



Title	加熱処理による大麦由来 Lipid transfer protein 1 および Lipid transfer protein 1b の物性変化および翻訳後修飾の包括的解析とビールの泡沫品質に与える影響の解明
Author(s)	水口, 潤哉
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105402
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

加熱処理による大麦由来 Lipid transfer
protein 1 および Lipid transfer protein 1b の物
性変化および翻訳後修飾の包括的解析とビ
ールの泡沫品質に与える影響の解明

水口 潤哉

2026 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

生物工学専攻

高分子バイオテクノロジー領域

目次

略語	1
第一章 序論	2
1.1 ビール	2
1.2 ビールにおける泡沫の重要性	4
1.3 ビールの泡沫に寄与する成分	5
1.4 タンパク質による泡沫安定化	6
1.5 ビールの泡沫に寄与するタンパク質	7
1.6 LTP1/LTP1b の物性および翻訳後修飾の醸造工程での変化	10
1.7 先行研究の課題と本研究の目的および構成	12
第二章 加熱処理による LTP1/LTP1b の物性および翻訳後修飾と泡沫特性の変化	16
2.1 背景	16
2.2 実験試料および実験方法	16
2.2.1 実験試料	16
2.2.2 一番麦汁からの LTP1 および LTP1b の精製とサンプルの加熱処理	16
2.2.3 大麦のタンパク質の抽出方法および非グリケーション LTP1 (LTP1-0g) の精製	18
2.2.4 精製 LTP1/LTP1b および一番麦汁粗タンパク質の電気泳動	19
2.2.5 動的表面張力の測定	19
2.2.6 泡沫特性評価	19
2.2.7 RP-HPLC-MS による表面疎水性と翻訳後修飾の評価	20
2.2.8 SEC を用いた流体力学的半径評価	21
2.2.9 SEC-MALS を用いた分子量の評価	22

2.3 結果	22
2.3.1 LTP1/LTP1b の精製とグリケーションレベルの調整	22
2.3.2 LTP1/LTP1b の界面活性および泡沫特性	29
2.3.3 LTP1/LTP1b の加熱による特性変化の分析	32
2.3.4 LTP1/LTP1b の加熱によるサイズ分布および分子量変化の分析	40
2.3.5 低グリケーション LTP1/LTP1b および LTP1-0g の泡沫特性	42
2.4 考察	44
 第三章 ビールの高品質な泡沫を実現するための新たな戦略の探索	48
3.1 背景	48
3.2 実験試料および実験方法	48
3.2.1 実験試料	48
3.2.2 RP-HPLC-MS を用いた精製 LTP1/LTP1b、一番麦汁粗タンパク質、市販ビールの LTP1-0g /LTP1b-0g 濃度概算	49
3.2.3 NIBEM によるビール泡沫安定性評価	49
3.2.4 パイロットスケールでのビールの醸造	50
3.2.5 一番麦汁、ホップ添加麦汁およびビールからの粗精製	50
3.2.6 RP-HPLC-MS を用いた一番麦汁粗タンパク質、ホップ添加麦汁粗タンパク質およびビール粗タンパク質の表面疎水性および翻訳後修飾の評価	50
3.2.7 大麦および麦芽からのタンパク質抽出	50
3.2.8 全窒素含有量 (TN: Total nitrogen)、苦味価 (BUs: Bitter units) の定量	51
3.3 結果	51
3.3.1 LTP1b の泡沫安定化効果：純粋系と混合系における比較	51
3.3.2 醸造工程における LTP1b の変化	56

3.3.3 異なる品種の大麦中の LTP1b 含有量の分析	60
3.4 考察	62
第四章 総括と今後の展望	67
4.1 本研究の総括	67
4.2 今後の展望	69
補足資料	71
発表論文	76
参考文献および参考資料	77
謝辞	90

略語

BDAI-1: barley dimeric α -amylase inhibitor-1

LTP1: lipid transfer protein 1

LOX: lipoxygenase, リポキシゲナーゼ

AOS: allene oxide synthase, アレンオキシド合成酵素

CEX: cation exchange chromatography, 陽イオン交換クロマトグラフィー

HIC: hydrophobic interaction chromatography, 疎水性相互作用クロマトグラフィー

SEC: size exclusion chromatography, サイズ排除クロマトグラフィー

LTP1-0g: 非グリケーション LTP1

RP-HPLC-MS: reversed phase high performance liquid chromatography mass spectrometry, 逆相高速液体クロマトグラフィー質量分析法

MALS: multiple angle light scattering, 多角度光散乱光度計

RMSD: root mean squared deviation, 二乗平均平方根偏差

第一章 序論

1.1 ビール

ビールは、先史時代に偶然発見された穀物ベースの発酵飲料に起源を持ち^{1,2}、紀元前 3500 年頃にはエジプトで醸造が行われ¹、9 世紀初頭には水、大麦、ホップ、酵母の 4 つの原料を使用する現代のビールの原型が生まれたと言われている^{1,3}。その後、ビールの多様化が、歴史的な技術・文化の積み重ねによって実現した。まず、原料や酵母の選択・加工により地域ごとの香味が生まれ、19 世紀の冷蔵技術と低温発酵の普及によりラガービールが安定的に製造可能となった。20 世紀には醸造科学の進展により香味の制御が可能となり、近年ではクラフトビール文化や副原料の活用、国際流通の発展により、世界各地で多様なビールが製造・消費されるようになった。その結果、今日では幅広い香りや味わいを持つ多種多様なビールが製造・販売されており、その結果、アルコール飲料の中でビールは最も売上が高く、世界中で最も消費されるアルコール飲料となっている(図 1)⁴。そのため、高品質なビールに対する継続的な需要があり、関連研究が強力的に推進されている⁵。

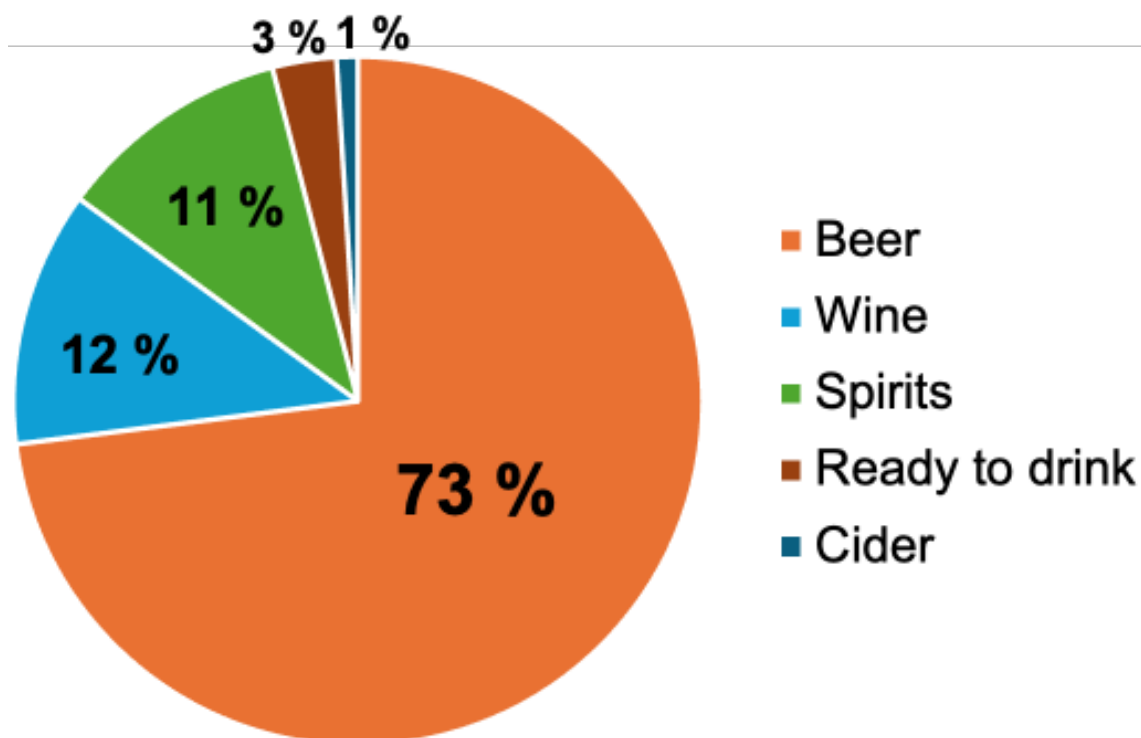


図 1. 2024 年の各アルコール飲料の消費量の割合

Analysis of the Global Alcoholic Beverage Market 2024: Trends, Segmentation, and Future Perspectives から引用し作成した。Ready to drink は「すぐに飲める」状態の飲料を指す。（缶チューハイ、缶カクテル、ハイボール缶など）

現代のビールは、水、大麦、ホップ、酵母を原材料とし、図 2 に示した一連の醸造工程を経て製造される^{6,7}。まず、制御された環境条件下で大麦を発芽させ、麦芽とする。この過程で、アミラーゼおよびプロテアーゼなどの加水分解酵素の転写および翻訳が促進される⁷。次に、麦芽を粉碎し、温水と混合することで、酵素的にデンプンを糖に、タンパク質をアミノ酸に変換する^{7,8}。糖化後にロイタリングと呼ばれる操作により固形分を取り除き、麦汁を得る。麦汁にホップを加えた混合物を煮沸することで、タンパク質の変性、ビール本来の味や香りを損なう風味（オフフレーバー）の除去、および麦汁の殺菌を行う⁷。また、こ

の過程でビールの苦味の主成分であるホップ由来の α 酸のイソ α 酸への異性化が起こる⁹。煮沸後の液を酵母の発酵に適した温度まで冷却し、発酵を行う。発酵工程において、酵母が利用可能な糖を代謝してエタノールと二酸化炭素を生成し、同時にビールの香りや風味特性に影響を与える様々な二次代謝産物を生成する¹⁰。これらの醸造工程はビールの品質特性に決定的な影響を及ぼすため、厳格な制御が必要である。

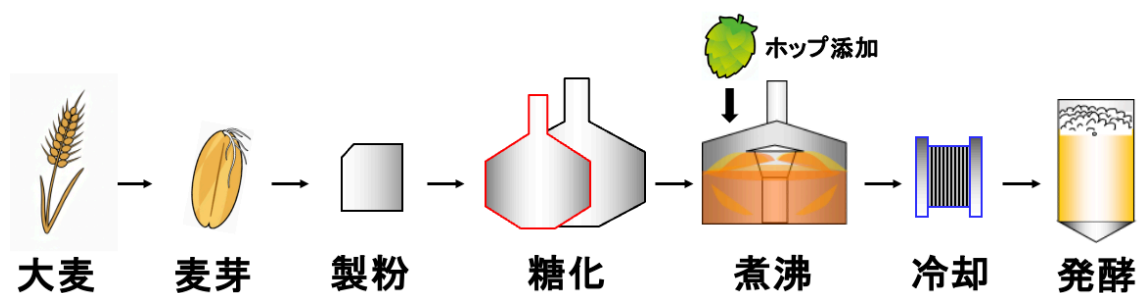


図 2. ビールの醸造工程の手順

1.2 ビールにおける泡沫の重要性

泡沫とは気泡の集合体であり、ビールの品質を決定づける重要な要素である¹¹。泡沫はビールの香気成分の放出を促進し、風味を高めることに貢献しており、クリーミーな泡沫は飲む際に独特の口当たりを与え、ビールを美味しくする役割を担っている^{5,12-14}。加えて、ビールの美しさの象徴である泡沫と液体の色のコントラストは、視覚的な魅力によって消費者に好意的な印象を与える⁵。さらに、泡沫は酸素との直接的な接触を防ぐバリアとして機能して酸化による品質劣化を抑制し、炭酸ガスが逃げるのを防ぐ蓋としての役割も果たす^{5,15}。このため、泡沫はビールの総合的な品質に大きく貢献する重要な因子として認識されており、泡立ち（起泡性）と泡持ち（泡沫安定性）からなる泡沫特性が優れたビールの指標となっている¹⁶。

1.3 ビールの泡沫に寄与する成分

ビールの泡沫の安定性は、複数の成分間の複雑な相互作用によって決定されるが、泡沫の形成と維持において、根幹的な役割を果たすのが、麦芽由来のタンパク質である³。これらの界面活性をもつタンパク質は、二酸化炭素（CO₂）に吸着し、開栓による圧力低下や注ぐ際の衝撃によって活性化された気泡核の二酸化炭素が気泡として発生する際に、その気液界面（空気と液体の境界）に速やかに吸着する。この吸着によって、気泡の周りに強固な膜が形成され、泡沫の基本的な骨格が構築される¹⁷。疎水性ペプチドも同様にビールの泡沫の安定化に関与している¹⁸。また、ホップの苦味成分であるイソフムロンは、泡沫の安定性を向上させる。イソフムロンは、前述のタンパク質と疎水性相互作用を通じて強固な複合体を形成することが示唆されており、この複合体が泡沫の気液界面に配列することで、泡膜の物理的強度が増し、泡沫の崩壊が抑制され、長時間にわたる持続性が確保される¹⁹。加えて、麦芽由来のデキストリンなどの多糖類は、ビールの液体の粘度を高めることで、泡同士の衝突や泡間の液体排出（排液）を抑制し、結果として泡沫の安定性を間接的に高める¹⁷。また、金属イオンはイソ α 酸およびタンパク質と相互作用することで、泡沫特性に影響を及ぼす可能性が示唆されている²⁰。一方で、特定の成分は泡沫の安定性を著しく阻害する。最も主要な阻害成分は、麦芽や酵母由来の脂質および脂肪酸である。これらの疎水性成分は、タンパク質が形成する界面膜に侵入し、その構造を乱すことで泡沫を急速に破壊する²¹。同様に、洗浄剤の残留物やガラスに付着した油分も、泡沫の形成を妨げる。したがって、適切なガラスの洗浄が、高品質な泡沫を形成する上で不可欠である。また、エタノールも泡沫を不安定化させることが示唆されている²²。以上より、低分子から高分子まで様々な分子が関連し、複合的に泡沫の形成、安定化/不安定化が引き起こされる。

1.4 タンパク質による泡沫安定化

タンパク質による泡沫の安定化は、タンパク質の両親媒性という特性に基づいた、複雑で多段階的なプロセスによって成り立っている²³。まず、水溶液中のタンパク質分子は液相で拡散し、気液界面に移行して吸着する²³。吸着したタンパク質の立体構造は、疎水性の部分を気相側へ、親水性の部分を液相側へ再配置するように変化するため、疎水性界面である気液界面で安定的に吸着する²³。その後、吸着したタンパク質同士が分子間相互作用によって、凝集し界面上に膜を形成する²³ (図 3)。タンパク質の界面膜は、低分子量界面活性剤の界面膜と比較して、より厚く、弾力性に富んで強固である²³。そのため、タンパク質の界面膜は、「排出」、「合一」、「不均一化」の主要な泡沫不安定化メカニズムを効果的に抑制する²³。具体的には、「排出」は主に重力によって泡沫の液体が底部に流れる不可逆的なプロセスであり、液体が失われることで液膜が薄くなり脆くなる²⁴。「合一」は隣接する 2 つ以上の気泡が融合し、一つの大きな気泡になることで気泡の数が低下する現象である^{23,25}。また、「不均一化」は気泡間でガスが移動することで、大きな気泡を成長させ、最終的には気泡が破裂する^{23,25,26} (図 4)。タンパク質の界面膜が液体の粘度を高めることで泡間の液体の「排出」を抑制し、物理的な障壁となることで隣接する気泡の「合一」を防ぎ、ガスの透過を抑えることで「不均一化」を遅らせる^{23,25}。その結果、タンパク質は泡沫の構造と持続性を根本から支える重要な安定剤として機能する。

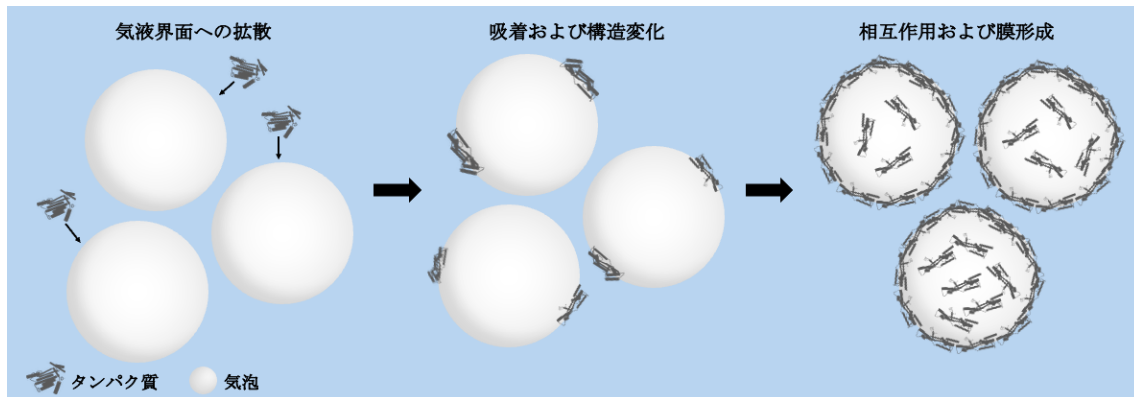


図3 タンパク質の気液界面での膜形成プロセス

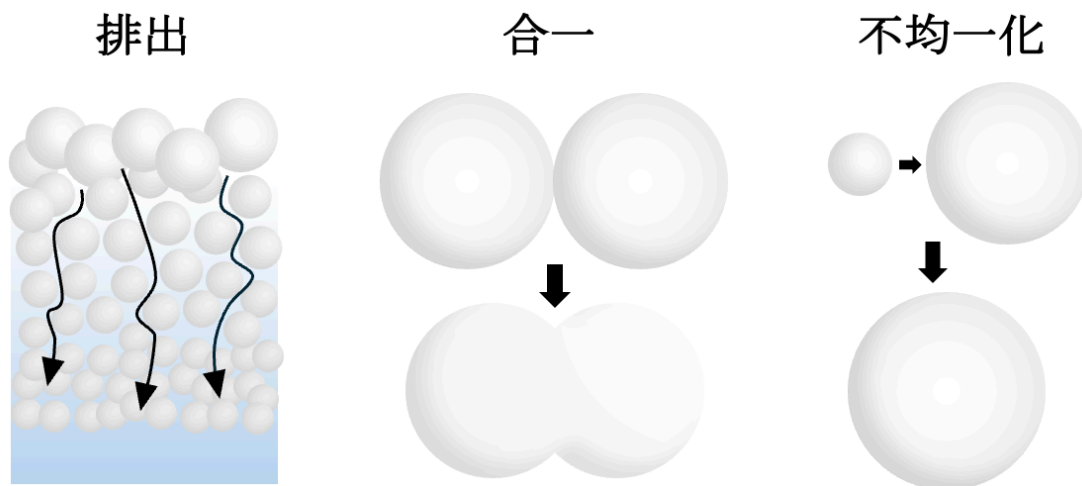


図4 泡沫の不安定化メカニズム

1.5 ビールの泡沫に寄与するタンパク質

ビールに含まれるタンパク質の多くは原料の大麦に由来する³。大麦由来のタンパク質の多くは醸造工程の煮沸や酵素分解により失われるが、特定のタンパク質は失われずビール中に残存し、泡沫安定化に寄与する。残存する主要なタンパク質としては、ホルデイン、プロテイン Z (Protein Z)、Barley dimeric α -amylase inhibitor-1 (BDAL-1)、Lipid transfer protein1 (LTP1)が報告されている²⁷⁻³⁰。ホルデ

インは大麦の主要な貯蔵タンパク質であり、大麦種子タンパク質の約 30～50% を占めるアルコール可溶性のプロラミンに分類される³¹。また、B-、C-、 γ -、D- の 4 つの主要なサブタイプがあり、B-ホルデインが最も多くを占める²⁷。特に分子量約 23,000 のホルデイン分画は泡沫に濃縮されやすいことが報告されており、醸造過程で分解されて生じたペプチドとともに、泡沫の形成と保持に一定の役割を果たすと示唆されている³²。しかし、ホルデイン由来の泡沫は泡立ちが良い一方で、ビールの濁り (haze) を引き起こしやすいため、その管理には注意が必要となる³³。

Protein Z は、分子量約 40,000 の水溶性タンパク質であり、大麦に豊富に存在する主要な成分である^{34,35}。Protein Z4, Z7 などのサブファミリーが存在し、大麦・麦芽中においては Protein Z4 の比率が最も高いとされている。醸造過程において、Protein Z は麦芽成分の中でも特に多く、麦芽化や煮沸中にメイラード反応によるグリケーションが起きることで、熱や酵素による分解に対して高い耐性を持つ³⁴。その結果、醸造工程を安定して移行して最終製品に残存し、泡沫の安定性に寄与していることが示唆されている³⁶。

BDAI-1 (Barley dimeric α -amylase inhibitor-1) は、分子量約 13,000 のタンパク質で、麦芽の酵素であるアミラーゼの活性を阻害する役割を担っている³⁷。ビールから精製した BDAI-1 をビールに添加したところ BDAI-1 濃度依存的に泡沫安定性が増加したことが示され、泡沫安定性に寄与するタンパク質の一つとして同定された³⁷。

LTP1 は分子量 9,686 の脂質結合タンパク質であり、大麦胚乳の糊粉層に豊富に存在する^{22,38,39}。LTP1 は 8 つの α -ヘリックスから構成され、脂質が結合できる疎水性空洞を有する (図 5a)。この疎水性空洞における脂肪酸や脂肪酸誘導体との非共有結合的な結合は、植物の多くの発育過程やストレス応答に関与してい

るとの報告例がある⁴⁰。LTP1 は、4 つのジスルフィド結合によって安定化されており、熱安定性が非常に高く、煮沸後もほとんど沈殿せず、ビールに残存する³⁰。LTP1 は、大麦の発芽過程で植物ホルモンのジャスモン酸が生合成される際の、リポキシゲナーゼ(LOX)とアレノキシド合成酵素(AOS)の酵素活性によって生じる 9S,10-エポキシ-10,12Z-オクタデカジエン酸 ($M_w=294$ Da) というオキシリピンが付加した、脂質結合型アイソフォームである LTP1b ($M_w=9,980$ Da) を形成する (図 5b,c)^{22,38,40-42}。オキシリピンの C9 位に、LTP1 の Asp-7 の酸素原子と共有結合を形成することから、LTP1b におけるオキシリピンは分岐構造をとる⁴⁰。C10-C18 セグメントは LTP1 の疎水性空洞内に埋め込まれる一方、C1-C8 セグメントはタンパク質表面に露出し表面疎水性を増加させる⁴³。LTP1 は泡沫を不安定化させる遊離脂肪酸と相互作用することで泡沫の安定化に寄与するという、他のタンパク質にはない特性を持つことが示唆されている²²。さらに、LTP1 または LTP1b と考えられる分子量約 10,000 のタンパク質を含む画分の濃度増加に伴い、泡沫特性の向上が確認されている^{44,45}。

前述の通り、ビールの泡沫は複数のタンパク質によって形成されているが、中でも Protein Z および LTP1/LTP1b はビール中での含有量の多さから泡沫特性への強い関与が古くから指摘されている⁴⁶。

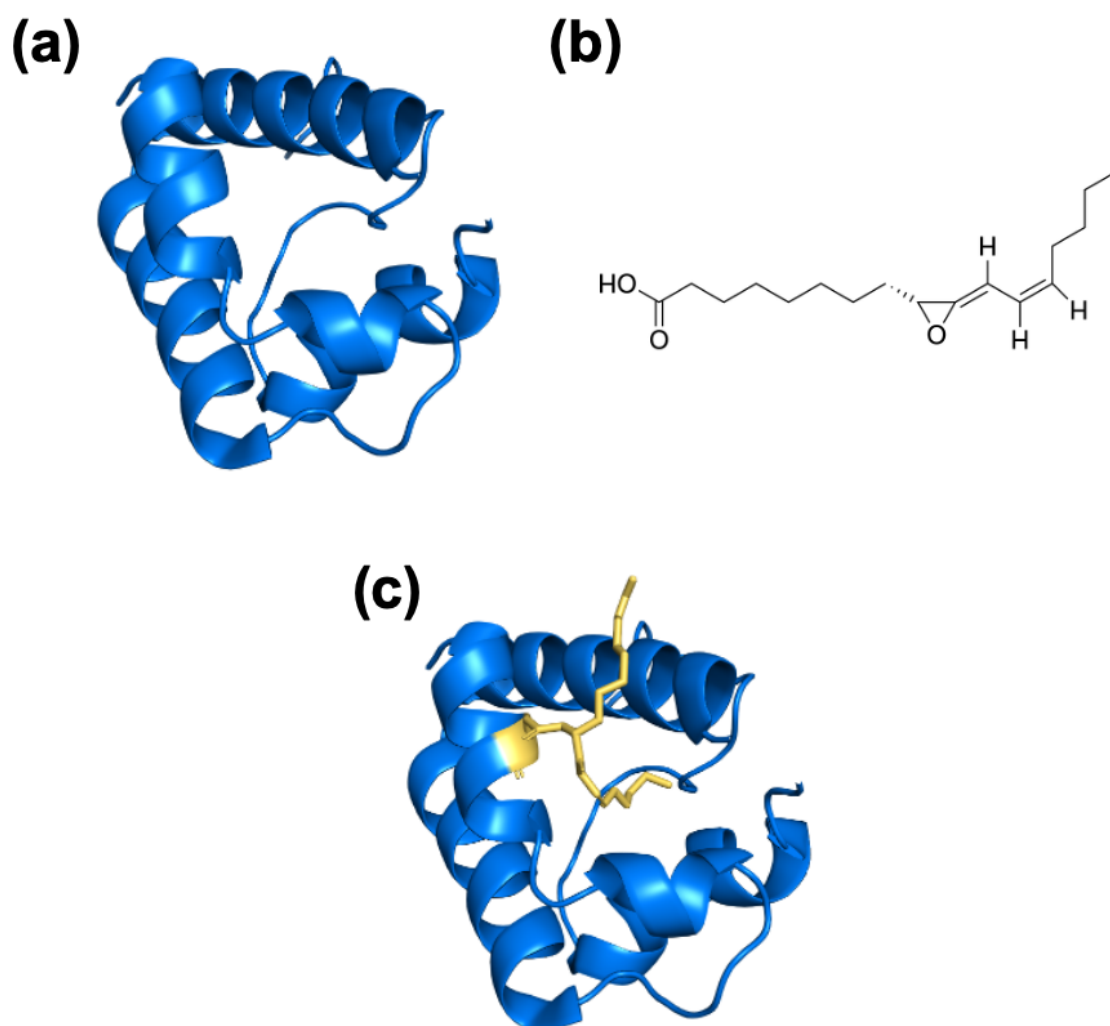


図5 (a) LTP1 (b) 9S,10-エポキシ-10,12Z-オクタデカジエン酸（オキシリピン）および (c) LTP1b の構造

オキシリピンおよび結合残基の Asp-7 を黄色で示した。PyMOL Molecular Graphics System を用いて、LTP1 と LTP1b は PDB: 3GSH から作成し、オキシリピンは ChEBI ID: 143790 を参照し、ChemDraw を用いて作成した。

1.6 LTP1/LTP1b の物性および翻訳後修飾の醸造工程での変化

LTP1 および LTP1b は泡沫特性に大きな寄与をもたらしていると考えられているため、泡沫特性に関連する物性の変化を詳細に把握することは極めて重要である。実際に、LTP1/LTP1b の泡沫特性に関連する物性の変化やそれに影響を与

える翻訳後修飾、および、醸造工程における変化に着目した研究が多数報告されている^{22,38,47-50}。流体力学的半径、表面疎水性および構造柔軟性は、気液界面へのタンパク質の吸着しやすさの指標である界面活性に影響するため、特に評価すべき特性である。先行研究により LTP1b は LTP1 よりも、オキシリピンの結合により流体力学的半径が大きく、表面疎水性が高いことが示されている⁴⁹。加えて、室温での疎水性空洞の体積は LTP1 よりも高く、オキシリピンの結合によって構造柔軟性が増加していることが NMR や全原子分子動力学法で示唆されている^{51,52}。これらの特性から、LTP1b は LTP1 と比較して高い界面活性を持つ⁴⁹。界面活性は泡沫特性と相関すると考えられており、LTP1b は LTP1 よりも高い泡沫特性を持つと考えられる。しかしながら、界面活性と泡沫特性が相関しない例も報告されていることから⁵³、LTP1b と LTP1 の泡沫特性とビール泡沫への寄与を評価するためには、それぞれの泡沫特性を直接測定する必要がある。

LTP1/LTP1b の物性は、醸造工程における熱負荷、特に煮沸によって変化することがこれまでに示されている。LTP1/LTP1b の界面活性の増加⁴⁹、流体力学的半径の増大および表面疎水性の増加が報告されており、LTP1/LTP1b の加熱変性または凝集が起こり、界面活性が増加したと考えられる^{22,49}。

翻訳後修飾はタンパク質がリボソームで合成された後、その構造や機能が変化する化学反応の総称であり、タンパク質の物性に影響を与える⁵⁴。醸造工程で起こりうる大麦タンパク質の翻訳後修飾の一つに、糖化および煮沸の段階で生じるグリケーションが挙げられる³⁸。麦芽に含まれるデンプンは、糖化段階でアミラーゼ等の酵素によって加水分解され、グルコースやマルトースといった還元糖へと分解される⁷。これらの還元糖は、タンパク質のリジン残基およびアルギニン残基とメイラード反応によって結合し、グリケーションされた LTP1/LTP1b (LTP1-g/LTP1b-g と表記) が生じる³⁸。LTP1/LTP1b のグリケーショ

ンがその物性や泡沫特性に与える影響は未だ十分に解明されていない。しかしながら、他のタンパク質における先行研究では、グリケーションが構造安定性の向上⁵⁵、溶解性の増加⁵⁶、表面疎水性の低下⁵⁷、および泡沫特性の変化^{58,59}を引き起こすことが示唆されている。したがって、LTP1/LTP1bにおいても、グリケーションが物性および泡沫特性に影響する可能性が考えられる。また、加熱処理におけるLTP1bからのオキシリピンの極めて緩やかな解離が報告されている⁶⁰。さらに、熱処理によって促進される脱アミド化などの他の翻訳後修飾も発生する可能性がある。以上の加熱に伴う翻訳後修飾の変化と泡沫特性の関係を明らかにすることは、ビールの泡沫特性向上を目的とした醸造工程開発に不可欠である。

1.7 先行研究の課題と本研究の目的および構成

先行研究によって、加熱処理によるLTP1/LTP1bの物性および翻訳後修飾の変化が個別に明らかとなってきたが、包括的な研究は行われていない。実際の醸造においては、複数の物性の変化と翻訳後修飾が同時に起こり、ビールの泡沫特性に影響することを考えると、LTP1/LTP1bの物性の変化および翻訳後修飾に関する包括的な解析が求められる。また、個々の特性に着目する研究のもう一つの限界として、着目していない特性の差異が泡沫特性に影響している可能性を排除できないことがある。例えば、LTP1とLTP1bの比較によるオキシリピンの界面活性への影響を検討した研究では、グリケーションが界面活性や熱安定性に差異をもたらす可能性があるにもかかわらず、LTP1とLTP1bのグリケーションレベルが不明なため、試料間でのグリケーションレベルの違いの影響を排除できず、オキシリピンの影響を正確に評価できていない可能性がある。加えて、煮沸

前後の LTP1/LTP1b の泡沫特性の測定が行われていない点にも注意が必要である。このように、醸造中の熱負荷による物性の変化および翻訳後修飾と泡沫特性との関係は解明されているとはいえず、ビールの泡沫品質を醸造工程の管理によって正確に制御することを困難にしている。以上の背景から、本研究では、煮沸処理で生じた LTP1 と LTP1b の物性の変化および翻訳後修飾を包括的に評価することで、泡沫特性に影響を与える特定の変化や修飾を解明し、その知見を原料組成や発酵条件の設計にも反映することで、ビールの泡沫品質向上に資する醸造工程全体の最適化を目指すことを目的とした。

第二章では、LTP1 および LTP1b の加熱時における特性変化を包括的に分析し、泡沫特性との関係性を明らかにすることを試みた。まず、一番麦汁から粗タンパク質を分取するため、硫酸アンモニウム沈殿（硫安沈殿）後に陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）で粗精製を行い、さらに、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）およびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いてグリケーションレベルが同程度の LTP1-g および LTP1b-g を精製した。次に、加熱処理前後の両タンパク質溶液の泡沫特性を比較評価した。その結果、加熱前は LTP1b が LTP1 よりも高い起泡性と泡沫安定性を示すことが明らかになった。しかし、加熱によって LTP1b 溶液の起泡性は減少し、泡沫安定性は LTP1 溶液、LTP1b 溶液ともに低下し、特に LTP1b 溶液において顕著な減少が観察された。加熱処理によって変化した、翻訳後修飾、表面疎水性、流体力学的半径、および分子量の変化は、逆相高速液体クロマトグラフィー質量分析法（RP-HPLC-MS）と SEC および多角度光散乱光度計を組み合わせた SEC（SEC-MALS）によって詳細に評価した。その結果、加熱処理がオキシリピンおよび糖の解離、脱アミド化による疎水性 LTP1 会合体の濃度増加を引き起こすことが明らかになった。グリケーションレベルが異なる LTP1/LTP1b 溶液の泡沫特性の比較から、糖の解離は

LTP1/LTP1b 溶液の泡沫特性に影響を与えないことを確認したため、オキシリピンの解離と疎水性 LTP1 会合体の濃度増加が、泡沫特性の低下をもたらすことが示唆された。このことから、醸造工程、特に煮沸条件を制御することで、LTP1b からのオキシリピンの解離および会合体の形成を効果的に抑制し、ビールの泡沫特性を向上できる可能性が示された。

第三章では、第二章で得られた知見をもとに、さらに複合系であるビールにおける LTP1/LTP1b の泡沫安定性への寄与および醸造工程における LTP1/LTP1b の挙動を詳細に調べ、その結果をもとにビールの泡沫安定性改善に向けたビール醸造製造における戦略について検討した。まず、様々な成分が含まれた市販ビールの LTP1/LTP1b 含有量とその泡沫安定性の相関を評価した。その結果、低いタンパク質濃度領域では LTP1b 含有量と市販ビールの泡沫安定性には正の相関があることが判明し、精製 LTP1 の添加に比べ、精製 LTP1b をビールに添加することで泡沫安定性は顕著に増加した。一方、精製 LTP1b の添加と同時に、他の大麦タンパク質が同時に添加された場合は泡沫安定性が顕著に増加しなかった。さらに、大麦タンパク質の濃度が高い場合は、むしろ精製 LTP1b の添加が泡沫安定性を低下させた。この結果から、全タンパク質量を増加させることなく、LTP1b を添加することが、ビールの泡沫安定性を向上させることに重要であることが示唆された。また、各醸造工程における LTP1b からのオキシリピンの解離および疎水性会合体の挙動を調べた結果、煮沸工程において LTP1b の量が最も低下したことが判明し、煮沸強度や pH の最適化によってオキシリピンの解離を抑制することで泡沫特性を改善できる可能性が示唆された。また、多価不飽和脂肪酸からヒドロペルオキシ脂肪酸を生成する Lipxygenase (LOX) 活性が異なる大麦品種間で、LTP1b 含有量を分析した結果、LOX 活性の高い大麦は LTP1b 含有量も高いことが判明した。この結果は、ビールの LTP1b 残存量を増加させ

るための大麦の選定に、LOX 活性が重要な指標になり得ることを示した。

第四章では、第二章と第三章で得られた結果を基に、加熱処理と泡沫特性の因果関係および LTP1b のビール泡沫安定化に果たす役割について総括するとともに、ビールの高品質な泡沫を追求するための新たな戦略を提言する。また、泡質向上に向け、未解明の課題を明らかにし、今後の展望を記述した。

第二章 加熱処理による LTP1/LTP1b の物性および翻訳後修飾と泡沫特性の変化

2.1 背景

ビールの泡沫特性に LTP1/LTP1b が関与することが示唆されている。これまでに、煮沸工程における LTP1/LTP1b の修飾の変化（オキシリピンの解離）、構造変化や界面活性の増加が報告されているが、各研究は単一の特性変化に焦点を当てており、包括的な解析は行われていない。さらに、界面活性と泡沫特性が必ずしも相関しない点を考慮すると、LTP1/LTP1b の物性および翻訳後修飾の変化と泡沫特性との関係も明らかになっていないと言える。そこでここでは、物性として界面活性、表面疎水性、流体力学的半径を評価し、翻訳後修飾と合わせて泡沫特性との関連について検討した。

2.2 実験試料および実験方法

2.2.1 実験試料

一番麦汁を、CEX を用いて粗精製したタンパク質画分（一番麦汁粗タンパク質）および大麦の抽出液はサントリーグローバルイノベーションセンター（株）より提供された。硫酸アンモニウム、酢酸、水酸化ナトリウム、0.1%ぎ酸-蒸留水、0.1%ぎ酸-アセトニトリル、アセトニトリル、塩化カリウム、リン酸は富士フイルム和光純薬（株）から購入し、使用した。

2.2.2 一番麦汁からの LTP1 および LTP1b の精製とサンプルの加熱処理

一番麦汁から LTP1 および LTP1b を精製するために、一番麦汁に硫酸アンモニウムを 60%飽和になるように (390 g/L) 添加し、混合物を 4°C で一晩攪拌した。

遠心分離（8,000 rpm、10 分、4°C）によって沈殿物を回収し、20 mM 酢酸緩衝液（pH 4.5）に再溶解させた後、脱塩のために透析を行った。脱塩後の溶液を遠心分離し、上清を陽イオン交換樹脂（SP Sepharose Fast Flow, Cytiva, Marlborough, MA）に加え、麦汁 1 L に対し、20 mM 酢酸緩衝液（pH 4.5）で洗浄した。その後、0.5 M 塩化ナトリウム（NaCl）を含む同緩衝液で溶出させた。タンパク質に富む画分を一番麦汁粗タンパク質として回収し、限外濾過により 20 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）にバッファー交換した。粗精製一番麦汁に 2 M の硫酸アンモニウムを加えて不純物を沈殿させ、その後遠心分離（10,000 g、10 分、4°C）を行った。得られた上清を回収し、Millex-GV 0.22 µm メンブレンフィルター（Merck, Darmstadt, Germany）でろ過した。この上清を ÄKTA prime plus（Cytiva）に注入し、HiTrap Butyl HP カラム（Cytiva）を用いて疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）を実施した。グラジエント溶出は、溶媒 A（2 M 硫酸アンモニウム含有 50 mM 酢酸緩衝液、pH 5.3）と溶媒 B（50 mM 酢酸緩衝液、pH 5.3）を用いて以下のプログラムで行った：0-22.5 分（B 0%）、22.5-50 分（B 36%まで直線的に増加）、50-60 分（B 43%まで）、60-62 分（B 44%まで）、62-80 分（B 57%まで）、80-83 分（B 58%まで）、83-87 分（B 59%まで）、87-120 分（B 62%まで）、120-132 分（B 64%まで）、132-137.5 分（B 100%を維持）。流速は 0-22.5 分で 2.0 mL/min、22.5-132 分で 1.0 mL/min、132-137.5 分で 5.0 mL/min に設定した。カラム温度は 4°C に維持した。溶出した画分を回収し、3,000 Da カットオフの Amicon Ultra 遠心フィルター（Merck）を用いて濃縮した。その後、濃縮液 500 µL を、Superdex 75 Increase 10/300 GL カラム（Cytiva）を装着した ÄKTA prime plus（Cytiva）に注入し、LTP1 と LTP1b を分離した。分離は、0.2 mL/min の流速で 50 mM 酢酸緩衝液（pH 5.3）を移動相として行い、カラム温度は 4°C に維持した。回収した LTP1 および LTP1b 画分を、Amicon フィルターを用いてさらに濃縮し、2 回目の

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって、異なるグリケーションプロファイルを持つ LTP1 と LTP1b を得た。グリケーションプロファイルが同等の LTP1 および LTP1b を得るため、低グリケーション画分と高グリケーション画分を混合して均一化した。得られた LTP1 および LTP1b の濃度は、吸光係数 $0.513 \text{ (mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ (SEDNTERP による計算値) を用いて算出した。加熱実験の前に、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3、典型的な一番麦汁の pH) で希釈し、LTP1 および LTP1b 濃度を 10 μM に調整した。この液を 200 μL ずつ 1.5 mL チューブに量り取り、醸造を模倣した条件として 100°C で 90 分間、過酷な条件として 180 分間加熱した。サンプルを冷却し、分析まで 4°C で保存した。

2.2.3 大麦のタンパク質の抽出方法および非グリケーション LTP1 (LTP1-0g) の精製

-80°C で保管した麦芽および大麦をシェイクマスター (バイオメディカルサイエンス、日本) で凍結粉砕した。次に、各粉砕原料計 500 g に対し、1 mM EDTA、150 mM NaCl および 0.08 % Triton X を加えた 10 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) 10 L を加え、4°C で 1.5 時間攪拌した。その後、遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 10 分間) で上澄みを回収し、約 9 L の上澄み回収液に飽和濃度 80% (561 g/L) の硫酸アンモニウムを加え、4°C で一晩攪拌した。遠心分離 (9,000 rpm) で硫酸アンモニウム沈殿物を回収し、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶解し、透析で脱塩処理を行った後に限外濾過 (Centricon PLUS70, Merck) で濃縮した。最終的に、濃縮液を 2.2.2 項で前述した HIC および SEC で精製し、LTP1-0g 画分を得た。

2.2.4 精製 LTP1/LTP1b および一番麦汁粗タンパク質の電気泳動

精製 LTP1/LTP1b、および一番麦汁粗タンパク質（各 6.5 μ L）を、NuPAGE Sample Reducing Agent（10 $\times$ ） 1 μ L と NuPAGE LDS Sample Buffer（4 $\times$ ） 2.5 μ L（いずれも Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）と混合し、70 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した。その後、各サンプル 10 μ L および Mark12 Unstained Standard（Thermo Fisher Scientific）を、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel（1.0 mm $\times$ 12-well, Thermo Fisher Scientific）のウェルに注入した。電気泳動は、NuPAGE MES SDS Running Buffer（Thermo Fisher Scientific）と NuPAGE Antioxidant（Thermo Fisher Scientific）を用いて、Mini Gel Tank（Thermo Fisher Scientific）で 200 V の定電圧下、25 分間行った。電気泳動後、ゲルを蒸留水で 5 分間穏やかに攪拌しながら洗浄した。洗浄は 3 回行った。SimplyBlue SafeStain（Thermo Fisher Scientific）で 1 時間染色した後、一晩蒸留水中で脱色した。ゲルの画像は、iBright Imaging System（Thermo Fisher Scientific）を用いて取得した。

2.2.5 動的表面張力の測定

動的表面張力は、Theta Flex 装置（Biolin Scientific, Gothenburg, Sweden）を用いて、ペンダントドロップ法により測定した。液滴は、一貫した形状を確保するため、1 μ L/sec の排出速度で 5 μ L の容量となるように生成し、その後、液滴の形状を 600 秒間記録した。表面張力値は、OneAttension ソフトウェア（Ver 4.0.3）を用いて、Young-Laplace 方程式に基づき 2 秒ごとに算出した。

2.2.6 泡沫特性評価

各サンプル 15 mL を 50 mL のメスシリンダーにとり、図 6 の装置を用いて

11,400 rpm で 30 秒間激しく攪拌して泡立てた。起泡直後の総泡沫体積と泡沫が完全に崩壊するまでの時間を記録した ($n=3$)。起泡性および泡沫安定性の指標となる泡沫崩壊速度は、それぞれ式 1 および式 2 を用いて算出した。

$$\text{起泡性 (\%)} = \frac{V_0}{V_{\text{liquid}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{泡沫崩壊速度 (mL/s)} = \frac{V_0}{t_{\text{collapse}}} \quad (2)$$

ここで、 V_0 は起泡直後の泡沫体積 (mL)、 V_{liquid} は起泡前の液体の体積 (mL)、 t_{collapse} は泡沫が完全に崩壊するまでの時間 (s) を示す。LTP1 と LTP1b 間の各時点での統計的有意性は Welch の t 検定を用いて評価し、異なる加熱時間での比較は Tukey の多重比較検定を用いて行った。p 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意と見なした。



図 6 自作の泡立て装置

2.2.7 RP-HPLC-MS による表面疎水性と翻訳後修飾の評価

Nexera X2 HPLC システム (Shimadzu, Kyoto, Japan) を接続した maXis II ETD 質

量分析計 (Bruker, Billerica, MA) を用いて RP-HPLC-MS 分析を行った。各サンプル 5 μ L を Nexera X2 HPLC システムに注入し、ACQUITY UPLC Protein BEH C4 カラム (300 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm; Waters, Milford, MA) を用いて 40°C、流速 0.2 mL/min の条件で分離した。移動相は、0.1%ギ酸を含むアセトニトリル (溶媒 B) と 0.1%ギ酸を含む蒸留水 (溶媒 A) を用いてグラジエント溶出 (10%から 34%) を行った。溶出液の 280 nm における紫外吸収をモニターした。データは Bruker Compass HyStar (バージョン 5.1.8.1, Bruker) を用いて解析した。デコンボリューションは、質量範囲 5,000-15,000 Da、データ点間隔 0.1 m/z、機器分解能 40,000 の条件で、Maximum Entropy 法を用いて行った。抽出イオンクロマトグラム (XICs) は、目的とする分析物に対応する代表的な m/z 値を中心とした ± 0.05 m/z の範囲で取得した。同位体分布シミュレーションは、代表的な分子式を入力し、半値幅 (FWHM) を 0.26 Da に設定して実施した。Root Mean Squared Deviation (RMSD) は、シミュレートされた同位体分布と実験的な同位体分布の強度を正規化した際の各同位体ピークの強度差に基づいて算出した。

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Int_{Sim(i)} - Int_{Exp(i)})^2}{n}} \quad (3)$$

ここで、 $Int_{sim(i)}$ はあるデータポイントでのシミュレートされた同位体分布のシグナル強度、 $Int_{Exp(i)}$ はあるデータポイントでの実験的に測定された同位体分布のシグナル強度、 n はデータポイント数を示す。

2.2.8 SEC を用いた流体力学的半径評価

未加熱、または 90 分および 180 分加熱したサンプルを、TSKgel UP-SW2000 カラム (内径 4.6 mm $\times$ 150 mm; Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan) を装着した Vanquish UHPLC システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて SEC 分析を行った。溶出は、流速 0.35 mL/min、カラム温度 25°C で 20 分間、移動相として 200 mM KCl と

アセトニトリル (95:5, v/v) を含む 133 mM リン酸緩衝液を用いて行った。サンプル注入量は 5 μ L とした。溶出液の 280 nm における紫外吸収をモニターし、ピーク面積は Chromeleon Chromatography Data System (バージョン 7.3.2, Thermo Fisher Scientific) を用いて算出した。

2.2.9 SEC-MALS を用いた分子量の評価

加熱前後の LTP1 の分子量を、SEC-MALS 分析を用いて計測した。分析には、室温において、TSKgel UP-SW2000 カラム (内径 4.6 mm $\times$ 150 mm; Tosoh Bioscience) を装着した Arc HPLC システム (Waters Corporation) を使用し、658 nm のレーザー光源と、22.5° から 147° の間に均等に配置された 18 個の検出器を持つ DAWNTM MALS 検出器 (Wyatt Technology, LLC) で散乱光の検出を行った。サンプル注入量は 5 μ L とし、200 mM KCl とアセトニトリル (95:5, v/v) を含む 133 mM リン酸緩衝液を移動相として、流速 0.35 mL/min で溶出を行った。MALS 検出器からの出力信号は、ASTRATM ソフトウェア (Wyatt) に取り込まれ、データ処理を行った。

2.3 結果

2.3.1 LTP1/LTP1b の精製とグリケーションレベルの調整

一番麦汁には炭水化物、タンパク質、ミネラル、酸、フェノール類、脂質など多様な成分が含まれており、タンパク質だけでも 100 種類以上含まれている³。そのため、硫酸沈殿および CEX、HIC、SEC の原理の異なる 3 種類のクロマゲ

ラフィーを使用し、LTP1/LTP1b を精製した（図 7）。

硫酸沈殿は高濃度の硫酸アンモニウムを加えた際に、タンパク質の溶解度が低下し、沈殿する塩析と呼ばれる現象を利用した精製法であり、最も広く用いられるタンパク質の分離・濃縮方法の一つである⁶¹。また、CEX、HIC、SEC はそれぞれ電荷、疎水性、流体力学的半径の違いに基づいてタンパク質を分離する手法である⁶²。

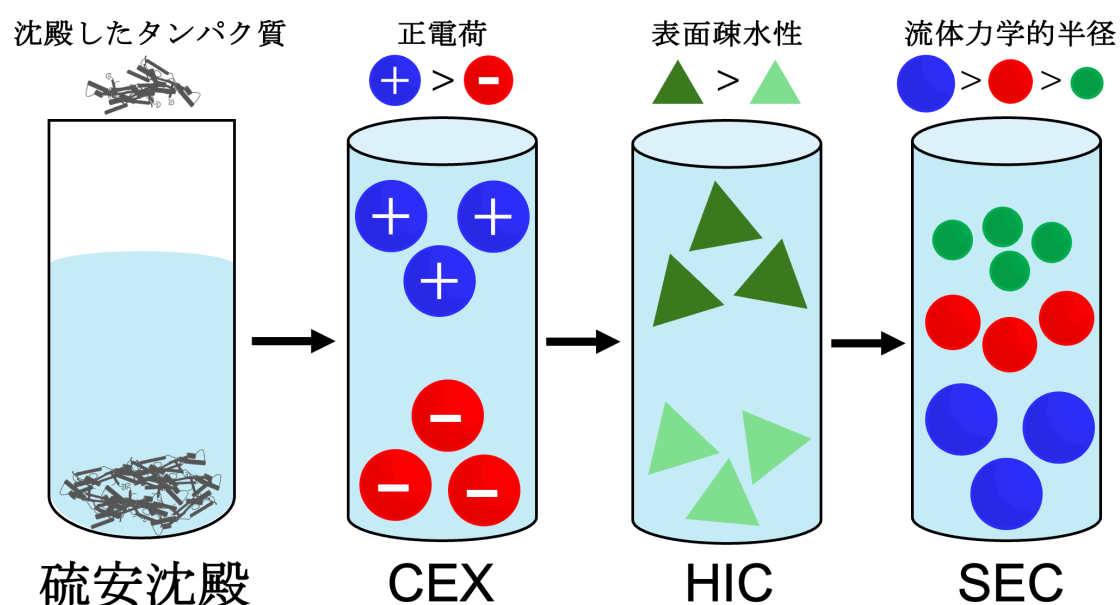


図 7 LTP1 および LTP1b の精製手順と分離の原理

一番麦汁に硫酸アンモニウムを添加して生じた沈殿を回収し、沈殿を 20 mM 酢酸バッファー（pH 4.5）で再溶解した後 CEX で粗精製を行った⁶³。LTP1 の等電点が 9.0 付近であることから⁶³、フロースルー画分を回収した（一番麦汁粗タンパク質）。続いて、疎水性の違いによって LTP1 と LTP1 を分画することを目的として、HIC による分離を行い、62～83 分に溶出する画分（F1）と 83～110 分に溶出する画分（F2）を回収した（図 8）。F1 および F2 についてさらに SEC を用

いて精製を行い、F1.1 (図 9a) および F2.1 (図 9b) 画分を得た。

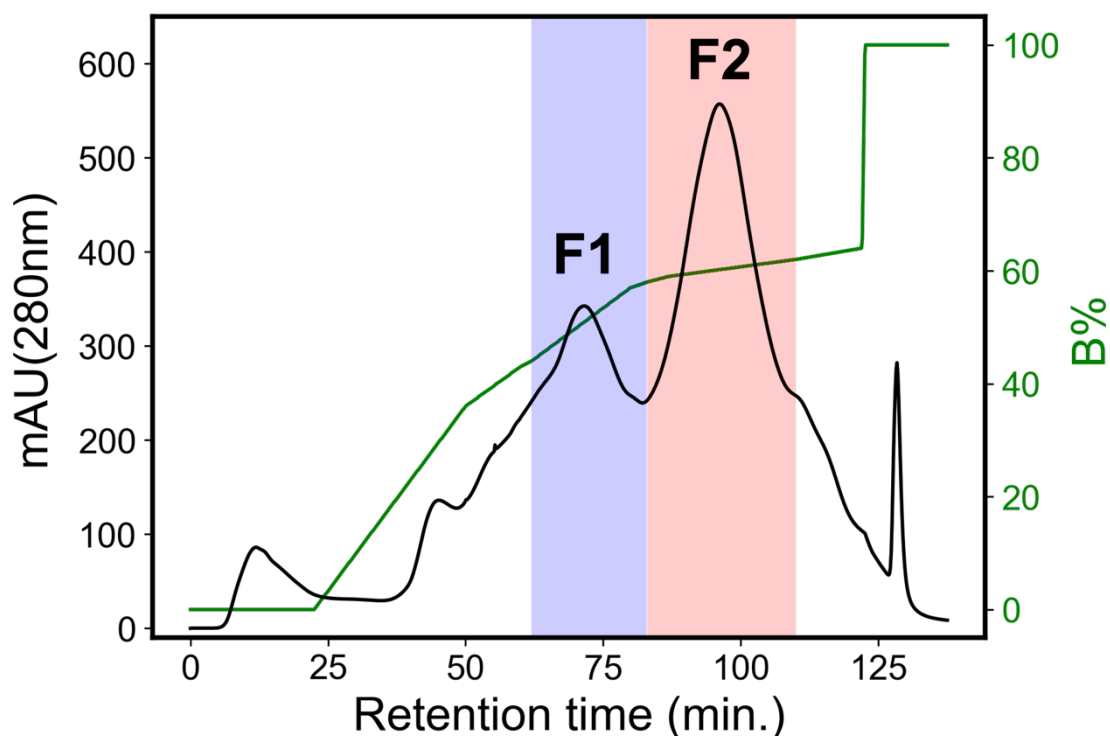


図 8 一番麦汁粗タンパク質の硫酸沈殿後の上澄み液の HIC クロマトグラム。
F1、F2 画分を分取した。青色と赤色の横幅は分取した時間を示している
([Mizuguchi, J et al., 2025](#) より転載した。)

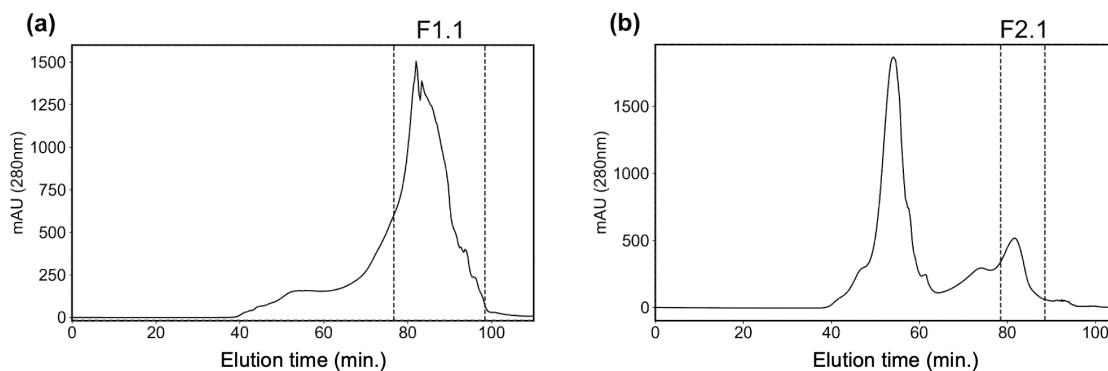
F1.1 および F2.1 の純度を SDS-PAGE で分析し、それぞれ単一のバンドを示すことを確認した (図 9c)。さらに、純度および分子量を RP-HPLC-MS を用いて測定した。UV クロマトグラムにおいて、各画分について単一のピークが観察された (図 9d)。質量スペクトルは、F1.1 では 9,686 Da、F2.1 では 9,980 Da のピークが見られたのに加え、162 Da の増分で複数のピークが検出された (図 9e,f)。これらのピークは、LTP1 (9,686 Da)、LTP1b (9,980 Da) およびそれらがグリケーションした質量と一致していた。以上の結果から、F1.1 には非グリケーション LTP1 (LTP1-0g) および LTP1-g が、F2.1 には非グリケーション LTP1b (LTP1b-0g) および LTP1b-g が含まれており、それらの純度が十分に高いことが示され

た。

LTP1-0g/LTP1b-0g および各 LTP1-g/LTP1b-g の抽出イオンクロマトグラム (XIC) のピーク面積から、式 4 および式 5 を用いてグリケーションの割合を計算したところ、興味深いことに、LTP1b-g の割合 (72.9%) は、LTP1-g の割合 (77.1%) よりも低かった。この結果は、発芽中に進行するオキシリピンの付加⁶⁴ (LTP1b の形成) による立体障害が、糖化プロセスでのグリケーション反応を阻害する可能性を示唆している。実際、潜在的なグリケーション部位である Lys および Arg 残基の一部は、オキシリピン付加部位である Asp-7 に近接している (図 S1)。

$$\text{LTP1-g 割合 (\%)} = \frac{\text{Area}_{g\text{LTP1-0g}}}{\text{Area}_{0g\text{LTP1-0g}} + \text{Area}_{g\text{LTP1-g}}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{LTP1b-g 割合 (\%)} = \frac{\text{Area}_{g\text{LTP1b-0g}}}{\text{Area}_{0g\text{LTP1b-0g}} + \text{Area}_{g\text{LTP1b-g}}} \times 100 \quad (5)$$



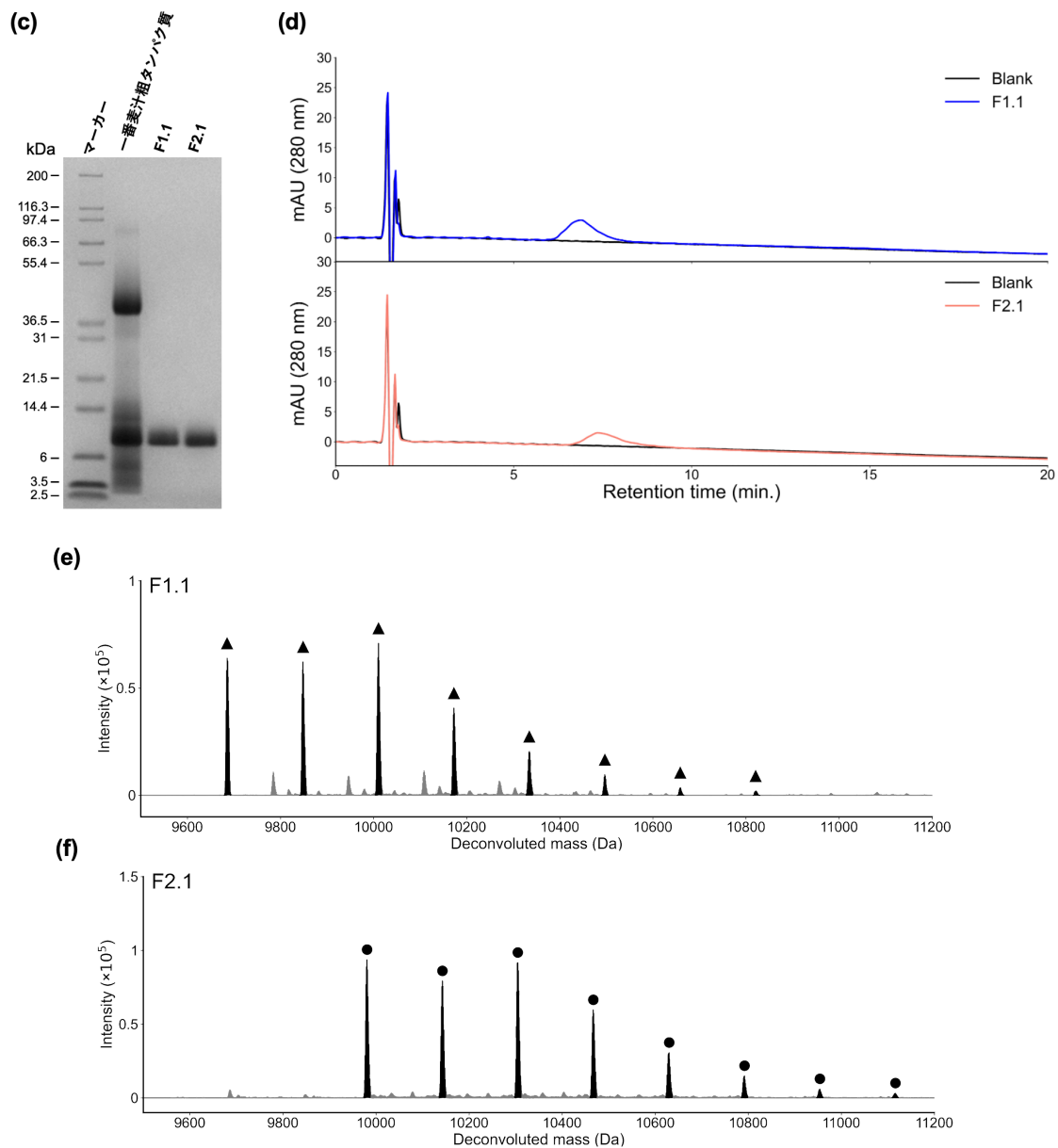


図 9 : (a) F1 画分および (b) F2 画分のサイズ排除クロマトグラフィーによる精製。F1.1 および F2.1 を分取した。(c) 一番麦汁粗タンパク質、F1.1 および F2.1 の SDS-PAGE 分析、ならびに (d) F1.1 および F2.1 の主ピークを拡大した RP-HPLC クロマトグラム。(e) F1.1 および (f) F2.1 の主ピークの質量スペクトル。図中の▲は非グリケーション LTP1 (LTP1-0g) および LTP1-g を、●は非グリケーション LTP1b (LTP1b-0g) および LTP1b-g をそれぞれ示す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

グリケーションが泡沫特性に影響を与える可能性があることを考慮すると、オキシリピン付加等が泡沫特性に与える影響を明確に評価するためには、サンプル間でのグリケーションレベルの違いを最小限に抑えることが重要である。グリケーションレベルが高くなると流体力学的半径が大きくなると考え、SEC を用いて F1.1 と F2.1 の分画を試みた。図 10 の通り、F1.1 を F1.1a (79～84 分) と F1.1b (84～88 分) に、F2.1 を F2.1a (68～85 分) と F2.1b (85～89 分) に分画した。F1.1b と F2.1b のグリケーションレベルは、それぞれ F1.1a と F2.1a に比べて低いことが RP-HPLC-MS によって確認された (図 10c,d)。RP-HPLC-MS の結果に基づき F1.1a と F1.1b、F2.1a と F2.1b をそれぞれ混合し、LTP1 と LTP1b のグリケーションレベルが同等となるように調整した後に、グリケーションレベルを RP-HPLC-MS で確認した (図 11a,b)。LTP1 は 74.5%、LTP1b が 72.9%であり、有意差がなかった。グリケーションレベル調整後のサンプルとして、それぞれ精製 LTP1 および精製 LTP1b とし、以降の実験で使用した。

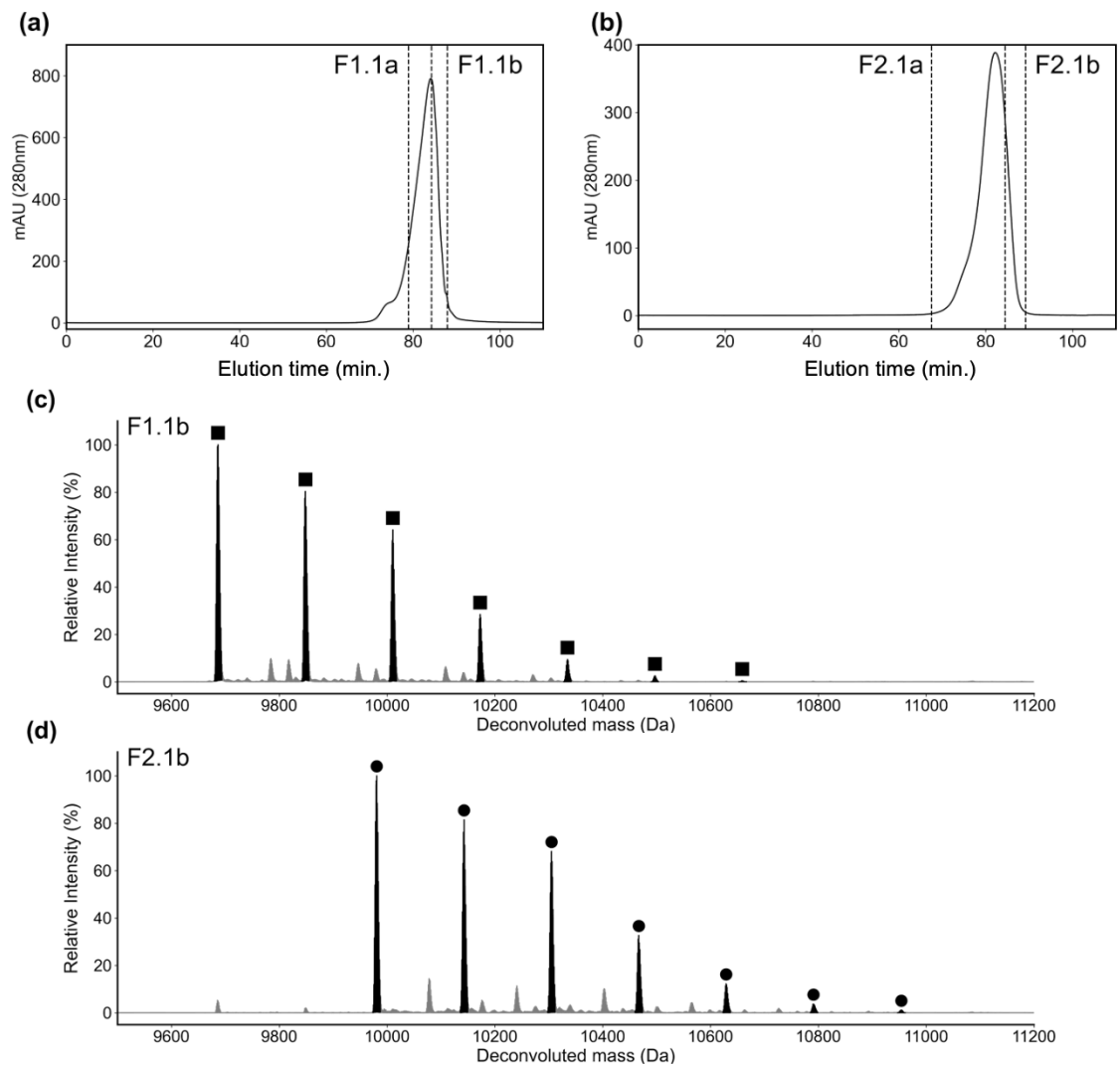


図 10 : (a) F1.1 および(b) F2.1 のサイズ排除クロマトグラフィーによる精製、ならびに分取された画分(c) F1.1b および(d) F2.1b の質量スペクトル。▲は LTP1-0g および LTP1-g を、●は LTP1b-0g および LTP1b-g をそれぞれ示す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

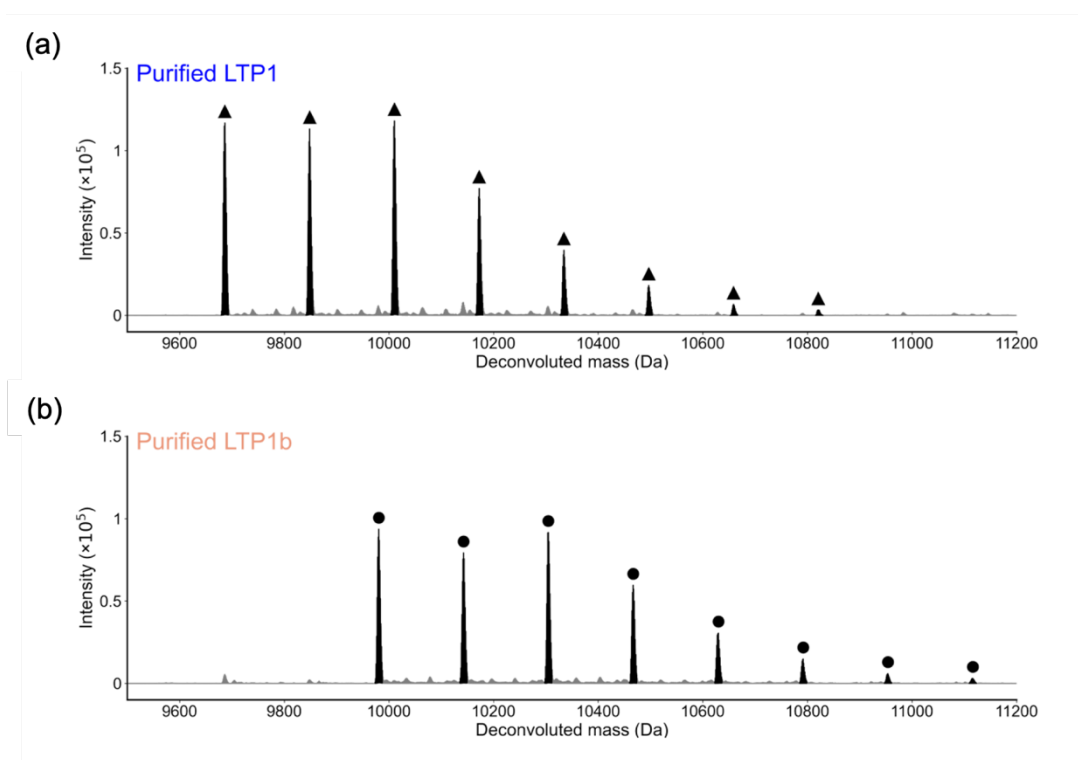


図 11：グリケーションレベル調整後の (a) 精製 LTP1 および (b) 精製 LTP1b のデコンボリューション質量スペクトル。▲は LTP1-0g および LTP1-g を、●は LTP1b-0g および LTP1b-g をそれぞれ示す。

([Mizuguchi, J et al., 2025](#) より転載した。)

2.3.2 LTP1/LTP1b の界面活性および泡沫特性

精製 LTP1 および精製 LTP1b の加熱前後の界面活性を動的表面張力測定により評価した (図 12)。加熱条件にかかわらず、LTP1b は LTP1 よりもわずかに低い表面張力を示した。起泡性については、LTP1b は加熱前、LTP1 よりも有意に高い起泡性を示した (図 13a)。しかしながら、加熱によって LTP1b 溶液の起泡性は顕著に減少し、加熱された LTP1 溶液と同等となった。泡沫安定性についても同様に、加熱前は LTP1b が LTP1 よりも有意に低い泡沫崩壊速度を示し、高い泡沫安定性を持つことが示唆された (図 13b)。90 分の加熱によって LTP1b 溶液の

泡沫安定性は顕著に減少したが、LTP1 溶液の泡沫安定性は加熱前と同等であった。LTP1 溶液の泡沫安定性は、180 分の加熱後顕著に減少した。加熱により界面活性は増加したにもかかわらず、起泡性および泡沫安定性は悪化し、さらに LTP1/LTP1b 間の界面活性の相対的關係とも明確な関連性は認められなかった。後述の実験で、加熱された LTP1 および LTP1b の物性を分析し、界面特性、起泡性および泡沫安定性の加熱による低下に寄与する要因を議論する。

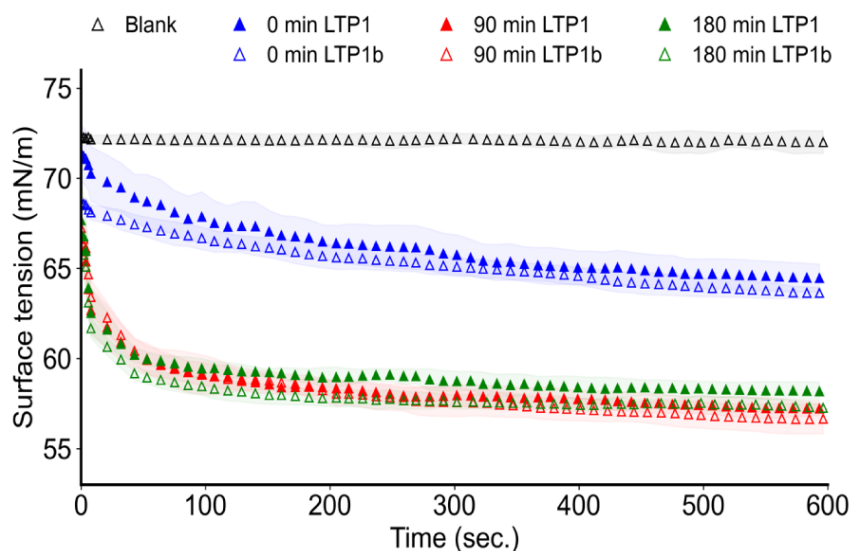


図 12 加熱処理した LTP1 および LTP1b の表面張力。網掛け部分は、各時点における 3 回の測定結果の標準偏差を示す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

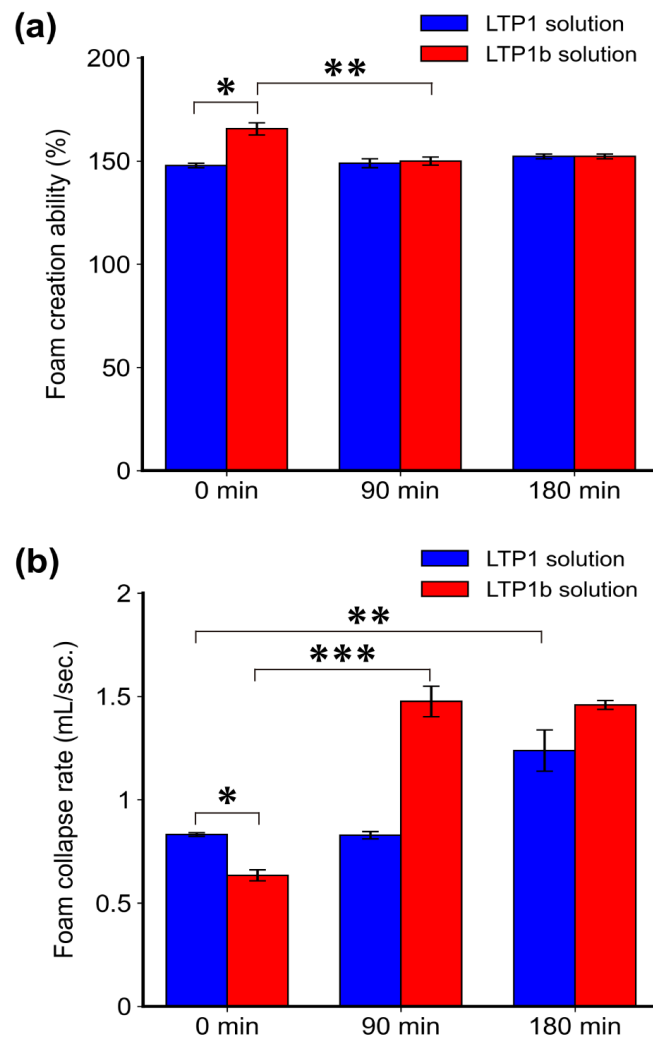


図 13 加熱時間 0 分、90 分、180 分後の LTP1 および LTP1b 溶液の (a) 起泡性および (b) 泡沫崩壊速度。アスタリスクは有意差を示す： $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.01$ (**)、 $p < 0.001$ (***)。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

2.3.3 LTP1/LTP1b の加熱による特性変化の分析

精製 LTP1 および精製 LTP1b を 100°C で 90 分間または 180 分間加熱した後、RP-HPLC-MS による分析を行った。図 14a のとおり、加熱前は精製 LTP1 および LTP1b の単一のピーク (P1 および P1b) が見られたが、100°C で加熱すると、新しいピーク (P2 および P2b) が出現し、P1 および P1b のピーク面積は減少した。P2 および P2b の保持時間が P1 および P1b に比べて長かったことから、LTP1 および LTP1b よりも高い表面疎水性を持つタンパク質が加熱プロセスによって生成されたことが示唆された。加熱前後で総ピーク面積 (P1 + P1b の合計および P2 + P2b の合計) はほとんど変化しなかった (表 1) ことから、P2 および P2b は LTP1 および LTP1b から生成した可能性が高い。各ピークの質量スペクトルをみると、P1 と P2 のいずれにおいても、LTP1 と LTP1-g に対応するピークがみられた (図 14b,c)。LTP1b を加熱した試料では、LTP1b のピークに加えて LTP1 に対応するピークも見られたことから、エステル結合が切断され、オキシリピンが解離したと考えられる (図 14d および 図 15)。これらの結果は、エステル結合の切断が 96~110°C の温度範囲で発生することを示した先行研究と一致している。注目すべきことに、P2b では LTP1b およびグリケーションした LTP1b のピークは検出されなかった (図 14e)。このことから、オキシリピンの解離が疎水性成分の生成に先行して起こる可能性が示唆された。

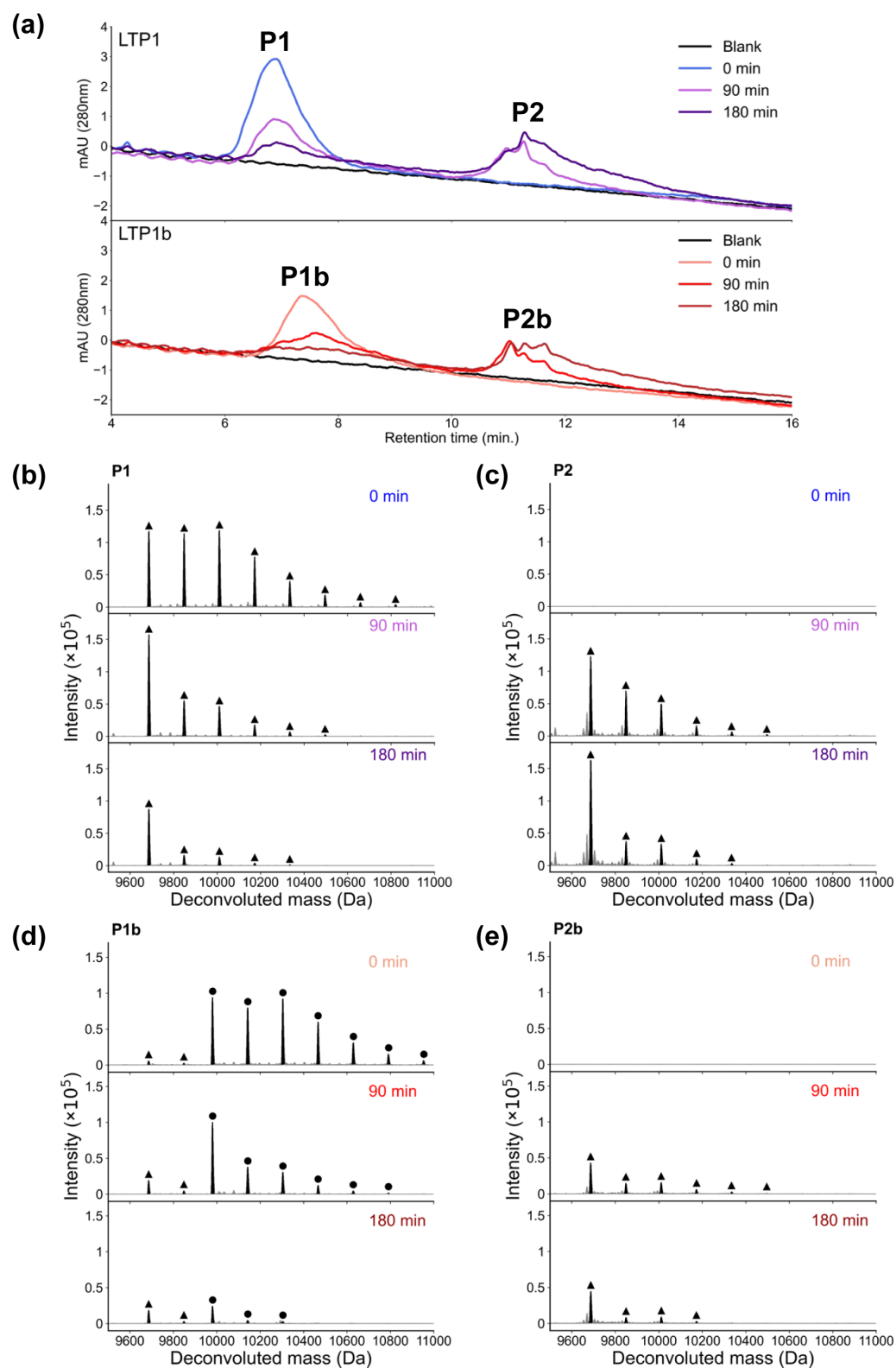


図 14 加熱処理前後の LTP1 および LTP1b の RP-HPLC-MS 分析。(a) RP-HPLC

クロマトグラム、(b) P1、(c) P2、(d) P1b、および (e) P2b のデコンボリューション質量スペクトル。▲は LTP1-0g および LTP1-g を、●は LTP1b-0g および LTP1b-g を示す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

表 1 各加熱時間点における LTP1 (P1+P2) および LTP1b (P1b+P2b) の総ピーク面積。0 分における LTP1 および LTP1b の総ピーク面積を 100%とした。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

	LTP1	LTP1b
90 min	101 ± 16.1	115 ± 10.4
180 min	106 ± 2.15	111 ± 7.88

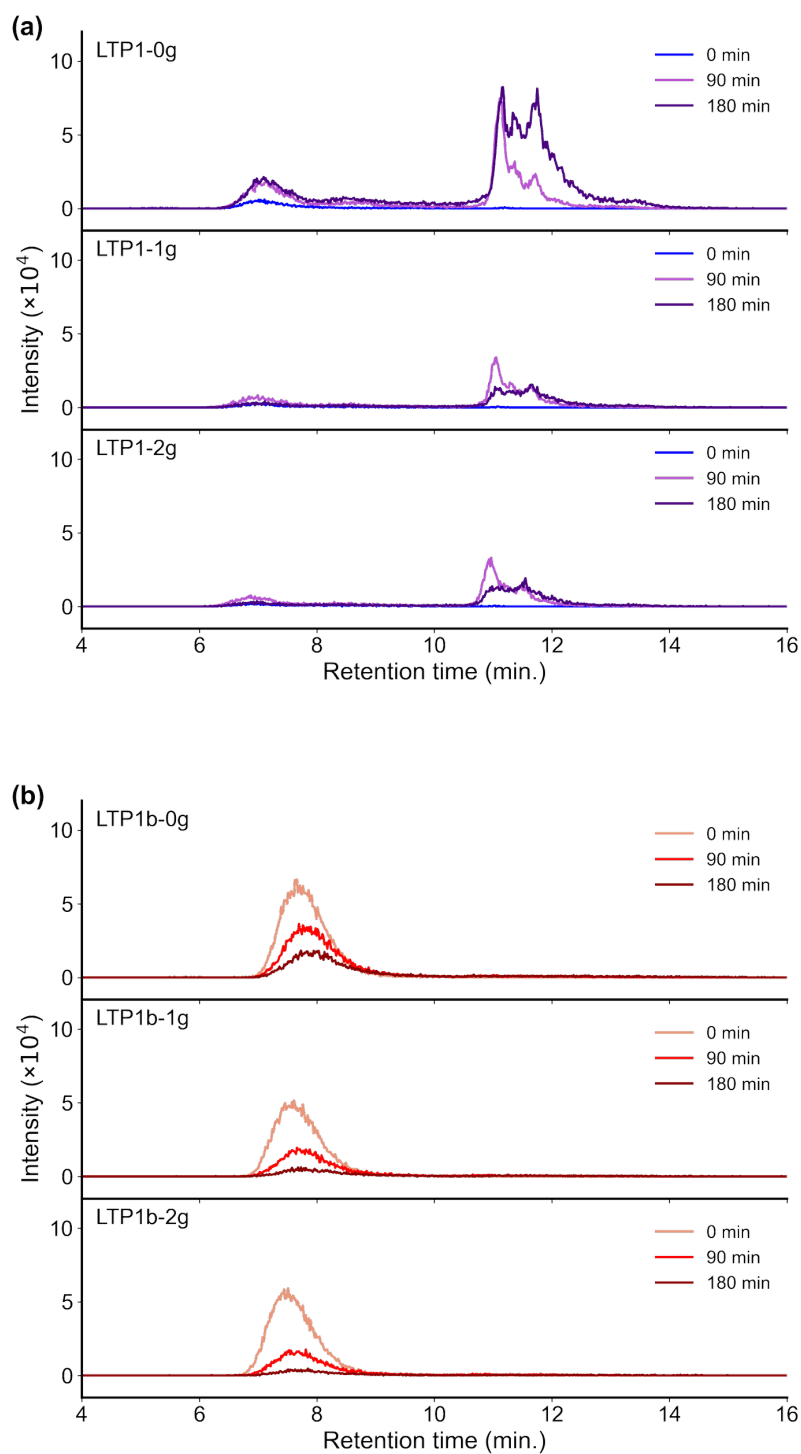


図 15 加熱処理した LTP1b サンプルにおける、(a) LTP1-0g、LTP1-1g、LTP1-2g および (b) LTP1b-0g、LTP1b-1g、LTP1b-2g の XIC。

([Mizuguchi, J et al., 2025](#) より転載した。)

グリケーションレベルに関して、LTP1-0g/LTP1b-0g ピークに対する LTP1-g/LTP1b-g ピークの高さの比が加熱によって減少した。この結果は、熱処理が糖の解離を引き起こしたことを示している。さらに、P2 および P2b ピークを詳細に解析したところ、LTP1 とは±16~18 Da 異なる m/z ピークがみられた (図 16a,b)。高温条件 (100°C) で起こるタンパク質の修飾として、セリンからデヒドロアラニン (DHA) への脱水、プロリンおよびアルギニンから 5-ヒドロキシ-2-アミノ吉草酸 (5-HAVA) への酸化、およびリジンから α -アミノアジピン酸セミアルデヒド (AAS) への酸化が報告されている⁶⁵⁻⁶⁷。P1 および P1b における LTP1 の同位体分布が熱処理による顕著な変化を示さなかったのに対し、P2 および P2b における LTP1 の同位体分布はわずかに変化し、ピークトップが+1 Da シフトした (図 16a,b)。加えて、同様の 1 Da の質量増加は、グリケーションした LTP1 でも観察された。観察された 1 Da の質量増加が脱アミド化によるものと仮定し、脱アミド化した場合としない場合の LTP1 の理論的な同位体分布を分子式からシミュレートし、実験データと比較した。P1 および P1b における LTP1 の同位体分布は、予想された通り、脱アミド化 LTP1 よりも脱アミド化していない LTP1 の理論的な同位体分布と一致した (図 17a,b)。一方で、P2 および P2b における同位体分布は、脱アミド化 LTP1 の理論的な同位体分布とより高い一致を示した (図 17c,d)。したがって、より長い保持時間を持つ P2 および P2b でのみ脱アミドが起こる可能性が示唆された。脱アミド化は局所的な構造変化を引き起こすことが知られていることから^{68,69}、脱アミド化を含む翻訳後修飾が疎水性の高い P2 および P2b の生成に寄与する可能性がある。

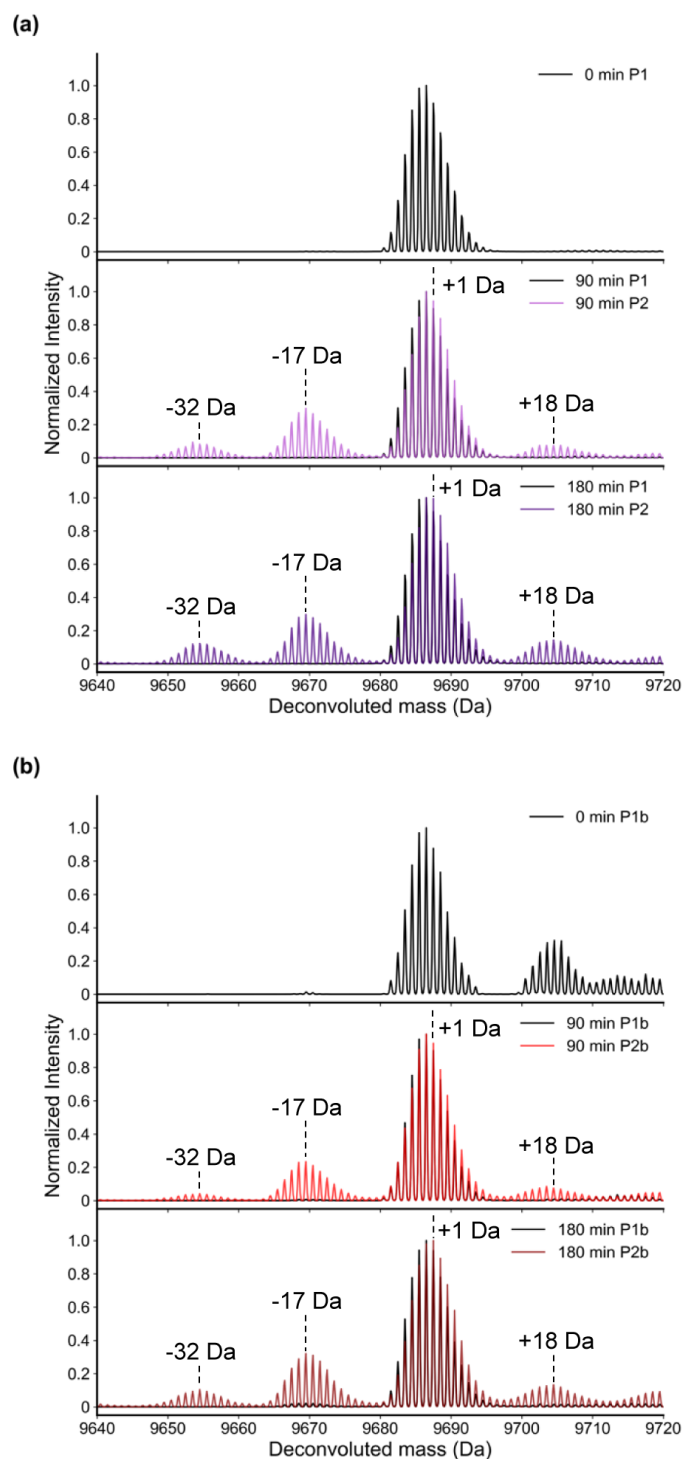
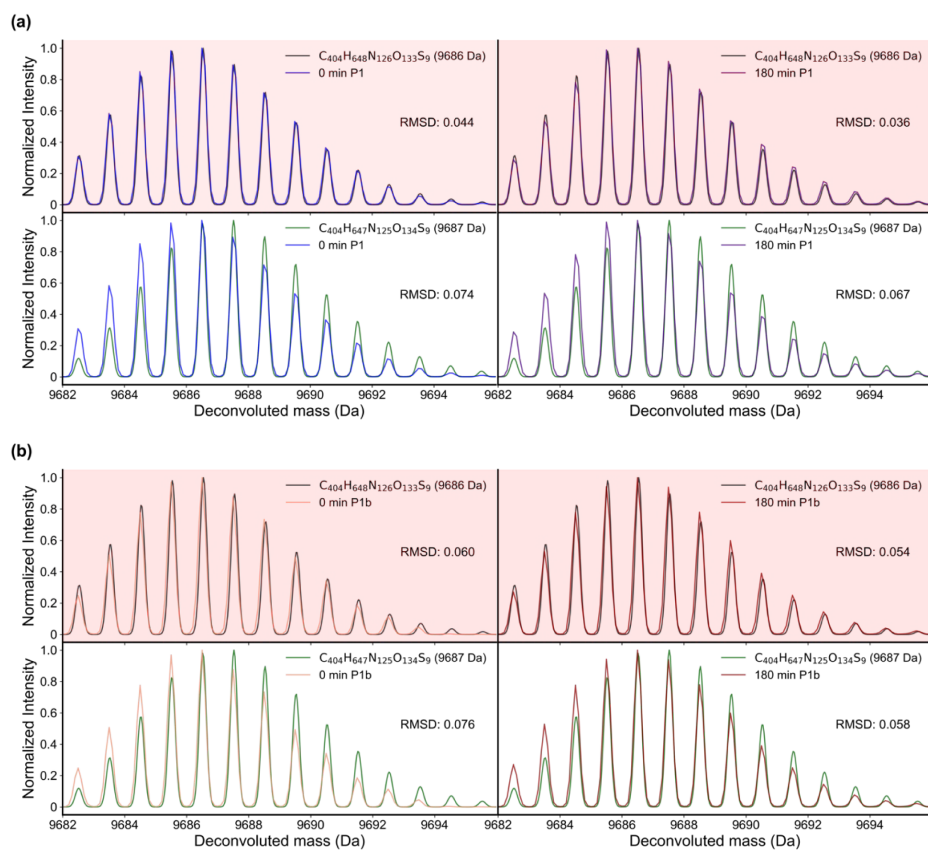


図 16 加熱時間ごとのデコンボリューション質量スペクトル (質量範囲 9,640～9,720 Da) : (a) LTP1 (P1 および P2)、(b) LTP1b (P1b および P2b)。各ピーク中央に示された値は、LTP1 (9,686 Da) に対する相対的な質量差を表す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)



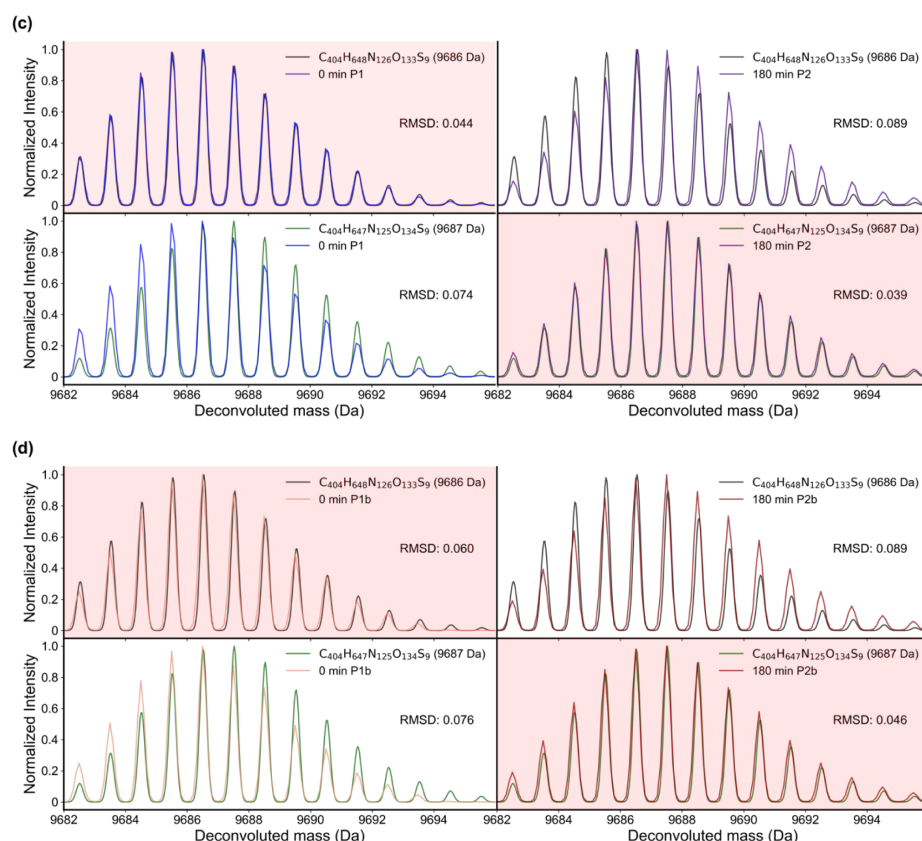


図 17 デコンボリューション質量スペクトルと理論的な同位体分布との比較。(a) P1、(b) P1b、(c) P2、および (d) P2b。これらのデコンボリューション質量スペクトルは、図 16 に示されているデータから作成した。比較のため、(c) と (d) には 0 分における P1 および P1b のデータも再掲した。上段のパネルは非脱アミド化 LTP1 の比較を示し、下段のパネルは脱アミド化 LTP1 の比較を示す。背景が赤色の部分は、脱アミド化と非脱アミド化の比較において二乗平均平方根偏差が低いことを示している。

([Mizuguchi, J et al., 2025](#) より転載した。)

2.3.4 LTP1/LTP1b の加熱によるサイズ分布および分子量変化の分析

加熱処理後の LTP1/LTP1b のサイズ分布変化を評価するため、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用し分析を行った。加熱前のサンプルでは、5.0~5.5 分にピークが検出され、その後に小さなピークが検出された (図 18a,b)。この小さなピーク群は、緩衝液のみを分析した際にも検出されたことから、緩衝液成分に由来すると考えられる。加熱時間が増加するにつれて、LTP1 と LTP1b の両方で 4.5~5.5 分のピークがより高分子量側へ広がり、加熱によってより大きな流体力学的半径を持つタンパク質の割合が増加することが示唆された (図 18c,d)。また、高分子量側へ主ピークは広がったが、主ピークの頂点の保持時間は低分子量側へシフトした。これは、オキシリピンの解離および脱グリケーションによって流体力学的半径がわずかに減少したことが原因であると考えられる。

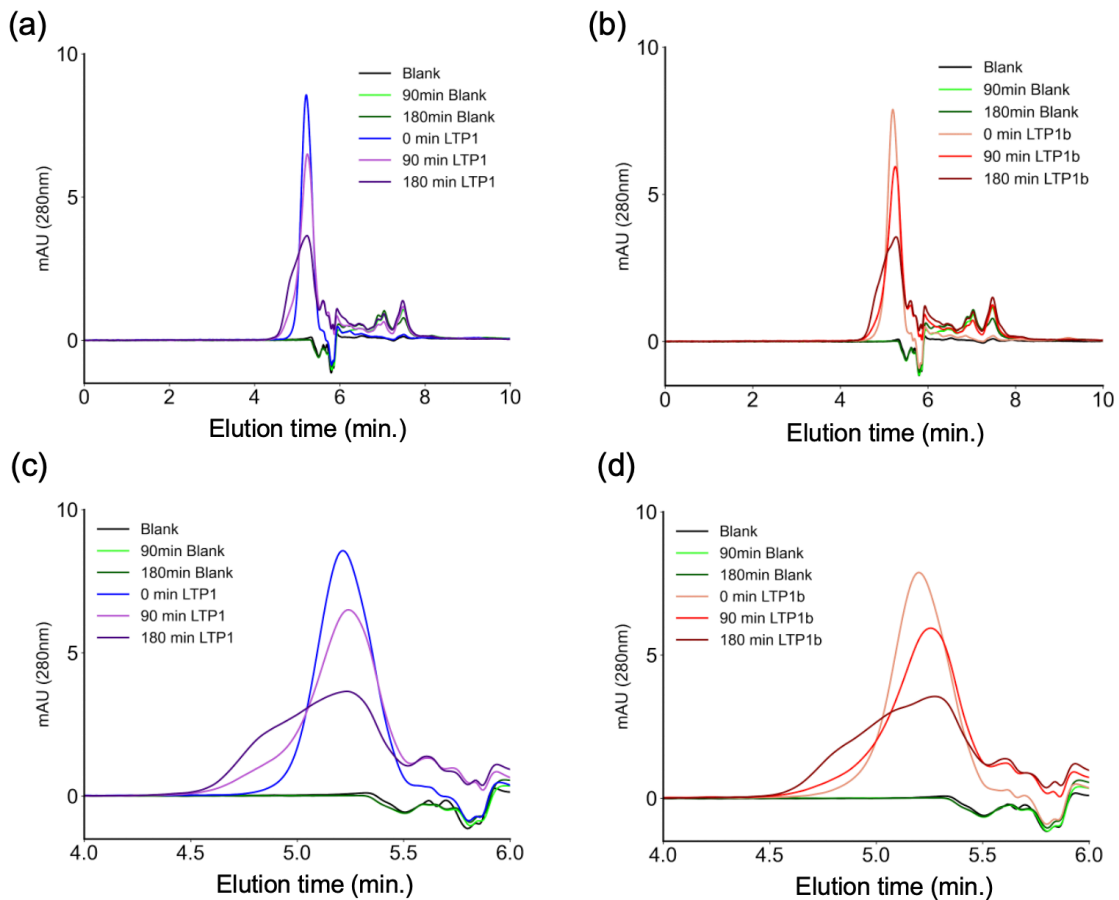


図 18 SEC クロマトグラム：加熱処理前後の (a) 精製 LTP1 (b) 精製 LTP1b (c) 精製 LTP1 の 4-6 min の拡大図 (d) 精製 LTP1b の 4-6 min の拡大図。

一般的に、流体力学的半径を増加させる会合体の形成は構造変化を伴って生じるが、構造変化のみでも流体力学的半径の増加が生じる可能性がある⁷⁰。したがって、加熱による流体力学的半径の増加が、構造変化あるいは会合体の形成によるものかを判断するため、SEC-MALS によりピーク成分の質量を分析した。SEC-MALS は、試料を流体力学的半径に基づいて分離した後、溶出した成分にレーザーを照射した際の散乱光を検出することによって質量を評価する手法である⁷¹。図 19 は保持時間ごとの散乱光強度と分子量を示しており、加熱によって散乱光のピークシフトと分子量の増加が確認された。加熱前 LTP1 は単量体に相当する質量が算出されたのに対し、加熱後ピークの質量は 15-40 kDa と算出された。このことから、加熱により LTP1 の会合体が生じたことが明らかとなった。先行研究で、加熱による二次構造変化が報告されていることを踏まえると²²、構造変化した LTP1 が相互作用し会合体が生じると考えられる。

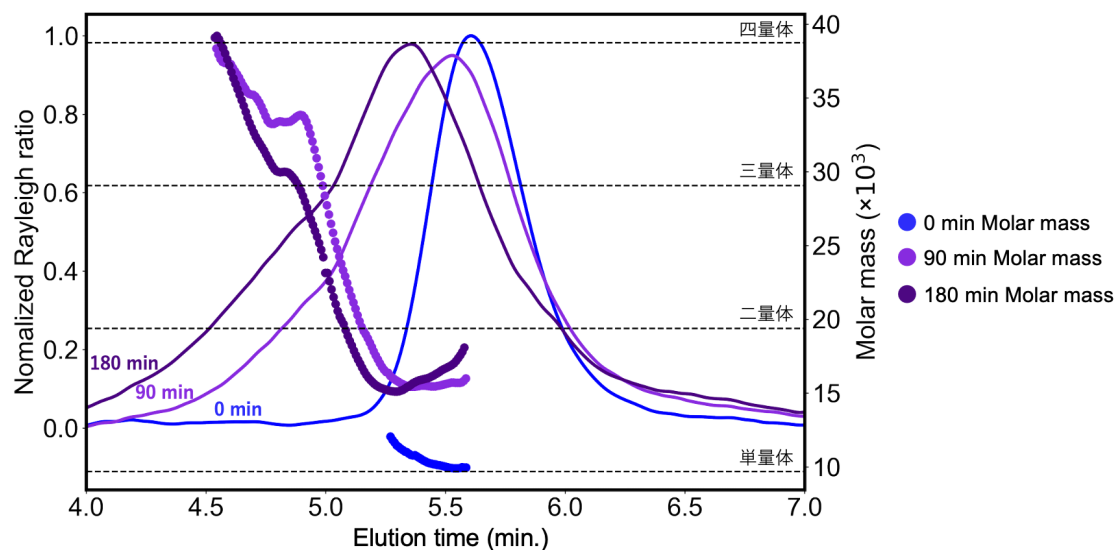


図 19 SEC-MALS を用いた精製 LTP1 の加熱前後での質量変化

2.3.5 低グリケーション LTP1/LTP1b および LTP1-0g の泡沫特性

RP-HPLC-MS と SEC-MALS の分析により、加熱によって LTP1b からのオキシリピンの解離、会合体の生成、グリケーションレベルの低下が生じることが示された。これらの特性変化の中で、グリケーションレベルの低下が泡沫特性に与える影響を検討した。グリケーションレベルを調整するために精製した、F1.1b と F2.1b では LTP1 および LTP1b のグリケーションレベルが低いため (F1.1b: 61.4%, F2.1b: 63.9%)、これらのサンプルと精製 LTP1 および精製 LTP1b の泡沫特性を比較した (図 20)。代表的なグリケーションレベルである LTP1 と LTP1b と比較したところ、低グリケーションの LTP1 と LTP1b は、起泡性、泡沫安定性ともに有意な差はみられなかった。次に、よりグリケーションレベルが低い場合の泡沫特性を評価するため、大麦抽出液から精製した LTP1-0g を使用して精製 LTP1 と泡沫特性を比較した (図 21)。(LTP1-0g の純度とグリケーションレベルを評価するための RP-HPLC-MS を用いた逆相クロマトグラムと質量スペクトラムは図

S2a,b に示した。) LTP1-0g においても、精製 LTP1 との起泡性、泡沫安定性ともに有意な差は認められなかった。したがって、泡沫特性へのグリケーションの影響は低いことが示唆された。オボアルブミンを用いた先行研究では、グリケーションが泡沫特性を変化させることが示されており⁷²、タンパク質の種類によってグリケーションの泡沫特性への影響は異なることが推察される。

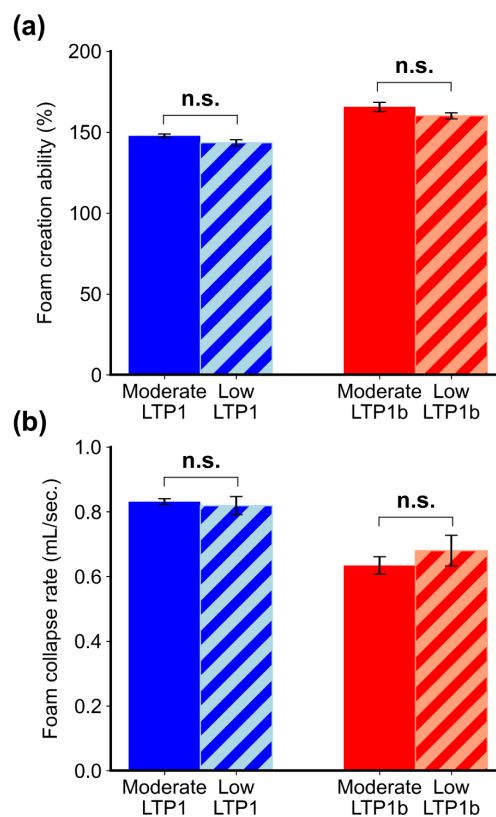


図 20 異なるグリケーションレベル（中程度および低程度）を持つ LTP1 および LTP1b 溶液の起泡性 (a) および泡沫崩壊速度 (b)。図 15 の「0 min」の結果を中程度のグリケーションレベルを持つ非加熱 LTP1 および LTP1b の結果として示した。「n.s.」は有意な差がないことを示す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

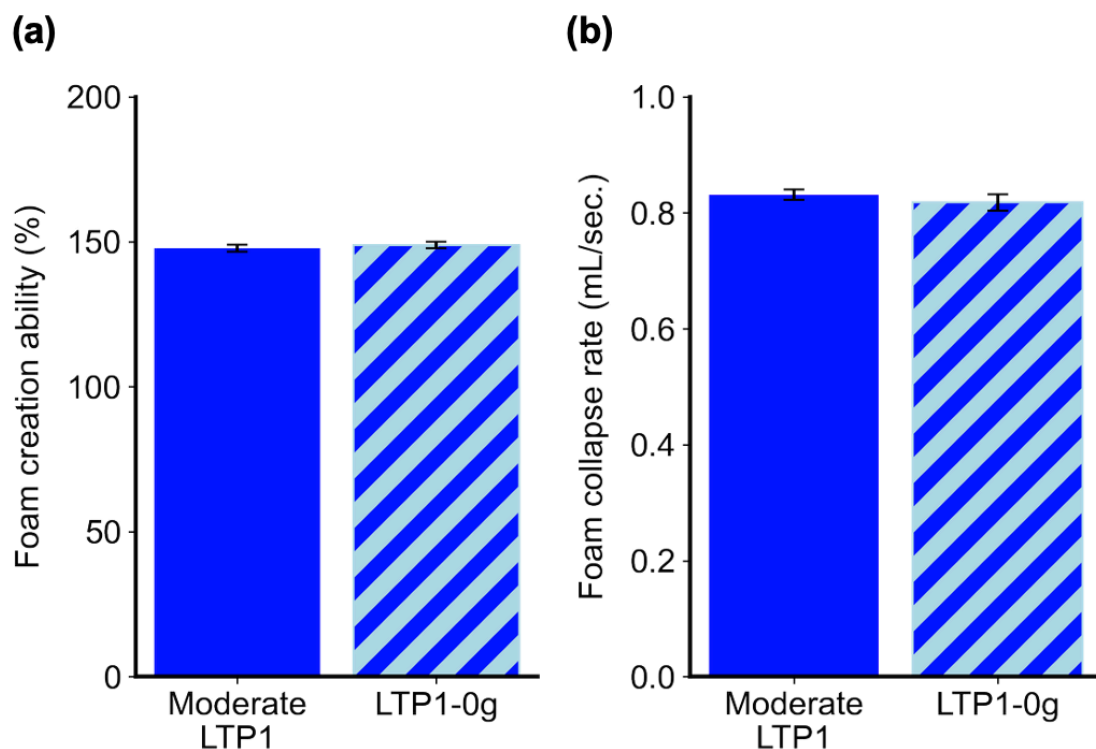


図 21 異なるグリケーションレベル（中程度および 0）を持つ LTP1 溶液の起泡性（a）および泡沫崩壊速度（b）。図 15 の「0 min」の結果を中程度のグリケーションレベルを持つ非加熱 LTP1 の結果として示した。「n.s.」は有意な差がないことを示す。

2.4 考察

加熱処理による LTP1/LTP1b の物性および翻訳後修飾の変化がビールの泡沫特性へ影響することは認識されてきた。しかし、加熱に伴う構造変化、疎水性の変化、翻訳後修飾などを含めた包括的な変化を踏まえたうえで、泡沫特性との関係性は十分に評価されていなかった。本研究で得られた分析結果から、加熱処理が LTP1/LTP1b に複数の変化を同時に引き起こすことが明らかとなった。ここでは、明らかとなった加熱による変化と泡沫特性の関連について考察する。

加熱を行わない場合、LTP1b は LTP1 よりも有意に高い起泡性を示した（図 13 a）。さらに、LTP1b は LTP1 よりもわずかに低い表面張力を示した（図 12）。これは、LTP1b に結合している疎水性のオキシリピンの一部が分子の表面に露出していることで、界面活性が高くなったと考えられる。

加熱によって、LTP1/LTP1b 溶液ともに表面張力が低下したが、起泡性は向上しなかった。これらの結果は、泡沫特性を評価する上で、界面活性の結果のみでは不十分で、実際に泡沫を形成しての測定が重要であることを強調している。この表面張力と起泡性の間に相関がみられない結果は、先行研究と一致している^{53,73}。これは、気液界面の形成プロセスが、表面張力測定で用いる液滴と実際の泡沫とで大きく異なるため、泡沫形成時の動的な吸着を表面張力測定では十分に評価できないことに起因すると考えられている。したがって、泡沫特性に影響を与える要因をより詳細に解明するには、泡沫形成時のような動的な状態においての、LTP1/LTP1b の気液界面への吸着挙動に基づいた評価が不可欠である。また、興味深いことに、水に溶解させた LTP1 を加熱した先行研究では、加熱後に起泡性が高くなることが示されていた^{74,75}。本研究ではビールの標準的な pH である pH 5.3 に調整した緩衝液を使用しており、加熱時の pH やイオン強度が LTP1/LTP1b の起泡性に影響を与える可能性がある。

起泡性と同様に、加熱前の泡沫安定性も LTP1b の方が LTP1 よりも高かった。タンパク質は気液界面に吸着し、分子間相互作用によって粘弾性のある界面膜を形成することで泡沫を安定化する²³。分子動力学シミュレーションを用いた研究で、LTP1b が気液界面で LTP1 よりも密な界面層を形成することが示されていることから、LTP1b が LTP1 よりも強い分子間相互作用を通じて気液界面に粘弾性のある膜を形成し、より高い泡沫安定性を示したと考えられる⁵¹。LTP1 と LTP1b とともに加熱後に泡沫崩壊速度が有意に増加し、泡沫安定性が低下するこ

とが示された (図 13b)。したがって、加熱にともなって生じた脱アミド化を伴う会合体の生成、オキシリピンおよび糖の解離が泡沫安定性を低下させる原因だと考えられた。しかしながら、精製 LTP1/精製 LTP1b と低グリケーションおよび LTP1-0g との泡沫特性の比較から、糖の解離による泡沫特性への影響は低いことが示唆された。このことから、脱アミド化を伴う会合体の生成、オキシリピンの解離が泡沫安定性の低下に大きく影響していると言える。すでに記載したように他のタンパク質を用いた先行研究では、グリケーションが泡沫特性を変化させることが示されており、タンパク質の種類によってグリケーションの泡沫特性への影響は異なることが推察される。一方で、グリケーションはタンパク質の構造安定性を増加させることが報告されており、LTP1/LTP1b 加熱時の会合体の形成やオキシリピンの解離に影響を与える可能性がある。したがって、グリケーションは泡沫特性には直接的に関与しないものの、他の特性変化に関与することで間接的に泡沫特性に影響する可能性があるため、複合系におけるグリケーションの影響に着目する必要がある。

一般に、タンパク質の流体力学的半径は変性後に増加する^{76,77}。先行研究によると、LTP1b の構造変化は約 100°C で始まる⁷⁸。したがって、SEC-MALS で確認された会合体は、構造変化が生じた後に形成されたと考えられ、構造変化体および会合体が加熱後の疎水性の増加に寄与する可能性がある。加熱による表面張力の顕著な低下は、気液界面への吸着の増加を示している。しかしながら、泡沫安定性の増減がタンパク質の会合体の量およびサイズに依存するという報告に加え⁷⁹、加熱によって精製 LTP1/LTP1b の大半が疎水性 LTP1 に変化したこと (図 14a) を考慮すると、泡沫を安定させる気液界面でのネットワークの形成が会合体の形成によって妨げられた可能性がある。また、分子の疎水性は泡沫安定性と相関があると考えられているが、本研究では加熱によって RP-HPLC で保持

時間の長い成分が増加したが、泡沫安定性は低下した。疎水性の他に、表面電荷や構造の柔軟性も泡沫安定性に影響を与えることが報告されており、疎水性以外の特性も解析することで、加熱による変化が泡沫安定性を低下させるメカニズムを明らかにすることができると考えられる⁸⁰。

遊離脂肪酸は泡沫を不安定にすることが知られていることから⁸¹、LTP1b から加熱によってオキシリピンが放出されたことが、加熱された LTP1b の泡沫安定性低下に寄与した可能性が考えられる。本研究では、LTP1b の濃度を 10 μM に調整しており、オキシリピンが LTP1b から完全に解離したと仮定すると、放出されたオキシリピンの濃度は 1,400 $\mu\text{g/L}$ となる。これは、泡沫安定性を低下させる遊離脂肪酸の濃度閾値よりも高く、LTP1b からのオキシリピンの解離が泡沫安定性を低下させたことが支持される²²。

以上より、加熱前 (100°C)、LTP1b は LTP1 に比べて起泡性および泡沫安定性に優れ、ビールの泡沫特性向上に寄与すると考えられる。一方で、100°C での加熱処理を行うと、会合体の形成に加えて、LTP1b からオキシリピンが遊離することで、泡沫安定性が顕著に低下する。ビールの醸造において、煮沸工程はメイラード反応やカラメル化による香味成分の生成、酵素の失活と殺菌、ホップ由来苦味成分であるフムロンの異性化、タンパクやポリフェノールなどの凝集体の澄清化、オフフレーバーの除去など、最終的なビールの品質を決定づける重要なプロセスである^{7,9}。従って、本研究で得られたこれらの知見を指標に、煮沸条件の最適化を行うことで、煮沸の本来の目的を維持しつつ、会合体の形成と LTP1b からオキシリピンの解離を抑制することが可能となる。

第三章 ビールの高品質な泡沫を実現するための新たな戦略の探索

3.1 背景

第二章では、未加熱状態の精製 LTP1b が精製 LTP1 を上回る優れた起泡性と泡沫安定性を示すこと、そして加熱処理が泡沫を不安定化させるオキシリピンの解離を引き起こし、その泡沫特性が低下する可能性を明らかにした。これらの結果から、ビール製造プロセスにおいて LTP1b の残存量を高めることが、ビールの泡品質を改善する有望なアプローチとなりうることが示唆された。そこで次に、複雑な混合系である実際のビールで LTP1/LTP1b が泡沫特性向上に貢献するかについて、第三章では中味特性が異なる製品ビールの LTP1/LTP1b と泡沫安定性の関係を調査することとした。さらに、醸造工程における煮沸においても、LTP1b からのオキシリピンの解離や、会合体を含む疎水性 LTP1 の生成が、精製 LTP1b を加熱した際と同様の変化が起きているのかを調査した。そして、それらの結果に基づき LTP1b の残存量を増加させるための具体的な方法論を検討することで、ビールの泡持ち改善という長年の課題を解決するための新たな道筋を拓くことを目指す。

3.2 実験試料および実験方法

3.2.1 実験試料

総窒素量及び苦味価が異なる 17 種類の市販ビール（ビールおよび発泡酒を含む）、大麦麦芽、ホップ、水を原料としてパイロットスケールで醸造した、一番麦汁、ホップ添加麦汁およびビールからの粗精製タンパク質（それぞれ、一番麦汁粗タンパク質、ホップ添加麦汁粗タンパク質およびビール粗タンパク質で表記した。）、LOX 欠失を導入したことで LOX 活性が低下したビール用二条大麦

と一般的な LOX 活性を持つビール用二条大麦と、それぞれ同じロットの大麦から製造した麦芽から抽出したタンパク質はサントリーグローバルイノベーションセンター（株）より提供された。第二章で前述した試薬、精製 LTP1/LTP1b は引き続き使用した。

3.2.2 RP-HPLC-MS を用いた精製 LTP1/LTP1b、一番麦汁粗タンパク質、市販ビールの LTP1-0g /LTP1b-0g 濃度概算

吸光度（280 nm）に基づいて 10 μ M に濃度調整した精製 LTP1/LTP1b のグリケーションレベル毎に（LTP1-0g/LTP1b-0g から LTP1-7g/LTP1b-7g まで）XIC ピーク面積を解析し、その総和を算出した。その後、総和に対する LTP1-0g /LTP1b-0g のピーク面積比を求め、これに 10 μ M を乗じることで、精製 LTP1/LTP1b 中の LTP1-0g /LTP1b-0g の濃度を概算した。この LTP1-0g /LTP1b-0g の濃度と XIC ピーク面積との間に比例関係があると仮定し、原点との直線を検量線とした。一番麦汁粗タンパク質、市販ビールの LTP1-0g/LTP1b-0g の XIC ピーク面積値から検量線を用いて市販ビールの LTP1-0g /LTP1b-0g 濃度を概算した。

3.2.3 NIBEM によるビール泡沫安定性評価

NIBEM-TPH 装置（Haffmans, Venlo, Netherlands）を用いて測定した。20°C のビールを、専用の円筒形ガラス（内径 60 mm、内高 120 mm）の中に炭酸ガスを用いて強制的に注ぎ起泡させ、ビール泡面が 10 mm 低下した時から 40 mm まで、30 mm 分低下するまでの時間を電導度センサーにより測定した。

3.2.4 パイロットスケールでのビールの醸造

ビールの醸造では、大麦麦芽とホップから麦汁を製造した。糖化は、50℃で 20 分、65℃で 40 分、73℃で 3 分という段階的に温度を増加して実施し、一番麦汁として分取した。糖化後は麦汁を 90 分間煮沸した後に冷却し、ホップ添加麦汁として分取した。冷却後の麦汁は溶存酸素濃度を 10～11 ppm に調整し、ラガー酵母を加えて 11℃で発酵させ、その後熟成させた。最終的に、ろ過と瓶詰めを行い、溶存酸素濃度を 100 ppb 以下に調整して、ビールとして分取した。

3.2.5 一番麦汁、ホップ添加麦汁およびビールからの粗精製

一番麦汁、ホップ添加麦汁の粗精製は 2.2.2 項と同様に行った。ビールは 2.2.2 項で示された手法に以下の修正を加え、粗精製を行った。陽イオン交換樹脂からタンパク質画分を回収した後、NaOH を添加して pH 7.0 に調整し、硫酸アンモニウムを最終濃度 1.8 M になるように加えて 4℃で一晩攪拌し、タンパク質を塩析した。塩析したタンパク質を、透析で脱塩処理を行い、最終的に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を溶媒として使用した。

3.2.6 RP-HPLC-MS を用いた一番麦汁粗タンパク質、ホップ添加麦汁粗タンパク質およびビール粗タンパク質の表面疎水性および翻訳後修飾の評価

2.2.5 項と同様に実施した。

3.2.7 大麦および麦芽からのタンパク質抽出

2.2.3 項で前述したタンパク質の抽出方法と同様に実施した。

3.2.8 全窒素含有量 (TN: Total nitrogen)、苦味価 (BUs: Bitter units) の定量

全窒素含有量 (TN) および苦味価 (BUs) はビール酒造組合国際技術委員会 (BCOJ) の分析法 (8.9.2 および 8.15) に従い分析した。

3.3 結果

3.3.1 LTP1b の泡沫安定化効果：純粋系と混合系における比較

NIBEM 法では一定条件下で生成されたビールの泡が、特定の厚さまで崩壊するのに要する時間を測定する。まず、測定対象となるビールサンプルは、規定された温度および圧力の条件下で、専用の装置を用いて自動的に泡立てられる。次に、この泡沫が自然に崩壊していく過程を観察する。泡沫の液化が進行するにつれて、泡沫の高さは徐々に減少する。本測定では、泡沫の安定性を示す指標を、泡沫の高さが初期の高さから 30 mm 下に達するまで崩壊するのに要した時間とした。この NIBEM 値が大きければ大きいほど、そのビールがより高い泡沫安定性を有していると解釈できる⁸²。

図 22a,b に市販ビールの LTP1-0g/LTP1b-0g 濃度と NIBEM 値との相関を評価した結果を示す。LTP1-0g/LTP1b-0g はそれぞれ 0-0.2 μM 、0-0.5 μM の範囲であった。LTP1-0g/LTP1b-0g と NIBEM 値の相関係数はそれぞれ 0.32、0.17 であり、高い相関係数が確認できなかった。しかしながら、LTP1b-0g 濃度が 0.2-0.3 μM で NIBEM 値が高止まりしていると考えられた。興味深いことに、糖化工程で麦汁の一部を煮沸し、元の麦汁に戻すデコクション法を行っているビール（オレンジ色のマーカー）では、LTP1b-0g 濃度が高いにも関わらず NIBEM 値

が高止まりする傾向がみられた。そのため、デコクション法を採用しているビールを除いた解析では、NIBEM 値との相関係数は LTP1b-0g では 0.90 で高い正の相関係数を示す一方、LTP1-0g は 0.54 であった (図 23a,b)。このことから、LTP1b が複雑な混合系であるビールにおいても、泡沫安定性に正に寄与する可能性が示唆された。

そこで、次に、複合系における LTP1b 単独の泡沫安定性への寄与を確認するため、市販ビール (Beer 1) に精製 LTP1b を添加し、NIBEM 測定を実施した。図 24 のとおり、精製 LTP1b の添加によって NIBEM 値が明確に増加したことから、精製 LTP1b の添加がビール泡沫の安定化に効果的であることが分かった。ただし、「Beer1”」で NIBEM 値の高止まり傾向が見られたことから、LTP1b の添加量が増えたとしても、ビールの泡沫安定性に上限が存在する可能性がある。

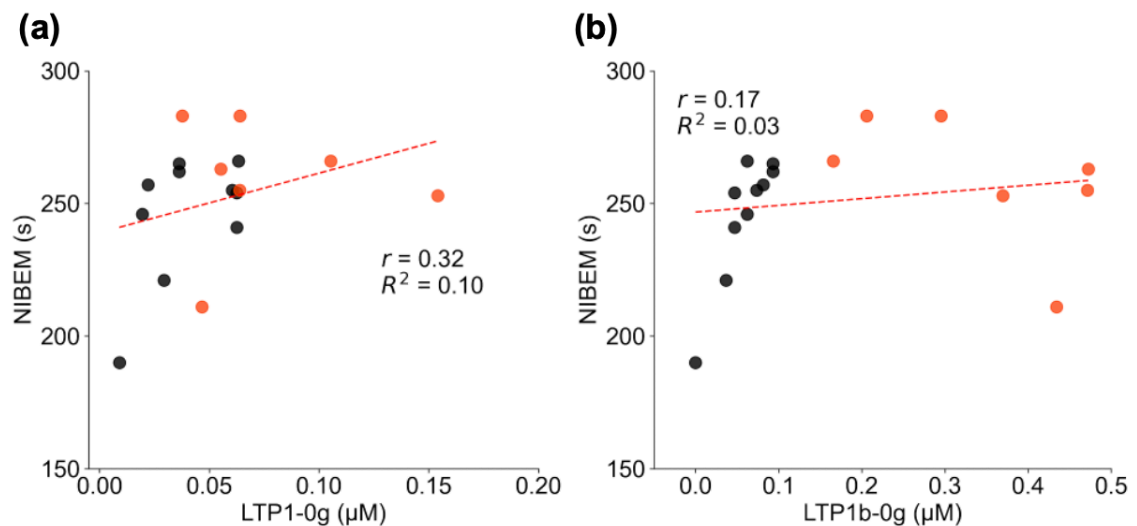


図 22 17 種類の市販ビールテイスト飲料の NIBEM 値と (a) LTP1-0g、(b) LTP1b-0g の関係

デコクション法を用いて醸造しているビールをオレンジのマーカで示す。相関係数 (r)、決定係数 (R^2) の値をそれぞれ示す。

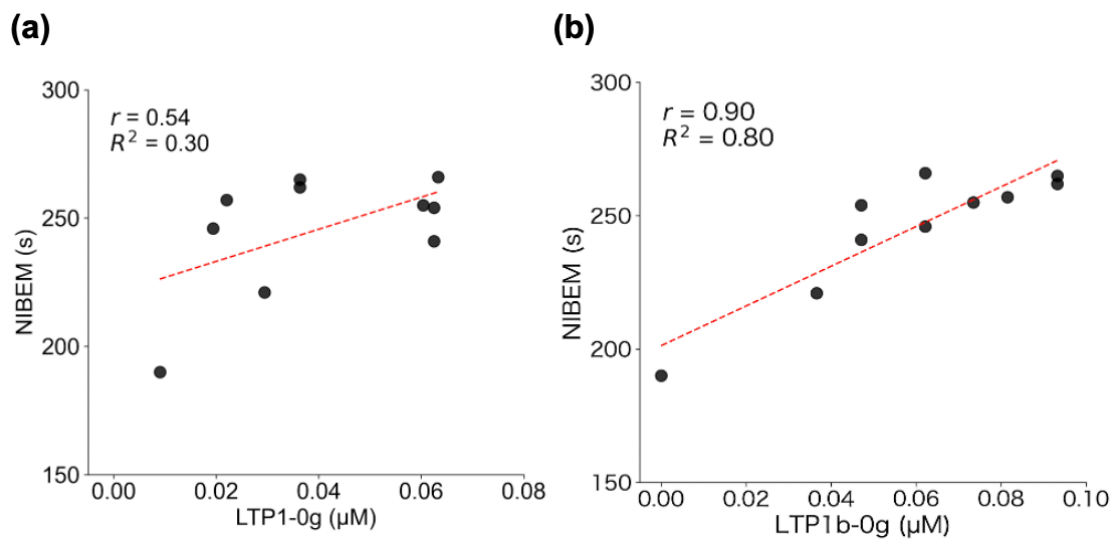


図 23 デコクション法を用いていないビールの (a) LTP1-0g 濃度と NIBEM 値の関係、(b) LTP1b-0g と NIBEM 値の関係
相関係数 (r)、決定係数 (R^2) の値をそれぞれ示す。

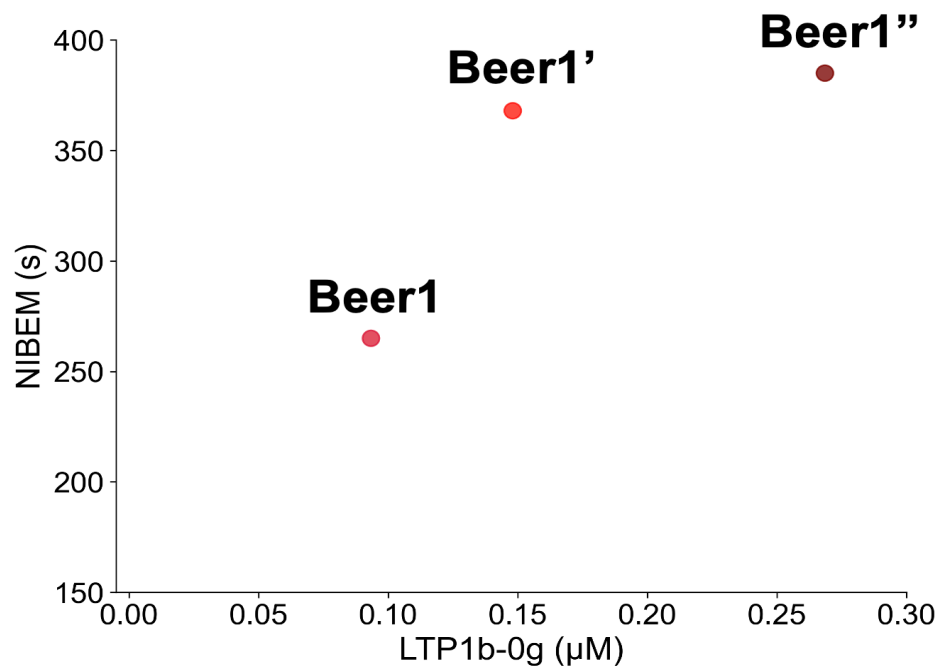


図 24 精製 LTP1b 添加時の NIBEM 値の増加

Beer1：市販ビール

Beer1'：Beer1 に精製 LTP1b を添加したビール

Beer1''：Beer1 に精製 LTP1b を高濃度添加したビールをそれぞれ示す。

精製 LTP1b の添加がビールの泡沫安定性向上に効果的であることが明らかとなったが、実際のビール醸造工程において LTP1b だけを選択的に増加させることは現実的でないため、クルードなタンパクの状態でも LTP1b が増加すれば泡沫安定性が向上するかを確認する必要がある。そのため、一番麦汁から CEX で分取した、LTP1b を含む粗タンパク質（一番麦汁粗タンパク質）の添加でも NIBEM 値が増加するか検証を行なった。

精製 LTP1b と一番麦汁粗タンパク質を添加した際の NIBEM 値の変化量を図 25 に示した。同じ製品ビール（Cont.）に、LTP1b-0g 濃度が同等になるように精製 LTP1b を添加した精製 1 と一番麦汁粗タンパク質を添加した粗 1 を比較した結

果、精製 1 が顕著に高い NIBEM 増加量を示した。CEX 処理した一番麦汁粗タンパク質の主成分の大部分がタンパク質であると推察されることから、この違いの要因は、LTP1b 以外の他のタンパク質による LTP1b の気液界面への吸着阻害による可能性が考えられた。この仮説を検証するため、粗 1 にさらに同じ LTP1b-0g 濃度相当の一番麦汁粗タンパク質を添加した粗 2 と精製 LTP1b を添加した精製 2 を比較した結果、前述の結果と同様に、粗 2 よりも精製 2 のほうが NIBEM 値が顕著に増加した。ところが、粗 2 に対しさらに同じ LTP1b-0g 濃度相当の一番麦汁粗タンパク質を添加した粗 3 と精製 LTP1b を添加した精製 3 を比較した結果、精製 3 よりも粗 3 のほうが NIBEM 値の増加が大きくなり、それぞれの効果が逆転した。つまり、総タンパク質濃度がある濃度以上高くなることで、精製 LTP1b 添加の NIBEM 値の上昇効果が抑制されたと考えられる。さらに一番麦汁粗タンパク質の濃度を増加すると（粗 4、粗 5）、NIBEM の値が高止まりのような傾向を示した。一方、粗 4 に精製 LTP1b を添加した精製 4 は NIBEM 値が顕著に減少した。これは LTP1b が他のタンパクに吸着し相互作用することで、泡沫安定性を失わせた可能性がある。以上の結果から、複数の総タンパク質濃度が過剰になると、精製 LTP1b の泡の気液界面への吸着が顕著に抑制されることが示唆された。特に、粗タンパク質が高濃度の場合、精製 LTP1b の添加は NIBEM 値の改善に対してむしろ負の効果をもたらすことが示され、単にタンパク濃度を増加させるだけでは泡質を改善できないといえる。これらの知見は、ビールの泡沫安定性を向上させるためには、他のタンパク質の濃度を制御しつつ、精製 LTP1b を添加する戦略が必要であることを示している。

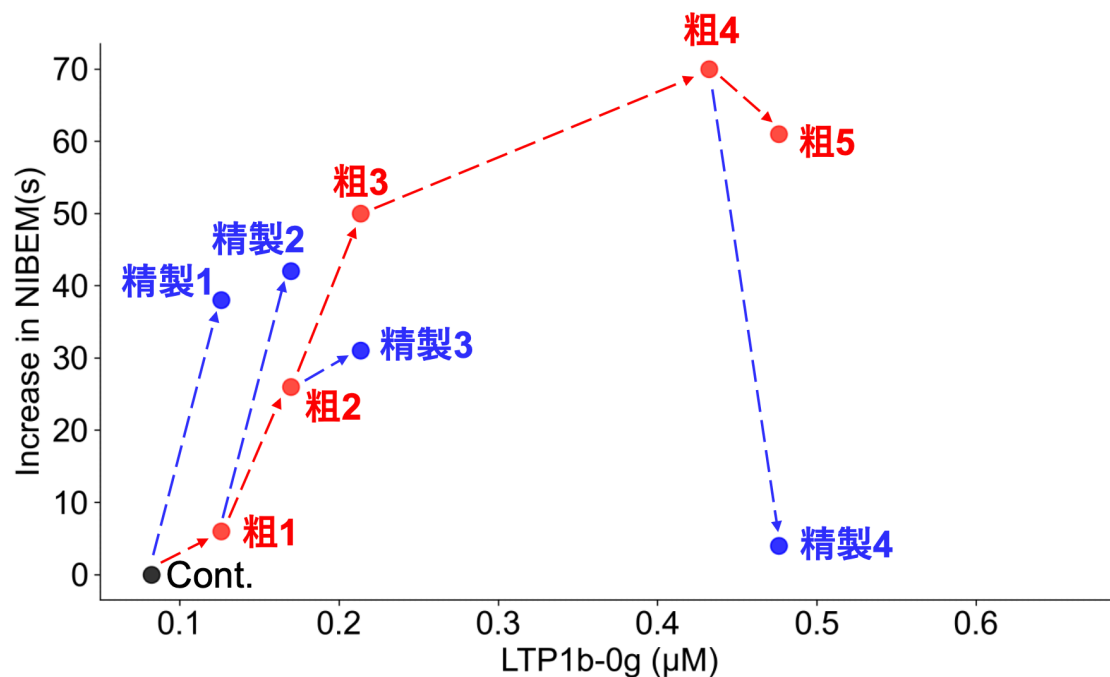


図 25 一番麦汁粗タンパク質および精製 LTP1b 添加が NIBEM 値に与える影響
 精製 LTP1b あるいは一番麦汁粗タンパク質を添加した際のビールの NIBEM 値の増加を示している。添加実験にはビール（コントロール：黒い丸で表示）を使用し、NIBEM 値の増加量は、添加前後の NIBEM 値を比較することで算出した。精製 LTP1b の添加による NIBEM 値の増加は、青い丸で示されており、一方、一番麦汁粗タンパク質添加時の増加量は赤い丸で示されている。添加前後の NIBEM 値の増加は点線の矢印で示している。

3.3.2 醸造工程における LTP1b の変化

3.3.1 において、ビールの泡沫安定性を向上させるためには、ビール中の LTP1b の絶対量および他のタンパク質に対する相対量を増加させることが効果的であることが示された。しかし、第二章の分析で、精製 LTP1b 溶液を加熱した際に、LTP1b に結合したオキシリピンが解離し、LTP1b の量が減少することが明らかに

なった。一方で、実際の醸造工程では、多様な化合物が混在しており煮沸中における LTP1b からのオキシリピンの解離を抑制または促進する可能性がある。これらの背景を踏まえ、醸造工程でのオキシリピンの LTP1b からの解離について、LTP1b 含有量の醸造工程での推移を分析することで検証した。また、精製 LTP1/LTP1b 溶液を加熱した際に生じた、疎水性成分の増加、グリケーションレベルおよびその他の翻訳後修飾の変化が、実際の醸造工程においても生じるかについて、同一ロットの醸造工程から得た一番麦汁、ホップ添加麦汁、およびビールの各粗精製サンプルを分析することで検証した。

醸造工程の各段階（一番麦汁、ホップ添加麦汁、ビール）における LTP1 および LTP1b の挙動を、LC-MS を用いて分析した。その結果、第二章の結果と同様に、LTP1/LTP1b のピークは低疎水性領域（4-10 分）と高疎水性領域（10-16 分）に溶出した（図 26a）。一番麦汁では大部分のピークが低疎水性領域で観察された一方、ホップ添加麦汁とビールでは高疎水性成分が大部分を占めた。これらの結果から、実際の醸造においても煮沸工程中の高温条件によって疎水性成分が増加することが明らかとなった。

また、一番麦汁からホップ添加麦汁への工程で、全 LTP1/LTP1b ピーク面積に対する LTP1b のピーク面積比が大きく減少する一方で、LTP1 のピーク面積比が顕著に増加した。この変化は、LTP1b からのオキシリピンの解離が、実際の醸造工程中においても生じていることを示唆している。さらに、この LTP1b の割合の減少は煮沸段階だけでなく、ホップ添加麦汁からビールへの発酵工程においても観察された。この結果から、オキシリピンの LTP1b からの解離が、高温だけでなく、酵母由来のエステラーゼ活性によっても引き起こされる可能性が示唆される。以上より、醸造工程中においても LTP1b の減少が確認され、特に煮沸時および発酵時における LTP1b の減少を抑制することが、ビール中の LTP1b

残存量の増加につながり、泡沫安定性の向上に寄与する戦略となり得ることが示された。

醸造工程由来の試料の分析では、高疎水性領域で LTP1 のピークが 2 つに分かれて溶出した。より遅く（約 13 分）に溶出したピークは、精製 LTP1/LTP1b の加熱処理では見られなかった。先行研究で、ホップ由来のイソ α 酸がタンパク質と相互作用して疎水性複合体を形成することが報告されていることから、LTP1 以外の成分との複合体の可能性がある。また、そのピークの相対ピーク面積は発酵後に増加したことを考えると、酵母および/または発酵由来の成分ともより疎水性の高い複合体を形成する可能性や発酵中に疎水性が低い成分が分解される可能性がある。構成成分の種類や濃度が異なる試料を分析することで、疎水性成分のより詳細な解析が可能になると考える。

低疎水性領域と高疎水性領域における質量スペクトルを図 26b,c に示す。高疎水性領域は、二つに分かれたピーク間で明らかな質量スペクトルの違いがなかったことから、保持時間 10-16 分のスペクトルとしてまとめて示した。第二章で加熱した LTP1/LTP1b とは対照的に、グリケーションレベルは煮沸によって増加し、発酵後も顕著に減少することはなかった。麦汁には還元糖が含まれているため、煮沸中にもグリケーションが進行すると考えられる。

ホップ添加麦汁およびビールの質量スペクトル分析の結果、脱アミド化に起因する可能性のある +1 Da の質量シフトが確認された（図 27）。これらの修飾は、大麦由来のタンパク質やホップ由来のイソ α 酸などの共存成分とは独立して、高温条件によって引き起こされると考えられる。

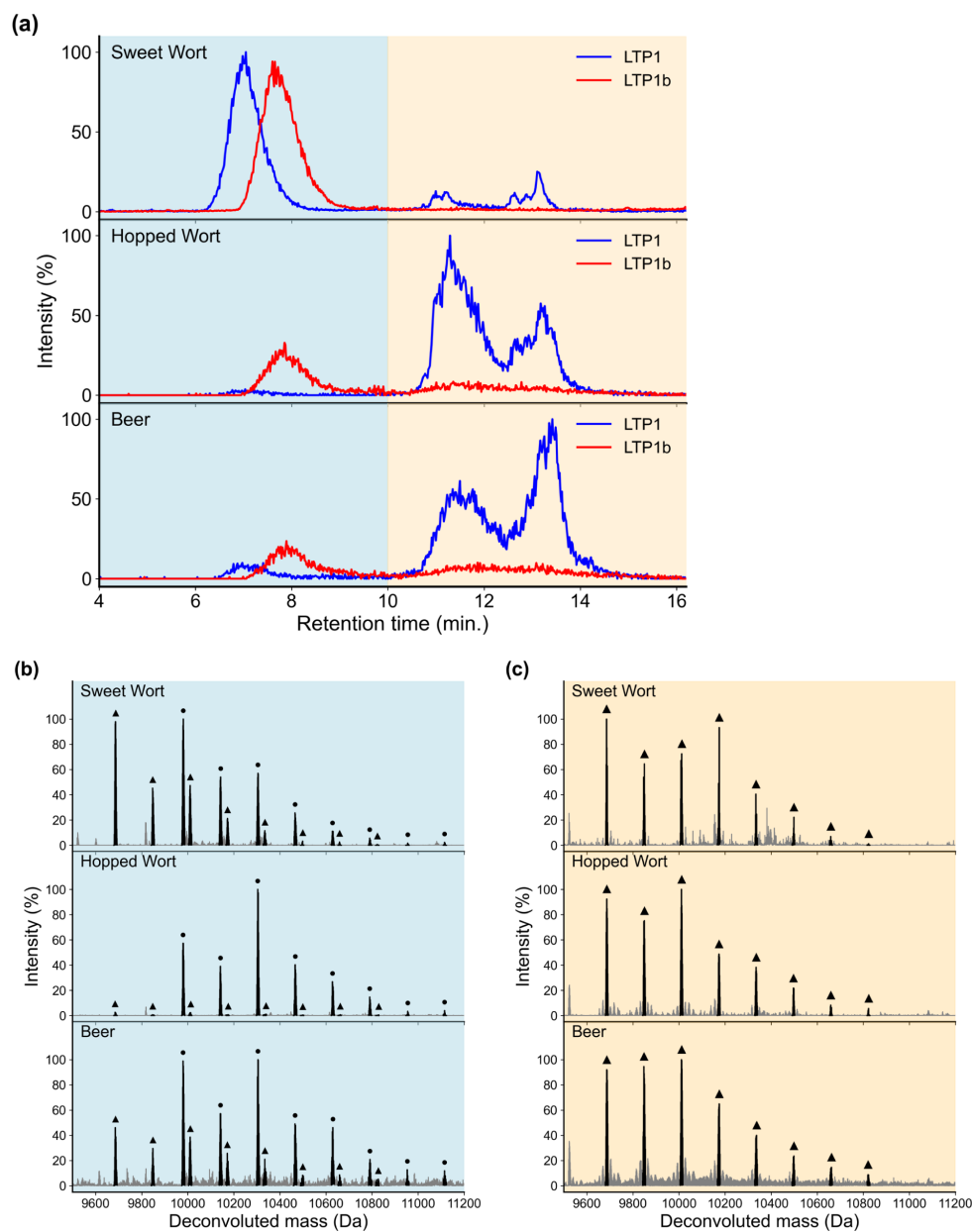


図 26 一番麦汁 (Sweet wort)、ホップ添加麦汁 (Hopped wort)、およびビール (Beer) 中の LTP1 と LTP1b の代表的な XIC および質量スペクトルを示す。(a) 一番麦汁、ホップ添加麦汁、およびビールの XIC。(b) 6～10 分で検出された UV ピークの質量スペクトル。(c) 10～16 分で検出された UV ピークの質量スペクトル。▲のマーカは LTP1-0g および LTP1-g を、●は LTP1b-0g および LTP1b-g をそれぞれ示す。

(Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

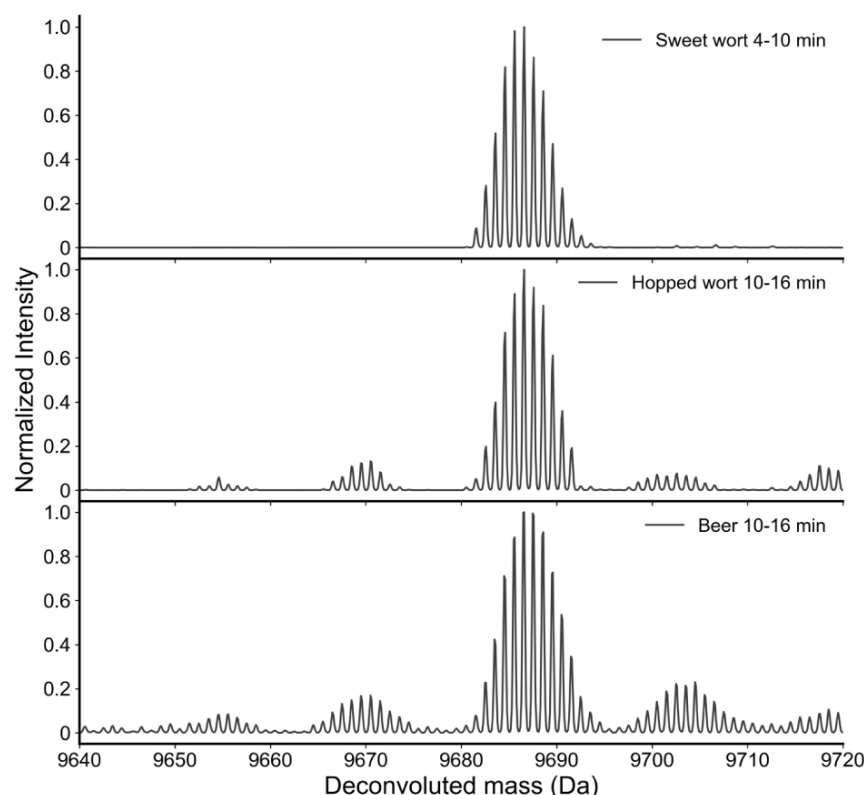


図 27 一番麦汁 (Sweet wort)、ホップ添加麦汁 (Hopped wort)、およびビール (Beer) 中のデコンボリューション質量スペクトル (Mizuguchi, J et al., 2025 より転載した。)

3.3.3 異なる品種の大麦中の LTP1b 含有量の分析

醸造工程中に LTP1b 含有量が減少することが明らかになり、その減少を抑制することがビールの泡沫品質向上に重要である。一方で、原材料である大麦に含まれる LTP1b 含有量を増やす、あるいは LTP1b 含有量の多い大麦を使用することもビールの泡沫品質向上に有効である可能性がある。しかしながら、LTP1b の含有量が多い大麦品種は知られていない。そこで、オキシリピンの生合成経路に着目し、オキシリピン合成に必要な LOX 活性と大麦の LTP1b 含有量の間に相関関係があるという仮説を立てた。この仮説に基づき、本項では、LOX 活性が異なる大麦の LTP1b 含有量を評価した。

図 28 に、大麦品種 A および B の質量スペクトルを示す。LOX 活性が高い大麦 B で LTP1b-0g が顕著に多かった。このことから、LTP1b 含有量が高い大麦を選定する際、LOX 活性を指標とすることが有効であると考えられる。

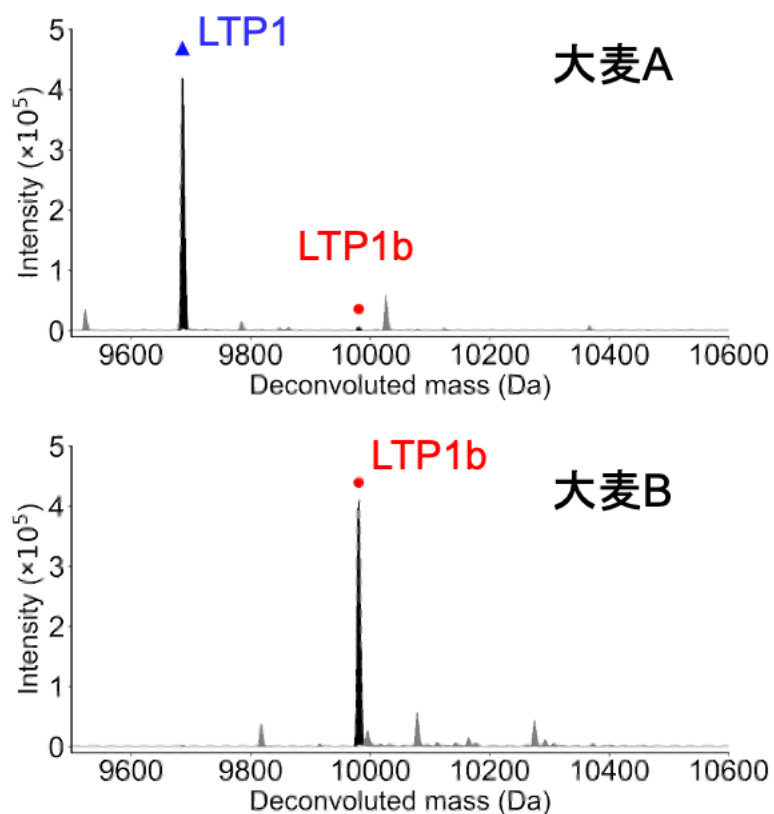


図 28 大麦 A および大麦 B の質量スペクトル

▲のマーカ―は LTP1-0g および LTP1-g を、●は LTP1b-0g および LTP1b-g をそれぞれ示す。

3.4 考察

LTP1/LTP1b に限定されず、複数のタンパク質、リン脂質、脂肪酸、イソ α 酸を含むフェノール類も界面活性を持つため、LTP1/LTP1b の吸着は競合する^{83,84}。そのため、ビール内の LTP1b がこれらの物質との競合吸着においても、優先的に吸着し、泡沫安定性に寄与できるかを確認することは極めて重要であった。デコクション法で醸造したビールは、LTP1b-0g の濃度が比較的高い傾向を示した一方で、NIBEM 値は顕著に向上しなかった。この結果から、ビールの泡沫安定性は LTP1b と量的な関係だけではなく、質的な関係にも依存することが示唆される。デコクション法による過度の熱負荷が、LTP1b の構造変化や他の化合物との相互作用を促進している可能性があるが、詳細については更なる解析が必要である。一方、デコクション法を使用していないビールでは、LTP1b-0g の濃度が比較的低く、LTP1b-0g 濃度と NIBEM 値に極めて高い正の相関を示した (図 23a,b)。LTP1b が混合系においても LTP1 よりも優先的に気液界面に吸着する、または LTP1b が LTP1 よりも他の物質と相互作用しにくく、その結果吸着が阻害されにくい可能性が示唆される。第二章において、LTP1b が LTP1 よりも高い界面活性および表面疎水性を示したことから、LTP1b は LTP1 よりも気液界面に吸着し、疎水性相互作用によって他の物質と相互作用しやすいタンパク質であると考えられる。したがって、LTP1b は、LTP1 と比較して混合系に含まれる他のタンパク質などより優先的に気液界面に吸着すると推察する。

この推察は、精製 LTP1b の添加と比較して、精製 LTP1 の添加が NIBEM 値の増加に寄与しなかったことから支持される (図 S3)。さらに、精製 LTP1b の添加がビールの NIBEM 値を顕著に増加させた一方で、LTP1b 濃度が同等になるように一番麦汁粗タンパク質を添加した場合には、同程度の増加は確認されなかった。また、一番麦汁粗タンパク質に加えて精製 LTP1b を添加した際に、精製

LTP1b 単独添加時よりも NIBEM 値の増加量が低いことを確認した。一方で、LTP1b を含む総タンパク質濃度が高くなるに従い、精製 LTP1b 添加による NIBEM 値の増加効果が小さくなる傾向が認められた。これらの結果は、一番麦汁粗タンパク質に含まれる LTP1b 以外のタンパク質が、LTP1b の吸着を阻害している可能性を示唆する。LTP1b の吸着が、競合的吸着もしくは相互作用のどちらによって阻害されているかは他のタンパク質との親和性を評価するなどのさらなる調査が必要となる。もし、LTP1b と競合するタンパク質を特定できれば、そのタンパク質の機能および含有量の抑制がビールの泡沫安定性のさらなる向上に有効な手段になると考える。また、総タンパク質が高濃度の際に、精製 LTP1b の添加によって NIBEM 値が顕著に減少したことから、凝集体の形成などで気液界面に吸着したタンパク質の濃度が減少した可能性が示唆された。

1.3 で前述した通り、タンパク質量および α 酸、イソ α 酸は泡沫特性に関与する重要な要因であるので、図 S4a,b に各ビールのタンパク質量の指標である全窒素含有量 (TN) および α 酸、イソ α 酸の含有量の指標である苦味価 (BUs) と NIBEM 値の相関を評価した。TN、BUs の両方とも NIBEM 値とは高い相関を示さなかった。一方で、LTP1b は NIBEM 値と正の相関を示したことを踏まえると、その他の全ての要因を網羅出来てはいないものの、これまで泡沫安定性への寄与について報告されてきた因子の中でも、特に LTP1b が優位に NIBEM 値を制御するために非常に重要な因子であることが本研究により改めて示された。この優位性は、LTP1b が他のタンパク質に比べて二つの点で泡沫安定性に有利に作用することによるものと考えられる。一つ目は、分子量が低いことである。強固な界面膜の形成には、タンパク質が高密度で気液界面に吸着することが必要であり、大麦由来の他のタンパク質に比べ、分子量が低く流体力学的半径が小さい LTP1b は、高密度で密集して吸着すると予想される。二つ目は、LTP1b 分子間の

相互作用が強いことである。LTP1b は、脂肪酸などの疎水性分子と非共有的に結合する疎水性空洞に加え、表面に露出したオキシリピンの一部を持つ。これらが相互作用することで、LTP1b 間に強固な分子間相互作用を気液界面で形成する可能性がある。LTP1b 以外のタンパク質が同時に添加された場合に泡沫安定性が低下した結果は、この仮説を支持するものであり、他のタンパク質との競合的吸着によって、LTP1b の強固な分子間相互作用が阻害されたために泡沫安定性が減少したと考えられる。また、タンパク質の添加量が増えるにつれて泡沫安定性が一定の値で頭打ちになった結果は、気液界面に吸着できるタンパク質量の飽和を示唆しており、飽和するタンパク質濃度を把握することで効率的な LTP1b の添加が可能となる。

第二章では、精製 LTP1 溶液の泡沫特性がグリケーションの有無によって影響を受けないという結果が得られた。ビールという複雑な混合系においても同様の傾向を示すかを確認するため、LTP1b の各グリケーションレベルと NIBEM 値の相関を図 S5a,b,c に示す。図 23b との比較から、LTP1b-0g は LTP1b-g よりも NIBEM 値との相関係数が高いことが確認された。この結果は、グリケーションの有無がビールの泡沫安定性に関与している可能性を示し、泡沫安定性に与える影響が精製 LTP1/精製 LTP1b 溶液とは異なることが示唆された。ビールに含まれるイソフムロンは、タンパク質のリジンのアミノ基と相互作用することで、タンパク質間の相互作用を促進することが報告されている⁸⁵。グリケーションはリジンのアミノ基で生じるため、イソフムロンの相互作用を抑制し、結果的に LTP1b-0g と比較して泡沫安定性への寄与を低下させたと推察できる。これらの知見は、グリケーションの制御も、ビールの泡沫安定性を向上させる戦略の一つとなる可能性を示した。

3.3.2 で述べたように、醸造工程の煮沸および発酵過程において、LTP1b からの

オキシリピンの解離および会合体 LTP1 分子の生成が明らかになった。これらの変化は、第二章における精製 LTP1 および LTP1b の分析に基づくと、泡沫特性の悪化を引き起こすため、抑制することが望ましい。麦汁が 10 nM の LTP1 を含有することを考慮し、一番麦汁における LTP1b のピーク面積が LTP1 と類似していることから、LTP1b の濃度も 10 nM と仮定した。この仮定に基づくと、熱処理後に約 3 $\mu\text{g/L}$ のオキシリピンが放出されたと推定される。このオキシリピン濃度は、泡沫特性に影響を及ぼすと報告されている脂肪酸濃度よりも低いものの、放出されたオキシリピンが泡沫安定性に与える潜在的な負の影響は否定できない。LTP1b の泡沫特性が LTP1 よりも優れていることを踏まえると、LTP1b からのオキシリピンの解離は、①オキシリピン自体が持つ泡沫特性への影響、② LTP1b 残存量の低下、という二つの側面から、泡沫特性に悪影響を及ぼすと考えられる。

煮沸工程では、LTP1b からのオキシリピン解離を抑制する上で pH と煮沸温度・時間が重要な因子となる。LTP1 へのオキシリピンの結合はエステル結合であり、酸性または塩基性条件下ではその加水分解が著しく促進される。一般的な一番麦汁の pH は約 5.0 であるため⁸⁶、煮沸前に pH を中性付近に調整することは、LTP1b からのオキシリピン解離を抑制し、LTP1b の残存量増加に貢献する可能性がある。さらに、醸造工程における煮沸は高圧下で行われるため 100°C を超えることが予想される。先行研究で 95°C 付近の温度ではオキシリピンの解離速度が非常に遅いと報告されていることから、加熱温度を 95°C 付近に調整することで LTP1b の残存量を確保できる可能性がある⁶⁰。これらの知見から、煮沸時の pH、温度、および時間を最適化することで、LTP1b 残存量を効果的に増加させ、結果としてビールの泡沫安定性を向上させる戦略となりうる。ただし、ビールの香味バランスとの両立も考慮する必要がある。

醸造工程における LTP1b の減少を抑制する戦略だけでなく、最上流の原材料である大麦に由来する LTP1b の初期含有量を増加させることも同様に重要である。LTP1b 含有量が豊富な大麦品種を選定するための戦略として、LOX 活性に着目した。LOX 活性が低い大麦（LOX レス大麦）は香味の過度な老化を抑制できるとして、育成されている⁸⁷。本研究では LOX レス大麦を用い、LOX 活性が高い大麦と比較した。分析の結果、LOX 活性が高い大麦 B には LTP1b が顕著に存在し、一方、LOX 活性が低い大麦 A には LTP1b がほとんど含まれていなかった。このことは、大麦中の LOX 活性と LTP1b 含有量の間に相関があるという仮説を裏付けており、LTP1b 量が高い大麦を選定する際には、LOX 活性を指標とすることが極めて有効な戦略であることが示唆された。一方で、LOX 活性が高まり、脂肪酸濃度が過度に生じると香味安定性や泡沫安定性に影響しかねない。さらに、煮沸時の条件検討を最適化しなければ LTP1b からのオキシリピンの解離が増加することになる。したがって、LTP1b の基質となる LTP1 含有量と、その結合基質となるオキシリピンの前駆体を生成させる LOX 活性を正確に把握し、発芽条件および煮沸条件も合わせて適切に制御することが、泡沫品質の高いビールの製造に有効であると考えられる。

第四章 総括と今後の展望

4.1 本研究の総括

ビール中の泡沫は、その品質に極めて重要な要素であると認識されている。しかしながら、泡沫形成に寄与する LTP1/LTP1b の煮沸による物性や翻訳後修飾への影響は包括的に分析されておらず、それらと泡沫特性との関係性は未解明であった。これらの未解明な点は、ビールの泡沫特性を正確に制御することを困難にしている。本研究は、この課題に対処するため、LTP1/LTP1b の加熱による特性変化と泡沫特性の関係性を包括的に解明し、得られた結果に基づき、ビールの泡沫特性を向上させるための戦略を提案した。

第二章では、一番麦汁から精製した LTP1 および LTP1b を用いて、煮沸時の特性変化が泡沫特性に与える影響を包括的に検証した。加熱前、LTP1b は LTP1 よりも有意に高い起泡性および泡沫安定性を示し、高い界面活性を持つことから、ビールの泡沫特性に大きく貢献する可能性が示唆された。しかし、煮沸処理による熱ストレスが LTP1b の優れた泡沫特性を損なうことが明らかになり、起泡性と泡沫安定性はいずれも顕著に低下した。この機能低下の要因を特定するため、RP-HPLC-MS と SEC-MALS を用いて詳細な分析を行った。その結果、加熱処理が LTP1b からオキシリピンを解離させ、脱アミド化を伴う高疎水性の会合体を生成し、さらに脱グリケーションを引き起こすことが明らかになった。これらの物性変化の中で、特に LTP1b からのオキシリピン解離と、脱アミド化を伴う高疎水性の LTP1/LTP1b 会合体生成が、泡沫安定性低下の主な原因であると示唆された。以上の結果から、LTP1b は LTP1 よりも優れた泡沫特性を持つため、ビールの泡沫特性向上に大きく貢献する可能性が示された。しかし、煮沸といった加熱処理が LTP1b からオキシリピンを解離させ、その結果として泡沫安定性を著

しく低下させる可能性があることも明らかになった。これらの知見は、ビールの醸造工程において、オキシリピンを解離させることなく LTP1b をビール中に残存させることが、泡沫特性を改善するための有効なアプローチであることを強く示唆している。

第三章では、第二章の知見に基づき、ビールの泡沫安定性を向上させるための具体的な戦略を検討した。まず、市販ビール中の LTP1b 含有量と泡沫安定性の指標である NIBEM 値との間に高い正の相関があることを確認した。また、精製 LTP1b をビールに添加することで泡沫安定性が顕著に向上したが、他のタンパク質を同時に添加すると、総タンパク質の濃度増加に伴い LTP1b の吸着が阻害される傾向が確認された。この結果から、総タンパク質の濃度を把握し、精製 LTP1b を添加することが重要であると結論付けられた。また、ビール中においてはグリケーションの有無が泡沫安定性に影響した可能性も示唆された。次に、LTP1b 含有量を維持・増加させるための戦略について検討した。第二章の分析で、煮沸中に LTP1b 含有量が減少することが明らかになったことから、実際の醸造中においても LTP1b が減少するのかを確認した。その結果、LTP1b が醸造中の煮沸によって減少していることが明らかになり、その減少を抑制する戦略の重要性が強調された。さらに、原材料である大麦の選定段階から LTP1b 量を増やすアプローチも検討した。オキシリピンを合成する LOX 活性と LTP1b 含有量に相関があるという仮説を立てた。分析の結果、LOX 活性が高い大麦品種には LTP1b が顕著に存在し、大麦の選定指標として LOX 活性が有効であることが示唆された。これらの結果は、ビールの泡沫品質を向上させるためには、大麦の選定から醸造工程の最適化に至るまで、LTP1b の含有量を戦略的に管理することが不可欠であることを示唆している。本研究の成果は、ビールの泡沫安定性向上に向け、LTP1b を管理指標として原料から醸造工程までを包括的に制御する

ことで、泡沫安定性を向上させる新しいアプローチを提示するものである。

4.2 今後の展望

ビールに関する論文数は過去数年間で増加傾向にあり、研究が活発に行われている。しかしながら、ビールの品質に大きく寄与する泡沫の重要性は広く認識されているものの、醸造工程が泡沫特性に与える影響については未解明な点が多い。また、原料や醸造プロセスの多様化に伴い、泡沫特性を理論的に制御し、より高品質なビールを開発するためには、醸造工程が引き起こすタンパク質の特性変化と泡沫特性変化の関係性を明らかにすることが求められる。

第二章では、加熱処理が LTP1/LTP1b に複数の物性変化や翻訳後修飾を誘発し、それが泡沫特性の低下に繋がることを示唆した。一方で、泡沫形成が単に表面張力の低下だけでなく、気液界面への動的な吸着挙動によって決定されることを示唆しており、この点をさらに深く解明するためには、泡沫形成時における動的な吸着メカニズムに関する追加の研究が不可欠である。また、本研究は常圧下で実施されたが、実際の醸造工程では高圧がかかるため、圧力が沸点を上昇させ、結果的に LTP1/LTP1b の構造変化に更なる影響を与える可能性が考えられる。将来の研究では、醸造条件下での LTP1/LTP1b の特性変化と泡沫特性への影響をより正確に理解するため、圧力効果を考慮した検討も求められる。さらに、脱アミド化や脱グリケーションといった翻訳後修飾が LTP1/LTP1b に生じたが、これらの修飾がどのアミノ酸残基で生じるかは特定されていない。ペプチドマッピングや高分解能質量分析計を用いた解析により、これらの修飾部位を特定することが今後の重要な課題となる。

第三章では、実際のビールという複雑な混合系における LTP1/LTP1b の挙動と、泡沫安定性向上に向けた具体的な戦略を検討した。本研究では、粗精製タンパク

質の存在が LTP1b の泡沫安定性への寄与を阻害する可能性が示唆されたものの、その詳細なメカニズムは未解明なままである。今後は、タンパク質相互作用解析や気液界面での分子動力学シミュレーションを組み合わせることで、LTP1b と他のタンパク質の相互作用部位を特定および、他のタンパク質の存在下での LTP1b の吸着機構に関する研究が不可欠となる。これらの知見は、LTP1b の機能を最大限に引き出すための、より効果的な醸造プロセスの開発や、阻害タンパク質を特異的に除去する技術の確立に貢献できる。また、LTP1b 含有量の増加戦略として、LOX 活性と LTP1b 含有量の相関関係が示唆された。しかし、この仮説の普遍性を確証するためには、より多様な大麦品種や異なる醸造条件下での大規模な検証が必要である。さらに、発芽条件の最適化が LTP1b 含有量増加に繋がるという戦略を産業レベルで応用するには、最適化された発芽条件で製造した麦芽を用いて実際にビールを醸造し、最終的な泡沫安定性向上への効果を実証する必要がある。これらの研究は、原料の選定段階からビールの泡品質を向上させるための重要な指針を提供すると考えられる。ビールの香味バランス及び香味安定性も踏まえたうえで、これらの課題を克服し、得られた新規知見を応用することで、高品質なビールを安定的に提供するための具体的な方策を醸造業界に提供できると思われる。

補足資料

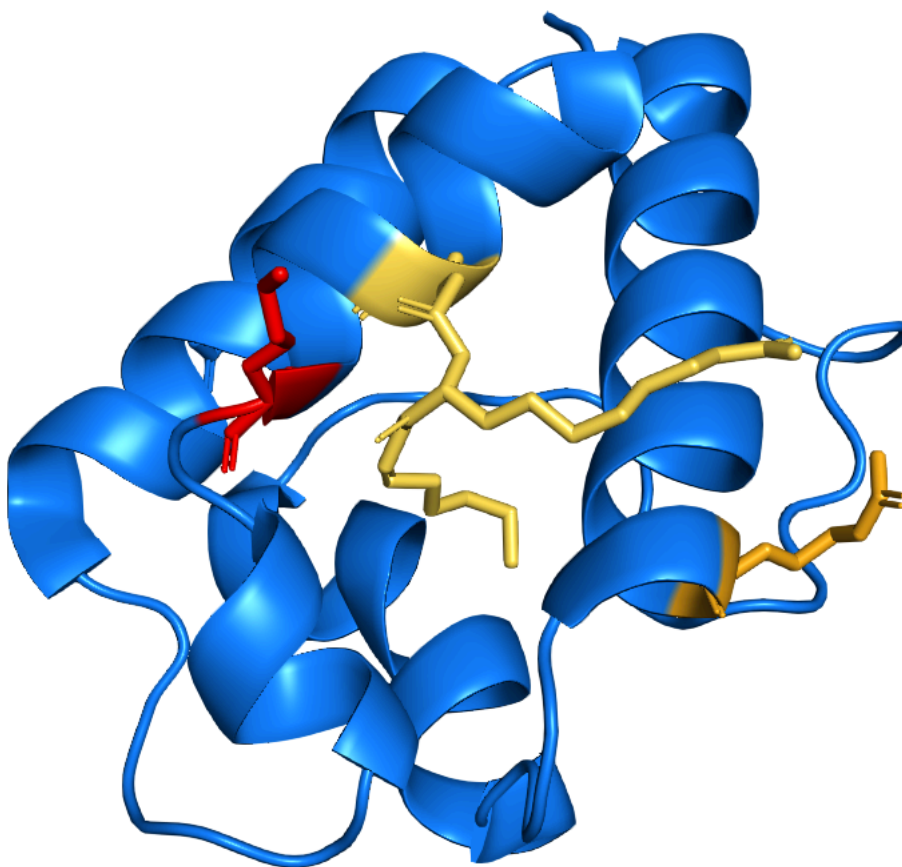


図 S1 オキシリピン付加部位である Asp-7 に近接している Lys および Arg 残基の一部。黄色がオキシリピンおよびオキシリピン結合部位の Asp-7 を示す。赤色とオレンジ色は、それぞれ、オキシリピンに隣接している Lys および Arg 残基を示す。

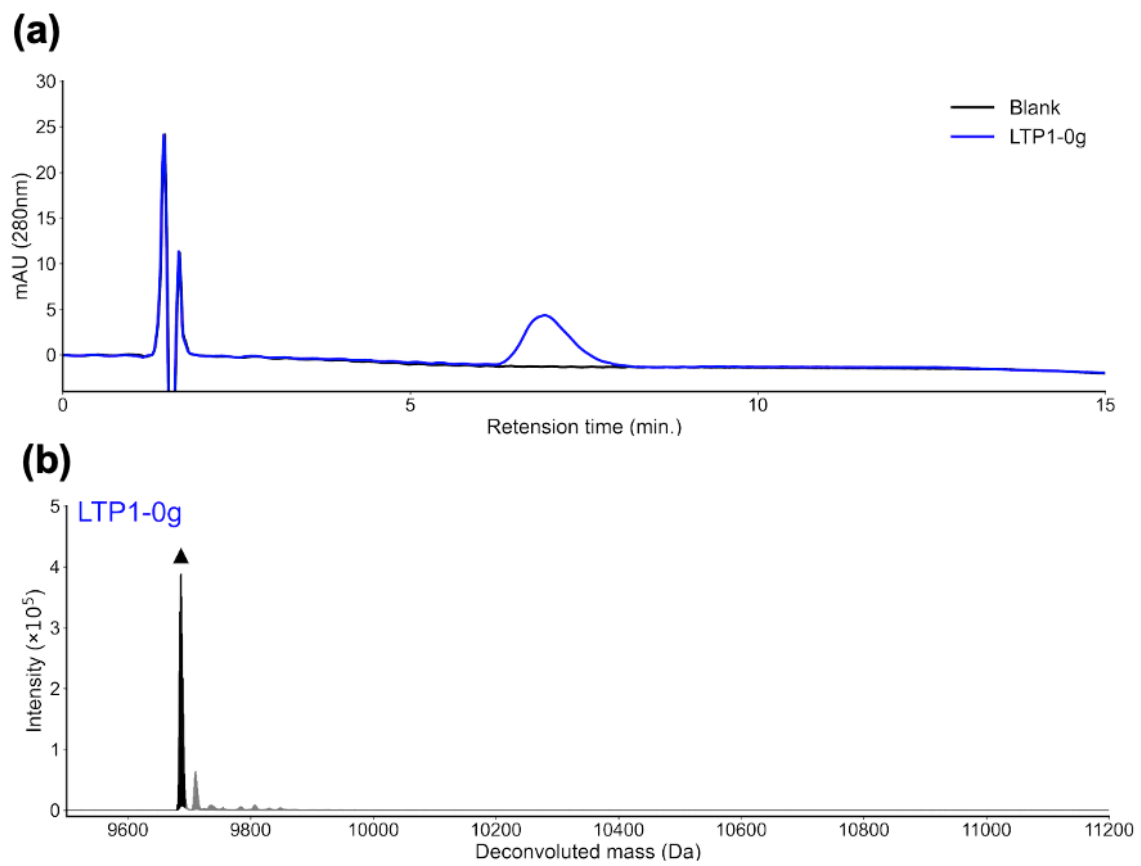


図 S2a,b LTP1-0g の逆相クロマトグラムと質量スペクトラム

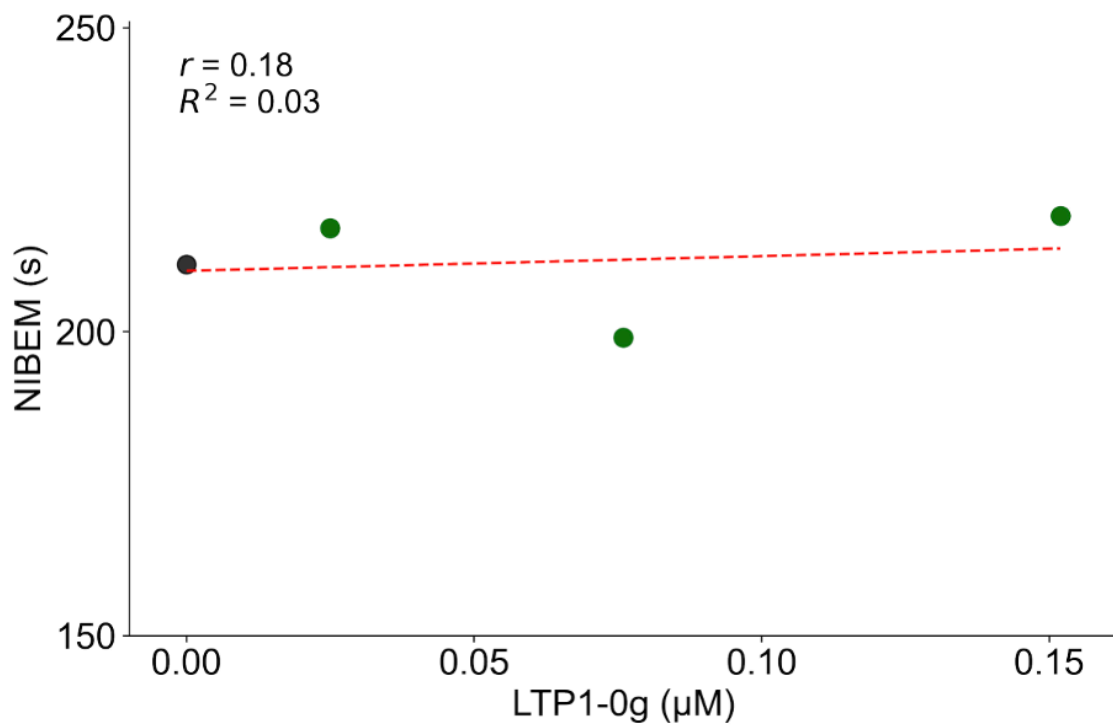


図 S3 精製 LTP1 添加時の NIBEM 値の増加（図 24 で使用したものとは異なる種類のビールに添加した。）黒色の●は、精製 LTP1 添加前の市販ビールの NIBEM 値を示す（Beer 2）。緑色の●は、各 LTP1-0g 濃度に到達するように精製 LTP1 を添加した Beer 2 の NIBEM 値をそれぞれ示す。

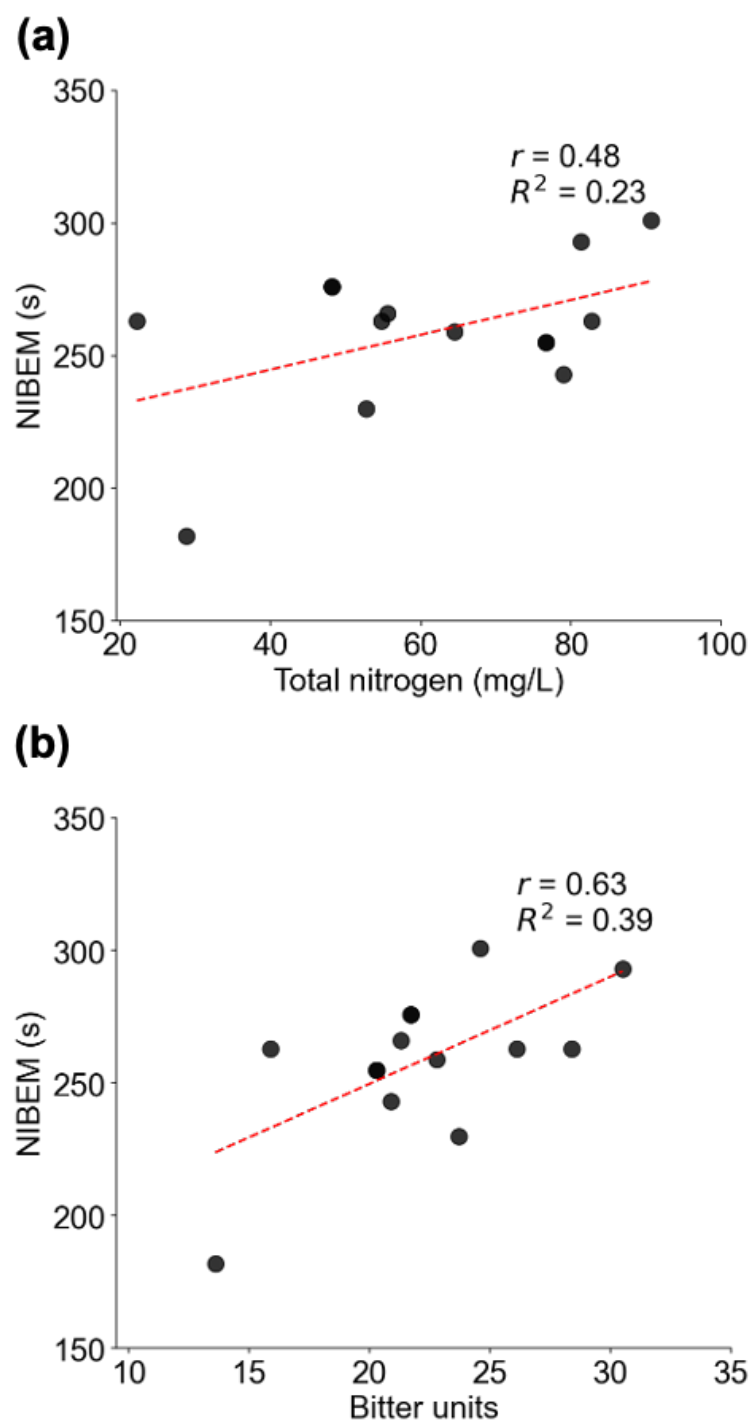


図 S4a,b 全窒素含有量 (Total Nitrogen; TN) および苦味価 (Bitter Units; BUs) と NIBEM 値の関係性

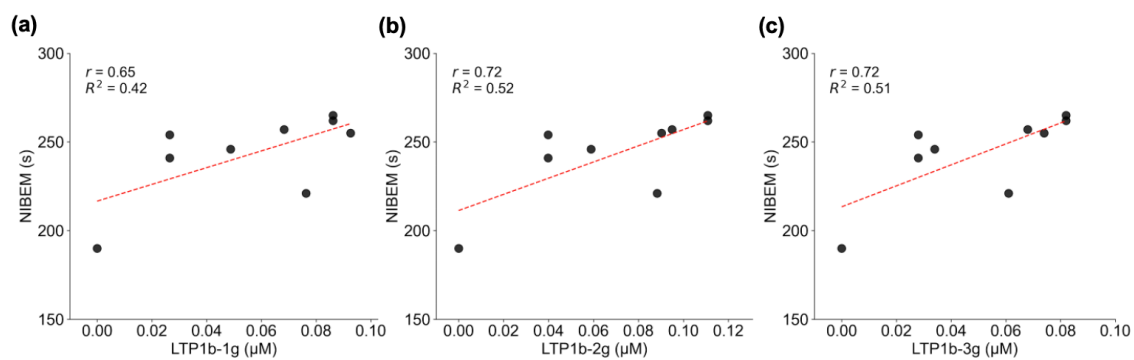


図 S5a,b,c 各グリケーションレベルの LTP1b と NIBEM 値の相関

(a) LTP1b-1g (b) LTP1b-2g (c) LTP1b-3g

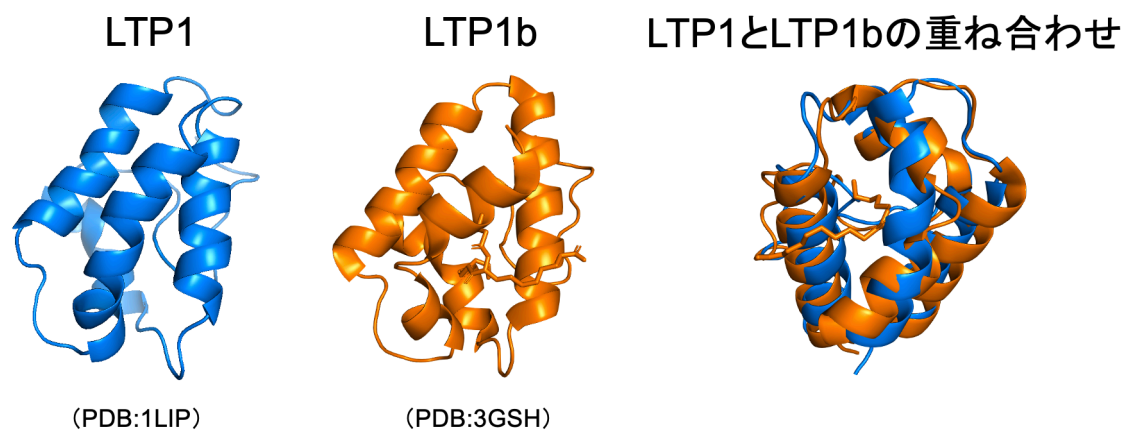


図 S6 LTP1 と LTP1b の構造の比較

発表論文

Mizuguchi, J., Asaka, K., Konishi, M., Inui, T., Uchiyama, S., & Torisu, T. (2025). Heat-Induced Changes in the Chemical Structure, Hydrophobicity, and Size Distribution of Free/Bound Lipid Transfer Protein 1 and Their Effects on Beer Foam. *Journal of agricultural and food chemistry*, 73(38), 24343–24353. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c07895>

(本学位論文第二章および第三章に關与する原著論文)

Enomoto, K., Torisu, T., Mizuguchi, J., Tanoue, R., & Uchiyama, S. (2024). Structure of Human Serum Albumin at a Foam Surface. *Journal of agricultural and food chemistry*, 72(15), 8774–8783. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c09357>

参考文献および参考資料

- (1) Esslinger, H. Michael. *Handbook of Brewing : Processes, Technology, Markets*; Wiley-VCH, 2009.
- (2) A HISTORY OF BEER AND BREWING, *The Royal society of chemistry*, 2003.
- (3) Pinto, M. B. C.; Schmidt, F. L.; Chen, Z.; Rappsilber, J.; Gibson, B.; Wietstock, P. C. The Influence of Barley Proteome on Hop Bitter Acid Yield during Brewing. *Journal of agricultural and food chemistry* 2024, 72 (38), 21166–21180. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c04396>.
- (4) Poelmans, E.;; Swinnen, J. F. M. *Standard-Nutzungsbedingungen*. <https://hdl.handle.net/10419/74857>.
- (5) Kaneda, H.; Aikawa, T.; Matsushita, K.; Noba, S.; Kobayashi, M. Beer Foam Is a Carrier of Aroma. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 2024, 82 (2), 160–169. <https://doi.org/10.1080/03610470.2023.2215686>.
- (6) Uchechukwu, K. *Review: Beer Production*; 2018. <https://ssrn.com/abstract=3458983>.
- (7) Thesseling, F. A.; Bircham, P. W.; Mertens, S.; Voordeckers, K.; Verstrepen, K. J. A Hands-On Guide to Brewing and Analyzing Beer in the Laboratory. *Current Protocols in Microbiology* 2019, 54 (1). <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>.
- (8) Schmitt, M. R.; Skadsen, R. W.; Budde, A. D. Protein mobilization and malting-specific proteinase expression during barley germination. *Journal of Cereal Science* 2013, 58(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.007>
- (9) Kostrzewa, D.; Dobrzyńska–Inger, A.; Rój, E.; Grzęda, K.; Kozłowski, K. Isomerization of Hop Extract α -Acids. *Journal of the Institute of Brewing* 2016, 122 (3), 493–499. <https://doi.org/10.1002/jib.349>.
- (10) Maicas, S. The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*. MDPI AG

August 1, 2020, pp 1–8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>.

- (11) Li, X.; Jiang, K.; Jin, Y.; Liu, J. Comparative Study on Protein Composition and Foam Characteristics of Barley and Wheat Beer. *Foods* 2024, 13 (21). <https://doi.org/10.3390/foods13213400>.
- (12) Bamforth, C. W. The Physics and Chemistry of Beer Foam: A Review. *European Food Research and Technology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH June 2023, pp 3–11. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04134-4>.
- (13) Viejo, C. G.; Torrico, D. D.; Dunshea, F. R.; Fuentes, S. Bubbles, Foam Formation, Stability and Consumer Perception of Carbonated Drinks: A Review of Current, New and Emerging Technologies for Rapid Assessment and Control. *Foods*. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute June 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8120596>.
- (14) Ono, M.; Hashimoto, S.; Kakudo, Y.; Nagami, K.; Kumada, J. Foaming and Beer Flavor. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 1983, 41 (1), 19–23. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-41-0019>.
- (15) Wu, X.; Xia, M.; Cao, S.; Cai, W.; Li, L.; Yang, L. Research Progress of Air-Water Interface Stability in Food Foam System. In *Proceedings of the 1st International Conference on Health Big Data and Intelligent Healthcare*; SCITEPRESS - Science and Technology Publications, 2022; pp 100–106. <https://doi.org/10.5220/0011232900003438>.
- (16) Chatzigiannakis, E.; Alicke, A.; Bars, L. Le; Bidoire, L.; Vermant, J. The Hidden Subtlety of Beer Foam Stability: A Blueprint for Advanced Foam Formulations. *Physics of Fluids* 2025, 37 (8). <https://doi.org/10.1063/5.0274943>.
- (17) Blasco, L.; Viñas, M.; Villa, T. G. Proteins Influencing Foam Formation in Wine and Beer: The Role of Yeast. *International Microbiology*. Sociedad Espanola de Microbiologia

2011, pp 61–71. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.136>.

- (18) Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Jorge, K.; Nogueira, L. C.; Silva, F.; Trugo, L. C. Effects of the Combination of Hydrophobic Polypeptides, Iso- α Acids, and Malto-Oligosaccharides on Beer Foam Stability. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005, 53 (12), 4976–4981. <https://doi.org/10.1021/jf047796w>.
- (19) Lu, Y.; Choi, B.; Nylander, T.; Bergenståhl, B.; Nilsson, L. Surface Rheology and Morphology of Beer Protein and Iso-Humulone at Air-Liquid Surface. *Food Hydrocolloids* 2020, 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105897>.
- (20) Luykx, J. M. M. INFLUENCE OF METAL IONS ON BEER PROPERTIES, WITH SPECIAL REFERENCE TO FOAM. *Journal of the Institute of Brewing* 1960, 66 (5), 399–407. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1960.tb01732.x>.
- (21) Gribkova, I. N.; Eliseev, M. N.; Belkin, Y. D.; Zakharov, M. A.; Kosareva, O. A. The Influence of Biomolecule Composition on Colloidal Beer Structure. *Biomolecules*. MDPI January 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12010024>.
- (22) Nierop, S. N. E. Van; Evans, D. E.; Axcell, B. C.; Cantrell, I. C.; Rautenbach, M. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1. *Journal of agricultural and food chemistry* 2004, 52 (10), 3120–3129. <https://doi.org/10.1021/jf035125c>.
- (23) Hu, X.; Meng, Z. An Overview of Edible Foams in Food and Modern Cuisine: Destabilization and Stabilization Mechanisms and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. John Wiley and Sons Inc January 1, 2024, pp 1–30. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13284>.
- (24) Narsimhan, G.; Xiang, N. The Annual Review of Food Science and Technology Is Online at Food. *Annualreviews.Org* Downloaded from *Www. Annual Review of Food Science*

and Technology Annu. Rev. Food Sci. Technol 2025, 9, 45–63.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216>.

- (25) Zhan, F.; Youssef, M.; Shah, B. R.; Li, J.; Li, B. Overview of Foam System: Natural Material-Based Foam, Stabilization, Characterization, and Applications. *Food Hydrocolloids*. Elsevier B.V. April 1, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107435>.
- (26) Hill, C.; Eastoe, J. Foams: From Nature to Industry. *Advances in Colloid and Interface Science* 2017, 247, 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.013>.
- (27) Herrera-Díaz, J.; Jelezova, M. K.; Cruz-García, F.; Dinkova, T. D. Protein Disulfide Isomerase (PDI1-1) Differential Expression and Modification in Mexican Malting Barley Cultivars. *PLoS One* 2018, 13 (11), e0206470.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206470>.
- (28) Iimure, T.; Takoi, K.; Kaneko, T.; Kihara, M.; Hayashi, K.; Ito, K.; Sato, K.; Takeda, K. Novel Prediction Method of Beer Foam Stability Using Protein Z, Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-1 (BDAI-1) and Yeast Thioredoxin. *Journal of agricultural and food chemistry* 2008, 56 (18), 8664–8671. <https://doi.org/10.1021/jf801184k>.
- (29) Bahmani, M.; O’Lone, C. E.; Juhász, A.; Nye-Wood, M.; Dunn, H.; Edwards, I. B.; Colgrave, M. L. Application of Mass Spectrometry-Based Proteomics to Barley Research. *Journal of agricultural and food chemistry* 2021, 69 (31), 8591–8609.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01871>.
- (30) Perrocheau, L.; Rogniaux, H.; Boivin, P.; Marion, D. Probing Heat-Stable Water-Soluble Proteins from Barley to Malt and Beer. *Proteomics and systems biology* 2005, 5 (11), 2849–2858. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401153>.
- (31) Tanner, G. J.; Colgrave, M. L.; Blundell, M. J.; Howitt, C. A.; Bacic, A. Hordein

Accumulation in Developing Barley Grains. *Frontiers in Plant Science* 2019, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00649>.

- (32) Picariello, G.; Bonomi, F.; Iametti, S.; Rasmussen, P.; Pepe, C.; Lilla, S.; Ferranti, P. Proteomic and Peptidomic Characterisation of Beer: Immunological and Technological Implications. *Food Chemistry* 2011, 124 (4), 1718–1726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.111>.
- (33) Wang, Y.; Ye, L. Haze in Beer: Its Formation and Alleviating Strategies, from a Protein–Polyphenol Complex Angle. *Foods* 2021, 10 (12), 3114. <https://doi.org/10.3390/foods10123114>.
- (34) Jaeger, A.; Zannini, E.; Sahin, A. W.; Arendt, E. K. Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers’ Spent Grain Protein. *Foods* 2021, 10 (6), 1389. <https://doi.org/10.3390/foods10061389>.
- (35) Hejgaard, J.; Kaersgaard, P. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE MAJOR ANTIGENIC BEER PROTEIN OF BARLEY ORIGIN. *Journal of the Institute of Brewing* 1983, 89 (6), 402–410. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1983.tb04215.x>.
- (36) Maeda, K.; Yokoi, S.; Kamada, K.; Kamimura, M. Foam Stability and Physicochemical Properties of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 1991, 49 (1), 14–18. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-49-0014>.
- (37) Iimure, T.; Kihara, M.; Sato, K.; Ogushi, K. Purification of Barley Dimeric α -Amylase Inhibitor-1 (BDAI-1) and Avenin-like Protein-a (ALP) from Beer and Their Impact on Beer Foam Stability. *Food Chemistry* 2015, 172, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.012>.
- (38) Bobalova, J.; Strouhalova, D. Non-Enzymatic Glycation: An Essential Modification of Barley Proteins Affecting Beer Quality—Brief Review. *Cereal Research*

Communications. Akademiai Kiado ZRt. June 2024. <https://doi.org/10.1007/s42976-024-00530-6>.

- (39) Runavot, J. L.; Bakan, B.; Geneix, N.; Saulnier, L.; Moco, K.; Guillon, F.; Corbineau, F.; Boivin, P.; Marion, D. Impact of Low Hydration of Barley Grain on β -Glucan Degradation and Lipid Transfer Protein (LTP1) Modifications during the Malting Process. *Journal of agricultural and food chemistry* 2011, 59 (15), 8256–8264. <https://doi.org/10.1021/jf2011134>.
- (40) Bakan, B.; Hamberg, M.; Perrocheau, L.; Maume, D.; Rogniaux, H.; Tranquet, O.; Rondeau, C.; Blein, J. P.; Ponchet, M.; Marion, D. Specific Adduction of Plant Lipid Transfer Protein by an Allene Oxide Generated by 9-Lipoxygenase and Allene Oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281 (51), 38981–38988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608580200>.
- (41) Douliez, J.-P.; Jégou, S.; Pato, C.; Larré, C.; Mollé, D.; Marion, D. Identification of a New Form of Lipid Transfer Protein (LTP1) in Wheat Seeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 2001, 49 (4), 1805–1808. <https://doi.org/10.1021/jf001327m>.
- (42) Lindorff-Larsen, K.; Lerche, M. H.; Poulsen, F. M.; Roepstorff, P.; Winther, J. R. Barley Lipid Transfer Protein, LTP1, Contains a New Type of Lipid-like Post-Translational Modification*. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276 (36), 33547–33553. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104841200>.
- (43) Zhao, Y.; Cieplak, M. Proteins at Air–Water and Oil–Water Interfaces in an All-Atom Model. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2017, 19 (36), 25197–25206. <https://doi.org/10.1039/C7CP03829A>.
- (44) Kato, M.; Kamada, T.; Mochizuki, M.; Sasaki, T.; Fukushima, Y.; Sugiyama, T.; Hiromasa, A.; Suda, T.; Imai, T. Influence of High Molecular Weight Polypeptides on the Mouthfeel

- of Commercial Beer. *Journal of the Institute of Brewing* 2021, 127 (1), 27–40. <https://doi.org/10.1002/jib.630>.
- (45) Li, X.; Jiang, K.; Jin, Y.; Liu, J. Comparative Study on Protein Composition and Foam Characteristics of Barley and Wheat Beer. *Foods* 2024, 13 (21). <https://doi.org/10.3390/foods13213400>.
- (46) Niu, C.; Han, Y.; Wang, J.; Zheng, F.; Liu, C.; Li, Y.; Li, Q. Malt Derived Proteins: Effect of Protein Z on Beer Foam Stability. *Food Bioscience* 2018, 25, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.07.003>.
- (47) Kerr, E. D.; Caboche, C. H.; Pegg, C. L.; Phung, T. K.; Viejo, C. G.; Fuentes, S.; Howes, M. T.; Howell, K.; Schulz, B. L. The Post-Translational Modification Landscape of Commercial Beers. *Scientific Reports* 2021, 11 (1), 15890. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95036-0>.
- (48) Perrocheau, L.; Bakan, B.; Boivin, P.; Marion, D. Stability of Barley and Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) toward Heating and Reducing Agents: Relationships with the Brewing Process. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006, 54 (8), 3108–3113. <https://doi.org/10.1021/jf052910b>.
- (49) Mills, E. N. C.; Gao, C.; Wilde, P. J.; Rigby, N. M.; Wijesinha-Bettoni, R.; Johnson, V. E.; Smith, L. J.; Mackie, A. R. Partially Folded Forms of Barley Lipid Transfer Protein Are More Surface Active. *Biochemistry* 2009, 48 (51), 12081–12088. <https://doi.org/10.1021/bi901328f>.
- (50) Jégou, S.; Douliez, J.-P.; Mollé, D.; Boivin, P.; Marion, D. Evidence of the Glycation and Denaturation of LTP1 during the Malting and Brewing Process. *Journal of agricultural and food chemistry* 2001, 49 (10), 4942–4949. <https://doi.org/10.1021/jf010487a>.
- (51) Zhao, Y.; Cieplak, M. Structural Changes in Barley Protein LTP1 Isoforms at Air-Water

- Interfaces. *Langmuir* 2017, 33 (19), 4769–4780.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00791>.
- (52) Wijesinha-Bettoni, R.; Gao, C.; Jenkins, J. A.; Mackie, A. R.; Wilde, P. J.; Mills, E. N. C.; Smith, L. J. Post-translational Modification of Barley LTP1b: The Lipid Adduct Lies in the Hydrophobic Cavity and Alters the Protein Dynamics. *FEBS Letters* 2007, 581 (24), 4557–4561. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.041>.
- (53) Saint-Jalmes, A.; Peugeot, M.-L.; Ferraz, H.; Langevin, D. Differences between Protein and Surfactant Foams: Microscopic Properties, Stability and Coarsening. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2005, 263 (1–3), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.02.002>.
- (54) Lin, H.; Carroll, K. S. Introduction: Posttranslational Protein Modification. *Chemical Reviews*. American Chemical Society February 14, 2018, pp 887–888. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00756>.
- (55) Medrano, A.; Abirached, C.; Panizzolo, L.; Moyna, P.; Añón, M. C. The Effect of Glycation on Foam and Structural Properties of β -Lactoglobulin. *Food Chemistry* 2009, 113 (1), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.036>.
- (56) Kutzli, I.; Weiss, J.; Gibis, M. Glycation of Plant Proteins Via Maillard Reaction: Reaction Chemistry, Technofunctional Properties, and Potential Food Application. *Foods* 2021, 10 (2), 376. <https://doi.org/10.3390/foods10020376>.
- (57) Zhang, Z.; Bai, Y.; Wang, W.; Qiao, J.; Guo, S.; Zhao, C.; Zhou, J.; Xue, Y.; Xing, B.; Guo, S.; Ren, G.; Zhang, L. Effects of Glycation Treatment on the Structural, Physicochemical, and in Vitro Digestible Properties of Tartary Buckwheat Protein. *LWT* 2024, 205, 116493. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116493>.
- (58) Li, Q.; Li, W.; Li, L.; Zong, X.; Coldea, T. E.; Yang, H.; Zhao, H. Enhancing the Foaming

Properties of Brewer's Spent Grain Protein by Ultrasound Treatment and Glycation Reaction. *Food & Function* 2023, 14 (6), 2781–2792. <https://doi.org/10.1039/D2FO03734C>.

- (59) Niu, C.; Han, Y.; Wang, J.; Zheng, F.; Liu, C.; Li, Y.; Li, Q. Comparative Analysis of the Effect of Protein Z4 from Barley Malt and Recombinant *Pichia Pastoris* on Beer Foam Stability: Role of N-Glycosylation and Glycation. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018, 106, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.001>.
- (60) Matejková, M.; Žídková, J.; Žídek, L.; Wimmerová, M.; Chmelík, J.; Sklenář, V. Investigation of Thermal Denaturation of Barley Nonspecific Lipid Transfer Protein 1 (Ns-LTP1b) by Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, 57 (18), 8444–8452. <https://doi.org/10.1021/jf902580f>.
- (61) Duong-Ly, K. C.; Gabelli, S. B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation; 2014; pp 85–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>.
- (62) Saraswat, M.; Musante, L.; Ravidá, A.; Shortt, B.; Byrne, B.; Holthofer, H. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. *Biomed Research International* 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/312709>.
- (63) Arondel, V.; Vergnolle, C.; Cantrel, C.; Kader, J.-C. Lipid Transfer Proteins Are Encoded by a Small Multigene Family in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Science* 2000, 157 (1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00232-6).
- (64) Bakan, B.; Hamberg, M.; Larue, V.; Prangé, T.; Marion, D.; Lascombe, M.-B. The Crystal Structure of Oxylipin-Conjugated Barley LTP1 Highlights the Unique Plasticity of the Hydrophobic Cavity of These Plant Lipid-Binding Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009, 390 (3), 780–785.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.049>.

- (65) Ayala, A.; Cutler, R. G. The Utilization of 5-Hydroxyl-2-Amino Valeric Acid as a Specific Marker of Oxidized Arginine and Proline Residues in Proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 1996, *21* (1), 65–80. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02220-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02220-1).
- (66) Friedman, M. Lysinoalanine in Food and in Antimicrobial Proteins; 1999; pp 145–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4853-9_10.
- (67) Padilla, P.; Andrade, M. J.; Peña, F. J.; Rodríguez, A.; Estévez, M. An in Vitro Assay of the Effect of Lysine Oxidation End-Product, α -Aminoadipic Acid, on the Redox Status and Gene Expression in Probiotic *Lactobacillus Reuteri* PL503. *Amino Acids* 2022, *54* (4), 663–673. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03087-4>.
- (68) Alam, M. E.; Barnett, G. V.; Slaney, T. R.; Starr, C. G.; Das, T. K.; Tessier, P. M. Deamidation Can Compromise Antibody Colloidal Stability and Enhance Aggregation in a PH-Dependent Manner. *Molecular Pharmaceutics* 2019, *16* (5), 1939–1949. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01311>.
- (69) Yan, Y.; Wei, H.; Fu, Y.; Jusuf, S.; Zeng, M.; Ludwig, R.; Krystek, S. R.; Chen, G.; Tao, L.; Das, T. K. Isomerization and Oxidation in the Complementarity-Determining Regions of a Monoclonal Antibody: A Study of the Modification–Structure–Function Correlations by Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2016, *88* (4), 2041–2050. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02800>.
- (70) Batas, B.; Jones, H. R.; Chaudhuri, J. B. Studies of the Hydrodynamic Volume Changes That Occur during Refolding of Lysozyme Using Size-Exclusion Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1997, *766* (1–2), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)01020-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)01020-5).
- (71) Hastie, K.; Rayaprolu, V.; Sapphire, E. O. Analysis of Oligomeric and Glycosylated

- Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled with Multiangle Light Scattering; *Europe PMC* 2021; pp 343–359. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1241-5_24.
- (72) Zhang, S.; Liu, Y.; Wu, W. Study on the Structural Characteristics and Foaming Properties of Ovalbumin—Citrus Pectin Conjugates Prepared by the Maillard Reaction. *Foods* 2024, *13* (22), 3542. <https://doi.org/10.3390/foods13223542>.
- (73) Yang, C.; Han, F.; Wang, Z.; Cui, B.; Wu, Y.; Shen, Q.; Li, B.; Chen, Y. The Air-Water Interfacial Properties of Bovine Serum Albumin with PH-Shifting Treatments by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Food Hydrocolloids* 2025, *166*, 111360. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111360>.
- (74) Sorensen, S. B.; Bech, L. M.; Muldbjerg, M.; Beenfeldt, T.; Breddam, K. *Barley Lipid Transfer Protein 1 Is Involved in Beer Foam Formation*; 1993; Vol. 30.
- (75) Throughout the Brewing Process Barley Lipid Transfer Protein 1 Is Transformed into a More Foam-Promoting Form. *European brewery convention: proceedings of the 25th congress brussels* 1995
- (76) Waszkiewicz, R.; Michaś, A.; Białobrzewski, M. K.; Klepka, B. P.; Cieplak-Rotowska, M. K.; Staszalek, Z.; Cichocki, B.; Lisicki, M.; Szymczak, P.; Niedzwiecka, A. Hydrodynamic Radii of Intrinsically Disordered Proteins: Fast Prediction by Minimum Dissipation Approximation and Experimental Validation. *Journal of Physical Chemistry Letters* 2024, *15* (19), 5024–5033. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.4c00312>.
- (77) Białobrzewski, M. K.; Klepka, B. P.; Michaś, A.; Cieplak-Rotowska, M. K.; Staszalek, Z.; Niedzwiecka, A. Diversity of Hydrodynamic Radii of Intrinsically Disordered Proteins. *European Biophysics Journal* 2023, *52* (6–7), 607–618. <https://doi.org/10.1007/s00249-023-01683-8>.
- (78) Lindorj-Larsen, K.; Winther, J. R. *Surprisingly High Stability of Barley Lipid Transfer*

Protein, LTP1, towards Denaturant, Heat and Proteases.

- (79) Hu, J.; Yang, J.; Xu, Y.; Zhang, K.; Nishinari, K.; Phillips, G. O.; Fang, Y. Comparative Study on Foaming and Emulsifying Properties of Different Beta-Lactoglobulin Aggregates. *Food & Function* 2019, 10 (9), 5922–5930. <https://doi.org/10.1039/c9fo00940j>.
- (80) Othmeni, I.; Karoui, R.; Blecker, C. Impact of PH on the Structure, Interfacial and Foaming Properties of Pea Protein Isolate: Investigation of the Structure – Function Relationship. *International Journal of Biological Macromolecules* 2024, 278, 134818. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134818>.
- (81) Kobayashi, N.; Segawa, S.; Umemoto, S.; Kuroda, H.; Kaneda, H.; Mitani, Y.; Watari, J.; Takashio, M. A New Method for Evaluating Foam-Damaging Effect by Free Fatty Acids. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 2002, 60 (1), 37–41. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-60-0037>.
- (82) Evans, D. E.; Finn, J. E. C.; Robinson, L. H.; Eglinton, J. K.; Sheehy, M.; Stewart, D. C. The Effects of Hop- α -Acids and Proline-Specific Endoprotease (PSEP) Treatments on the Foam Quality of Beer. *Journal of the Institute of Brewing* 2011, 117 (3), 335–342. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00477.x>.
- (83) Karmakar, G.; Nahak, P.; Guha, P.; Roy, B.; Chettri, P.; Sapkota, M.; Koirala, S.; Misono, T.; Torigoe, K.; Ghosh, S.; Panda, A. K. Effects of Fatty Acids on the Interfacial and Solution Behavior of Mixed Lipidic Aggregates Called Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Oleo Science* 2016, 65 (5), 419–430. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15234>.
- (84) Takoi, K. Influence of Hop Bitter Acids and Their Derivatives on Beer Foam Stability Evaluated Using Customer-Oriented Foam Collapse Time (FCT) Method. *BrewingScience* 2021, 74 (11–12), 141–150. <https://doi.org/10.23763/BrSc21-14takoi>.

- (85) Gänz, N.; Becher, T.; Drusch, S.; Titze, J. Interaction of Proteins and Amino Acids with Iso- α -Acids during Wort Preparation in the Brewhouse. *European Food Research and Technology* 2022, 248 (3), 741–750. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03926-4>.
- (86) Ditych, M.; Mertens, T.; Filipowska, W.; Soszka, A.; Jaskula-Goiris, B.; De Rouck, G.; De Cooman, L.; Aerts, G.; Andersen, M. L. Effect of Mashing-in PH on the Biochemical Composition and Staling Properties of the Sweet Wort. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 2024, 82 (3), 238–251. <https://doi.org/10.1080/03610470.2024.2319928>.
- (87) 日本農芸化学会 農芸化学技術賞 受賞者公演要旨 ビール泡品質向上への一貫した取り組み、サッポロビール株式会社 (2015)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、厚いご指導を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域 内山 進 教授に謹んで感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始、直接のご指導、種々の有益なご助言を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域、鳥巢 哲生 准教授に深く感謝致します。

本博士学位論文を審査して頂き、貴重なご指導及びご高閲を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 福崎 英一郎 教授、ならびに大阪大学工学研究科生物工学専攻 分子微生物学研究室 本田 孝祐 教授に厚く感謝申し上げます。

また、サントリーグローバルイノベーションセンター（株）の皆様には、数多くの試料をご提供いただき、泡沫安定化に関する測定において多大なご協力をいただきました。特に、乾 隆子 氏、影山 紀彦 氏、末吉 泰大 氏には測定の実施とデータ解析に関して貴重なご尽力をいただきました。心から感謝いたします。

そして、研究活動のみならず、普段の研究室生活を支えてくださった同研究室の廣畑 貴一 氏、Wang Zeken 氏、村上 誠 氏、中塚 遼治 氏、笠原 里実 氏、岡田 梨櫻 氏、池田 智彦 氏、Saki Elga 氏、古田 勇馬 氏、小西 萌絵 氏、浅香 輝弘 氏、さらに、研究室の先輩、同期、後輩、先生、研究員、事務補佐の方々に心から感謝いたします。

尚、本研究は JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェローシップ創設事業 JPMJFS2125 のご支援を受けたものです。深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程への進学を快諾し、いつも支えてくれた家族、また、日常を楽しく彩ってくださった友人に深い感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。