疫応答性を調べた結果を示した。抗大麦 Protein Z 抗体との間には F4 画分のみが免疫反応を示し、その沈降線は抗大麦 Protein Z 抗体と、抗原として用いた Protein Z 標品との間に形成された沈降線と完全に融合した。

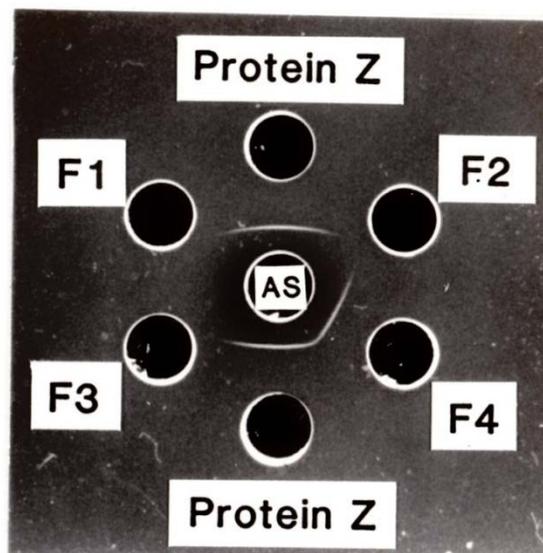


Fig. 5-3 Immunodiffusion of anti-Protein Z serum (AS) and beer protein fractions.

以上の SDS-PAGE および免疫応答性の結果から、F4 画分は主として大麦由来 Protein Z から成ることを確認した。

5-3-2. ビール蛋白質画分の表面粘度

前章で記述したようにビールの泡持ちと密接な関係を有する事が明らかとなっている表面粘度と、前項で記述したビール蛋白質画分の関係を明らかにすることを目的に、表面粘度計を用いて F1~F4 画分の表面粘度増加速度を測定した。Fig. 5-4 に示したように、各画分は異なる表面粘度増加速度を示し、0~60 mg/l の濃度範囲において、F4 画分に特異的に高い表面粘度増加速度を検出した。

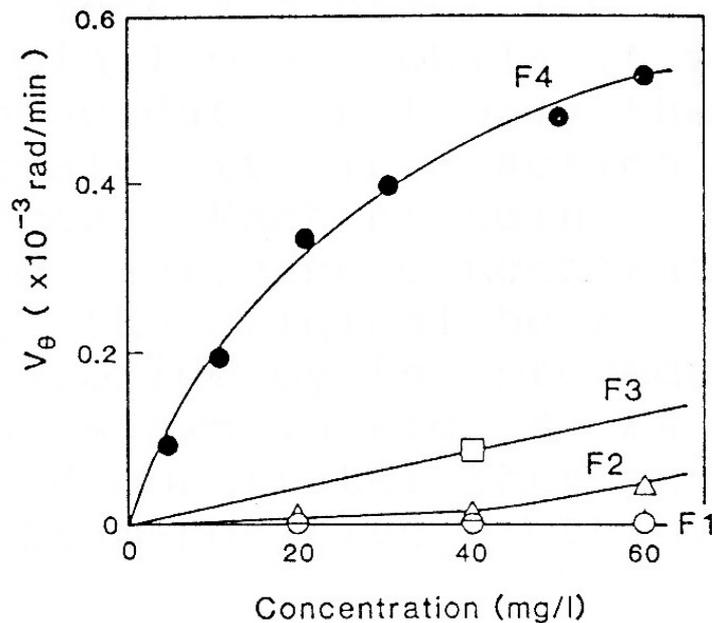


Fig. 5-4 Velocity of increase in surface viscosity of beer protein fractions.

前項で F4 画分は大麦由来 Protein Z より成ることが分かっており、この画分が特異的に高い表面粘度増加速度を示すことは、Protein Z 由来の蛋白質が泡持ちに有利な何らかの物理的性質を有している可能性がある。その性質を明らかにすると同時に、ビール中の含量や醸造工程でのより詳細な挙動などを調べることで、泡品質の向上や、そのための醸

造工程の改善、最適原料の選択等につながる可能性がある。我々は、大麦育種において、Protein Zを、泡持ちを良くするための醸造用大麦分子育種に活用しており、高 Protein Z 含有大麦（北米産 Bonanza）の交配系統を用いて Protein Z の構造遺伝子多型を調査し、得られた分子マーカー（RFLP marker）が選抜マーカーとして利用可能であることを見出している [70]。

5-3-3. ビール蛋白質画分の化学的性質

得られた画分のアミノ酸組成および炭水化物含量を測定した結果を Fig. 5-5 に示した。F1, F2, F3 画分のアミノ酸組成と比較して、F4 画分はやや異なる組成を示し、次項で述べる蛋白質の疎水性度と関係があると考えられる疎水性アミノ酸（ここでは Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe と定義した）含量の比が比較的高いことが認められた。すなわち、疎水性アミノ酸含量（mol%）の少ない順に F1 画分が 27%、F2 画分が 28%、F3 画分が 29%、F4 画分が最も高く 36%であった。また、おそらく製麦や麦汁煮沸といった高温下での蛋白質と糖類の反応（メイラード反応と考えられる）に起因すると思われる炭水化物を含んでおり、その含量はグルコース重量換算で少ない順に F2 画分が 4.1%、F1 画分が 4.5%、F4 画分が 6.7%、F3 画分が 7.9%であった。

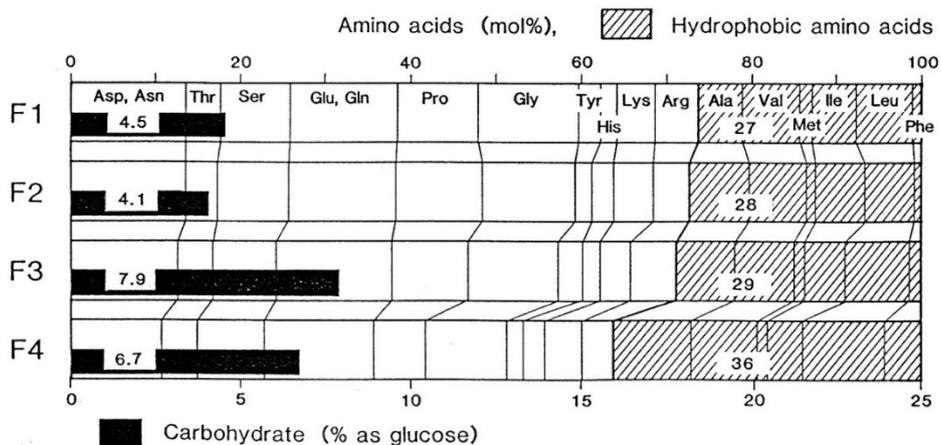


Fig. 5-5 Amino acid compositions and carbohydrate contents of beer protein fractions.

得られた4画分の等電点をポリアクリルアミド等電点電気泳動により測定した。泳動結果を Fig. 5-6 に示した。

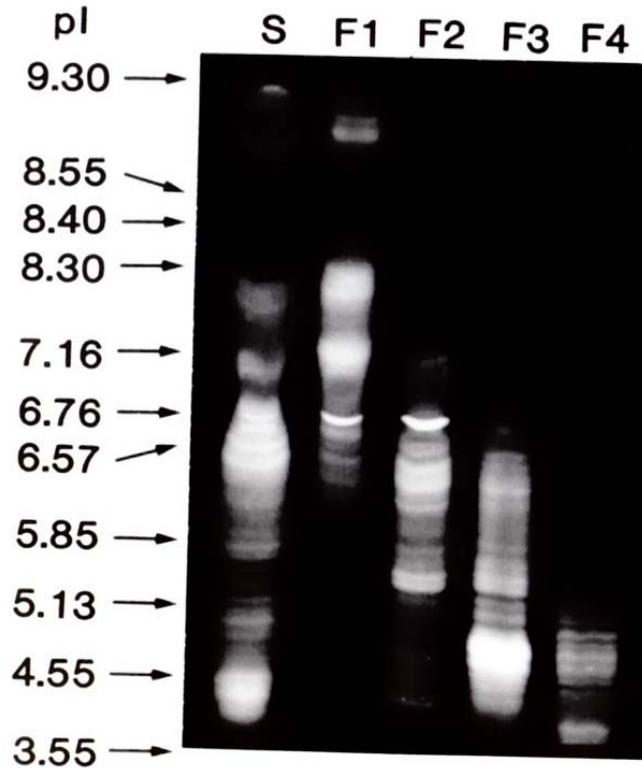


Fig. 5-6 Polyacrylamide gel isoelectric focusing of beer protein fractions.
S: Sample prior to Q-Sepharose chromatography.

分画に用いた Q-Sepharose は陰イオン交換担体であり、理論的には等電点の高い分子から低い分子の順に溶出される。Fig. 5-6 から分かるように、F1 画分は等電点が 6 以上の塩基性蛋白質、F2 画分は 5.5 から 7 の中性領域、F3 画分は 4 から 7 にかけて広い酸性領域の等電点分布を示し、F4 画分は 4 から 5 の比較的狭い酸性領域に分布していた。全ての画分に言えることは、複数の微細なバンドがそれぞれの画分を構成しており、とりわけ F4 画分は Fig. 5-2 の SDS-PAGE の結果は分子量的には単一に見えるものの、等電点的には多数のバンドを示し、電荷を有するアミノ酸残基が不規則に修飾される形で変性を受けていることが推測される。ビールの pH は 4 前後の酸性であり、この pH 近くに等電点を持つ蛋白質は酸性領域で電荷を失った結果、溶解度が低下し（極端な場合には等電点沈殿

を引き起こし) 泡沫表面に吸着されやすくなることで泡沫安定性に寄与する事が推察できる。

5-3-4. ビール蛋白質画分の疎水性度

得られた4つの画分について5-2-7項に示した Octyl-Sepharose CL-4B (ファルマシア社製) カラムを用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーによる方法で蛋白質の疎水性度分析を行った。高分子蛋白質はその分子の表面に疎水性の強いアミノ酸残基を持っており、疎水クロマトグラフィーは、この疎水性部分とゲル担体表面の疎水基に対する疎水的相互作用の差を利用した分離方法である。疎水的な結合力に影響を与える要因には、塩濃度、温度、pH、界面活性剤、エチレングリコールなどがあるが、イオン強度(塩濃度)が強いほど担体との疎水的な結合力は強くなり、塩濃度を下げると疎水性度の低い順に蛋白質が溶離してくる。本方法では25%飽和度の $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液で平衡化した Octyl-Sepharose CL-4B カラムに、25%飽和度となるように $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$ を溶解したビールを供し、素通り画分を親水性の“Hydrophilic”画分、次いで塩濃度を下げて蒸留水で溶出する画分を中程度の疎水性の“Moderately hydrophobic”画分、50%エチレングリコールで溶出する画分を強い疎水性の“Strongly hydrophobic”画分とした。

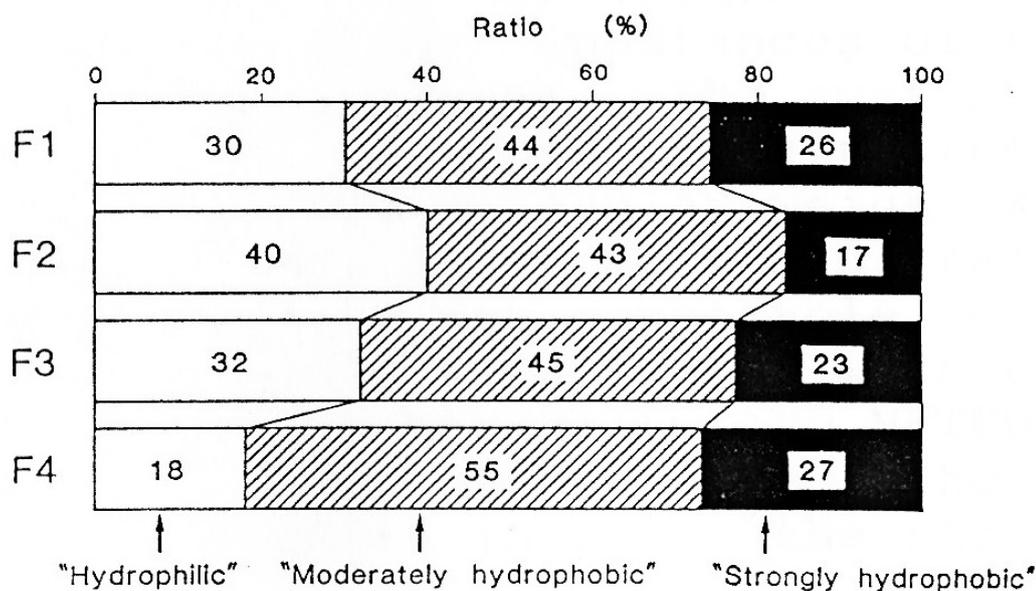


Fig. 5-7 Ratio of components with different hydrophobicity in the four beer protein fractions.

既に4章において、ビールの泡持ちには表面粘度の増加速度が関係し、また5-3-2項において記述したように、ビールに含まれる蛋白質の画分においては、F4画分において特異的に高い表面粘度の増加が認められたが、その理由にはFig. 5-7に示した各画分のアミノ酸組成においてF4画分の疎水性アミノ酸比率が高いことも要因のひとつと考えられる。本項ではF4画分が“Moderately hydrophobic”、“Strongly hydrophobic”を合わせると82%が疎水性の高い蛋白質で構成されていることが明らかとなった。この画分を構成する蛋白質、は5-3-1項にて考察したように主として大麦由来Protein Zから成ると考えられるが、実際には5-3-3項での等電点電気泳動の結果からも、同じ分子量を持ちながら電荷的に複雑に修飾されている様子が観察され、それによって疎水性の異なる分子を含んでいることが推察できる。以上述べたように、F4画分は疎水性の高い高分子蛋白質分子で構成されていることから高い表面粘度を有し、これが泡持ちにプラスに作用する要因となっていることは容易に推測できる。

5-3-5. 蛋白質画分の泡持ちへの寄与

既項で述べた物理化学的方法で推測されたビール蛋白質画分の泡持ちへの寄与を直接的に調べるために、限外濾過膜を用いて高分子蛋白質（分子量 10,000 以上）を除いた限外濾過処理ビールに添加して（蛋白質濃度は 50 および 100 mg/l の 2 水準を設定）泡持ちを測定する事で、得られた蛋白質画分の泡持ちへの寄与を測定した。泡持ちの測定は、方法 5-2-9 項に記述した改変 RUDIN 法を用い、測定チューブの外見を写真撮影する事で評価を行った。結果を Fig. 5-8 に示した。

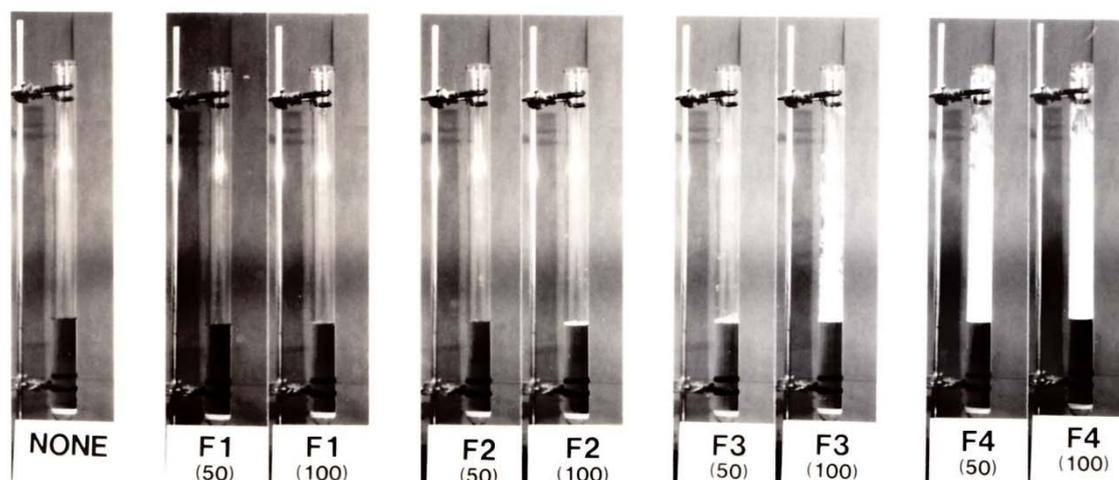


Fig. 5-8. Foam stability of beer protein fractions in ultrafiltered beer.

(): Concentration of protein in mg/l.

限外濾過処理したビールには泡持ちに関与すると報告されている低分子物質（イソ α 酸、金属イオン等）が元のビールと同じ濃度で含まれている一方で、分子量 10,000 以上の高分子蛋白質が除かれている。この限外濾過処理ビールの泡持ちは、Fig. 5-8.の左端の写真に示したように起泡した泡沫は一瞬にして消失した事から、高分子蛋白質自体が泡持ちにとって不可欠の要素であることが明らかである。F1~F4 画分を添加した試験区において、F4 画分を添加したものが最も安定した泡持ちを示し、次いで F3 画分という結果となった。この事は 5-3-2 項で述べた各画分の表面粘度測定結果と一致した。以上の結

果から、ビール中の蛋白質は低分子の金属イオンやイソ α 酸との相互作用によって泡持ちに寄与する事が知られているが、その度合いは蛋白質分子の性質によって異なっており、より疎水性が高く、表面粘度の高い分子（ここでは F4 画分）の寄与度が高いことが示された。また F4 画分の構成分子としては、SDS ポリアクリルアミド電気泳動および免疫応答性の結果から大麦胚乳中に含まれる大麦 Protein Z であると類推でき、大麦 Protein Z の泡持ちへの寄与を強く示唆する結果となった。

5-4. 小括

ビール中の高分子蛋白質を、塩析、透析、陽イオン・陰イオンクロマトグラフィーにより分画を行い、F1~F4 画分の 4 つの画分を得た。SDS-PAGE 分析結果、F1 画分が 10 kDa 近辺に比較的明瞭なバンドを示した一方、F2, F3 画分は其々 10 kDa, 15 kDa 以下の分子量ゾーンにブロードな分布を示した。また F4 画分は 40 kDa の分子量を持つ明瞭なバンドを示し、大麦 Protein Z 由来の蛋白質であると推察した。抗大麦 Protein Z 抗体を用いて行った免疫二重拡散法（Ouchterlony 法）による各画分の免疫応答性を調べた結果、抗大麦 Protein Z 抗体との間には F4 画分のみが免疫反応を示し、F4 画分が大麦 Protein Z 由来であることを確認した。表面粘度計を用いた分析の結果、F4 画分に特異的に高い表面粘度増加速度を検出した。アミノ酸組成分析の結果、F1, F2, F3 画分のアミノ酸組成と比較して、疎水性アミノ酸（Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe）含量の比が比較的高いことが認められた。ポリアクリルアミド等電点電気泳動分析の結果、F1 画分は等電点が 6 以上の塩基性蛋白質、F2 画分は 5.5 から 7 の中性領域、F3 画分は 4 から 7 にかけて広い酸性領域の等電点分布を示し、F4 画分は 4 から 5 の比較的狭い酸性領域に分布していた。全ての画分において、複数の微細なバンドが観察され、とりわけ F4 画分は SDS-PAGE の結果は分子量的には単一に見えるものの、等電点的には多数のバンドを示し、電荷を有するアミノ酸残基が不規則に修飾される形で変性を受けていることが推測された。疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いた分析の結果、F4 画分が疎水性の高い蛋白質分

子で構成されていることが明らかとなった。限外濾過により高分子蛋白質（分子量 10,000 以上）を除去した限外濾過処理ビールに各画分を添加して改変 Rudin 法により泡持ちへの影響を調査したところ、F4 画分を添加したものが最も安定した泡持ちを示した。これらの結果から、酸性に等電点を有し、より疎水性が高く、表面粘度の高い分子の集合体である F4 画分の寄与度が高いことが示された。F4 画分の構成分子としては、SDS ポリアクリルアミド電気泳動および免疫応答性の結果から大麦胚乳中に含まれる大麦 Protein Z であると類推でき、大麦 Protein Z の泡持ちへの寄与を強く示唆する結果となった。

第6章. 疎水性蛋白質の泡持ちへの寄与の検証

6-1. 緒論

これまでに、泡持ちに寄与する成分が泡沫の表面に集積して生じる表面粘度の上昇が泡持ちに深く関与していることや、大麦由来 Protein Z がその疎水性ゆえ泡持ちに大きく寄与している事が推測された。以上の論拠を直接的に検証するために、ビール中の高分子蛋白質を疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分画を行い、主として表面粘度を指標としてその性質を調べた。

6-2. 実験材料および実験方法

6-2-1. 実験材料

ビールはサッポロビール黒ラベル（市販品）を用いた。

6-2-2. 疎水性相互作用クロマトグラフィーによるビール蛋白質の分画

ガス抜きビール 200 ml に最終濃度が 1.0 M となるように溶解し、室温で一夜静置した。生じた沈殿物を遠心分離（28,000g, 10 分間）により除いたうえで、予め 1.0 M 硫酸ナトリウム溶液で平衡化処理した疎水性相互作用クロマトグラフィーカラム（TSK-Gel Butyl-Toyopearl 650M, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan. 直径 2.6 cm×長さ 10 cm）に供した。200 ml の 1.0 M 硫酸ナトリウム溶液でカラムを洗浄したのち、200 ml の 0.4 M 硫酸ナトリウム溶液、200 ml の 0.2 M 硫酸ナトリウム溶液、200 ml の蒸留水、そして 200 ml の 50%エチレングリコール溶液で蛋白質を脱着して分画を行った。なお、流速は 3.0 ml/分、分画操作は常温にて行った。

6-2-3. 高分子総蛋白質、疎水性蛋白質画分（H4）、大麦由来 Protein Z の定量分析

高分子総蛋白質の定量は、ゲル濾過担体 Sephadex G-25 Superfine を充てんしたミニカラム Fast Desalting Column HR10/10（直径 1.0 cm×長さ 10 cm）（Pharmacia,

Uppsala, Sweden) を用いて行った。溶離液として 10 mM 塩化ナトリウム溶液を用い、室温で流速 2.0 ml/分で通液した。100 μ l のビールをカラムに供し、そのボイドボリューム 1.2 ml を試験管に集め、真空乾燥後、第 2 章 2-2-4 項に示した方法で加水分解を行い、本章 6-2-4 項に示した方法でアミノ酸量を定量し、その総量から蛋白質量を算出した。

疎水性蛋白質画分 (H4 画分) の定量は、疎水性相互作用クロマトグラフィー担体 Butyl-Toyopearl 650C (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) を充てんしたミニカラム (直径 1.3 cm \times 長さ 2.2 cm) を用いて行った。ガス抜きした試料ビール 90 ml に硫酸ナトリウム 14.2 g を溶解して、同ビールで 100 ml に定容した (硫酸ナトリウム濃度は 1.0 M となる)。室温で一夜静置後、生じた沈殿物を遠心分離 (28,000g, 10 分間) により除いた。上澄みを、予め 1.0 M 硫酸ナトリウム溶液で平衡化した上記カラムに供し、30 ml の 1.0 M 硫酸ナトリウム溶液でカラムを洗浄したのち、15 ml の蒸留水で疎水性画分 (H4 画分) を溶離させた。これを 20ml に定容し、その 1.0 ml を真空乾燥後、第 2 章 2-2-4 項に示した方法で加水分解を行い、本章 6-2-4 項に示した方法でアミノ酸量を定量し、その総量から蛋白質量を算出した。

大麦由来 Protein Z の定量は、第 3 章 3-2-8 項に示したロケット免疫電気泳動法により行った。

6-2-4. アミノ酸分析

アミノ酸分析 (定量) は、Ishida ら [161] の方法に従い、高速液体クロマトグラフィーシステム Shimadzu LC-9A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) と *o*-フタルアルデヒド と次亜塩素酸ナトリウムを用いたポストカラム誘導体化法を組み合わせで行った。

6-2-5. 表面粘度の測定

第 4 章 4-2-4 項に示した協和界面化学社製の SVR-S を用いた方法で行った。

6-2-6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli [151]の方法で行った。

6-3. 結果および考察

6-3-1. 疎水性相互作用クロマトグラフィーによるビール蛋白質の分画

TSK-Gel Butyl-Toyopearl 650M を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーによるビール蛋白質の分画結果を Fig. 6-1 に示した。また、各画分に含まれる蛋白質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分析した結果を Fig. 6-2 に、各々の蛋白質画分が含む蛋白質の定量値を Table 6-1 に示した。

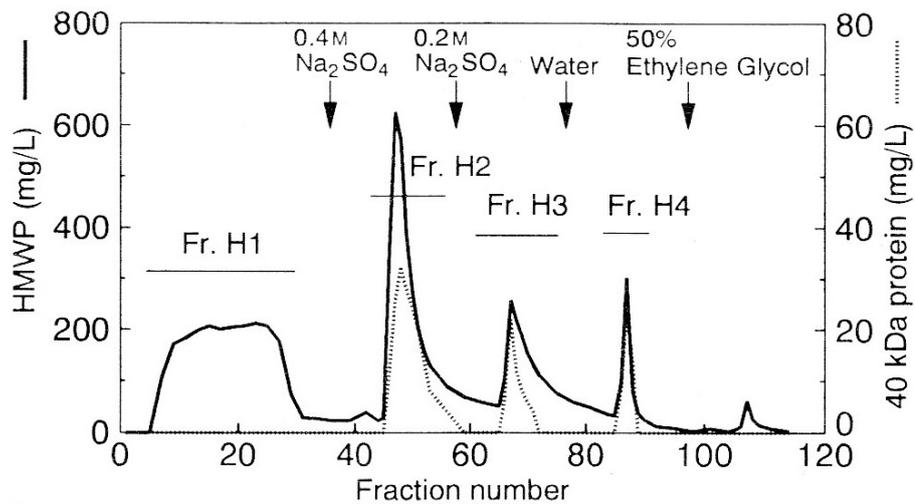


Fig. 6-1 Hydrophobic interaction chromatography on TSK-Gel Butyl-Toyopearl 650M of beer proteins.

Solid line: High-molecular-weight protein (HMWP).

Dotted line: 40 kDa protein.

Arrow indicates the change of the eluent.

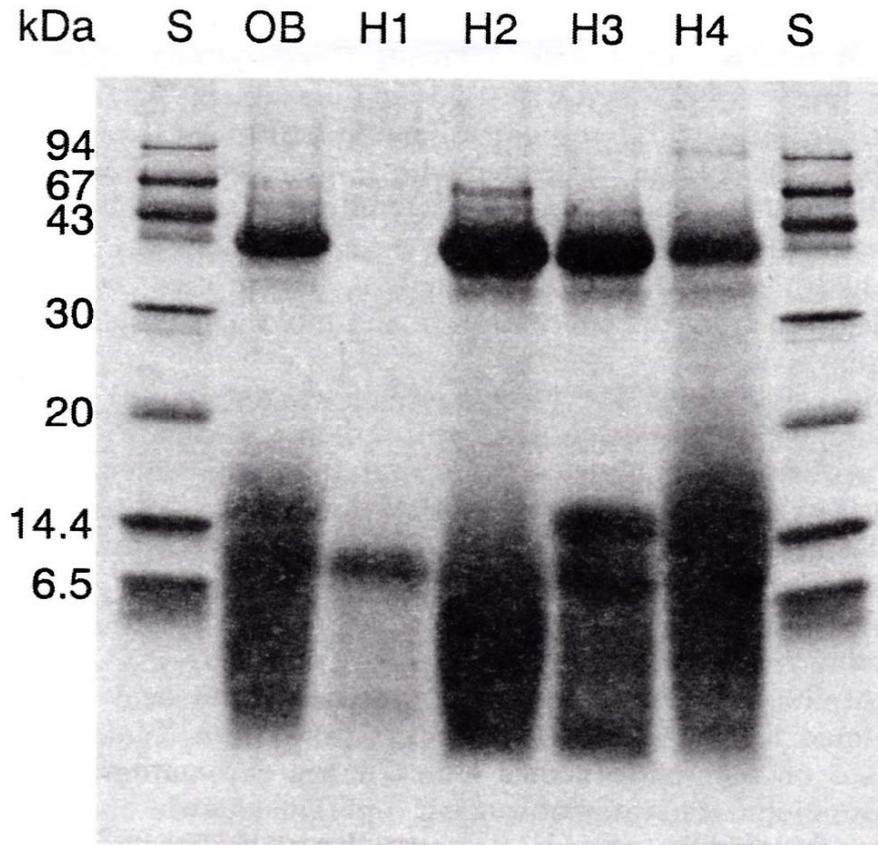


Fig. 6-2 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of isolated fractions of beer protein obtained by hydrophobic interaction chromatography.

S: Standard proteins.

OB: Original Beer.

Table 6-1 Quantity of proteins in fractions isolated from 1 L of beer

Fraction	HMWP* (mg)	40 kDa Protein (mg)
H1	218	0
H2	181	10
H3	96	3
H4	27	3
Total	522	16
Original beer**	480	20

* High-molecular-weight protein.

** Determination was carried out prior to the fractionation.

疎水性相互作用クロマトグラフィーにおいては、イオン強度が高い状態で疎水結合が高まり疎水性の高い蛋白質は担体に吸着し、親水性の蛋白質は吸着せずにカラムを通過する。イオン強度を連続的もしくは段階的に下げると吸着した蛋白質は親水性の高い順に溶出し、最も疎水性の高い蛋白質が最も遅れて脱着して溶出する。Fig. 6-1 に示したように、最も疎水性の低い（親水性）画分として H1 画分、硫酸ナトリウム溶液の塩濃度を 0.4 M, 0.2 M と下げることで疎水性の低い順に、各々 H2 画分、H3 画分が順に溶出し、蒸留水による通液で最も疎水性の高い H4 画分が最後に溶出した。最終的に 50%エチレングリコール溶液でカラムを通液したが、蛋白質はほとんど検出されず、蒸留水による通液でほとんどの蛋白質が溶出されたと考える。これまでの試験結果から泡持ちへの寄与が示唆されている大麦 Protein Z 由来の 40 kDa 蛋白質の溶出位置を確認するために、ロケット免疫電気泳動で同蛋白質の溶出パターンをモニターした。Fig. 6-1 の点線でクロマトグラムを示したように、大麦由来の同蛋白質は H2, H3, H4 画分の 3 つに分かれて溶出した。なお、データは示さないが、第 3 章 3-2-5 項で示した方法で精製し、同章 3-3-2 項に示したように、精製結果を確認した大麦 Protein Z 自体を同一条件で本クロマトグラフィーに供したところ、大麦 Protein Z は H3 画分の位置のみに溶出した。この結果から、大麦種子の胚乳中に存在した Protein Z は製麦や醸造工程中において、主として熱によるものと考えられる変性を受け（第 3 章 3-3-2 項に示したように SDS ポリアクリルアミド電気泳動において、バンドがややブロードに変化した事や、第 5 章 5-3-3 項に示したようにポリアクリルアミド等電点電気泳動においてビール中のそれは複数の等電点を示したことが醸造工程中での変性を示唆している）、一部の分子はより親水性の分子へ（H2 画分に溶出したもの）、また一部の分子はより疎水性の分子へ（H4 画分に溶出したもの）と変化したことが推測できる。

また、分子量 15 kDa 以下の蛋白質についても H3 画分に数本のバンドが認められるのみで、H2, H3, H4 画分に渡ってブロードなゾーンが検出され、結論として導き出される事は、ビール中の蛋白質は元々の大麦中に存在していた性質を変え、分子種に因らずに幅広い疎水性度を持つ蛋白質の集合体としてビール中に存在しているという事である。

6-3-2. 疎水性蛋白質画分の表面粘度

疎水性相互作用クロマトグラフィーによって得られた蛋白質画分の表面粘度を表面粘度計を用いて分析した。なお、今回はよりビールに近い環境を再現するために、限外濾過膜を用いて高分子蛋白質（分子量 10,000 以上）を除いた限外濾過処理ビールに得られた H1, H2, H3 および H4 画分を所定濃度になるように溶解して表面粘度を測定した。結果を Fig. 6-3 に示した。

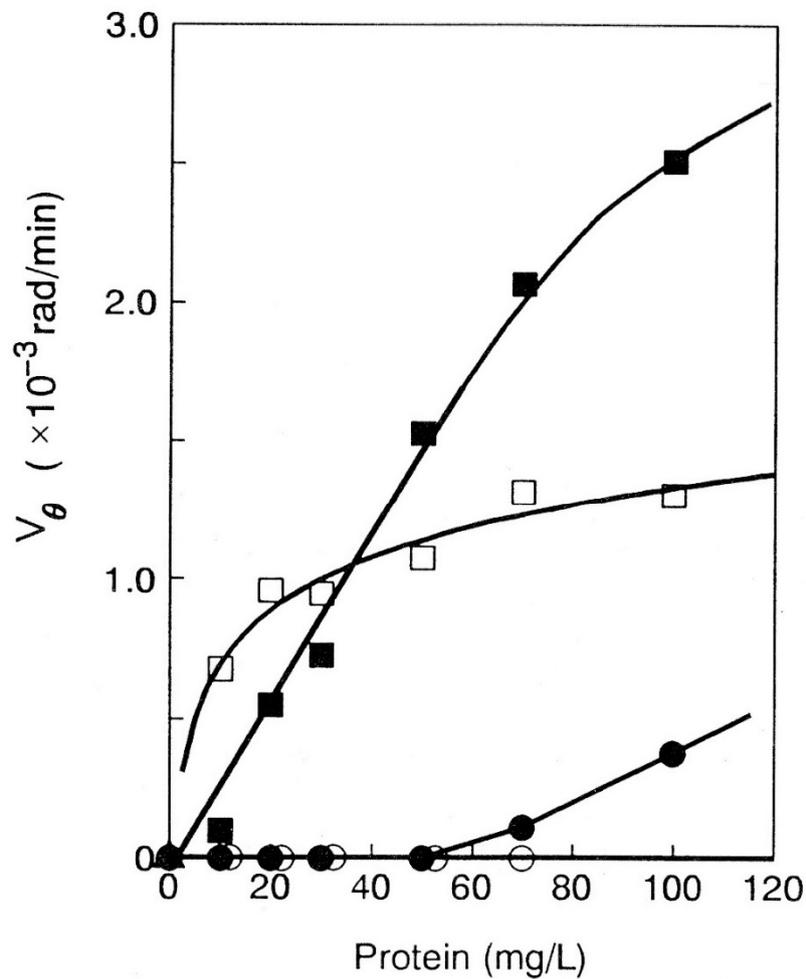


Fig. 6-3 Effect of the protein content on surface viscosity (V_θ) of fractions H1 (○), H2 (□), H3 (●), and H4 (■).

4つの画分は各々異なる濃度依存性の表面粘度を示した。最も親水性の H1 画分は調査した濃度範囲において表面粘度は検出されず、泡持ちへの寄与は低いと推察した。また

H3 画分も表面粘度が低く、濃度が高くなると（70～100 mg/L）若干の表面粘度の増加を観測した。H2 画分は一定レベルの表面粘度を示し、濃度に応じて表面粘度が増加したが、次に述べる H4 画分と比較して増加する傾向は小さかった。最も疎水性の高い H4 画分は濃度に依存して表面粘度が増加し、その増加率は他の画分と比較して圧倒的に高かった。ビールの表面粘度と泡持ちの関係については第 4 4 - 3 - 2 項で述べたように、泡持ちの良いビールほど表面粘度が高い事が示されている。本実験により疎水性クロマトグラフィーによって分画された最も疎水性の高い H4 画分に高い濃度依存性の表面粘度特性が認められたことは、この画分が泡持ちに大きく寄与している直接的な証拠と考える。また、Fig. 6-2 に示した SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果から H4 画分には複数の蛋白質のバンド（ゾーン）が検出され、その中には分子量 40,000 の Protein Z 由来の蛋白質も含まれている。つまり、分子種としては Protein Z が着目すべき泡持ち寄与蛋白質と言えるが、実際には製麦・醸造工程中において蛋白質は疎水性にばらつきをもたらす方向で変性が起こり、結果としてより疎水性の高い分子群が泡持ちに寄与することとなり、それは分子量 15,000 以下の低分子の蛋白質にも言えると考えられる。このように泡持ちに寄与する蛋白質は分子種と、その変性の度合いという複雑な要素によって決まってくると結論付けられる。

6 - 3 - 3. 疎水性画分の表面粘度に及ぼすイソ α 酸の影響

イソ α 酸が泡持ちに寄与する事が古くから知られており、そのメカニズムは高分子蛋白質と結合する事で界面活性の高い複合体を形成する事とされている [27]。既述したように我々は表面粘度と泡持ちが深く関係し、泡持ちに寄与する蛋白質がビールの液表面において表面粘度の増加をもたらすことを明らかにした。これまでの知見から、これまで提唱されてきたメカニズムに加えて、ビール蛋白質のとりわけ疎水性蛋白質がイソ α 酸の疎水基と疎水性相互作用に基づいて結合し、より界面活性の強い複合体を形成する事は容易に推測できる。これを検証するために以下の実験を行った。すなわち、パイロット醸造により無ホップビールを醸造し、これを限外濾過処理によって高分子蛋白質を除去したビールを

調製した。これに疎水性相互作用クロマトグラフィーによって得られた4つの画分（H1、H2、H3、H4画分）を溶解したビールを調製した。各々の画分の濃度は、Table 6-1 に従った定量試験によって得られたビール中の各画分の濃度の算出結果に基づいて溶解する濃度を決定した。これに市販のイソ α 酸標品を一般的なピルスナータイプのビールに典型的なイソ α 酸濃度範囲を想定し、3段階（17, 27, 37 mg/L）を設定・溶解し、表面粘度を測定した。得られた結果を Fig 6-4 に示した。

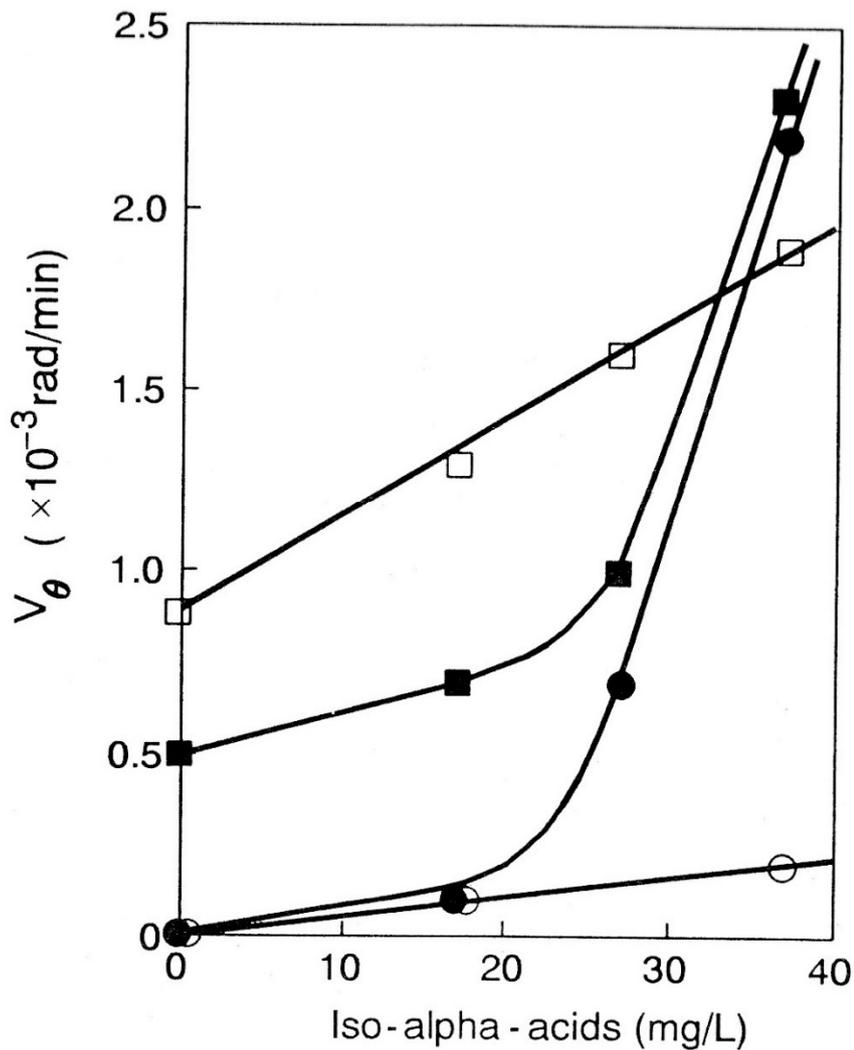


Fig. 6-4 Effect of iso- α -acids content on surface viscosity (V_θ) of protein fractions H1 (○), 220 mg/L; H2 (□), 180 mg/L; H3 (●), 100 mg/L; and H4 (■), 30 mg/L.

最も親水性の H1 画分は、220 mg/L という比較的高濃度ながらイソ α 酸との相互作用による表面粘度上昇はほとんど観測されなかったが、疎水性の高い H3、H4 画分はイソ α 酸の濃度が高まると、表面粘度が急激に増加する現象が観測された。特に H4 画分は 30 mg/L という低濃度ながら高い表面粘度の増加が観測された。この事から低濃度であっても疎水性蛋白質はホップ由来のイソ α 酸との相互作用を生じ、その結果として形成された複合体が泡表面に吸着して固体に近い液膜表面を形成し、それが泡沫を安定化させるというメカニズムが導き出される。

6-3-4. 疎水性蛋白質画分の泡への集積

ホップ苦味質は泡へ集積されることが知られており、ビールの泡の部分は液体の部分より苦く感じられることが経験的に言われている。同様に、泡に寄与する蛋白質もイソ α 酸との相互作用の結果として泡へ集積されることが言われているが、疎水性蛋白質の泡持ちへの寄与が示唆された事を受けて、疎水性蛋白質画分である H4 画分の泡への集積の度合いを検証する事とした。

泡持ちの異なる二種類のビール、すなわち泡持ちの良いビール A (Σ 値 121) と泡持ちの劣るビール B (Σ 値 113) を試料とし、泡持ち測定法 Σ 法 [15] の測定において、ビールを測定用の漏斗に注いで 230 秒間静置した後でビールを排液し、泡沫部分に含まれるビールが液化するのを待って得られたビールを泡ビール (Collapsed Foam) とし、原ビールとの比較を、総高分子蛋白質、40 kDa 蛋白質、H4 画分の三項目について行った。結果を Table 6-2 に示した。

Table 6-2 Quantitative Analysis of Proteins in Original Beer and Collapsed Foam

Beer	Σ^{**}	HMWP* (mg/L)		40 kDa Protein (mg/L)		Fraction H4 (mg/L)	
		Original Beer	Collapsed Foam	Original Beer	Collapsed Foam	Original Beer	Collapsed Foam
A	121	535 (100)***	740 (138)	42 (100)	67 (159)	26 (100)	66 (256)
B	113	537 (100)	730 (136)	25 (100)	44 (174)	21 (100)	39 (191)

* High-molecular-weight protein.

** Foam stability in Sigva value.

***Number in parentheses is concentration ratio.

2種類のビールともに、測定した3項目の蛋白質は原ビールと比較して、泡ビールに高い濃度で検出された。これまでの結果から、泡持ちに寄与する蛋白質の分子種として結論付けた大麦由来 Protein Z、および泡持ちに寄与する蛋白質画分として結論付けた H4 画分、ともに泡持ちの良いビールにおいて泡ビールに濃縮されていることが認められ、特に疎水性蛋白質画分である H4 画分は、泡持ちの良いビール A において、原ビールの約 2.5 倍に濃縮されていることが判明した。またデータは示さないがイソ α 酸も蛋白質の比率とほぼ同様に濃縮されていることが明らかとなった。これらの結果から、疎水性蛋白質はイソ α 酸と複合体を形成することで疎水性が高まり、泡表面に吸着する事で表面粘度が増加し、泡沫表面をより強固にすることで泡の安定性に寄与することが明らかとなった。また、その度合いは実際に泡持ちの良いビールほどその現象が顕著に起きることが明らかとなった。

6-4. 小括

ビール中の高分子蛋白質を疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分画を行い、主として疎水性を中心として、その性質を調べた。得られた4つの画分のうち、最も疎水性の高い H4 画分は分子量 40 kDa 付近および 15 kDa 以下の蛋白質から構成されており、前者は大麦 40 kDa 由来の蛋白質であることを免疫的に確認した。しかし、大麦 40 kDa 蛋白質由来の分子は H2, H3 画分にも検出され、この事は大麦 40 kDa 蛋白質が製麦・醸

造工程中に受けた変性により疎水性に幅を生じている事が明らかとなった。表面粘度の分析から、疎水性画分である H4 画分に高い表面粘度が認められ、またその性質は同じ分子種由来でもより疎水性の高い性質を持った分子の寄与が大きい事を明らかにした。また、ホップ苦味質であるイソ α 酸と共存下で、とりわけ H4 画分の表面粘度がイソ α 酸の濃度に依存して増加した。更に疎水性蛋白質画分が泡部分に濃縮され、泡持ちの良いビールほどその現象が顕著であることを確認した。

前章および本章における検討から、泡持ちに寄与する蛋白質は分子種としては大麦 Protein Z に由来する 40 kDa 蛋白質に着目すべきと同時に、疎水性の高さという観点でも泡持ち寄与蛋白質を捉え、原料や醸造工程をこれらの側面から評価を行い、品質の造り込みに反映させていくことが泡持ち改善に直結すると結論付けられる。

第7章. 酵母由来蛋白質分解酵素の泡持ちに与える影響と高感度活性測定法の開発

7-1. 緒論

これまで泡持ちに寄与する物質として高分子蛋白質に注目して特定分子種として大麦 Protein Z 由来蛋白質、また蛋白質の物性として疎水性に着目し、疎水性の高い蛋白質の寄与について述べてきた。一方、泡持ちにマイナスに寄与する要素として酵母由来蛋白質分解酵素の影響が報告されている [103, 107]。とりわけ酵母の液胞に存在する Proteinase A (PrA) の影響が大きいとされ詳細な研究が行われてきたが [104-106]、PrA の活性測定に関して著者らが追試を行った結果、これまで報告されている方法では再現性と繰返し精度について、十分な結果が得られなかった。そこで、これまで PrA の研究で報告されている Yokosawa らの方法 [162] を改変する事で、ビール中に含まれる妨害成分の影響を受けることなく同酵素の微弱な活性を選択的に再現性良く測定する方法を検討し、併せて同酵素の泡持ちへの影響を再確認する事を試みた。

7-2. 実験材料および実験方法

7-2-1. 実験材料

ビールはサッポロビール静岡工場製の黒ラベルを用いた。酵素精製にはビール酵母を用いた。酵素活性測定の基質として合成ペプチド Succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methylcoumaryl-7-amide (Suc-R-P-F-H-L-L-V-Y-MCA) (ペプチド研究所、Osaka, Japan) を用いた。

パン酵母由来 Proteinase A、Leucine aminopeptidase (Microsomal, from Porcine Kidney Microsomes)、7-amino-4-methylcoumarine (AMC)、pepstatin A、chymostatin、antipain は Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) 社製を用いた。

7-2-2. ビール酵母 Proteinase A の精製

同酵素の精製は、自己消化、塩析、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグ

ラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを用いて行った。泥状酵母 1.5 L を遠心分離と蒸留水懸濁を 2 回繰り返して洗浄し、2L の McIlvaine 緩衝液 (0.2 M Na_2HPO_4 溶液と 0.1 M クエン酸溶液を混合し、pH 7.0 に調整して作成) に懸濁した。懸濁液を室温に 16 時間静置して自己消化を行った。遠心分離で得られた上澄に硫酸アンモニウムを 95% 飽和度となるように溶解した。沈殿物を遠心分離で集め、300 ml の 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 mM Tris HCl (pH 7.2) に溶解し、同緩衝液で予め平衡化した疎水性相互作用クロマトグラフィーカラム Butyl Toyopearl 650C (直径 2.6 cm × 長さ 12 cm) に供した。同緩衝液 100 ml でカラムを洗浄した後、50% ethylene glycol, 30 mM Tris HCl (pH 7.2) で吸着した酵素を溶出した。溶出液 50 ml を 300 ml の 30 mM Tris HCl (pH 7.2) に溶解して陰イオン交換 Q-Sepharose Fast Flow クロマトグラフィーカラム (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden. 直径 2.6 × 長さ 12 cm) に供した。同緩衝液 100 ml で洗浄したのち、0 から 0.8 M NaCl, 30 mM Tris HCl (pH 7.2) のリニアグラジエント溶出 (流速 : 2.0 ml/min) を行い、活性画分を集めて 30 mM Tris HCl (pH 7.2) に対して透析を行った。透析内液を予め同緩衝液で平衡化した陰イオン交換 Mono-Q クロマトグラフィーカラム (直径 1.0 × 長さ 10 cm) に供し、0 から 0.5 M NaCl, 25 mM Tris HCl (pH 7.4) のリニアグラジエント溶出 (流速 : 1.0 ml/min) を行い活性画分を分取、このクロマトグラフィーを 2 回繰り返して、活性画分を獲得した。最終クロマトグラフィーにおいて、単一活性ピークと 280 nm の紫外外部吸収ピークは完全に一致した。

7-2-3. ビール中 Proteinase A (PrA) 活性の測定

測定対象のビールもしくは酵母懸濁液は予め McIlvaine 緩衝液 (pH 6.0) で活性の強さに応じて 2 倍~100 倍程度に希釈した。通常のビールの場合は 2 倍希釈が適当であった。希釈済み試料 100 μl を 1.5ml 容の蓋付きプラスチック製マイクロチューブに採取した。これに、共存する可能性のある Proteinase B (PrB) 活性を押さえるために、dimethyl sulfoxide に溶解した 1 mM chymostatin (PrB 阻害剤)、5 μl を加えた。また、ブランクには dimethyl sulfoxide に溶解した 1 mM chymostatin (PrB 阻害剤) , 100

mg/l pepstatin (PrA 阻害剤) 5 μ l を加えた。酵素反応は dimethyl sulfoxide に溶解した 0.25 mM 基質 (Suc-R-P-F-H-L-L-V-Y-MCA) 溶液 5 μ l を加えて開始させ、PrA による L-L 間の選択的切断を行わせた。37°C で 1 時間の反応後、沸騰水浴中にマイクロチューブを浸すことで反応停止を行った。マイクロチューブを冷却後、10 μ l の leucine aminopeptidase 溶液 (0.125U) および 100 μ l の 0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5、50 μ M chymostatin, 5 mg/l pepstatin を加え、3 時間 37°C で反応を行い、遊離した L-V-Y-MCA のアミノ末端側からアミノ酸を遊離させ、最終的に 7-amino-4-methylcoumarine (AMC) を遊離させた。遊離した AMC を逆相イソクラティック HPLC で検出した。HPLC システムは島津 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) 製の、システムコントローラー SCL-6B、自動注入ユニット SIL-6B、ポンプユニット LC-9A、蛍光検出器 RF-550A、データインテグレーター C-R4AX を用いた。カラムは Nova-Pac C18, 3.9 \times 150 mm (Waters, Millipore Corporation, MA, USA) を用い、溶離液は 15 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) : アセトニトリル (1 : 1) を用いた。流速は 0.6 ml/min、検出は励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm を用いた。

また、本報告では PrA の酵素活性について、37°C で 1 pmol の基質を分解する酵素活性を 1 ユニット (U_{PRA}) と定義する事とした。

7-2-4. 泡持ち

シグマ法による泡持ち測定は ASBC 公定法に従った [15]。

NIBEM 法による泡持ち測定は Klopper [17] の方法に従って NIBEM Foam Stability Tester を用いて行った。

RUDIN 法による泡持ちの測定は Rudin の方法 [12] を改変した Bishop の方法 [163] を用いて行った。

7-2-5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli [151] の方法で行った。

7-3. 結果および考察

7-3-1. ビール中の PrA 活性測定における遊離 AMC の HPLC による定量

MCA をアミノ末端に有する合成ペプチドを用いた蛋白分解酵素の活性測定においては、遊離した AMC が有する蛍光強度を蛍光光度計で測定するのが一般的である。種々の予備検討の結果、我々は Yokosawa らの方法 [162] を用いてビール中の蛋白分解酵素活性の測定を試みたが、二つの問題点を見出した。一つ目はビール中に含まれる蛍光物質が活性測定の弊害となることである。ブランクの測定で高い蛍光が検出され（とりわけ全麦芽ビールや濃色系のビールの場合はそれが顕著に表れる）、微弱な活性を検出したい場合に、目的とする遊離 AMC による蛍光強度の増加分を検出する事が難しい場合が出てくる。二つ目は Photobleaching（光退色）と言われる現象である。蛍光光度計の測定において、ビール中に含まれる蛍光物質が励起光に曝されることで不可逆的な光退色を起し、蛍光強度が低下する事で定量値が安定しない現象が観測された。遊離した AMC の蛍光強度をビール中に含まれる蛍光物質と切り離して検出する事が出来ればこの二つの問題は同時に解決できると考えた。そこで、反応液の中から逆相 HPLC により簡便かつ迅速に AMC のみを検出する方法を検討した。種々の予備実験から、カラムは Nova-Pac C18, 3.9 × 150 mm（Waters, Millipore Corporation, MA, USA）、溶離液は 15 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）：アセトニトリル（1 : 1）、流速は 0.6 ml/min、検出は励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm を用いたイソクラティック逆相 HPLC 分析により、一分析当たり 4 分以内に、ビール中の蛍光物質の影響を受けることなく、定量性良く AMC を分析できる条件を見出した。反応液および AMC 標準液の HPLC クロマトグラムを Fig. 7-1 に示した。

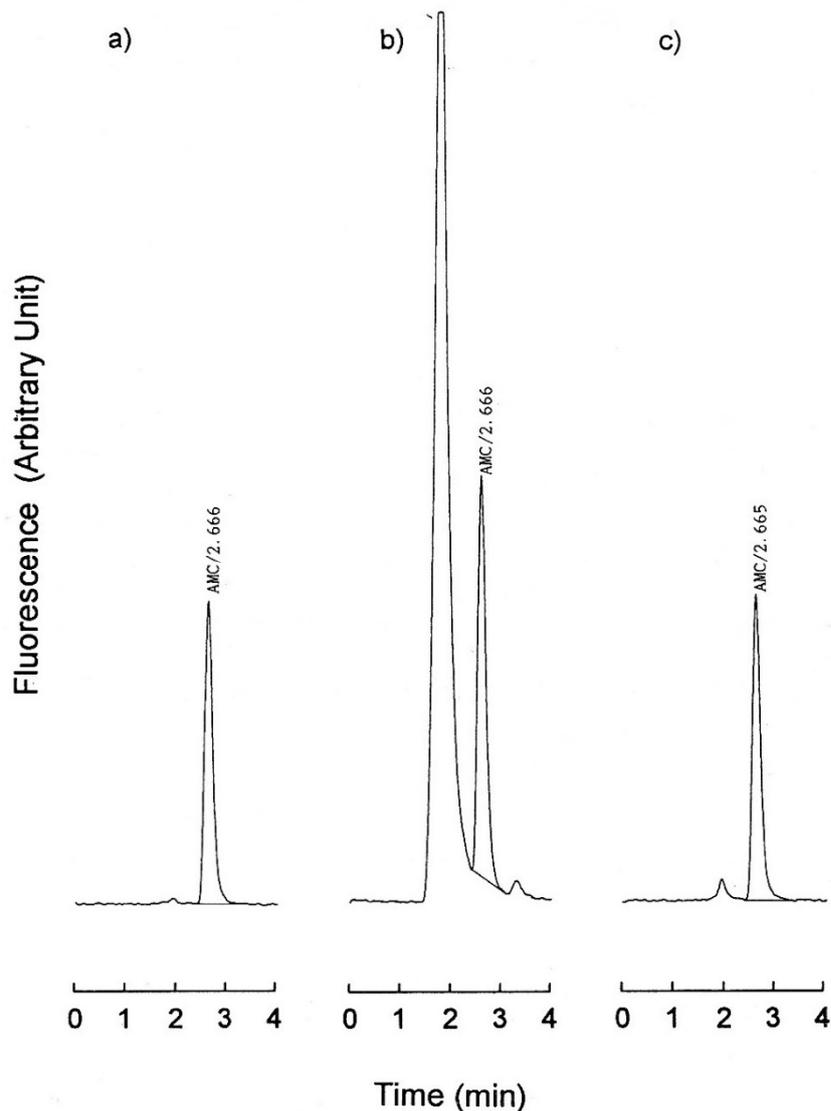


Fig. 7-1 The HPLC profile of the AMC determination with fluorometric detection on PrA assay: (a) standard AMC solution (200 nM), (b) unpasteurized bees sample, (c) yeast filtrate sample.

Fig. 7-1 (a) に示したように、AMC 標準品は保持時間 2.665～2.666 分の溶出位置に単一のピークを示した。(b) に示したように、ビールの分析においては問題となるビール中の蛍光物質は全て素通りの溶出位置に大きなピークとなって検出され、AMC の検出に影響を及ぼさなかった。従って、ビール中の蛍光物質の高ブランクとしての妨害や、Photobleaching (光退色) による誤差誘因の両方を回避することが明らかとなった。また (c) に示した酵母懸濁液のようにビール中の成分が希釈されているような場合は全く妨害物なく測定が可能であることも確認した。

AMC の濃度に応じた HPLC における濃度依存直線性につき、Fig 7-2 に示した。

AMC 10 mM \sim 1 μ M の濃度範囲において良好な直線性が確認された。

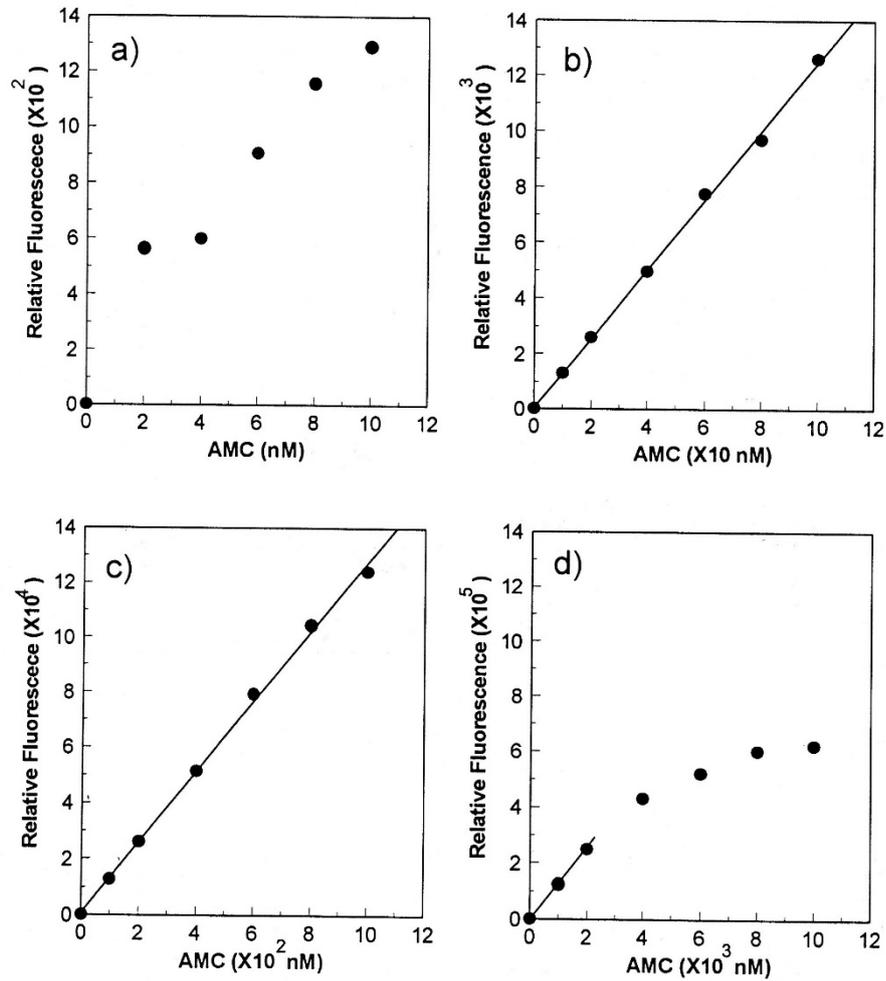


Fig. 7-2 The linearity of the AMC determination by isocratic HPLC.

(a) 20-100 nM AMC, (b) 100 nM-1 μ M AMC, (c) 1 μ M -10 μ M AMC.

また、異なる非熱処理ビールおよび酵母懸濁液について日内・日間誤差を検討した結果を

Table 7-1 に示した。

Table 7-1 Repeatability of the PrA assay for an unpasteurized beer and a yeast filtrate

Samples	Number of Samples	PrA Activity (U _{PRA} /ml)			Coefficient of Variation (%)
		Mean	Range	Standard Deviation	
Unpasteurized beer					
Day1	10	17.7	16.9-19.1	0.687	3.9
Day2	10	18.2	17.4-18.9	0.510	2.8
Day3	10	17.8	17.1-18.7	0.490	2.8
Yeast filtrate					
Day1	10	382	354-407	19.7	5.2
Day2	10	384	341-416	24.5	6.4
Day3	10	403	373-433	16.8	4.2

日内誤差・日間誤差ともに良好な結果が得られ、製造工程における定量的品質管理に十分耐えうる精度を有する事を確認した。

酵素反応の経時的直線性を調べた結果を Fig. 7-3 に示した。

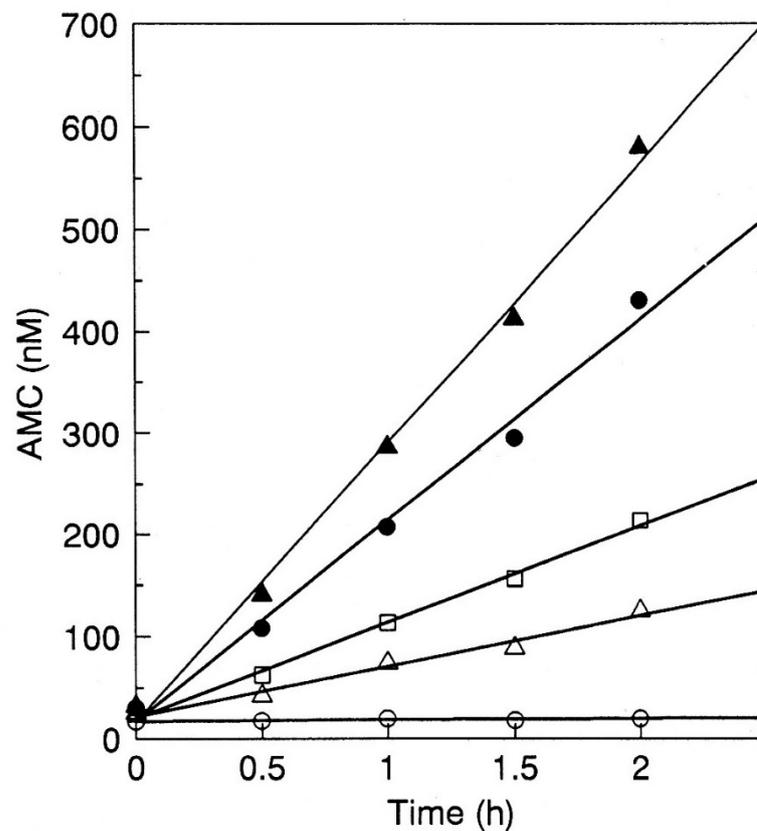


Fig. 7-3 The concentration of AMC in dependence on the reaction time.

PrA activity: 0 U_{PRA}/ml, ○, 5 U_{PRA}/ml, △, 10 U_{PRA}/ml, □, 20 U_{PRA}/ml, ●; 30 U_{PRA}/ml, ▲.

酵素活性濃度に比例して 37°C、0~2 時間の反応時間において直線性が認められ、酵素活性の測定が可能であることを認めた。

7-3-2. PrA による泡持ち低下の検証

今回設定した PrA 活性測定法を踏まえて、実際にどの程度の活性でどの程度の泡持ちダメージが生じるかについて、ビール酵母から精製した PrA を熱処理ビールに添加する事で市場における泡品質の劣化を想定した検証実験を行った。

本章 7-2-2 項で示したビール酵母 PrA の精製によって得られた PrA 標品の SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 分析結果を Fig. 7-4 に示した。

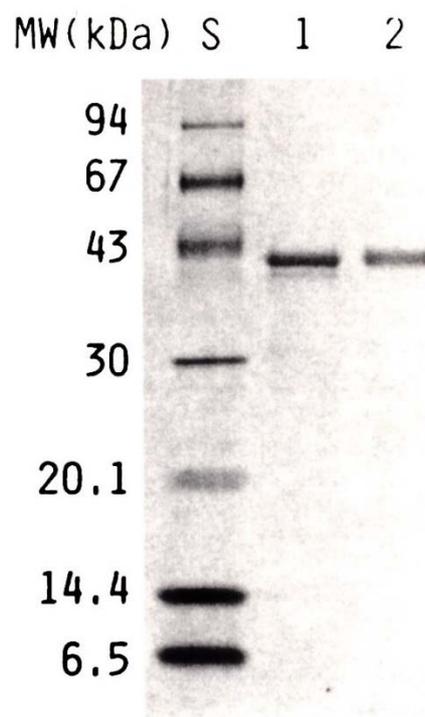


Fig 7-4. SDS PAGE of PrA from yeast. Lane 1: Commercial PrA from baker's yeast (obtained from Sigma). Lane 2: Purified PrA from brewer's yeast. Lane S: Standard proteins.

図中の Lane 2 に示したように SDS-PAGE において、分子量 41 kDa の位置にほぼ単一のバンドを示すまで精製されていることを確認した。また、参照として、市販されているパン酵母由来の PrA との比較を行ったが、これまで報告されている通り [104]、Lane 1 に認められるようにほぼ同一の分子量 (41 kDa) を有している事を確認した。

今回、ビール酵母から精製した PrA 標品を、熱処理によって残存する蛋白分解酵素を失活させたビールに添加し、20°C で 26 日間保存した後の泡持ちを異なる泡持ち測定法で測定した。Fig. 7-5 に示した通り、いずれの泡持ち測定方法においても、酵素活性の強さに応じて泡持ちの顕著な低下が観測された。

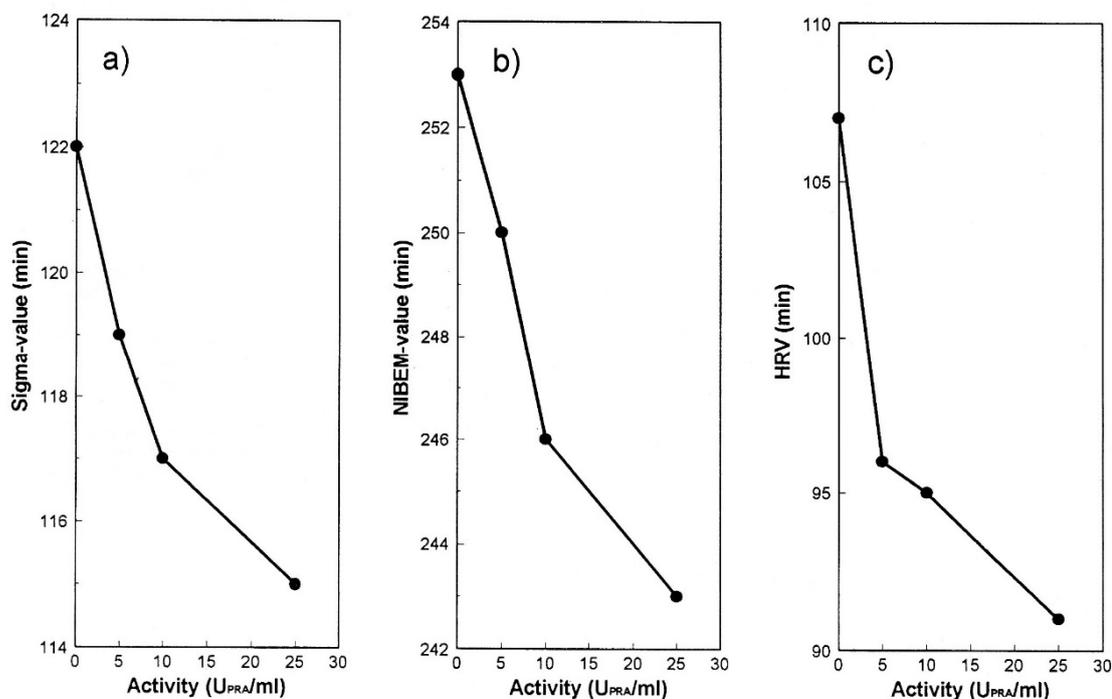


Fig. 7-5 The effect of the addition of purified PrA on the foam stability after storage (20°C, 26 days). (a)Sigma-value method, (b) NIBEM method, (c) RUDIN method.

緒論の 1 - 3 項 泡の測定法に関する研究の項で記したように、泡持ちの測定法は、どのような泡沫の特性を評価するかによって異なる方法が報告されている。今回用いた三つの方法のうち、NIBEM 法は今日醸造業界で最も広く採用されている方法で、専用測定機を用いて泡沫の低下速度を直接測定する方法で、Sigma 法と RUDIN 法 (HRV 値) は泡

沫からの排液速度を測定し、泡沫の安定性に代替する方法である。今回、原理の異なる三つの泡持ち測定方法のいずれにおいても泡持ちの低下が観測されたことから、ビール酵母由来の蛋白分解酵素がビール品質に重篤な悪影響をもたらすことが明らかとなった。

これまでの研究から酵母の液胞に存在する代表的エンド型の蛋白分解酵素として PrA と並んで PrB が報告されている [164]。今回、PrA による泡持ちへのダメージを直接的に検証したが、これを確認するために PrA, PrB の阻害剤を用いて両蛋白分解酵素の泡持ちへのダメージを間接的に確認した。PrA の阻害剤である Pepstatin A、PrB の阻害剤である Chymostatin, Antipain を非熱処理ビールに添加し、泡持ちへの影響を評価した。結果を Table 7-2 に示した。

Table 7-2 The effect of proteinase inhibitors on the foam stability after storage (37°C, 7 days)

	Inhibitors	Concentration of inhibitors	PrA activity (U _{PrA} /ml)	Foam stability (Sigma-value)
Beer A				
pasteurized	None	-	0	120
unpasteurized	None	-	7	115
unpasteurized	Chymostatin	50 μM	7	115
unpasteurized	Antipain	5 μg/ml	7	115
unpasteurized	Pepstatin A	5 μM	0	120
Beer B				
pasteurized	None	-	0	118
unpasteurized	None	-	12	112
unpasteurized	Chymostatin	50 μM	12	112
unpasteurized	Antipain	5 μg/ml	12	112
unpasteurized	Pepstatin A	5 μM	0	118

Beer A、Beer B ともに加熱処理 (pasteurized) したものは PrA 活性が消失したのに対して、非熱処理 (unpasteurized) のものは PrA 活性が残存し、保存後に泡持ち Sigma 値が低下した (Beer A: 120→115、Beer B: 118→112)。これに PrA 阻害剤である Pepstatin A を加えたものは PrA 活性が消失し、泡持ちの低下は認められなかった。これに対して、

PrB 阻害剤である Chymostatine、Antipain を添加したものは PrA 活性に影響を与えず、非熱処理ビールと同じ泡持ちの低下を示した。この事から酵母由来蛋白分解酵素の泡持ちへの影響はもっぱら PrA によってもたらされていることを確認した。

よってビール醸造工程において泡品質を改善するためには、プラスの要素である泡持ち寄与蛋白質を増強する事と並行して、酵母由来蛋白分解酵素である PrA の活性を抑制する事の両面が重要であることが示された。

7-4. 小括

これまで泡持ちに寄与する物質として高分子蛋白質に注目してきたが、一方、泡持ちにマイナスに寄与する要素として酵母の液胞に存在する Proteinase A (PrA) の影響が報告されている。この現象を詳細に調べるためには PrA の活性を正確に測定できることが前提となるが、これまで報告されている方法では再現性と繰返し精度について、十分な結果が得られなかった。そこで、これまで PrA の研究で報告されている合成ペプチド Succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methylcoumaryl-7-amide (Suc-R-P-F-H-L-L-V-Y-MCA) を用いた Yokosawa らの方法を改変する事で、ビール中に含まれる種々の成分の影響を受けることなく同酵素の微弱な活性を選択的に再現性良く測定する方法を検討した。活性測定において問題となるブランクの高さ (ビール中に含まれる蛍光物質の存在)、および Photobleaching (光退色) を回避するために、酵素反応で生成した 7-amino-4-methylcoumarine (AMC) をイソクラティック HPLC で簡便に測定する方法を試み、前述の二つの問題を同時に回避し、微弱な PrA 活性をビール中の妨害物質の影響を受けることなく測定できることを確認した。併せて同酵素の泡持ちへの影響を再確認するためにビール酵母より PrA を精製し、熱処理ビールに添加し、保存後の泡持ち低下を測定した。3つの泡持ち測定法 (Sigma 法、NIBEM 法、RUDIN 法) の全ての評価法で PrA による泡持ちの低下が認められた。また、酵母由来エンド型蛋白分解酵素の阻害剤を用いた添加試験の結果、PrB の影響は認められず、専ら PrA による影響で非熱処理ビールの保存中の泡持ち低下が生じていることを明らかにした。ビール醸造工程において泡品質を改善するた

めには、プラスの要素である泡持ち寄与蛋白質を増強する事と並行して、酵母由来蛋白分解酵素である PrA の活性を抑制する事の両面が重要であることが示された。

第8章. 消費者の視覚をシミュレートした泡持ち評価法の開発

8-1. 緒論

本論文緒言の1-3.「泡の測定法に関する研究」においてこれまで報告されている泡持ちの測定法について概説した。“ビールの泡が良い・悪い”を最終的に判断するのは消費者であり、本来は主観的なものである。しかし、これを製造工程の管理や品質保証、また製品の開発等に反映させるためには主観的な消費者の判断を、何らかの方法で客観的な数値に置き換える必要があり、それが故に泡持ちの測定法が必要になる。現在の泡持ち測定法は数値化のために、泡沫からの排液速度や、泡沫の高さの低下速度等々、なんらかの測定可能な代用特性を用いて数値化し、泡持ちの評価としている。これまで消費者の視覚評価を客観的に数値化して実用となっている方法は存在していない。

そこで我々は、人間がビールを注ぐ動きを再現できる自動ビール注ぎ機を開発し、これによって注がれたビールの泡の様子を画像処理し、液表面が露出するまでの時間、注がれたビール量および生じた泡の比率から泡消失までの時間（Foam Collapse Time: FCT）を統計的に算出する事によって、消費者の視覚をシミュレートした泡持ち評価法の開発を試み、得られた結果を統計的に解析した。

8-2. 実験材料および実験方法

8-2-1. 実験材料

実験に用いたビールは国内産各社の市販の壺ビール（大壺、48工場・68ロット）を用いた。

8-2-2. 泡持ち

シグマ法による泡持ち測定は ASBC 公定法に従った [15]。

NIBEM 法による泡持ち測定は Klopper [17]の方法に従って NIBEM Foam Stability Tester を用いて行った。

RUDIN 法による泡持ちの測定は Rudin の方法 [12]を改変した Bishop の方法 [163]を用いて行った。

8-2-3. 統計解析

全て SPSS6.1J for Macintosh を用いた。

8-3. 結果および考察

8-3-1. 注ぎをシミュレートした泡持ち評価法測定条件の設定

今回、開発を試みたビール注ぎ機の基本コンセプトは人間がビールを注ぐ際の動き、ならびに注がれたビールの状態を忠実に再現する事である。そのために必要なのは具体的に人間がビールを注ぐ際の条件設定である。そこで、我々は社内の 33 名（男性 21 名、女性 12 名）の社員のビールを注ぐ際の動き、合計 292 杯分をビデオで記録・解析する事を試みた。供試ビールは国内産の 11 銘柄の市販壺ビールで、ビールの温度は実際の飲用条件に近い 6°C、室温を 20°C に設定した。用いたビールグラスは、壺ビールを家庭および外食で飲む際に一般的に使用されるの 6 オンスグラス（内径 約 6 センチ、高さ 約 9 センチ）を用いた。ビールを注ぐ際の動きをビデオ撮影し、注ぎに要する時間と、注いでから 10 秒後のグラスの中の泡の比率を観測した。結果を Fig. 8-1 と Fig. 8-2 に示した。

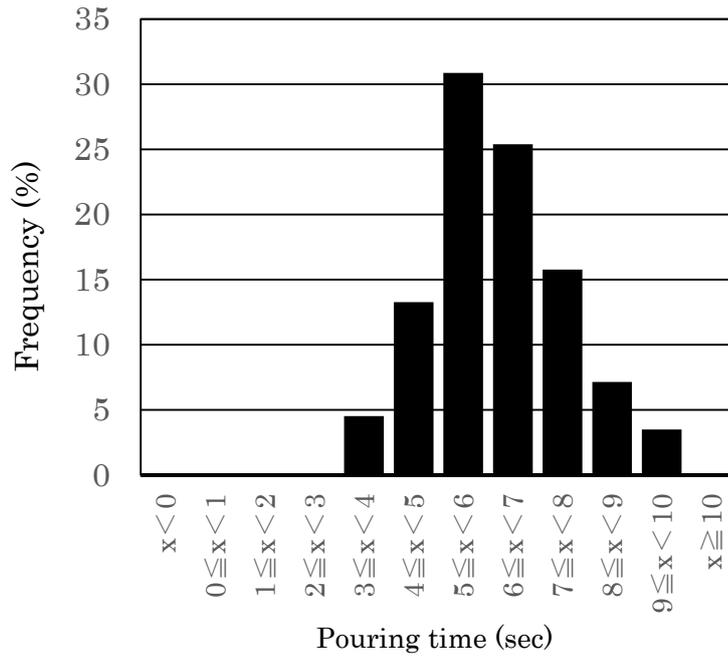


Fig. 8-1 Pouring time determined by video data analysis (poured by 33 people, 11 brands, for a total of 292 glasses).

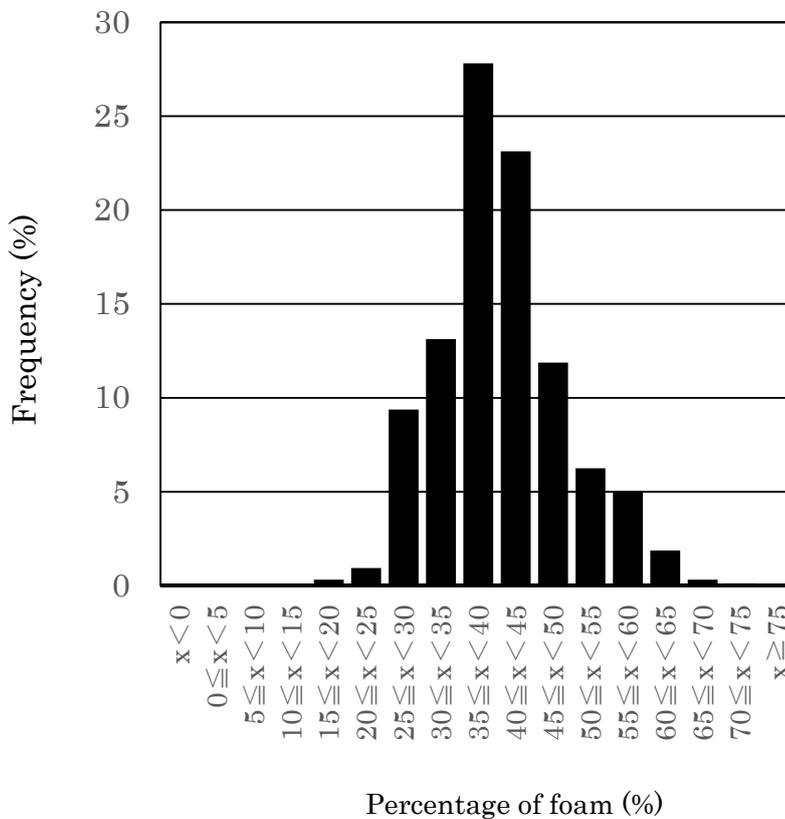


Fig. 8-2 Percentage of foam in the glass at 10 sec determined by video data analysis (poured by 33 people, 11 brands, for a total of 292 glasses).

注ぎ時間で頻度が最も高かったのは 5 秒から 7 秒の間で、平均値は 6.1 秒、メジアン 6.0 秒、標準偏差 1.38 であった。また、注ぎ終わったあとのビールの平均重量は 165.6 g であった。ビデオによる注ぎ調査では、溢れない程度にグラスいっぱいビールを注ぐケースが多かったが、実際の測定では溢れ出ないようにグラス上端に余裕を持たせたいため、設定するビール重量は 150 g/杯とした。従って、ビールを注ぐ時間としては、ビール 150 g に相当する注ぎ時間に換算し、 $(6.1 \text{ 秒} \div 165.6 \text{ g}) \times 150 \text{ g} = 5.5 \text{ 秒}$ とすることとした。泡の比率については、注ぎ調査からは、注ぎ終わってから 10 秒後のグラスの中の泡の比率は 35% から 40% が最も頻度が高かった。以上の結果から、実際の注ぎをシミュレートする注ぎ条件として「注ぎ時間 5.5 秒、泡比率 40%、注ぐビール重量 150 g」を採用する事とし、これを再現性良く注げる自動ビール注ぎ機の作成を試みた。

8-3-2. ビール自動注ぎ機の作成

今回の自動注ぎ機の作成で最も留意したのは、ビールを注ぐ際に人間がビール壺のどこを支点にしてビールを注ぐかという点である。留意点を Fig. 8-3 に示した。

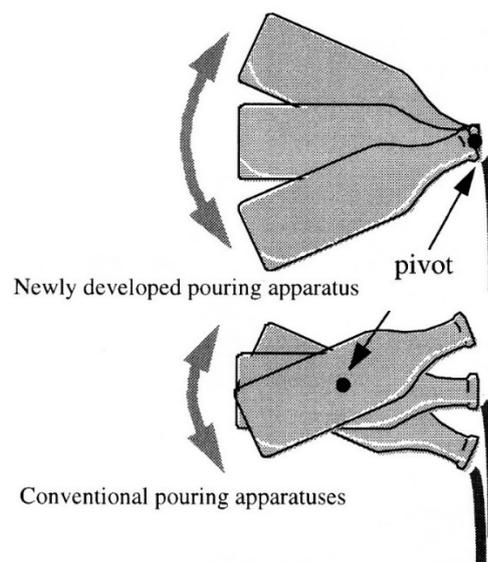


Fig. 8-3 Placement of the pivot. Appropriate placement of the pivot is at the lip of the bottle, not at the bottle's center of balance.

ビール工場においては品質管理目的で、手動でビールを注ぎ、目視で泡持ちの良否を判定するために、手動の注ぎ機を使用する場合があるが、一般的に Fig. 8-3 の下の図にあるように壇の中心を支点にした動きをするものが多い。しかしこの動きでは壇口が上下に動くために注いだ結果としてのビール量や泡の比率にばらつきを生じる要因になる可能性がある。ビデオで記録した人間の動きでは壇口を支点にビールを注ぐ割合が圧倒的に多く、また壇の中心を支点に注いだ場合には上述したようなばらつきが大きくなることを人間の動きからも観測できた。以上の点を考慮して Fig. 8-4 に外観を示した自動ビール注ぎ機を作成した。

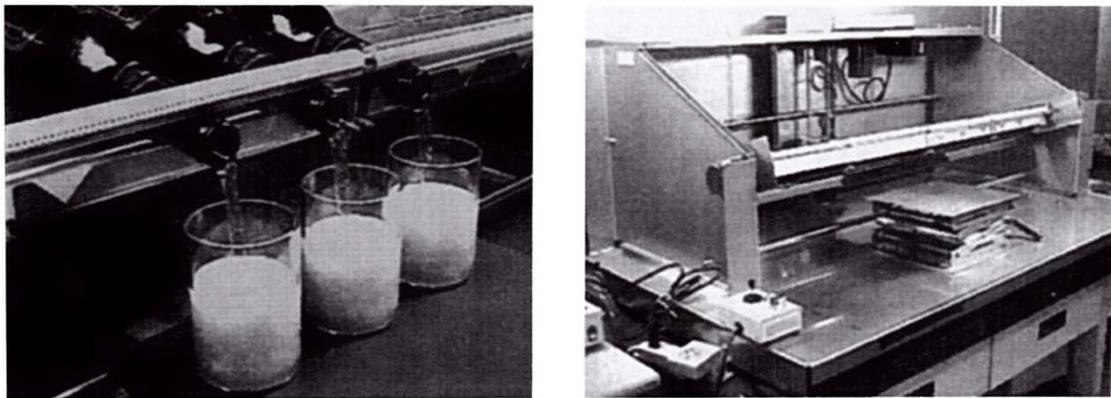


Fig. 8-4 Programmable beer pouring apparatus.

本自動ビール注ぎ機の駆動方式を Fig. 8-5 に、また制御方法を Fig. 8-6 に示した。今回採用した駆動方法はモータのトルクを有効に使えるだけでなく、微妙な動きを再現するのに適したものである。モータの回転速度が一定の場合に、厳密には壇台の回転角速度は一定にはならないが、注ぎ中の回転角範囲は非常に狭いので、実質的に問題にはならない。

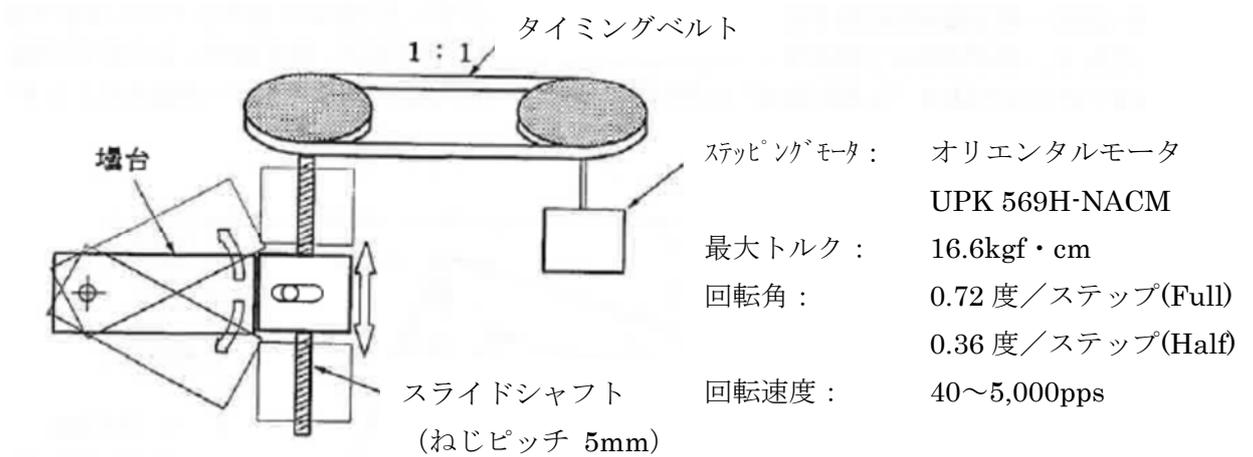


Fig. 8-5 Outline of the operation of programmable beer pouring apparatus.

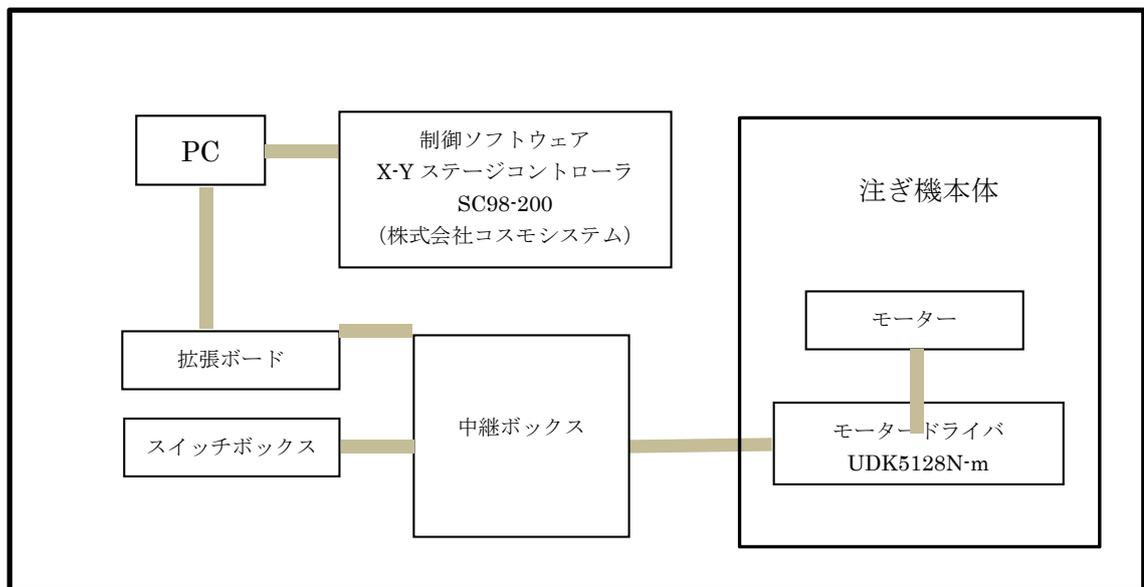


Fig. 8-6 Diagram of the control of programmable beer pouring apparatus.

測定に使用する動作プログラムの作成は試行錯誤を繰り返す事で行い、最終的に大壺 (633 ml) から 3 杯、中壺 (500 ml) から 2 杯のビールを人間とほぼ同じ動作で、注ぎ時間 5.5 秒、泡比率 40%、注ぐビール重量 150 g を実現するプログラムを作成した。

8-3-3. 泡持ち値 FCT (Foam Collapse Time) の算出法

以後、本方法で得られた泡持ち値を FCT (Foam Collapse Time) 値と称し、その定義

を「ビール温度 6°C、室温 20°C で泡比率 40%・注ぎ時間 5.5 秒・ビール重量 150 g で注がれた泡が崩壊し、液面が見えるまでに要する時間（秒）で評価する」とした。

8-3-3-1. 終点判定

FCT 測定における終点判定は、単層となった泡越しにビール液の色が見えた時点で「液面が見えた」と判定する。但し、単層の泡が液面に接触した時点ではなく、泡の直径分がビール液体の色に変化することを確認できた時点で終点と判定する。これにより判定精度が向上し、粗い泡への対処も可能となる。液面が見えるまでという表現は、幅を持った表現と捉えられるかもしれないが、本測定法では下記に記述するように終点タイミングを厳密に定めている。つまり、単層の泡が単に液面に接した時点ではなく、泡の直径分がビールの色に変化することを確認できた時点で終点と判定する方法を採用する。実際の測定における終点の 5 秒前、5 秒後の液面の様子を Fig. 8-7 に示した。

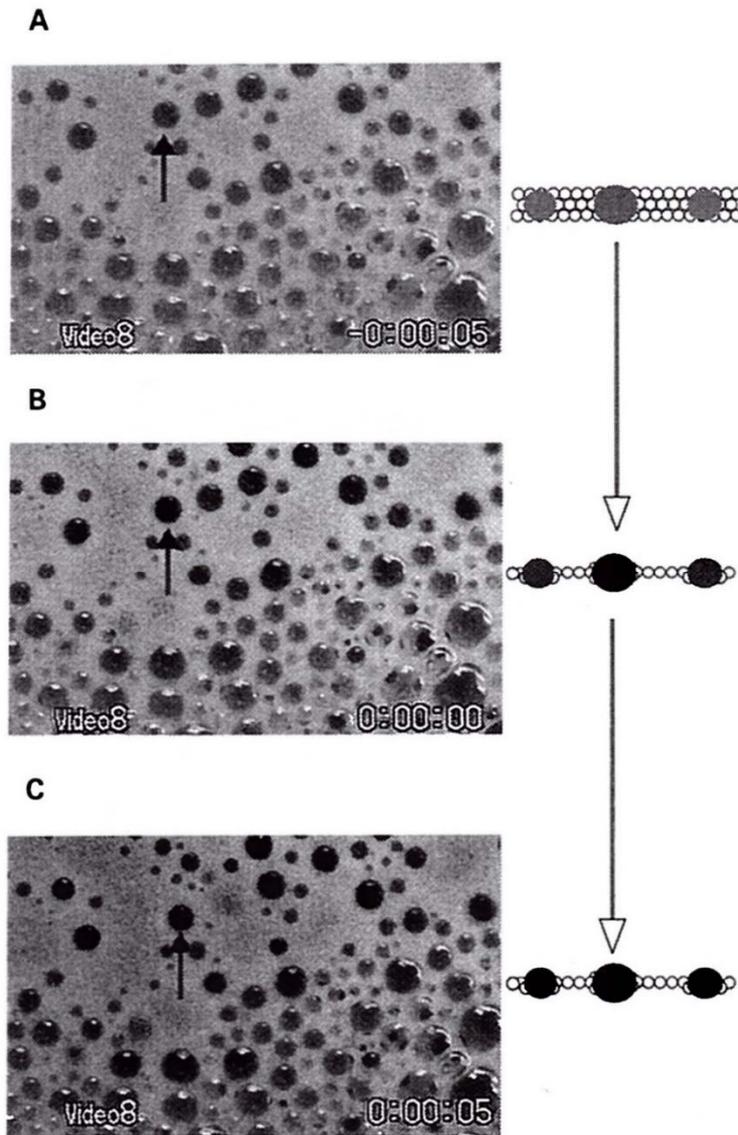


Fig. 8-7 Transition of the foam surface: 5sec before collapse point (A), collapse point (B), 5sec after collapse point (C).

終点のタイミングは Fig. 8-7 の (B) であるが、比較的サイズの大きな泡が最初に液面に接し、ビールの色が見え始めても終点とは判定しない (A)。比較的サイズの大きな泡の直径がビールの色に変化した終点タイミング (B) を境にして、その直後から小さな泡粒が次々と終点に達していく (C)。よって判定のトレーニングを積み、終点判定は数秒とズレない。

8-3-3-2. 統計処理（重回帰分析）を用いた FCT 算出

FCT 値は「泡比率 40%・注ぎ時間 5.5 秒・ビール重量 150 g で注がれた泡が崩壊し、液面が見えるまでに要する時間（秒）」で表すが、実際にはこの条件を厳密に満たすように樽からビールを注ぎ出すのは自動ビール注ぎ機をもってしても、壇誤差やビール流の乱れ等の不確定な要因により、制御は不可能であった。従って、実質的には、泡比率 $40 \pm 10\%$ ・ビール重量 150 ± 5 g・注ぎ時間 5.5 ± 0.5 秒の範囲内で注がれたデータから得られる複数の測定値を用い、泡比率とビール重量を説明変数、泡崩壊時間を目的変数とする重回帰分析により得られる重回帰平面から統計的に泡比率 40%・ビール重量 150 g に相当する点を推定して、これを FCT 値とする方法を採用した。重回帰平面と FCT 値との関係を Fig. 8-8 に示した。

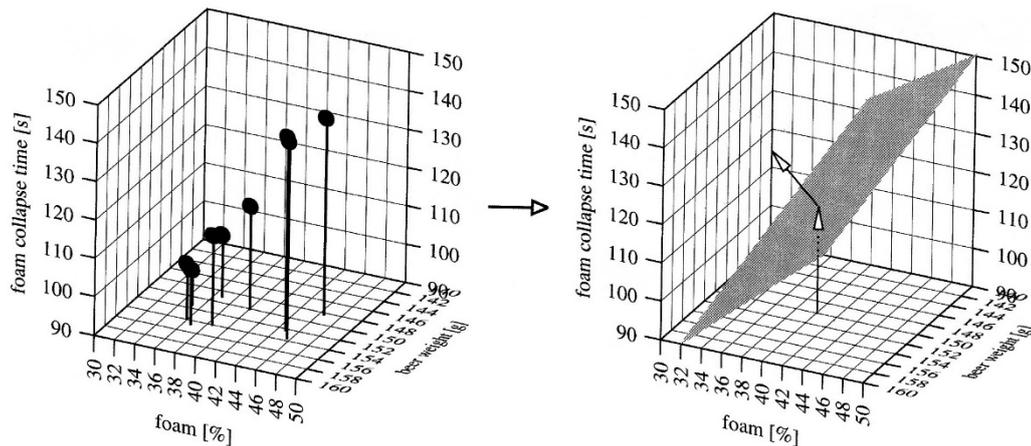


Fig. 8-8 Foam collapse time value is estimated by multiple regression analysis of nine data. Foam collapse time is estimated for a defined foam layer (40% foam amount and beer weight 150 g) considered to be a single layer.

厳密には泡比率とビール重量を説明変数とする重回帰面は平面ではなく局面となる。現実に分析法として具備すべき精度とハンドリングの両面を考慮し、FCT 測定では泡比率 40%・ビール重量 150 g の範囲内を近似的に平面とみなして値を算出する事とした。

ダムに 50 組（ビール 100 点）の組合せを作成してデータを取得した。2 点間の差を検出する場合、パネル数は 5～10 名が必要とされるが、今回のデータ取得は 6 名で行っておりサンプリング人数で問題はないと判断した。

以上の方法によって得られたデータを Table 8-1 に示した。合計 50 組の FCT 差、Sigma 差、NIBEM 差、Rudin 差、泡総合評価差（Overall Evaluation）、泡持ち（Stability）差、泡立ち（Foamability）差、付着性（Adhesion）差、キメ細かさ（Creaminess）差のデータが得られた。

Table 8-1 Difference in foam stability value and visual impression for beer pairs

Pair No.	Differences in Foam Stability Value				Differences of Visual Impression Grade				
	Sigma	FCT	NIBEM	Rudin	Overall Evaluation	Stability	Foamibility	Adhesion	Creaminess
1	16	10	46	19	1.8	1.7	1.7	1.8	0.5
2	8	11	24	10	0.3	-0.5	-0.1	0.7	-0.1
3	10	-1	21	6	0.8	0.9	0.2	1.1	0.5
4	11	-1	51	16	-1.1	-1.2	-1.5	-0.4	-0.7
5	0	10	2	1	1.0	1.2	0.5	1.2	0.1
6	-1	20	1	-2	-0.5	-0.2	-0.5	-0.5	-0.3
7	8	3	29	2	0.4	0.1	-0.5	1.3	-0.4
8	-11	-1	-42	-18	-0.2	-0.5	-0.2	0.0	0.1
9	4	2	5	9	0.6	0.4	-0.1	1.2	-0.2
10	1	-5	5	4	0.2	0.3	0.2	-0.1	0.2
11	0	-1	0	9	-0.8	-1.0	-0.7	-0.3	0.0
12	9	9	24	3	1.0	0.9	0.0	1.2	0.3
13	6	0	19	0	0.4	-0.5	0.2	0.4	0.2
14	7	0	35	11	-0.5	-1.0	-0.1	1.2	-0.5
15	2	-15	4	-3	-0.9	-0.6	-0.7	0.8	-0.6
16	4	0	-5	-14	-0.3	-0.7	-0.5	-0.3	0.0
17	-3	0	-1	0	-0.3	-0.1	-0.4	0.0	-0.3
18	-5	-6	-28	-2	-1.3	-1.4	-1.4	-1.2	-0.4
19	-8	-3	-31	-11	-0.7	-1.2	-1.0	0.5	-0.6
20	5	10	32	9	0.1	0.7	-1.3	-1.6	0.7
21	1	-8	-0.9	-0.9	-1.0	-0.4	-0.5
22	1	-10	-0.8	-0.9	-1.5	-0.1	-0.1
23	7	-4	-0.3	0.0	-0.4	0.0	0.4
24	-7	-7	0.1	0.3	0.3	-0.3	0.4
25	5	1	10	-2	-1.0	-1.2	-1.2	-0.8	-0.6
26	6	2	3	-2	0.1	0.0	0.0	0.4	0.1
27	-14	2	-40	-15	-0.3	-0.4	-0.8	-0.4	-0.5
28	12	-2	-0.5	-0.5	-1.1	0.0	-0.5
29	0	14	12	4	0.0	0.3	-1.0	0.0	0.2
30	-1	-15	-0.6	-0.6	-0.5	-0.1	-0.1
31	0	-7	-0.6	-0.2	-0.7	0.0	-0.3
32	-7	0	0.3	0.0	0.4	0.9	-0.1
33	1	-12	-0.8	-0.7	-0.7	-1.2	-0.5
34	-1	0	-5	-7	-0.3	-0.3	-0.5	-0.1	0.0
35	8	-2	0.4	0.1	0.0	1.0	-0.1
36	-1	-1	-5	0	-0.1	0.2	-0.1	-0.5	0.1
37	-13	-8	0.0	0.2	-0.4	-0.8	0.8
38	6	0	9	7	0.0	-0.1	-0.1	0.2	-0.1
39	16	17	53	14	1.2	1.1	0.0	1.5	0.3
40	2	-13	-2	3	-0.4	-0.7	0.0	0.0	-0.2
41	8	0	18	5	-0.2	0.3	-0.3	-0.3	0.0
42	0	-10	-2	-1	-0.5	-0.1	0.1	-0.3	0.1
43	-1	0	-12	-1	-0.5	-0.1	-0.6	-1.8	1.1
44	-7	-8	-18	-11	0.3	0.0	0.3	0.8	0.2
45	7	-2	30	3	-0.1	-0.3	-0.1	0.3	-0.5
46	-6	0	-20	-6	-1.0	-0.8	-0.7	-0.6	-0.7
47	13	16	34	8	0.9	0.5	0.3	2.1	-0.7
48	6	0	13	3	0.4	0.6	0.2	0.0	0.0
49	-6	2	-3	-5	0.0	0.5	-0.3	-0.8	0.2
50	9	3	25	14	0.5	0.5	0.0	0.5	0.3

8-3-5. FCT 値と目視評価および従来泡持ち測定法による数値との関係

今回の「消費者の視覚をシミュレートした泡持ち評価法の開発」が意図するところは、より消費者の視覚的評価に近い泡持ち測定法を開発する事であり、それを評価するために視覚評価パネルによる評価と FCT 値がどのような関係にあるかの相関分析を行った。8-3-4 項に既述したように、パネルの個々の評点を絶対評価値として扱うのは、日間の感覚のズレ等の影響から不適切と判断し、連続して注いだビール 2 点について、この 2 点の組合せの差（例：A-B、C-B）を代表値として解析を行った。まず、視覚評価パネルから得られた泡総合評価（Overall Evaluation）差と、視覚による泡持ち（Stability）差、FCT 差、Sigma 差、NIBEM 差、Rudin 差の関係を調べた相関行列（0 次相関）を Table 8-2 に示した（実際の計算は、上述した 6 変数に加えて、泡立ち（Foamability）差、付着性（Adhesion）差、キメ細かさ（Creaminess）差を加えた 9 変数の相関行列を計算したが、ここでは前者の 6 変数の相関行列を示した）。FCT 値差と最も高い相関を示したのは泡総合評価（Overall Evaluation）差で相関係数 0.549**、次いで視覚による泡持ち（Stability）差で相関係数 0.491**となり、FCT は視覚による泡持ち評価を反映していることが示された。従来の泡持ち測定値との相関は、相関係数の高い順に NIBEM 値差 0.423**、Sigma 値差 0.366**、Rudin 差 0.341*となった。

Table 8-2 Correlation coefficients ^a

	Overall	Stability	FCT	Sigma	NIBEM	Rudin
Overall	1.000	0.884**	0.549**	0.416	0.483**	0.400*
Stability	0.884**	1.000	0.491**	0.318*	0.417**	0.379*
FCT	0.549**	0.491**	1.000	0.366**	0.423**	0.341*
Sigma	0.416**	0.318**	0.366**	1.000	0.930**	0.807**
NIBEM	0.483**	0.417**	0.423**	0.930**	1.000	0.852**
Rudin	0.400*	0.379*	0.341	0.807**	0.852**	1.000

^a Coefficient, two-tailed significance. *: significant LE 0.05; **: significant LE 0.01

Valuables are differences in pairs for: overall visual impression of foam quality, visual impression of foam stability, FCT, Sigma value, NIBEM value and Rudin value.

FCT 値が見た目の泡を反映する傾向は認められたが、泡総合評価 (Overall Evaluation) 差の相関係数 0.549**、視覚による泡持ち (Stability) 差の相関係数 0.491**は圧倒的に高い相関とは言えない。しかし、これだけで今回の調査結果の本質が現れたわけではない。二つの変数間の関係を調べる時には、この関係に他の変数が及ぼす影響を常に考慮に入れなくてはならない。そこで、同時にデータ取得した泡立ち (Foamability) 差、付着性 (Adhesion) 差、キメ細かさ (Creaminess) 差のデータを用いて偏相関分析を行った。

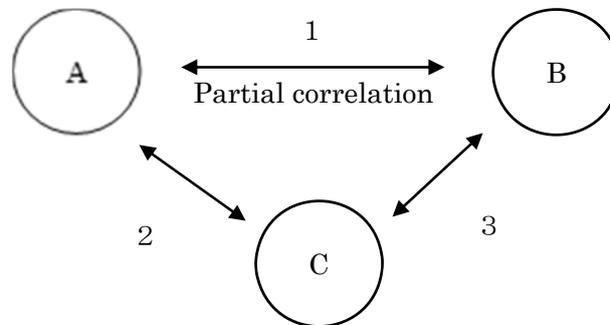


Fig. 8-10 Image of partial correlation between two variables.

Fig. 8-10 に示したように、二つの変数間の関係を調べる時はいつでも、その関係に他の変数が及ぼす影響を考慮に入れなくてはならない。Fig. 8-10 における変数 A と変数 B の相関関係 1 は、2、3 の相関関係が高い場合、変数 C の影響を受ける。偏相関は、この変数 C の線形効果を制御して、A-B 間の相関関係を調べることが出来る。すなわち、変数 C の影響を排除する事で疑似相関の問題が回避され、隠された関係の検出が可能になる。

Table 8-3 に、泡立ち (Foamability) 差、付着性 (Adhesion) 差、キメ細かさ (Creaminess) 差の影響を排除した偏相関行列の結果を示した。FCT 値差と泡総合評価 (Overall Evaluation) 差の相関係数は 0 次相関解析の結果と比較して上昇し、0.683**、次いで視覚による泡持ち (Stability) 差で相関係数 0.486**となり、一方で FCT 値差と従来の泡持ち測定値との相関は、NIBEM 値差が 0.306、Sigma 値差 0.223、Rudin 差 0.232 に低下した。

Table 8-3 Partial correlation coefficients ^a

	Overall	Stability	FCT	Sigma	NIBEM	Rudin
Overall	1.000	0.753**	0.638**	0.193	0.271	0.147
Stability	0.753**	1.000	0.486**	0.145	0.264	0.198
FCT	0.638**	0.486**	1.000	0.223	0.306	0.232
Sigma	0.193	0.145	0.223	1.000	0.911**	0.769**
NIBEM	0.271	0.264	0.306	0.911**	1.000	0.826**
Rudin	0.147	0.198	0.232	0.769**	0.826**	1.000

^a Controlling for foamability, adhesion and creaminess. *: significant LE 0.05; **: significant LE 0.01

Valuables are differences in pairs for: overall visual impression of foam quality, visual impression of foam stability, FCT, Sigma value, NIBEM value and Rudin value.

これらの結果は、今回開発した視覚を重視した泡持ち測定法の評価結果が従来から伝統的に用いられてきた泡持ち測定法と比較して、より消費者の視覚評価に近い測定結果が得られることを示している。

さらにこれら6変数の類似性を、クラスター分析を用いて評価した。類似性の計算は、代表的な手法のひとつである平方ユークリッド距離と Ward 法を用いた。計算結果から導き出されたデンドログラムを Fig. 8-11 に示した。

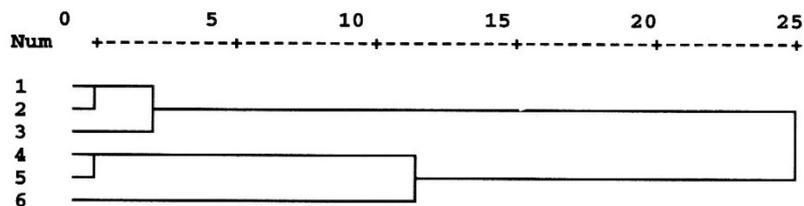


Fig. 8-11 Dendrogram of measured foam stability values and visual impressions. Variable 1-6 are differences in 1: Sigma value, 2: NIBEM value, 3: Rudin value, 4: overall visual impression, 5: visual impression of foam stability and 6: foam collapse time (FCT). Squared Euclidean measure and Ward method were used. n=39.

FCT 値は目視による評価である泡総合評価（Overall Evaluation）、泡持ち（Stability）と同じクラスターに属し、従来の泡持ち測定値である NIBEM 法、Sigma 法、Rudin 法による値とは別のクラスターに属する事が明らかとなった。NIBEM 法、Sigma 法、Rudin 法はビールの泡持ち研究や生産現場で長きにわたって活用されてきた歴史的に実績のある泡持ち測定方法であるが、今回開発した FCT 法はそれよりも更に人間の視覚に近い泡持ち測定法であることが統計的にも示された。

さらに、泡総合評価（Overall Evaluation）差がどの変数によって最も適切に説明できるかを解析するための重回帰分析を行った。なおこの解析からは泡総合評価（Overall Evaluation）差と最も相関の高かった泡持ち（Stability）差は変数から外して解析を行った。変数選択の結果を Table 8-4 に示した。

Table 8-4 The result of stepwise analysis of variance

Pairwise Deletion of Missing Data							
Equation Number 1 Dependent Variable. TOTAL							
Block Number 1. Method: Stepwise Criteria PIN 0.0500 POUT 0.1000							
SIGMA FCT NIBEM RUDIN TATI TUKI KIME							
Step	MultR	Rsqr	F (Eqn)	Sig F		Variable	BetaIn
1	.7264	.5276	41.326	.000	In:	TATI	.7264
2	.8289	.6871	39.535	.000	In:	FCT	.4088
3	.8500	.7225	30.371	.000	In:	TUKI	.2444
4	.9099	.8280	40.918	.000	In:	KIME	.4056
Multiple R			.90994				
R Square			.82800				
Adjusted R Square			.80776				
Standard Error			.26506				

変数選択を行うと、泡立ち差、FCT 差、付着性差、キメ差の順に変数が選択された。重相関係数 0.91、決定係数 0.83 であり、見た目の泡の総合評価を十分に説明できることが明らかとなった。また、FTC 差は目視評価の泡立ち差の次の二番目に選択されており、泡

立ち差で説明できない残差変数を最もよく説明できる変数、つまり、FCT 差は目視による泡総合評価を説明するのに必要な測定値とみなせる。一方で、NIBEM 差、Sigma 差、Rudin 差は必要な変数として選択されてこなかった。この傾向は Fig. 8-11 で示したクラスター分析によって得られたデンドログラフの結果と同じである。この結果からも、今回開発した FCT 法が人間の視覚に近い泡持ち測定法であることが言える。重回帰予測値と泡総合評価差の関係の散布図を Fig. 8-12 に示した。

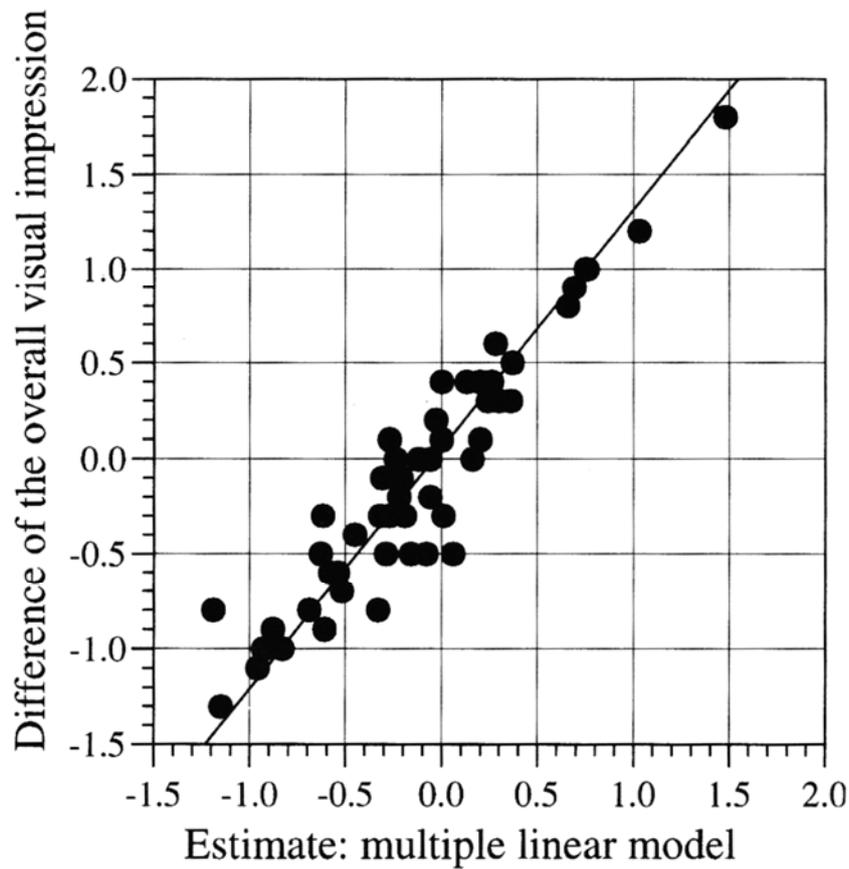


Fig. 8-12 Correlation between the difference in overall visual impression and estimated value using the Multiple linear model. Factors included the difference in foam collapse time (FCT) value, visual foamability, adhesion and creaminess. $r^2=0.89$, $n=50$.

8-4. 小括

“ビールの泡が良い・悪い”を最終的に判断するのは消費者であり、本来は主観的なものであるが、これまで消費者の視覚評価を客観的に数値化して実用となっている方法は存在していない。そこで、人間がビールを注ぐ動きを再現できる自動ビール注ぎ機を開発し、これによって注がれたビールの泡の様子を画像処理し、液表面が露出するまでの時間、注がれたビール量および生じた泡の比率から泡消失までの時間（Foam Collapse Time: FCT）を統計的に算出する事によって、消費者の視覚をシミュレートした泡持ち評価法を開発した。33名（男性21名、女性12名）のパネルを用いて人間がビールを注ぐ典型的な動きを解析した結果、内径6センチ、高さ9センチのグラスにビールを注ぐ条件として「注ぎ時間5.5秒、泡比率40%、注ぐビール重量150g」という条件を割り出した。このビール注ぎの条件を再現性良く実現する自動ビール注ぎ機を開発した。しかし、実際にはこの条件を厳密に満たすように壺からビールを注ぎ出すのは自動ビール注ぎ機をもってしても、壺誤差やビール流の乱れ等の不確定な要因により、制御は不可能であるため、泡比率 $40 \pm 10\%$ ・ビール重量 150 ± 5 g・注ぎ時間 5.5 ± 0.5 秒の範囲内で注がれたデータから得られる複数の測定値を用い、泡比率とビール重量を説明変数、泡崩壊時間を目的変数とする重回帰分析により得られる重回帰平面から統計的に泡比率40%・ビール重量150gに相当する点を推定して、これをFCT値とする方法を採る事とした。この方法を用いて、視覚評価パネルメンバー6名に手でグラスにビールを注いでもらい、目視で泡の品質を評価させ、泡総合評価（Overall Evaluation）、泡持ち（Stability）、泡立ち

（Foamability）、付着性（Adhesion）、キメ細かさ（Creaminess）の5項目について1～5段階で採点し、各項目共に6名の平均値を代表値として用いた。泡持ち（Stability）は泡がどれだけグラスの上に保持されるかに着目、泡立ち（Foamability）は注いだ後の泡立ち具合に着目、付着性（Adhesion）は泡が減少していく際にグラスの壁面にどれだけ付着するかに着目、キメ細かさ（Creaminess）は泡がどれだけクリーミーであるかに着目、そしてそれらを総合的に見てどれだけ泡品質が優れているかに着目して泡総合評価

（Overall Evaluation）を評価させた。実際には、個々の評点を絶対評価値として扱うの

は、日間の感覚のズレ等の影響から不適切と判断し、連続して注いだビール 2 点について、この 2 点の組合せの差を代表値として解析を行う事とした。相関行列（0 次相関）解析により、FCT 値差と最も高い相関を示したのは泡総合評価（Overall Evaluation）差で、次いで視覚による泡持ち（Stability）差で、FCT は視覚による泡持ち評価を反映していることが示された。さらに、泡総合評価に関係すると思われる変数、泡立ち

（Foamability）差、付着性（Adhesion）差、キメ細かさ（Creaminess）差の影響を排除した偏相関行列解析の結果、FCT 値差と泡総合評価（Overall Evaluation）差の相関係数は 0 次相関解析の結果と比較して上昇し、一方で FCT 値差と従来の泡持ち測定値との相関は低下した。これらの結果はクラスター分析によっても示され、今回開発した FCT 法は従来から用いられている泡持ち測定方法と比較して、より人間の視覚に近い泡持ち測定法であることが統計的にも示された。また重回帰分析の結果からもそれが裏付けられた。

第9章. 総括

ビールの泡に関する研究の最終目的は、消費者に提供する優れた泡品質を有する製品・商品の実現である。そのためには泡持ちにプラスに、あるいはマイナスに作用する成分や要素を特定し、最終製品の味や香り、また物的耐久性（混濁や噴き）に問題を起こすことなくその成分を制御し、より具体的には、原料を厳選し、製麦・醸造条件を最適化するべく製造プロセスを改善する事が必要となる。

我々は、まず泡持ちにプラスに関与すると報告されているビール中の高分子蛋白質の性質を調べるために、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) でビール中の蛋白質を分離し、泳動後のゲルから蛋白質を抽出し、マニュアルエドマン分解法およびカルボキシペプチダーゼによる酵素消化法を用いてアミノ末端およびカルボキシ末端の配列分析を行った。SDS-PAGE では分子量 40 kDa 近辺に独立したバンドを、10 kDa、8 kDa 近辺に双方が連続するようなブロードなバンドを検出した。40 kDa 蛋白質については既に報告されている大麦 Protein Z に由来する蛋白質の情報とほぼ一致した。一方、15 kDa 近辺から低分子に掛けて連続したブロードなバンドが存在し、10 kDa、8k Da 近辺に比較的濃いバンドが検出された。これらの蛋白質のアミノ酸組成や、アミノ末端、カルボキシ末端配列分析からは複数のアミノ酸配列が検出され、麦芽由来の蛋白分解酵素が製麦・仕込中に元々の蛋白質を部分的に酵素反応することで、断片化もしくはアミノ末端、カルボキシ末端が不揃いに酵素消化されたこと、さらにおもに麦汁煮沸中に当該蛋白質にメイラード反応が進行し、分子量的にも分布を持つ形で反応生成物が生じた結果とも考えられる。このような蛋白質のいずれがビールの泡持ちに関与していくかを明らかにする必要があることを示した。

泡持ちに関与する蛋白質を特定していくためには、原料のビール大麦に含まれる蛋白質が、製麦・仕込・発酵工程を経て最終ビールに至る醸造工程においてどのように移行していくかを把握する事が必要となる。SDS-PAGE を用いて調べたところ、仕込・発酵工程を経るにしたがって特定の蛋白質がビールに移行していく様子が観察された。とりわけ、40

kDa 付近の蛋白質は安定的に仕込工程を経て後工程に移行していた。また 14k Da 以下の低分子のブロードなバンドもビールへ移行していた。その中でも分子量 40 kDa の蛋白質は、そのアミノ酸組成や、免疫反応により大麦 Protein Z に由来することが確認されが。今後はこれらの蛋白質について泡持ちへの関与を確認していくことがビールの泡持ちに関する研究において必須要件となる。

泡持ちに関与すると考えられる代表的な物理的特性の中から、表面粘度に着目した物理化学的解析を行った。表面粘度計を用いた検討の結果、ビールの見かけの表面粘度 ($\mu\text{s a}$) は表面を形成してから経時的に増加することが判明し、泡持ちの良いビールほどその増加速度は大であった。また表面粘度を経時的に増加させる性質を強く持つビールほど泡持ちが良いことが示された。

ビール中の高分子蛋白質の性質をより詳しく調べるために、塩析、陽イオン・陰イオンクロマトグラフィーにより分画を行い、F1~F4 画分の 4 つの画分を得た。SDS-PAGE 分析結果、F1 画分が 10 kDa 近辺に比較的明瞭なバンドを示した一方、F2, F3 画分は其々 10 kDa, 15 kDa 以下の分子量ゾーンにブロードな分布を示した。また F4 画分は 40 kDa の分子量を持つ明瞭なバンドを示し、大麦 Protein Z 由来の蛋白質である事を免疫科学的に証明した。表面粘度計を用いた分析の結果、F4 画分に特異的に高い表面粘度増加速度を検出した。アミノ酸組成分析の結果、F4 画分は疎水性アミノ酸含量の比が比較的高いことが認められた。等電点については、F4 画分は 4 から 5 の比較的狭い酸性領域に分布していた。疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いた分析の結果、F4 画分が疎水性の高い蛋白質分子で構成されていることが明らかとなった。限外濾過により高分子蛋白質 (分子量 10,000 以上) を除去した限外濾過処理ビールに各画分を添加して泡持ちへの影響を調査したところ、F4 画分を添加したものが最も安定した泡持ちを示した。これらの結果から、酸性に等電点を有し、より疎水性が高く、表面粘度の高い分子の集合体である F4 画分の寄与度が高いことが示された。F4 画分の構成分子としては、大麦胚乳中に含まれる大麦 Protein Z であると類推でき、大麦 Protein Z の泡持ちへの寄与を強く示唆する結果となった。

蛋白質の疎水性が泡持ちに関連していることが推測されたが、これを直接的に検証するために、ビール中の高分子蛋白質を疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分画を行い、主として表面粘度を指標としてその性質を調べた。得られた4つの画分(H1~H4画分)のうち、最も疎水性の高いH4画分は分子量40 kDa付近および15 kDa以下の蛋白質から構成されており、前者は大麦40 kDa由来の蛋白質であることを免疫的に確認した。しかし、大麦40 kDa蛋白質由来の分子はH2, H3画分にも検出され、この事は大麦40 kDa蛋白質が製麦・醸造工程中に受けた変性により疎水性に幅を生じている事が明らかとなった。表面粘度の分析から、疎水性画分であるH4画分に高い表面粘度が認められ、またその性質は同じ分子種由来でもより疎水性の高い性質を持った分子の寄与が大きい事を明らかにした。泡持ちに寄与する蛋白質は分子種としては大麦Protein Zに由来する40 kDa蛋白質に着目すべきと同時に、疎水性の高さという要素でも泡持ち寄与蛋白質を捉え、原料や醸造工程をこれらの側面から評価を行い、品質の造り込みに反映させていくことが泡持ち改善に直結すると結論付けられる。

泡持ちにマイナスに寄与する要素として報告されている酵母の液胞に存在するProteinase A (PrA) について、合成ペプチド Succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methylcoumaryl-7-amide (Suc-R-P-F-H-L-L-V-Y-MCA)を用いたYokosawaらの方法を改変する事で、ビール中に含まれる種々の成分の影響を受けることなく同酵素の微弱な活性を選択的に再現性良く測定する方法を検討した。活性測定において問題となるブランクの高さ(ビール中に含まれる蛍光物質の存在)、およびPhotobleaching(光退色)を回避し、微弱なPrA活性をビール中の妨害物質の影響を受けることなく測定できる方法を考案した。併せてビール酵母よりPrAを精製し、熱処理ビールに添加し、保存後の泡持ち低下を測定した。3つの泡持ち測定法(Sigma法、NIBEM法、RUDIN法)の全ての評価法でPrAによる泡持ちの低下が認められた。また、酵母由来エンド型蛋白分解酵素の阻害剤を用いた添加試験の結果、PrBの影響は認められず、専らPrAによる影響で非熱処理ビールの保存中の泡持ち低下が生じていることを明らかにした。

“ビールの泡が良い・悪い”を最終的に判断するのは消費者であり、本来は主観的なも

のであるが、これまで消費者の視覚評価を客観的に数値化して実用となっている方法は存在していない。そこで、人間がビールを注ぐ動きを再現できる自動ビール注ぎ機を開発し、これによって注がれたビールの泡の様子を画像処理し、液表面が露出するまでの時間、注がれたビール量および生じた泡の比率から泡消失までの時間（Foam Collapse Time: FCT）を統計的に算出する事によって、消費者の視覚をシミュレートした泡持ち評価法を開発した。泡比率 $40 \pm 10\%$ ・ ビール重量 $150 \pm 5 \text{ g}$ ・ 注ぎ時間 5.5 ± 0.5 秒の範囲内で注がれたデータから得られる複数の測定値を用い、泡比率とビール重量を説明変数、泡崩壊時間を目的変数とする重回帰分析により得られる重回帰平面から統計的に泡比率 40% ・ ビール重量 150 g に相当する点を推定して、これを FCT 値とする方法を採用した。この方法を用いて、視覚評価パネルメンバー6名に手でグラスにビールを注いでもらい、目視で泡の品質を評価させ、泡総合評価（Overall Evaluation）、泡持ち（Stability）、泡立ち（Foamability）、付着性（Adhesion）、キメ細かさ（Creaminess）の5項目について1~5段階で採点し、各項目共に6名の平均値を代表値として用いた。実際には、個々の評点を絶対評価値として扱うのは、日間の感覚のズレ等の影響から不適切と判断し、連続して注いだビール2点について、この2点の組合せの差を代表値として解析を行う事とした。相関行列（0次相関）解析により、FCT 値差と最も高い相関を示したのは泡総合評価（Overall Evaluation）差で、次いで視覚による泡持ち（Stability）差で、FCT は視覚による泡持ち評価を反映していることが示された。さらに、泡総合評価に關係すると思われる変数、泡立ち（Foamability）差、付着性（Adhesion）差、キメ細かさ（Creaminess）差の影響を排除した偏相関行列解析の結果、FCT 値差と泡総合評価（Overall Evaluation）差の相関係数は0次相関解析の結果と比較して上昇し、一方でFCT 値差と従来の泡持ち測定値との相関は低下した。これらの結果はクラスター分析によっても示され、今回開発した FCT 法は従来から用いられている泡持ち測定方法と比較して、より人間の視覚に近い泡持ち測定法であることが統計的にも示された。また重回帰分析の結果からもそれが裏付けられた。

以上に総括した通り、消費者に提供する優れた泡品質を有する製品・商品を作るためには、プラス因子としての高分子蛋白質の物理化学的性質（特に蛋白質の疎水性）を知ること、原料を吟味し、醸造工程を最適化する事で泡持ちの改善が期待される。またマイナス因子として酵母液胞由来蛋白分解酵素の活性を正確に測定する事で、はじめて醸造工程の最適化を行い、マイナス因子を抑制することが可能となる。泡品質を総合的に評価するには人間の視覚に近い方法を採用する事で、従来の泡持ち測定法よりもより現実に即した評価が可能となり、有効な泡持ち改善のための重要な手段として活用する事が可能である。

S. Yokoi and A. Tsugita, "Characterization of Major Proteins and Peptides in Beer", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 46, No. 4, pp. 99-103, 1988.

S. Yokoi, K. Yamashita, N. Kunitake and S. Koshino, "Hydrophobic Beer Proteins and Their Function in Beer Foam", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 52, No. 3, pp. 123-126, 1994.

S. Yokoi, T. Shigyo and T. Tamaki, "A Fluorometric Assay for Proteinase A in Beer and its Application for the Investigation of Enzymatic Effects of Foam Stability", *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 102, Jan-Feb, pp. 33-37, 1996.

K. Maeda, S. Yokoi, K. Kamada and M. Kamimura, "Foam Stability and Physicochemical Properties of Beer", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 49, No. 1, pp.14-18, 1991.

K. Yasui, S. Yokoi, T. Shigyo, T. Tamaki and K. Shinotsuka, "A Customer-Oriented Approach to the Development of a Visual and Statistical Foam Analysis", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, Vol. 56, No. 4, pp. 152-158, 1998.

T. Kaneko, N. Hirota, S. Yokoi, R. Kanatani and K Ito, "Molecular Marker for Protein Z Content in Barley (*Hordeum vulgare* L.)", *Breeding Science*, Vol. 49, pp. 69-74, 1999.

謝 辞

本学位論文の執筆に当たりご指導を賜りました、静岡大学グリーン科学技術研究所 河岸洋和教授、静岡大学農学部 徳山真治准教授、静岡大学農学部 森田達也教授、静岡大学グリーン科学技術研究所 朴龍洙教授、静岡大学農学部 平井浩文教授に深謝申し上げます。

本研究を遂行するに当たり、サッポロビール株式会社醸造技術研究所において共同研究を遂行してくれた前田雄明氏、故 安井和久氏、山下和之氏に感謝申し上げます。

出向先にて研究指導を賜りました東京理科大学理学部化学科 故 次田皓教授に感謝申し上げます。

サッポロビール株式会社醸造技術研究所において上司として指導を賜りました、国武直之氏、執行達郎氏に感謝申し上げます。

研究の遂行に当たり終始サポートを賜りましたサッポロビール株式会社の歴代経営幹部の皆様にご心より感謝申し上げます。

引用文献

- [1] 坂口謹一郎, “泡はビールなりやの裁判における裁判所提出の答申書,” 昭和 17 年 1 月.
- [2] 端田晶, “とりあえず、ビール 続・酒と酒場の耳学問,” 2009.
- [3] C. W. Bamforth, "Foam", ASBC Handbook Series: Practical Guided for Beer Quality.
- [4] D. E. Evans and C. W. Bamforth, "Beer Foam: Achieving a Suitable Head." in *Beer: A Quality Perspective.*, Elsevier, Burlington, MA., 2009, pp. 1-60.
- [5] 小山内州一, “泡の化学”, オレオサイエンス, 第 卷 1, 第 8, 2001.
- [6] A. D. Ronteltap, M. Hollemans, C. G. J. Bisperink and A. Prins, "Beer Foam Physics", *Master Brewers Association of the Americas*, vol. 28, pp. 25-32, 1991.
- [7] A. Prins and J. T. van Marle, "Some Physics behind it.", *Beer Foam Quality*, Vols. Monograph 27. Amsterdam, The Netherlands; Fachverlag Hans Carl, Nurnberg., pp. 26-36, 1999.
- [8] C. W. Bamforth, "The Relative Significance of Physics and Chemistry for Beer Foam Excellence: Theory and Practice", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 110, pp. 259-266, 2004.
- [9] L. T. Lusk, G. R. Duncombe, S. B. Kay, A. Navarro and D. Ryder, "Barley β -glucan and Beer Foam Stability", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 59, pp. 183-186, 2001.
- [10] J. Blom, "Investigations of Foam", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 43, pp. 251-262, 1937.
- [11] S. Ross and G. L. Clark, "On the Measurement of Foam Stability with Special Reference to Beer", *Wallerstein Communications*, vol. 6, pp. 46-54, 1939.
- [12] A. D. Rudin, "Measurement of the Foam Stability of Beers", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 63, pp. 506-509, 1957.
- [13] P. St John-Coghlan, J. Woodrow, C. W. Bamforth and E. Hinchliffe, "Polypeptides with Enhanced Foam Potential", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 98, pp. 207-213, 1992.
- [14] J. K. S. Hung, C. E. Wallin and C. W. Bamforth, "An Evaluation of an Automated Procedure for Measuring Beer Foam Stability", *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, vol. 42, pp. 178-183, 2005.
- [15] American Society of Brewing Chemists, "Beer 22. Foam Collapse Rate: A. Sigma Value Method", *Methods of Analysis, 14th Edition*.
- [16] J. N. Rasmussen, "Automated Analysis of Foam Stability", *Carlsberg Research Communication*, vol. 46, pp. 25-36, 1981.
- [17] W. J. Klopper, "Foam Stability and Foam Cling", *Proceedings of the European Brewing Convention, Salzburg*, vol. 14, pp. 363-371, 1973.

- [18] M. Constant, "A Practical Method for Characterizing Poured Beer Quality", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 50, pp. 37-47, 1992.
- [19] K. Yasui, S. Yokoi, T. Shigyo, T. Tamaki and K. Shinotsuka, "Customer-oriented Approach to the Development of a Visual and Statistical Foam Analysis", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 56, pp. 152-158, 1998.
- [20] I. M. P. L. O. Ferreira, K. Jorge, L. C. Nogueira, F. Silva, L. C. Trugo, "Effects of the Combination of Hydrophobic Polypeptides, Iso- α -acides and Malt-oligosaccharides on Beer Foam Stability", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 4976-4981, 2005.
- [21] G. R. Knapp and C. W. Bamforth, "The Foaming Properties of Proteins Isolated from Barley", *Journal of the Science Food and Agriculture*, vol. 82, pp. 1276-1281, 2002.
- [22] G. Jackson and C. W. Bamforth, "The Measurement of Foam-lacing", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 88, pp. 378-381, 1982.
- [23] L. Narziss, *Abriss der Bierbrauerei*, 7. Auflage, November 2004.
- [24] L. Narziss and W. Back, *Die Bierbrauerei: Band 2: Die Technologie der Würzebereitung*, 8 Auflage, March 2012.
- [25] W. Kunze, *Technology Brewing and Malting: 5th revised English Edition*, August 2014.
- [26] C. W. Bamforth, "The Forming Properties of Beer", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 91, pp. 370-383, 1985.
- [27] K. Asano and N. Hashimoto, "Isolation and Characterization of Foaming Proteins of Beer", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 38, pp. 129-137, 1980.
- [28] C. W. Bamforth, *Scientific Principles of Malting and Brewing*, American Society of Brewing Chemists, St. Paul, NM, 2006.
- [29] D. W. Diffor, S. T. Lickens, A. J. Rehberger and R. J. Gurkhardt, "The Effect of Isohumuron/Isocohumulone Ratio on Beer Head Retention", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 36, pp. 63-65, 1978.
- [30] A. D. Rudin, "Effect of Nickel on the Foam Stability of Beers in Relation to their Iso-humurone Contents", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 64, pp. 238-239, 1958.
- [31] K. C. Stowell, "The Effect of Various Cereal Adjustments on the Head Retention Properties of Beer", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Helsinki*, pp. 507-513, 1985.
- [32] H. M. Archibald, "Beer Foam Getting Ahead", *The Brewer*, vol. 74, pp. 295-300, 1988.
- [33] L. T. Lusk, H. Goldstein and D. Ryder, "Independent Role of Beer Proteins,

- Melanoidins and Polysaccharides in Foam Formation", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 53, pp. 93-103, 1995.
- [34] D. E. Evans, "The Importance of Protein Z to the Quality of Barley and Malt for Brewing", *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, vol. 25, pp. 225-232, 1995.
- [35] L. T. Lusk, G. R. Duncombe, S. B. Kay, A. Navarro and D. Ryder, "Barley β -Glucan and Beer Foam Stability", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 59, pp. 183-186, 2001.
- [36] H. Hug and H. Pfenninger, "Improvement of Beer Filterability using Heat Stable β -Glucanase", *Brauerei Rundschau*, vol. 91, pp. 61-65, 1980.
- [37] D. K. Sarker, P. J. Wilde and D. C. Clarke, "Enhancement of Protein Foam Stability by Formation of Wheat Arabinoxylan-protein Crosslinks", *Cereal Chemistry*, vol. 75, pp. 493-499, 1998.
- [38] D. E. Evans and M. C. Sheehan, "Do Not be Fobbed Off, the Substance of Beer Foam", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 60, pp. 47-57, 2002.
- [39] C. W. Bamforth, "Bringing Matters to a Head: The Status of Research on Beer Foam", *European Brewing Convention Monograph*, Vols. XXVII, Amsterdam, pp. 10-23, 1999.
- [40] R. Kalla, K. Shimamoto, R. Potter, S. P. Nielsen, C. Linnestad and O. A. Olsen, "The Promoter of Barley Aleurone-specific Gene Encoding a Putative 7kDa Lipid Transfer Protein", *Plant Journal*, vol. 6, pp. 849-860, 1994.
- [41] J. Mundy and J. C. Rogers, "Selective Expression of a Probable Amylase/Protease Inhibitor in Barley Aleurone Cells: Comparison to the Barley Amylase/Subtilisin Inhibitor", *Planta*, vol. 169, pp. 51-63, 1986.
- [42] B. Svensson, K. Asano, I. Jonassen, F. M. Poulsen, J. Mundy and I. Svendsen, "A 10kDa Barley Seed Protein Homologous with an α -Amylase Inhibitor from Indian Finger Millet", *Carlsberg Research Communication*, vol. 51, pp. 493-500, 1986.
- [43] L. T. Lusk, P. Ting, H. Goldstein, D. Ryder and A. Navarro, "Foam Tower Fractionation of Beer Proteins and Bittering Acids", *European Brewing Convention Monograph*, XXVII, Amsterdam, pp. 166-187, 1999.
- [44] L. M. Bech, P. Vaag, B. Heinemann and K. Breddam, "Throughout the Brewing Process Barley Lipid Transfer Protein 1 is transformed into a more Foam-promoting Form", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Brussels*, vol. 25, pp. 561-568, 1995.
- [45] L. T. Lusk, H. Goldstein, H. Watts, A. Navarro and D. Ryder, "Monitoring Barley Lipid Transfer Protein Levels in Barley, Malting and Brewing", *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Budapest*, vol. 28,

- pp. 663-672, 2001.
- [46] G. Stanislava, "Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Proteins (ns-LTPs) in Beer Production and Quality", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 113, pp. 310-324, 2007.
- [47] L. Perrocheau, B. Bakan, P. Boivin and D. Marion, "Stability of Barley and Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) towards the Heating and Reducing Agents: Relationships with the Brewing Process", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, pp. 3108-3113, 2006.
- [48] S. N. E. van Nierop, D. E. Evans, B. C. Axcell, I. C. Cantrell and M. Rautenbach, "The Impact of Different Wort Boiling Temperature on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp. 3120-3129, 2004.
- [49] S. B. Sorensen, L. M. Beck, M. Muldberg, T. Beengeldt and K. Breddam, "Barley Lipid Transfer Protein 1 is involved in Beer Foam Formation", *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly.*, vol. 30, pp. 135-145, 1993.
- [50] M. Kreis and P. R. Shewry, "The Control of Protein Synthesis in Developing Barley Seeds" in *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, C. A. B. International: London, 1992, pp. 319-333.
- [51] K. Asano, K. Shinagawa and N. Hashimoto, "Characterization of Haze-forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 40, pp. 147-154, 1982.
- [52] M. C. Sheehan and J. H. Skerritt, "Identification and Characterization of Beer Polypeptides derived from Barley Hordeins", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 103, pp. 297-306, 1997.
- [53] P. Vaag, M. L. Bech, V. Cameron-Mills and I. Svendsen, "Characterization of a Beer Protein originating from Barley", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Cannes*, vol. 27, pp. 157-166, 1999.
- [54] J. A. Kauffman, E. N. C. Mills, G. M. Brett, R. J. Fido, A. S. Tatham, P. R. Shewry, A. Onishi, M. Promtlor and R. A. Morgan, "Immunological Characterization of Barley Peptides in Larger Foam", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 66, pp. 345-355, 1994.
- [55] E. N. C. Mills, J. A. Kauffman, M. R. A. Morgan, J. M. Field, J. Hejgaard, M. O. Proudlore and A. Onishi, "Immunological Study of Hydrophobic Polypeptides in Beer", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, pp. 4475-4485, 1998.
- [56] J. Hejgaard, "Origin of Dominant Beer Protein Immunochemical Identity with β -Amylase-associated Protein from Barley", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 83, pp. 94-96, 1977.
- [57] P. Kaersgaard and J. Hejgaard, "Antigenic Beer Macromolecules, an Experimental Survey of Purification Methods", *Journal of the Institute of*

- Brewing*, vol. 53, pp. 194-195, 1979.
- [58] E. Fasoli, G. Aldini, L. Regazzoni, A. V. Kravchuk, A. Citterio and P. G. Righetti, "Les Maitres de l'Orge: The Proteome Content of Your Beer Mug", *Journal of Proteome Research*, vol. 9, pp. 5262-5269, 2010.
- [59] H. Konecna, L. S. Muller, H. Dosoudilova, D. Potesil, J. Bursikova and O. Sedo, "Exploration of Beer Proteome using OFFGEL Prefractionation in Combination with Two-dimensional Gel Electrophoresis with Narrow pH Range Gradients", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, pp. 2418-2426, 2012.
- [60] D. E. Evans and J. Hejgaard, "The Impact of Malt derived Proteins of Beer Foam Quality. Part 1. The Effect of Germination and Kilning on the Level of Protein Z4, Protein Z7 and LTP1", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 105, pp. 159-169, 1999.
- [61] J. Hejgaard and P. Kaersgaard, "Purification and Properties of the Major Antigenic Beer Protein of Barley Origin", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 89, pp. 402-410, 1983.
- [62] S. Yokoi, K. Maeda, K. Kamada and M. Kamimura, "Characterization of Beer Proteins Responsible for the Foam of Beer", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Zurich*, vol. 22, pp. 593-600, 1989.
- [63] C. Dale and T. W. Young, "Rapid Methods for Determining the High Molecular Weight Polypeptide Components of Beer", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 93, pp. 465-467, 1987.
- [64] A. C. Douma, H. C. Mocking-Bode, M. Kooijman, E. Stolzenbach, R. Orsel, A. C. A. P. A. Bekkers and S. A. G. F. Angelino, "Identification of Foam-Stabilizing Proteins in the Condition of Normal Beer Dispense and Their Biochemical and Physicochemical Properties", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Maastricht*, vol. 26, pp. 671-679, 1997.
- [65] D. E. Evans, M. C. Sheehan and D. C. Stewart, "The Impact of Malt Derived Proteins on Beer Foam Quality. Part II: The Influence of Malt Foam-positive Proteins and Non-starch Polysaccharides on Beer Foam Quality", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 105, pp. 171-177, 1999.
- [66] D. E. Evans, M. C. Sheehan, R. L. Tolhurst, J. S. Skerritt, A. Hill and A. R. Barr, "Application of Immunological Methods to Differentiate between Foam-positive and Haze Active Proteins originating from Malt", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 61, pp. 55-62, 2003.
- [67] C. E. Gibson, D. E. Evans and M. O. Proudlove, "Protein Z4 and Beer Foam", *Ferment*, vol. 9, pp. 81-84, 1996.
- [68] M. Hollemans and A. R. J. M. Tonies, "The Role of Specific Proteins in Beer Foam", *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Zurich*, vol. 22, pp. 561-568, 1989.

- [69] D. E. Evans, R. Nischwitz, D. C. Stewart, N. Cole and L. C. MacLeod, "The Influence of Malt Foam-positive Proteins and Non-starch Polysaccharides on Beer Foam Quality", *European Brewery Convention Monograph*, Vols. XXVII, Amsterdam, pp. 114-128, 1999.
- [70] T. Kaneko, N. Hirota, S. Yokoi, R. Kanatani and K. Ito, "Molecular Marker for Protein Z Content in Barley (*Hordeum vulgare L.*)," *Breeding Science*, vol. 49, pp. 69-74, 1999.
- [71] D. C. Clark, P. J. Wilde and D. Marion, "The Protection of Beer Foam against Lipid-introduced Destabilization", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 100, pp. 23-25, 1994.
- [72] K. J. Morris and J. S. Hough, "Lipid-protein Interactions in Beer and Beer Foam Brewed with Wheat Flour", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 45, pp. 43-47, 1987.
- [73] A. Onishi, E. Canterranne, E. Clarke and M. O. Proudlove, "Barley Lipid Binding Proteins: Their Role in Beer Stabilization" *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Brussels*, vol. 25, pp. 553-560, 1995.
- [74] D. J. Cooper, F. A. Husband, E. N. C. Mills and P. J. Wilde, "Role of Beer Lipid-binding Proteins Preventing Lipid Destabilization of Foam", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, pp. 7645-7650, 2002.
- [75] J. P. Douliez, T. Michon, K. Elmorjani and D. Marion, "Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Transfer Proteins from Cereal Kernels", *Journal of Cereal Science*, vol. 32, pp. 1-20, 1999.
- [76] P. J. Wilde, D. C. Clarke and D. Marion, "Influence of Competitive Adsorption of a Lysopalmitoil-phosphalidyldoline on the Functional properties of Puroindoline A Lipid Binding Protein isolated from Wheat Flour", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 41, pp. 1570-1576, 1993.
- [77] F. Kühlbech, W. Back and M. Krottenthaler, "Influence of Lauter Turbidity on Composition, Fermentation Performance and Beer Quality - A Review", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 112, pp. 215-221, 2006.
- [78] F. Kühlbech, W. Back and M. Krottenthaler, "Influence of Lauter Turbidity on Wort Composition, Fermentation Performance and Beer Quality in Large-scale Trials", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 112, pp. 222-231, 2006.
- [79] C. W. Bamforth, "How Important is Wort Clarity?", *Brewers' Guardian*, vol. 131, pp. 26-28, 2002.
- [80] P. T. Slack and C. W. Bamforth, "The Fractionation of Polypeptides from Barley and Beer by Hydrophobic Interaction Chromatography: The Influence of their Hydrophobicity on Foam Stability", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 89, pp. 397-401, 1983.

- [81] A. Onishi and M. O. Proudlove, "Isolation of Beer Foam Polypeptides by Hydrophobic Interaction Chromatography and their Partial Characterization", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 65, pp. 233-240, 1994.
- [82] S. Yokoi, K. Yamashita, N. Kunitake and S. Koshino, "Hydrophobic Beer Proteins and their function in Beer Foam", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 52, pp. 123-126, 1994.
- [83] J. Hao, Q. Li, J. Dong, J. Yu, W. Fan and J. Chen, "Identification of the Major Proteins in Beer Foam by Mass Spectrometry following Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 64, pp. 166-174, 2006.
- [84] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitization of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-dye Binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 108, pp. 424-433, 1976.
- [85] M. J. Lewis, S. C. Krumland and D. J. Muhleman, "Dye-binding Method for Mearsurement of Protein in Wort and Beer", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 38, pp. 37-41, 1980.
- [86] V. Hii and W. C. Herwig, "Determination of High Molecular Weight Protein in Beer using Coomassie Blue", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 40, pp. 46-50, 1982.
- [87] S. J. Compton and C. J. Jones, "Mechanism of Dye Response and Interference in Bradford Protein Assay", *Analytical Biochemistry*, vol. 151, pp. 369-374, 1985.
- [88] K. J. Siebelt and P. Y. Lynn, "Mechanism of Beer Colloidal Stabilization", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 55, pp. 73-78, 1977.
- [89] K. M. Williams, P. Fox and T. Marshall, "A Comparison of Protein Assays for the Determination of the Protein Concentration of Beer", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 101, pp. 365-369, 1995.
- [90] C. W. Bamforth, E. Canterranne, P. Chandley and A. Onishi, "The Molecular Interaction of Beer Foam", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Oslo*, vol. 24, pp. 331-340, 1993.
- [91] C. W. Bamforth, "Foam, Myth or Magic", *The Brewer*, vol. 81, pp. 396-399, 1995.
- [92] C. W. Bamforth, G. R. Knapp and J. E. Smythe, "The Measurement of Hydrophobic polypeptides in Beer using the Fluorochrome 1-anilino-8-naphthalenesulfonate", *Food Chemistry*, vol. 75, pp. 377-383, 2001.
- [93] R. Letters, "Lipids in Brewing, Friend of Foe?", *Ferment*, vol. 5, pp. 268-274, 1992.
- [94] P. H. Blum, "Lipids in Malting and Brewing", *Brewers Digest*, vol. 44, pp. 58-63, 1969.
- [95] B. J. Anness and R. J. R. Reed, "Lipids in Wort", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 91, pp. 313-317, 1985.

- [96] L. Narziss, H. Miedaner, H. Graft, P. Eichhorn and S. Lusting, "Technological Approach to Improve Flavour Stability", *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, vol. 30, pp. 48-53, 1993.
- [97] P. J. Wilde, F. A. Husband, D. Cooper, M. J. Ridout, R. E. Muller and E. N. C. Mills, "Destabilization of Beer Foam by Lipids: Structural and Interfacial Effects", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 61, pp. 196-202, 2003.
- [98] C. W. Bamforth and G. Jackson, "Aspects of Foam Lacing", *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, London*, vol. 19, pp. 331-338, 1983.
- [99] N. Kobayashi, H. Kaneda, H. Kuroda, M. Kobayashi, T. Kurihara, J. Watari and K. Shinotsuka, "Simultaneous Determination of Mono-, di- and trihydroxyoctadecenoic Acids in Beer and Wort", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 106, pp. 107-110, 2000.
- [100] N. Kobayashi, H. Kaneda, H. Kuroda, M. Kobayashi, T. Kurihara, J. Watari and K. Shinotsuka, "Behavior of Mono-, di- and trihydroxyoctadecenoic Acids during Mashing and Methods of Controlling their Production", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 90, pp. 69-73, 2000.
- [101] N. Kobayashi, S. Segawa, S. Umemoto, H. Kuroda, K. Mitani and J. Watari, "A New Method for Evaluating Foam-damage Effect by Free Fatty Acids", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 60, pp. 37-41, 2002.
- [102] H. Kuroda, N. Kobayashi, H. Kaneda, J. Watari and M. Takashio, "Characterization of Factors that Transform Linoleic Acid into di- and trihydroxyoctadecenoic Acids in Mash", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 93, pp. 73-77, 2002.
- [103] E. Reicheneder and L. Narziss, "Untersuchung über die Schaumshädigung des Biere durch Hefeproteinase", *Brauwelt*, vol. 127, pp. 956-963, 1987.
- [104] F. Meussdoerffer, P. Tortora and H. Holzer, "Purification and Properties of Proteinase A from Yeast", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, pp. 12087-12093, 1980.
- [105] T. Dreyer, K. Biedermann and M. Ottesen, "Yeast Proteinase in Beer", *Carlsberg Research Communication*, vol. 48, pp. 249-253, 1983.
- [106] T. Dreyer, B. Halkier, I. Svendsen and Ottesen, "Primary Structure of the Aspartic Proteinase A from *Saccharomyces cerevisiae*", *Carlsberg Research Communication*, vol. 51, pp. 27-41, 1986.
- [107] I. H. L. Ormrod, E. F. Lalor and F. R. Sharpe, "The Release of Yeast Proteolytic Enzymes into Beer", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 97, pp. 441-443, 1991.
- [108] M. Muldbjerg, M. Meldal, K. Breddam and P. Sigsgaard, "Protease Activity in Beer and Correlation of Foam", *Proceedings of the European Brewery*

- Convention Congress, Oslo*, vol. 25, pp. 357-346, 1993.
- [109] H. Kondo, H. Yomo, S. Furukubo, N. Fukui, K. Nakatani, Y. Kawasaki, "Advanced Method for Measuring Proteinase A in Beer and Application to Brewing", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 105, pp. 293-300, 1999.
- [110] H. Kondo, H. Yomo, S. Furukubo, Y. Kawasaki and K. Nakatani, "Advanced Method for Measureing Proteinase A in Beer", *Proceedings of the 25th Convention, The Institute of Brewing, Asia Pacific Section, Perth*, vol. 25, pp. 119-124, 1998.
- [111] S. Yokoi, T. Shigyo and T. Tamaki, "A Fluorometric Assay for Proteinase A in Beer and its Application for the Investigation of Enzymatic Effects on Foam Stability", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 102, pp. 33-37, 1996.
- [112] K. Saeki, A. Suyama, K. Takegawa, K. Sato and T. Shigyo, "Analysis of Beer Foam Atability-affecting Vacuolar Protease PrA and its Relevant Proteins" in American Society of Brewing Chemists Annual Meeting, 2014.
- [113] C. Shimizu, S. Yokoi, T. Shigyo and S. Koshino, "The Mechanism Controlling the Decrease in Beer Foam Stability using Proteinase A", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Brussels*, vol. 25, pp. 569-576, 1995.
- [114] T. Iimure, N. Nankaku, N. Hirota, Z. Tiansu, T. Hoki, M. Kihara, H. Hayashi, K. Ito and K. Sato, "Construction of a Novel Beer Proteome Map and its Use in Beer Quality Control", *Food Chemistry*, vol. 118, pp. 566-574, 2010.
- [115] T. Iimure and K. Sato, "Beer Proteomics Analysis for Beer Quality Control and Malting Barley Breeding", *Food Research International*, vol. 54, pp. 1013-1020, 2013.
- [116] T. Iimure, M. Kihara, S. Ichikawa, K. Ito, K. Takeda and K. Sato, "Development of DNA Markers Associated with Beer Foam Stability for Barley Breeding", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 122, pp. 199-210, 2011.
- [117] T. Iimure, T. Kimura, T. Araki, M. Kihara, M. Sato, S. Yamada, T. Shigyou and K. Sato, "Mutation Analysis of Barley Malt Protein Z4 and Protein Z7 on Beer Foam Stability", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, pp. 1548-1554, 2012.
- [118] Y. Okada, T. Iimure, K. Takoi, T. Kaneko, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito, K. Sato and K. Takada, "The influence of Barley Malt Protein Modification on Beer Foam Stability and their Relationship to the Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-I (BDAI-I) as a Possible Foam-promoting Protein", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, pp. 1458-1464, 2008.
- [119] T. Iimure, M. Kihara, K. Sato and K. Ogushi, "Purification of Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-I (BDAI-I) and Avenin-like Protein-A (ALP) from Beer and their Impact on Beer Foam Stability", *Food Chemistry*, vol. 172, pp. 257-264, 2015.

- [120] T. Iimure, K. Takoi, T. Kaneko, M. Kihara, K. Hayashi, K. Ito, K. Sato and K. Takada, "Novel Prediction Method of Beer Foam Stability using Protein Z, Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-I (BDAI-I) and Yeast Thioredoxin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, pp. 8664-8671, 2008.
- [121] T. Iimure, T. Zhou and T. Hoki, "Development of CAPS Markers and its Use for Malting barley Breeding" in *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology*, Nova Science Publishers, pp. 151-166, 2014.
- [122] 飯牟礼 隆, 木原 誠, 佐藤 和, “ビールの泡持ちに関連するオオムギ育種用 DNA マーカーの開発,” *ブレインテクノニュース*, 第 138 巻, pp. 7-11, 2010.
- [123] 飯牟礼 隆, 木原 誠, 佐藤 和, “ビールの泡持ちに関連する大麦タンパク質と DNA マーカー,” *バイオサイエンスとインダストリー*, 第 69 巻, pp. 31-34, 2011.
- [124] 佐藤 和, 飯牟礼 隆, “オオムギのゲノムとビールのプロテオーム,” *Foods & Food Ingredients J. Jpn*, 第 218 巻, pp. 331-337, 2013.
- [125] 飯牟礼 隆, “プロテオーム解析に基づくビールオオムギ品質選抜法の開発,” *育種学研究*, 第 17 巻, pp. 139-143, 2015.
- [126] D. J. Cooper, G. G. Stewart and J. H. Bryce, "Hydrophobic Polypeptide Extraction during High Gravity Mashing-experimental Approach for its Improvement", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 104, pp. 283-287, 1998.
- [127] G. G. Stewart, A. Mader, P. Chlup and M. Miedl, "The Influence of Process Parameters on Beer Foam Stability", *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, vol. 43, pp. 47-51, 2006.
- [128] J. J. Palmer, "How the Mash Works" in *How to Brew: Everything You Need to Know to Brew Beer Right the First Time*, Brewers Association: Boulder, CO., 2006, pp. 141-152.
- [129] D. E. Evans, H. M. Collins, J. K. Eglinton and A. Wilhelmson, "Assessing the Impact of the Level of Diastatic Power Enzymes and their Thermostability on the Hydrolysis of Starch during Wort Production to Predict Malt Fermentability", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 63, pp. 185-198, 2005.
- [130] B. L. Jones, "Endoproteinases of Barley and Malt", *Journal of Cereal Science*, vol. 42, pp. 139-156, 2005.
- [131] S. Furukubo, M. Shobayashi, N. Fukui, A. Isoe and K. Nakatani, "A New Factor which Effects the Foam Adhesion of Beer", *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, vol. 30, pp. 155-158, 1993.
- [132] P. B. Swarcz and R. E. Pyler, "Lipoxygenase and Hydroperoxide Isomerase Activity of Malting Barley", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 42, pp. 47-53, 1984.
- [133] N. Kobayashi, H. Kaneda, Y. Kano and S. Koshino, "Behaviour of Lipid Hydroperoxides during Mashing", *Journal of the American Society of Brewing*

- Chemists*, vol. 52, pp. 141-145, 1994.
- [134] G. Yang and P. B. Schwarz, "Activity of Lipoxygenase Isoenzymes during Malting and Mashing", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 53, pp. 45-49, 1995.
- [135] H. Kuroda, N. Kobayashi, H. Kaneda, J. Watari and M. Takashio, "Characterization of Factors that Transform Linoleic Acid into di and trihydroxyoctadecenoic Acids in Mash", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 93, pp. 73-77, 2002.
- [136] Y. Ishibashi, Y. Terano, N. Fukui, N. Honbou, T. Kakui, S. Kawasaki and K. Nakatani, "Development of a Novel Method for Determining Beer Foam and Haze Proteins by using Immunochemical Method - ELISA", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 54, pp. 177-182, 1996.
- [137] L. Narziss, E. Reicheneder and D. Barth, "Investigations on the Effect of Glycoproteidase on Foam Properties of Foam", *Monatsschrift fur Brauwissenschaft*, vol. 35, pp. 275-285, 1982.
- [138] L. Narziss, E. Reicheneder and D. Barth, "Concerning the Influence of High Molecular Protein Fractions and Glycoproteins on Beer Foam with Particular Emphasis on Technological Procedures", *Monatsschrift fur Brauwissenschaft*, vol. 35, pp. 213-223, 1982.
- [139] Y. Kano and M. Kamimura, "Simple Methods for Determination of the Molecular Weight Distribution of Beer Proteins and Their Application to Foam and Haze Studies", *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 51, pp. 21-28, 1993.
- [140] S. Jegou, J. -P. Douliez, D. Molle, P. Boivin and D. Marion, "Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, pp. 4942-4949, 2001.
- [141] R. T. Roberts, "Glycoproteins and Beer Foam", *European Brewery Convention Congress*, vol. 15, pp. 453-464, 1975.
- [142] A. -A. Townsend and S. Nakai, "Relationship between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins", *Journal of Food Science*, vol. 48, pp. 588-594, 1983.
- [143] M. Le Mestre, B. Colas, D. Simatos, B. Closs, J. L. Courthaudon and D. Lorient, "Contribution of Protein Flexibility to the Foaming Properties of Casein", *Journal of Food Science*, vol. 55, pp. 1445-1447, 1990.
- [144] A. Curioni, G. Pressi, L. Furegon, A. D. B. Peruffo, "Major Proteins of Beer and their Precursors in Barley: Electrophoretic and Immunological Studies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, pp. 2620-2626, 1995.
- [145] S. N. E. van Nierop, D. E. Evans, B. C. Axcell and I. C. Cantrell, "Studies on Beer Foam Proteins in a Commercial Brewing Process", *Proceedings of the 27th*

- Convention, The Institute of Brewing, Asia Pacific Section, Adelaide*, Paper 14, 2002.
- [146] Y. Han, J. Wang, Y. Li, Y. Hang, X. Yin and Q. Li, "Circular Dichroism and Infrared Spectroscopic Characterization of Secondary Structure Components of Protein Z during Mashing and Boiling Process", *Food Chemistry*, vol. 188, pp. 201-209, 2015.
- [147] J. Andrews and B. C. Axcell, "Wort Boiling-evaporating the Myths of the Past", *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, vol. 40, pp. 249-254, 2003.
- [148] S. N. E. van Nierop, D. E. Evans, B. C. Axcell and I. C. Cantrell, "Studies on Beer Foam Proteins in a Commercial Brewing Process", *Proceedings of the 27th Convention, The Institute of Brewing, Asia Pacific Section, Adelaide*, vol. Paper 14, 2002.
- [149] A. D. Haukeli, T. O. Wulff and S. Lie, "Practical Experiments to Improve Foam Stability", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Oslo*, vol. 24, pp. 365-372, 1993.
- [150] H. Kondo, Y. Shibano, N. Fukui, K. Nakatani, K. Oda and T. Amachi, "Development of A Novel and Sensitive Method for Measurement of Proteinase A in Beer", *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Brussels*, vol. 25, pp. 669-676, 1995.
- [151] U. K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- [152] A. Tsugita, T. Ataka and T. Uchida, "Approaches for Submicrosequencing", *Journal of Protein Chemistry*, vol. 6, pp. 121-130, 1987.
- [153] A. Tsugita and J. J. Scheffler, "A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid", *European Journal of Biochemistry*, vol. 124, pp. 585-588, 1982.
- [154] T. Isobe, M. Yanagida, A. Boosman and A. Tsugita, "Characterization of the Morphogenesis-dependent Cleavage Region of the Major Capsid Protein (P23) of Bacteriophage T4; Sequence of an Amber Fragment of P23", *Journal of Molecular Biology*, vol. 125, pp. 339-346, 1978.
- [155] M. W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander and L. E. Hood, "Isolation of Microgram Quantities of Proteins from Polyacrylamide Gels for Amino Acid Sequence Analysis", *Methods in Enzymology*, vol. 91, pp. 227-236, 1983.
- [156] J. Hejgaard, S. K. Rasmussen, A. Brandt and I. Svendsen, "Sequence Homology between Barley Endosperm Protein Z and Protease Inhibitor of the α 1-Antitrypsin Family", *FEBS Letters*, vol. 180, pp. 89-94, 1985.
- [157] S. Jegou, J.-P. Douliez, D. Molle, P. Boivin and D. Marion, "Purification and Structural Characterization of LTP1 Polypeptides from Beer", *Journal of the*

- Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 5023-5029, 2000.
- [158] J. Hejgaard, "Purification and Properties of Protein Z - A Major Albumin of Barley Endosperm", *Physiologia Plantarum*, vol. 54, pp. 174-182, 1982.
- [159] O. Ouchterlony, "Antigen-antibody Reactions in Gels", *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, vol. 26, pp. 507-515, 1949.
- [160] C. B. Laurell, "Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies", *Analytical Biochemistry*, vol. 15, pp. 45-52, 1966.
- [161] Y. Ishida, T. Fujita, K. Asai, "New Detection and Separation Method for Amino Acids by High-performance liquid Chromatography", *Journal of Chromatography*, vol. 204, pp. 143-148, 1981.
- [162] H. Yokosawa, H. Ito, S. Murata and S. Ishii, "Purification and Fluorometric Assay of Proteinase A from Yeast", *Analytical Biochemistry*, vol. 134, p. 210, 1983.
- [163] L. R. Bishop, A. L. Whitear and W. R. Inman, "The Quantitative Measurement of Foam Stability", *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 81, p. 131, 1975.
- [164] K. Fujishiro, Y. Sanada, H. Tanaka and N. Katunuma, "Purification and Characterization of Yeast Proteinase B", *Journal of Biochemistry*, vol. 87, pp. 1321-1326, 1980.