

(前文)

酒類総合研究所は、第3期中期計画(平成23年度から平成27年度)に基づき、研究開発に関して外部有識者による評価及び助言を求め、業務運営に反映させることを目的とする「研究開発評価委員会」を設置しています。当該委員会は、当研究所研究開発評価委員会運営要領(指針)に基づき、「国の研究開発評価に関する大綱的指針」(平成24年12月6日内閣総理大臣決定)に沿った事前評価、中間評価、事後評価等を行うこととされています。

この度研究開発評価委員会は、平成23年度から実施している第3期中期目標期間に実施した研究課題について、酒類行政的、科学・技術的及び社会的・経済的意義、又は目的の妥当性における必要性、計画・実施体制及び費用対効果の妥当性における効率性、目標を達成する手段、新しい知の創出への貢献及び今後見込まれる効果・波及効果における有効性の観点から事後評価を実施し、報告をいただきましたので、ここに公表いたします。

1 開催日

平成27年6月9日(火)

2 場所

独立行政法人酒類総合研究所 広島事務所

3 出席委員

会長 太田明徳

委員 飯島信司、大河内基夫、熊谷日登美、須藤茂俊、塚本芳昭、平田大

(敬称略、五十音順)

(注)委員には、酒類に関する研究等に関して高い見識をお持ちの方が就任されています。

## 事後評価

### 課題名：酒類の品目判定に関する研究

#### 1 実施者

水野昭博、後藤奈美、日下一尊、増田達也、高橋圭、徳岡昌文、金井宗良、後藤美保、橋本知子、矢澤彌

#### 2 研究の目的及び意義

品目による酒類成分の相違を明らかにし、ビール系酒類の麦芽使用比率の推定精度向上等、品目判定法の開発を行う。また、清酒の製法品質表示基準（平成元年国税庁告示第8号）では、吟醸酒などの特定名称の要件の一つとして麴米の使用割合（清酒の製造に使用される白米の重量に対する麴米の重量の割合。以下「麴歩合」という。）を15%以上と規定している。そこで、適正表示の確保に資するため、麴歩合の推定方法等の開発を行う。

#### 3 主な研究成果及び知見

ビール系酒類については、麦芽使用比率等により品目及び税率が異なる。そこで、ビール系酒類の品目判定に資するため、①LC-Q/TOFMSを用いたノンターゲット分析により、ビール系酒類の製造工程（製麦を含む）中の成分動向を解析し、麦芽に特徴的かつ製造工程中の変動の少ない40成分を麦芽使用比率推定の指標とした。これら指標成分の定量法としてLC-TQMSを用いた一斉分析法を確立し、精度の高い麦芽使用比率の推定法を開発した。また、②麦芽又は副原料に特異的な成分のうち、13成分によるオールモルト及び麦芽不使用の判別法並びに③各種ペプチド系原料使用の判別法を開発した。

清酒については、清酒の製法品質表示基準により麴歩合が規定されていることから、④麴歩合の推定法の開発について、これまでにLC-Q/TOFMS及びCE-MSによるノンターゲット分析を行い、麴に特徴的な30成分を選定し、予備的に麴歩合の推定式を作成した。これら成分の麴歩合推定指標としての妥当性を確認するため、試験醸造を行い製造条件（精米歩合、アルコール添加等）の影響及び製造・貯蔵中の動向を確認した。また、推定誤差の大きかった一部製品について原因を検討したところ、一部の指標成分の含量が通常製品と異なるためであることを確認した。生酒の判別については、製品中に残存する酵素活性の有無による方法が報告されている。しかし、限外ろ過により酵素が除去された生酒には適用できない。そこで、成分による判別のため、⑤市販清酒のLC-Q/TOFMS、GC-MSを用いたノンターゲット分析等により、生酒に特徴的な15成分を見出した。また、生酏・山廃酒母の使用酒の判別についても、同様の手法により、特徴的な8成分を見出した。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性
  - きわめて重要 □重要 □必要 □必要ではなかった
- ・ 効率性
  - きわめて効率的 ■かなり効率的 □効率的 □非効率
- ・ 有効性

きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった

・ 総合評価

目標を十分に達成できた

目標を概ね達成できた

目標の達成が必ずしも十分でなかった

目標の達成が不十分であった

5 総合所見

ビール系酒類の品目判定に資する麦芽使用比率の推定法及び使用ペプチド系原料の判別法を開発した点は大いに評価できる。今後は、麦芽及び副原料に特異的な未同定の指標成分の同定に期待したい。清酒についても、製法品質表示基準に規定される表示の確保に資するため、麴歩合の推定法を開発するとともに、生酒及び生酏・山廃酒母の使用酒について判別法の開発に取り組んでいることは評価できる。

## 課題名：酒類原材料等の判別に関する研究

### 1 実施者

#### (1) 安定同位体比等に基づいた原材料等の判別

藤井力、松丸克己、須藤茂俊、橋口知一、伊豆英恵、橋本知子、赤松史一

#### (2) 単式蒸留しょうちゅうの分析・鑑定に関する研究

福田央、山田修

### 2 研究の目的及び意義

#### (1) 安定同位体比等に基づいた原材料等の判別

酒類の適正表示の確保に資するため、安定同位体比分析を用いて、酒類の原材料を判別する技術を開発する。

#### (2) 単式蒸留しょうちゅうの分析・鑑定に関する研究

酒類の適性表示の確保に資するため、各種単式蒸留しょうちゅう（以下「しょうちゅう」という。）のうち、製造地域が限定されている泡盛及び黒糖しょうちゅうについて、その特徴的な成分を明らかにするとともに、それ以外のしょうちゅう及び類似の原料を使用する蒸留酒との判別方法を確立する。

### 3 主な研究成果及び知見

#### (1) 安定同位体比等に基づいた原材料等の判別

植物の種類によって炭水化物の炭素安定同位体比が異なり、緯度などによって水の酸素安定同位体比が異なることが知られている。清酒、みりん、しょうちゅうに含まれるアルコール及びエキスの安定同位体比分析により、製造工程中におけるアルコール又は糖類の添加を判別する方法を開発した。加えて、日本の各地で醸造された清酒中の水の酸素安定同位体比は、過去に報告された地下水の値と相関が認められた。したがって、原料水及び清酒中の水の酸素安定同位体比を分析することにより、清酒がその原料水を用いて製造されたものであるか否かを判別できる可能性が見出された。

また、清酒の水素・酸素安定同位体比分析の結果、酸素安定同位体比は醸造アルコールの添加により変化しなかったが、水素安定同位体比は醸造アルコール（米由来の醸造アルコールを含む。）の添加により減少したことから、水素安定同位体比分析により、清酒に添加された米由来醸造アルコールの検出が可能となることが示唆された。さらに、清酒のグルコースの安定同位体比を変化させることなく単離する方法の開発に成功した。

#### (2) 単式蒸留しょうちゅうの分析・鑑定に関する研究

泡盛と他のしょうちゅうの揮発性成分を比較検討し、高級脂肪酸エチルエステル、モノテルペン系アルコールの他、12成分を変数として判別方法を検討したところ、95%以上の精度で判別された。同様に、泡盛の古酒と一般酒の判別方法についても開発した。さらに、黒糖しょうちゅうとそれ以外のしょうちゅうで同様に検討した結果、95%以上の精度で判別され、同じく糖質を原料とするラム酒との成分による判別ではすべて正しく予測された。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性
  - きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性
  - きわめて効率的 ■かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性
  - きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 総合評価
  - 目標を十分に達成できた
  - 目標を概ね達成できた
  - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
  - 目標の達成が不十分であった

#### 5 総合所見

安定同位体比による判別については、炭素安定同位体比分析により、清酒へのアルコール又は糖類の添加について判別を可能にするとともに、水素安定同位体比分析により米由来醸造アルコールの検出が可能となることを示したことは大いに評価できる。

しょうちゅうにおける判定については、揮発性成分の分析により、泡盛と他の単式蒸留しょうちゅう、泡盛の一般酒と古酒、黒糖しょうちゅうとラム酒等について高い精度で判別できることを確認したことは評価できる。

## 課題名：酒類関連微生物に係る酒類の安全性のための研究

### 1 実施者

- (1) 酒類関連微生物に係る酒類の安全性のための研究  
後藤奈美、水野昭博、正木和夫、高橋正之、西堀奈穂子
- (2) 麴菌の同定及び安全性評価のための比較ゲノム解析  
後藤奈美、岩下和裕、織田健

### 2 研究の目的及び意義

- (1) 酒類関連微生物に係る酒類の安全性のための研究  
酒類及び酒類製造工程中の微生物叢を解析し、混入する可能性のある汚染微生物の実態を把握し、酒類の微生物学的安全性及び品質の確保に役立てる。
- (2) 麴菌の同定及び安全性評価のための比較ゲノム解析  
清酒醸造に利用される黄麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は安全な微生物であると認識されているが、カビ毒を生産する *A. flavus* と近縁であることから、比較ゲノム解析の手法により、さらなる分類の検討及び安全性の検証を行う。

### 3 主な研究成果及び知見

- (1) 酒類関連微生物に係る酒類の安全性のための研究  
これまでの酒類中の汚染微生物に関する調査報告は、ほとんどが培養法に基づいており、また研究自体も古い時代のものである。近年、DNA 解析に基づく微生物の新しい検出方法が開発されていることから、酒類醸造工程中及び市販醸造酒中の微生物叢を分子生物学的手法により網羅的に解析した。その結果、醸造工程中で生育する可能性のある微生物として *Bacillus* 属等いくつかの細菌を新たに見出した。また、市販醸造酒 128 点を解析したところ、その微生物叢は非常に多様であったが、ほとんどの製品からは食中毒原因細菌種は遺伝子レベルで検出されなかった。1 例のみ、*Bacillus cereus* が検出されたが、その菌体量（生死は不明）は発症につながるレベルより十分に低いレベルであった。  
通常、次世代シーケンスによる微生物の検出では、種ごとの存在比しか分からないが、定量 PCR と組み合わせることで細菌の総菌数を推定する方法を開発した。また、醸造用酵母が大量に存在する環境でも、少数存在する他の酵母を検出できる新しい手法を開発した。
- (2) 麴菌の同定及び安全性評価のための比較ゲノム解析  
*A. oryzae* 及び *A. flavus* 菌群それぞれ 30 株以上を用いて、麴菌 DNAchip を用いたゲノムワイドな進化系統解析を行ったところ、両菌株群は異なるクラスターを形成し、近縁ではあるが識別可能であることを示した。また、同様の手法を用いて黄麴菌群が 13 系統に分かれ、それぞれ特徴的な醸造特性を示すことを明らかにした。さらに、PCR による特定フラグメントの有無からその系統を簡易に判別し、醸造特性を予測する方法を開発した。  
二次代謝系については、黄麴菌のゲノム情報から二次代謝遺伝子クラスターが多数

推定されたことから、*A. oryzae* や *A. flavus* で生産が報告されている二次代謝産物（カビ毒及び有用物質）を中心に、検出法の確立と遺伝子クラスターの解析を行った。そのうち、*A. fumigatus* のカビ毒グリオトキシシン生産クラスターに類似する配列は、グリオトキシシンではなく、抗生物質のアスピロクロリンを生産することを明らかにした。しかし、2014年に海外の研究グループからアスピロクロリンをカビ毒とする報文が出されたことから、麴菌のアスピロクロリン生産性について、至適生産条件を設定し、菌株による生産性の有無を調べた。また、アスピロクロリン生産クラスターのシーケンスを解析した。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性
  - きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性
  - きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性
  - きわめて有効 ■かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 総合評価
  - 目標を十分に達成できた
  - 目標を概ね達成できた
  - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
  - 目標の達成が不十分であった

#### 5 総合所見

微生物安全性については、PCR法を介した遺伝子解析技術により酒類醸造工程中の微生物叢を詳細に解析するとともに、醸造用酵母の検出を抑制し、微量に存在する他の酵母を効率的に検出する技術を開発したことは評価できる。また、市販酒類の微生物叢を網羅的に解析することにより、食中毒原因細菌の実態把握を行い、酒類の安全性に関する新たな知見を得たことは有意義な成果である。

比較ゲノムについては、麴菌株群とカビ毒生産性を有する *A. flavus* 菌株群が系統的に識別可能であること示すとともに簡易判別法を開発したこと、また、各種2次代謝物について多様な面から検討を行うことにより重要な知見を得ていることは、酒類の安全性を確保する観点から評価できる成果である。

## 課題名：酒類中の有害物質の実態把握及びその低減法の開発

### 1 実施者

- (1) 酒類中の有害物質の実態把握及びその低減法に関する研究  
藤井力、松丸克己、須藤茂俊、橋口知一、伊豆英恵
- (2) 酒類中の有害物質の低減法の開発  
山田修、福田央、正木和夫、水谷治

### 2 研究の目的及び意義

- (1) 酒類中の有害物質の実態把握及びその低減法に関する研究  
カルバミン酸エチル（EC）は人に対する発がん性の可能性があると考えられる成分で酒類等に微量含まれる。そこで、酒類中の安全性に係る微量成分としてECの分析を行い、その実態を明らかにするとともに、低減法を開発する。
- (2) 酒類中の有害物質の低減法の開発  
甘藷しょうちゅうに含まれるメタノールや、酒類中に生成されるカルバミン酸エチル（EC）の低減法について、酵素科学的な手法で検討する。

### 3 主な研究成果及び知見

- (1) 酒類中の有害物質の実態把握及びその低減法に関する研究  
清酒のECについては、これまでに生成要因の解明や低減法の開発が行われてきたが、その他の酒類については情報が十分ではない。海外では核果蒸留酒にEC濃度の高いものがあると報告されていることから、核果蒸留酒等のEC濃度を調べたところ、外国産では1 mg/Lを超えるものがあったが、国産では最大で0.10 mg/Lであった。また、市販本格しょうちゅうのEC濃度を調べたところ、平均値は14 µg/Lで、一部の国のスピリッツの規制値150 µg/Lを超えるものはなかった。なお、ECは尿素またはシアン化合物から生じることが知られているが、ECを20 µg/L以上含む本格しょうちゅうから尿素は検出されなかったことから、本格しょうちゅうにおけるECはシアン化合物から生成すると考えられた。  
梅酒のECについては、これまでにシアン化合物が前駆体であることを明らかにしている。そこで、仕込み時に空間部に配置したソーダ石灰でシアン化合物を除去することで、酒質に有意な影響を与えず、対照と比較してECを70%減少させる方法を開発した。また、樽貯蔵した梅酒では、リグニン又はその分解物によりECが増加することを明らかにした。
- (2) 酒類中の有害物質の低減法の開発  
(メタノール低減関係)  
国産酒類のメタノール含量はわが国の規制値を大幅に下回っているが、甘藷しょうちゅうのメタノール濃度は他の酒類よりやや高く、規制の厳しい国に輸出する際、問題となることがある。甘藷しょうちゅうのメタノールは、しょうちゅう麹菌の酵素ペクチンメチルエステラーゼが甘藷のペクチンに作用して生じると考えられている。しょうちゅう麹菌のゲノムシーケンスから、しょうちゅう麹菌にはペクチンメチルエス

テラーゼが3種類（PmeA、B、Cと命名）あることが明らかになった。米麴中では *pmeB* の発現が多いが、リコンビナント酵素の活性は PmeA が高かった。各種遺伝子破壊株を用いて米麴を作成し、甘藷しょうちゅう小仕込み試験を行った結果、甘藷しょうちゅう中のメタノールは主に PmeA によって生成され、*pme* 遺伝子の破壊が甘藷しょうちゅうのエタノール濃度及び香気成分にほとんど影響を与えないことを明らかにした。

次に、ゲノム上の変異を検出する方法として植物等で実績のある TILLING 法を検討し、しょうちゅう麴菌のメタノール低生成 *pmeA* 変異実用株の育種においても利用出来ることを明らかにした。

（EC 低減関係）

これまで、酒類中に生成された EC を低減させる方法は知られていない。EC を分解する酵素については知られていたが、研究例が少なく、その酵素の実体についても明らかではなかった。そこで、細菌及び酵母を探索し、*Candida* 属酵母より、新規の EC 分解酵素を部分精製することに成功した。この酵素を用い、EC 分解活性に対するエタノール濃度、温度（安定性、至適温度）、金属イオン、阻害剤等の影響など、基本的な諸性質を調べた。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性
  - きわめて重要 □重要 □必要 □必要ではなかった
- ・ 効率性
  - きわめて効率的 □かなり効率的 □効率的 □非効率
- ・ 有効性
  - きわめて有効 □かなり有効 ■有効 □有効性が認められなかった
- ・ 総合評価
  - 目標を十分に達成できた
  - 目標を概ね達成できた
  - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
  - 目標の達成が不十分であった

#### 5 総合所見

カルバミン酸エチルについては、樽貯蔵した梅酒においてカルバミン酸エチルが増加する原因を解明したこと、ソーダ石灰の使用による梅酒のカルバミン酸エチルの低減化技術を開発したこと、本格しょうちゅうに含まれるカルバミン酸エチル濃度の実態を把握したことは意義ある成果である。また、酵母由来の新規なカルバミン酸エチル分解酵素について検討し、今後、新たな分解酵素を探索するにあたって有用な知見が得られた。

しょうちゅうに微量含まれるメタノールについては、麴菌のペクチンメチルエステラーゼの遺伝子破壊株を造成し、*pmeA* 遺伝子をターゲットにした麴菌育種を行えばメタノール低減化が図れることを明らかにしたことは意義ある成果であり、今後は実用菌株の育種に期待したい。

## 課題名：酒類成分の解析に関する研究

### 1 実施者

#### (1) 香気成分

藤井力、松丸克己、須藤茂俊、岩下和弘、磯谷敦子、飯塚幸子

#### (2) 代謝成分

福田央、後藤奈美、岩下和裕、磯谷敦子、増田達也、高橋圭、徳岡昌文、織田健

#### (3) 原料

福田央、高橋圭

### 2 研究の目的及び意義

酒類の成分分析は、品目判定等の基盤となる技術であることから、酒類成分の解析技術の高度化を図るため、醸造酒に適した多成分分析法を設定するとともに、醸造酒成分の ID 化を行う。さらに、清酒をモデルに醸造工程中の各パラメーターが各種成分の変動に及ぼす影響を解析するとともに、原料から製品までの各種成分の変化について明らかにする。

### 3 主な研究成果及び知見

醸造酒に適した可溶性成分の LC-Q/TOFMS を用いた一斉成分分析法（醸造酒メタボライト分析法）を開発した（現時点で 161 成分を同定可能）。本方法により、市販清酒及び試験醸造酒の分析を行い、精米歩合やアルコール添加の有無、酵母の種類などの影響を受ける清酒成分を明らかにした。

清酒の揮発性成分についても Stir bar sorptive extraction 法と溶媒抽出法を併用した GC-MS による網羅的分析方法を確立し、これまで清酒で報告されていなかった化合物（アセタール類やラクトン類）を含む約 180 成分を同定した。この方法でさまざまな清酒を分析することにより、製法による揮発性成分組成の差異を確認するとともに、これら揮発性成分の清酒製造工程中の消長を解析した。さらに、全国新酒鑑評会出品酒を用いて揮発性成分と使用酵母の関係を解析し、各種酵母に特徴的な成分を見出した。また、出品酒の「甘臭・カラメル様」、「焦げ臭」指摘酒の揮発性成分を解析し、これらの指摘酒に多く含まれる成分（アルデヒド、アセタール、エチルエステルなど）を見出した。「香辛料様・4VG（4-ビニルグアヤコール）」については、4VG のほか、グアヤコールの寄与も示唆された。

米タンパク質の分解については、醸造酒に含まれるジペプチド等の低分子オリゴペプチドを解析するため、LC-MS/MS を用いたプロファイリング方法・定量分析方法及び LC-Q/TOFMS を用いた構造推定方法を開発した。醸造酒中のオリゴペプチドを分析し、清酒には約 90 種類とビールやワインより多種類で高濃度のジペプチドが含まれることを明らかにした。また、麹菌の多数のプロテアーゼのうち、PEPA が米グルテリンの分解を担う主要な酵素であることを明らかにした。清酒製造工程中における米タンパク質の溶出と分解について、イムノプロット等により解析し、グルテリン、PEPA とも、もろみ日数経過とともに徐々に溶出し分解されていくことを確認した。

### 4 評価結果

- ・ 必要性  
きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性  
きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性  
きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 総合評価  
目標を十分に達成できた  
目標を概ね達成できた  
目標の達成が必ずしも十分でなかった  
目標の達成が不十分であった

## 5 総合所見

酒類の揮発性成分及び可溶性成分の網羅的解析方法及び ID 化、並びに低分子ペプチドの分析方法を開発し、清酒の製造方法や官能評価項目と関連する成分を明らかにするなど、酒類成分に関して多様な知見を得た。多方面の波及効果が期待できるため、今後の展開に期待したい。

## 課題名：醸造原料に関する研究

### 1 実施者

後藤奈美、奥田将生、小山和哉、高橋圭

### 2 研究の目的及び意義

酒類原料の各種成分に及ぼす精米等の原料処理の影響や原料の品種、産地等による特徴を把握するとともに、これらの原料特性が、醸造条件によってどのように変動するかを明らかにし、酒類の分析・鑑定等の基盤的情報を得る。併せて、酒類原料に関する基礎的・基盤的研究を行う。

### 3 主な研究成果及び知見

#### （原料米関係）

一部の農作物で、無機成分（ミネラル）の組成が産地の推定に利用されている。そこで、清酒原料米の無機成分に関して、品種や産地による特徴、精米による濃度変化、醸造工程での挙動を解析した。清酒もろみにおける各無機成分の消長パターンについては、洗米・浸漬による無機成分の溶出や吸着、麴消化による蒸米からの溶出特性、酵母による吸収特性などが影響することを確認した。

原料米のタンパク質は、清酒の品質に大きな影響を及ぼす成分であるが、不明の点が多く残されている。そこで、様々な米品種の精米歩合別画分を用いたイムノブロット及び免疫蛍光染色により、主要米タンパク質であるグルテリンはサブファミリーによって米粒内の分布に差異があることを明らかにした。登熟中の温度条件と米タンパク質については、気温が高いとグルテリン／プロラミン比が増加するが、特に出穂後 6-20 日目に高温にさらされると米粒内部でグルテリンの割合が多くなることを明らかにした。また、一般に米タンパク質は米粒の外層部に多く分布するが、米中心部において相対発現量の高いタンパク質を 10 種類同定した。

近年問題となっている原料米の高温登熟による利用率低下の原因については、もろみでのデンプンの老化速度が影響することを明らかにした。また、イネ登熟期の気温がアミロペクチンの構造、ひいては清酒醪中の酵素消化性を左右するというこれまでの研究結果を検証し、この成果に基づいて平成 25 年から酒造期前に気象データによる米の消化性の予報を開始した。

#### （醸造用ブドウ関係）

赤ワイン用ブドウのフェノール化合物（色素、タンニンなど）は赤ワインを特徴づける重要な成分である。そこで、これらの成分に及ぼす産地の気象条件や果汁成分の影響を検討し、アントシアニン色素の蓄積には平均気温と夏の降水量が大きく影響することを明らかにした。プロアントシアニジン（タンニン）については、生育期の光（UV ではなく白色光）によって生合成が促進されることを明らかにした。また、環境応答に係るプロアントシアニジン生合成の制御遺伝子を同定し、機能を解明した。

ブドウ品種の特徴については、国内育成品種と欧州品種では、これまで知られているアントシアニン組成だけでなく、プロアントシアニジン組成も大きく異なっていること、野

生種のなかには、抗酸化性を示すフラボノールや、機能が報告されているレスベラトロールを高含有するものがあることを明らかにした。

また、ワインの無機成分について、醸造中の変化や醸造条件の影響を明らかにした。

基盤的研究として、日本の在来品種で白ワイン醸造に用いられる甲州について、一塩基多形解析 (SNPs) 及び葉緑体 DNA の部分シーケンスを行い、起源を明らかにした。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性  
きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性  
きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性  
きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 総合評価  
目標を十分に達成できた  
目標を概ね達成できた  
目標の達成が必ずしも十分でなかった  
目標の達成が不十分であった

#### 5 総合所見

酒造用原料米成分の無機元素及びタンパク質について、米粒内の分布及び醸造過程での変動を明らかにした。また、夏期の気象条件がデンプンの利用率に及ぼす影響を検討し、酒造期前の情報提供を開始したことで実用的成果を得た。

醸造用ブドウについては、DNA 多型解析により甲州の起源を明らかにするとともに、赤ワイン用ブドウのフェノール化合物について、栽培条件、品種による影響を明らかにし、その生合成制御について基礎的知見を得た。

これらの知見は、酒類の分析・鑑定及び酒類原料に関する研究を発展していく上で意義深い成果である。

## 課題名：醸造微生物に関する研究

### 1 実施者

- (1) 分析・鑑定の高度化に資する醸造用酵母の基盤的研究  
福田央、下飯仁、赤尾健、渡辺大輔、五島徹也、富本和也、周延
- (2) 分析・鑑定の高度化に資する麴菌の基盤的研究  
(黄麴菌) 岩下和裕  
(黒麴菌) 山田修、高橋徹

### 2 研究の目的及び意義

- (1) 分析・鑑定の高度化に資する醸造用酵母の基盤的研究  
酒類醸造に不可欠な酵母の各種特性について、ゲノム情報や表現型情報を解析することにより、基盤的な情報を蓄積する。
- (2) 分析・鑑定の高度化に資する麴菌の基盤的研究  
酒類製造に使用される黄麴菌及び黒麴菌について、二次代謝産物の生産性や各種麴菌の特性等の違いに関するゲノム情報等を活用し、安全性を検証するとともに、麴菌に関する基礎的・基盤的知見を得る。

### 3 主な研究成果及び知見

- (1) 分析・鑑定の高度化に資する醸造用酵母の基盤的研究  
清酒酵母を中心に多数の菌株のゲノム配列を解読し、現在使用されている主要な清酒酵母は互いにきわめて近縁であることを明らかにした。さらに、LOH (Loss of Heterozygosity) が保存菌株の変異、系統分化及び進化の主要なメカニズムの一つであることを明らかにした。また、これらの知見をもとに菌株識別技術の開発を進めた。  
清酒酵母はストレス応答等に欠損があり、アルコールストレスがあっても細胞周期が休止期に移行せずアルコール発酵を継続するため高アルコール発酵性を示すが、他の酵母よりも死滅しやすいことを明らかにした。また、清酒酵母から高アルコール耐性変異株が取得されているが、その原因となる一塩基変異を明らかにするとともに、清酒酵母の醸造特性に関与すると考えられる複数の遺伝子を特定した。  
酒類の安全性の確保及び製品の多様化に資するため、尿素非生産性酵母等、様々な新規酵母菌株の育種を行った。
- (2) 分析・鑑定の高度化に資する麴菌の基盤的研究  
(黄麴菌関係)  
糸状菌類は、抗生物質やカビ毒など多くの二次代謝産物を生産することが知られている。そこで糸状菌の一種である黄麴菌について、ゲノムワイドな遺伝子発現制御に関わるヒストンアセチル化酵素遺伝子及びヒストン脱アセチル化酵素遺伝子を解析し、二次代謝物の生合成制御に関わる *AohstD* 遺伝子及び *Aospt3* 遺伝子を見出すとともに、二次代謝のグローバル制御因子である *laeA* 遺伝子との関連を明らかにした。  
(黒麴菌関係)  
黒麴菌はカビ毒の生産が報告されている *A. niger* と近縁で、同種であるとする意

見があった。そこで、5箇所ゲノムDNA 約2.5 kbのシーケンスに基づく系統解析を行い、両者は別の生物種であることを明らかにした。これまで黒麹菌として *A. awamori* 等、10数種が報告されているが、これらはすべて同種であることが確認されたことから、その学名を *A. luchuensis* とし、種の特性を再記載した。また、産官学の共同研究として黒麹菌のゲノムシーケンスを行なった結果、*A. niger* との相同性は88.9%と低く、別種であることが確認された。現在、麹菌ゲノム情報のデータベースを構築している。

安全性の検証については、製麹した黒麹の分析により、食品衛生法及び飼料安全法で規制の対象となっているカビ毒（アフラトキシンB1、B2、G1、G2、パツリン、ゼアラノン、デオキシニバレノール）の非生産性を確認した。また、*A. niger* で生産が報告されているカビ毒（オクラトキシンA及びフモニシンB2）について、遺伝子レベルで非生産性であることを明らかにした。これらの研究成果に基づいて黒麹菌判別解析の受託分析を平成26年4月から開始した。

種々の代謝系の研究には、基盤的技術として形質転換が必要であるが、黒麹菌はエレクトロポレーション法や、黄麹菌で用いられるプロトプラスト法では形質転換体が十分に得られなかった。そこで、種々検討の結果、アグロバクテリウム法による黒麹菌の形質転換法、高効率相同組換え宿主及び遺伝子高発現系を開発した。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性
  - きわめて重要 □重要 □必要 □必要ではなかった
- ・ 効率性
  - きわめて効率的 ■かなり効率的 □効率的 □非効率
- ・ 有効性
  - きわめて有効 □かなり有効 □有効 □有効性が認められなかった
- ・ 総合評価
  - 目標を十分に達成できた
  - 目標を概ね達成できた
  - 目標の達成が必ずしも十分でなかった
  - 目標の達成が不十分であった

#### 5 総合所見

酵母については、優良清酒酵母の高発酵性、高アルコール耐性などに関する遺伝子レベルの解析により基盤的知見を得るとともに、尿素低生産性酵母など新規酵母菌株の開発・育種にも取り組んでいる。

麹菌については、黒麹菌が *A. niger* とは別種であることを確認し、学名を *A. luchuensis* と提唱するとともに、ゲノム情報のデータベース化、形質転換方法の開発及び遺伝子レベルでのカビ毒非生産性の確認などを実施した。これらは、酒類の安全性の確保並びに醸造用微生物に関する研究を発展していく上で意義深い成果である。

## 課題名：日本産酒類の輸出等に資する研究

### 1 実施者

#### (1) DMTS-P1 低生産性酵母の育種

藤井力、松丸克己、下飯仁、須藤茂俊、磯谷敦子、渡辺大輔

#### (2) 清酒製造工程における DMTS 生成要因

藤井力、後藤奈美、山田修、金井宗良、西堀奈穂子

#### (3) 硫酸塩

水野昭博、日下一尊

### 2 研究の目的及び意義

酒類の長期品質保持を可能にし、日本産酒類の輸出等に資するため、清酒の貯蔵劣化臭である老香の生成機構を解明するとともに、その効果的な抑制技術を開発する。

### 3 主な研究成果及び知見

#### (DMTS-P1 低生産性酵母の育種)

清酒を半年から1年程度保存した場合に生じるたくあん様香のオフフレーバーを老香と呼ぶ。実験室酵母で老香の主成分であるジメチルトリスルフィド前駆体(DMTS-P1)生成への寄与が確認された遺伝子について、清酒酵母の破壊株を構築し、MRI1 もしくは MDE1 破壊が有効であることを明らかにした。実用株育種のため、セルフクロニング法により MRI1 の機能を欠失した株を作成した結果、製成酒の DMTS-P1 及び強制劣化処理後の DMTS 生成が減少し、官能的にも老香が低減した。また、ろ過材やガラス容器が DMTS 生成に与える影響を明らかにした。清酒の老ねやすさを測定する分析手法を開発し、全国新酒鑑評会においてオプション分析を開始した。

#### (清酒製造工程における DMTS 生成要因)

清酒によって DMTS の生成しやすさには大きな違いがある。そこで、種々の醸造条件を検討し、醪末期の酵母の死滅率と劣化処理後の清酒の DMTS 濃度は正の相関を示すことを明らかにした。酵母内容物の添加によって劣化処理後の DMTS 生成が促進されることを確認し、酵母内容物には①未同定の低分子物質による即効性効果と②高分子物質(酵素)による遅行性効果(生酒期間中に生成)の2種類があることを明らかにした。

その他、上槽直後の原酒の各種分析値と製造条件について統計解析し、DMTS 生成には「原料の溶解」と「酵母の死滅」が関連していることを示した。また、実証試験により、上槽時の最後に圧力をかけて搾った画分で DMTS が生成しやすく、割り水等による希釈で生成しにくくなることなどを明らかにし、老香を生成しにくい醸造条件として業界に情報提供をした。

#### (硫酸塩)

これまでに開発した、清酒の仕込水に低濃度の硫酸塩を添加することによりアミノ酸度のみを選択的に低減する方法について、その作用機作を検討し、硫酸塩の添加により、清酒もろみ中における米タンパク質の溶出及び酸性カルボキシペプチダーゼの活性が低下す

ることが要因であることを明らかにした。

#### 4 評価結果

- ・ 必要性  
きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性  
きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性  
きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 総合評価  
目標を十分に達成できた  
目標を概ね達成できた  
目標の達成が必ずしも十分でなかった  
目標の達成が不十分であった

#### 5 総合所見

清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分であるジメチルトリスルフィドについて、その前駆体の生成に関わる清酒酵母遺伝子を特定し、セルフクローニングによる低生産性酵母を開発するとともに、老香の発生しにくい各種醸造条件を明らかにした。また、硫酸塩添加によるアミノ酸低減化の機構を明らかにするなど、酒類の長期品質保持により日本産酒類の輸出促進に資する重要な成果が得られている。

## 課題名：酒類の製造技術の強化に資する研究

### 1 実施者

#### (1) 脂肪酸臭

福田央、高橋圭

#### (2) フェノール臭

山田修、向井伸彦

### 2 研究の目的及び意義

近年問題となっている酒類のオフフレーバーとして脂肪酸臭とフェノール臭に着目し、その発生要因を解明するとともに、抑制方法を明らかにし、酒類の製造技術の強化に資する。

### 3 主な研究成果及び知見

#### (脂肪酸臭)

鑑評会出品酒や試験醸造した純米吟醸酒を用いて、GC-FIDによる中鎖脂肪酸等の定量分析及び GCxGC-TOF MSによる揮発性成分の網羅的解析を行い、吟醸酒の脂肪酸臭には中鎖脂肪酸の中でもヘキサン酸の寄与が高く、中鎖脂肪酸エチルエステル/中鎖脂肪酸比を高く保つことが吟醸酒の品質に重要であること、さらに、中鎖脂肪酸誘導体やアルカンと推定される化合物が脂肪酸臭と相関が高いことを明らかにした。また、清酒醸造工程中における中鎖脂肪酸等の変動について解析を進めた。

#### (フェノール臭)

酒類のフェノール臭の主成分である 4-ビニルグアヤコール (4VG) について、各種醸造用酵母のフェルラ酸からの 4VG 生成能と、酵母のフェルラ酸脱炭酸反応に関与する *PAD1*、*FDC1* 両遺伝子の塩基配列を調べた。清酒酵母及びしょうちゅう酵母の 29 株は 4VG 生成能を持たず、*FDC1* 遺伝子配列中に一塩基置換により終止コドンが生じていることが原因と考えられた。ワイン酵母 16 株には、4VG 生成能を持つもの、弱いもの、持たないものが存在したが、両遺伝子の塩基配列と 4VG 生成能との関係は見出せず、異なる要因の存在が示唆された。

### 4 評価結果

#### ・ 必要性

きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった

#### ・ 効率性

きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率

#### ・ 有効性

きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった

#### ・ 総合評価

目標を十分に達成できた

目標を概ね達成できた

目標の達成が必ずしも十分でなかった

目標の達成が不十分であった

## 5 総合所見

吟醸酒で問題となることが多い脂肪酸臭については、ヘキサン酸の寄与が高く、その他にも正の相関を示す成分があることなどを明らかにしている。フェノール臭（4VG）については、各種醸造用酵母の 4VG 生成遺伝子について解析を進めており、今後の成果が、酒類の更なる品質向上を目指した製造技術の強化に資するものになると期待される。

## 課題名：酒類の機能性等に関する研究

### 1 実施者

#### (1) 清酒粕・しょうちゅう粕関係

藤井力、山田修、後藤奈美、水野昭博、家藤治幸、向井伸彦、金井宗良

#### (2) アルコール、酒類及び醸造副産物成分の生体への影響

藤井力、伊豆英恵

### 2 研究の目的及び意義

酒類及び醸造副産物の機能性を明らかにするとともに、醸造副産物の有効利用方法を開発する観点から、清酒粕やしょうちゅう粕（蒸留残液）に含まれる一般栄養成分や有用成分含量、成分の安定性等を明らかにするとともに、有用性を検証する。また、酒類に含まれるアルコールやその他の成分の生体への影響を明らかにし、酒類に対する理解を深めるとともに酒類業の健全な発展に資する。

### 3 主な研究成果及び知見

#### （清酒粕・しょうちゅう粕関係）

清酒粕については、清酒粕の一般成分含量が多様化していること、有用成分である S-アデノシルメチオニン (SAM)（機能性成分）、葉酸（ビタミン）、ポリアミン（機能性成分）及び  $\alpha$ -グリセロホスホコリン（機能性成分）を高含有することを明らかにした。また、SAM や葉酸の高含有要因を明らかにするとともに安定保持方法を開発した。また、SAM、葉酸、ポリアミン含量に関わる酵母の量的形質遺伝子座を解析し、SAM 高含有に寄与する清酒酵母遺伝子を明らかにした。

しょうちゅう粕については、SAM、葉酸、ビタミン B6 及びポリアミンを高含有すること、並びに SAM や葉酸の高含有要因を明らかにした。

#### （アルコール、酒類及び醸造副産物成分の生体への影響）

酒類及び醸造副産物の機能性について検討したところ、エタノールによる変形性関節症抑制、脳機能・脂質代謝改善、清酒含有成分アグマチンによる老化遅延、酒粕含有成分  $\alpha$ -グリセロホスホコリン及び SAM による脳機能改善等の機能性が示唆される知見を得た。また、エタノール摂取によるアディポネクチン増加により、適量飲酒の効能の機序を一部説明できることが示唆された。

### 4 評価結果

- ・ 必要性  
きわめて重要 重要 必要 必要ではなかった
- ・ 効率性  
きわめて効率的 かなり効率的 効率的 非効率
- ・ 有効性  
きわめて有効 かなり有効 有効 有効性が認められなかった
- ・ 総合評価

- 目標を十分に達成できた
- 目標を概ね達成できた
- 目標の達成が必ずしも十分でなかった
- 目標の達成が不十分であった

## 5 総合所見

清酒粕やしょうちゅう粕の一般成分や機能性成分について解析するとともに、有用成分の安定保持方法を開発するなど、新たな知見を得ている。アルコール等の生体への影響については、適量飲酒の効能の機序について知見を得るなど、酒類業の健全な発達に資する意義深い成果が得られており、業界の発展に資する重要な研究である。