

（前文）

独立行政法人酒類総合研究所は、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 28 年 12 月 21 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、令和 3 年度から実施する第 5 期中期目標期間の研究課題について中間評価を実施いたしました。下記のとおり、その報告書を公表いたします。

記

1 開催日

令和 5 年 6 月 29 日（木）

2 場所

独立行政法人酒類総合研究所

（注）新型コロナウイルス感染症の 5 類感染症移行に伴い、オンライン会議を併用したハイブリッド形式により実施しました。

3 委員

会長 飯島信司

委員 奥田 徹、熊谷日登美、須藤茂俊、塚本芳昭、平田 大、堀内裕之

（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。

中間評価

課題名：日本産酒類の競争力強化等に関する研究

1 実施者

岩下和裕、向井伸彦、磯谷敦子、長船行雄、小林拓嗣、ソリナボルジギン

2 中期計画記載内容

日本産酒類の特長を解明し新たな価値の創造に資する研究として、清酒の長期熟成による影響や清酒の成分と人の嗜好の関係性の解明、更に日本産蒸留酒に特徴的な香味の解明などに取り組む。

また、長期輸送・保管における清酒の品質劣化の抑制を目的とした研究を実施する。

3 研究目的及び概要

清酒成分とヒトが感じる香味や嗜好性との関係性について解析を行うとともに、清酒成分から香味や嗜好性を予測するモデルの構築について検討を行い、新たな価値の創造に資する。多数の清酒についてメタボロームデータを取得するとともに、個人の嗜好性を含めた官能評価データを取得することにより、ヒトが感じる香味や個人レベルの嗜好性等が形成される構造をメタボロームレベルで解析する。

清酒の長期熟成による品質への影響の解明等により、長期熟成酒の高品質化や魅力発信に資する。さらに、清酒の劣化臭の制御により、長期輸送・保管における品質安定性の向上に貢献する。長期熟成酒の品質に関与する成分の解明に取り組むとともに、それらの生成要因について検討する。長期熟成酒中の安全性に関わる成分等の実態調査を行う。また、第4期中期計画期間に取得した吟醸酒用老香前駆体低生産酵母の醸造特性等の性質を把握し、酒造現場への普及を図り、吟醸酒の劣化防止に役立てる。

日本産蒸留酒の特徴香と、原料や製造方法との関係性を明らかにすることにより、日本産蒸留酒の特性を解明する。また、海外産蒸留酒との違いを見出すことで海外市場での訴求ポイントを明らかにし、ブランド力向上に資する。以上の取組により、日本産酒類の競争力強化等に貢献する。本格焼酎・泡盛については、製造方法や製造原料に由来する特徴的な成分を探索する。日本産クラフトジンについては製造に使用されているベーススピリッツやボタニカルといった原料に、日本産クラフトウイスキーについては貯蔵条件などの製造方法に特徴的な成分を探索する。また、海外産蒸留酒の最終製品や製造工程途中の試料と比較することで、日本産蒸留酒にどのような特徴があるかについて検討を実施する。

4 主な研究成果及び知見

(消費者の嗜好性の科学的な解析と酒類製造技術への応用に関する研究)

清酒の成分（清酒メタボローム）と官能評価の関係性に関しては、訓練された多数のパネルの平均値に基づいた官能評価結果については、清酒成分から予測することが可能である。一方、多様な個々人の嗜好性については、清酒メタボローム等々との関連についての解析は乏しく、解析方法自体の検討が必要である。

本研究では、清酒成分と嗜好性の関連について基盤的な知見を得るため、540 点の清酒について十分な官能評価経験を有する専門家により、個々人の嗜好性による官能評価を実施し、

データを取得した。さらに、醸造酒メタボライト分析法による清酒メタボロームデータ（n = 3 以上）を取得し、分析精度評価の結果、再現性の高い 476 ピークが得られている。取得した清酒メタボロームデータ及び嗜好性データを用いて、機械学習等の種々の統計的方法を用い、多面的な解析を実施している。

さらに基盤的な知見を得るため、別課題で開発した網羅的清酒香気成分分析法による香気成分データを取得している。取得した香気成分データから、ピークピッキング^{*1} 及びアライメント^{*2} によるプレリミナリーな解析の結果、3 千あまりのピークを含むピークテーブルを得ている。

今後も、引き続き網羅的な香気成分データを取得するとともに、本データの前処理法、これまでに取得した清酒メタボロームデータとの統合方法等について検討するとともに、嗜好性、官能評価結果との関連解析を進める予定である。

*1 質量分析計で得られたデータ（グラフ）から波形（ピーク）の幅や高さを読み取る工程。

*2 異なるサンプル間で、同一の化合物と予想されるピーク同士を対応付けること。

（長期熟成酒の香りに寄与する成分）

長期熟成酒の香りの特徴は多様で、製品の個性を生み出す要因の一つと考えられる。そこで、長期熟成酒の香りの特徴及びそれらに寄与する成分の解明に取り組んだ。市販長期熟成酒（34 点）を用いて自由記述による官能評価を行い、特徴を表す用語を収集した。その結果、特に言及されることの多い香りの特徴は、「カaramel様」、「甘臭」、「焦臭」、「醤油」様であった。これら 4 項目の特徴に焦点を当て、それぞれの特徴が顕著に表れている試料を各々 2 点ずつ選び、GC-olfactometry（以下、GC-O という）により寄与成分を探索した。その結果、既知のカルボニル化合物やエステル類等に加え^{*1}、チオール類のベンジルメルカプタンや 2-フランメタンチオールなどを新たに見出した。同定された成分の定量分析の結果、「カaramel様」の香りが顕著な試料ではソトロロンやジメチルトリスルフィド（DMTS）が高めで、「甘臭」が顕著な試料ではメチオナル濃度が高いなど、香りの特徴ごとに成分濃度に違いが見られた。今後は新たに見出された成分の定量分析及び閾値測定などを行い、香りの特徴と成分との関係についてさらに検討を進める予定である。

*1 GC-O で検出・同定された成分のうち、既知の成分とは以下のとおり：sotolon, furfural, methional, benzaldehyde, phenylacetaldehyde, ethyl 2-methylbutyrate, ethyl isovalerate, ethyl phenylacetate, DMTS, acetic acid, diacetyl, ethyl butyrate, ethyl caproate, isobutyl acetate, isoamyl acetate, phenethyl acetate, butyric acid, isovaleric acid, isoamyl alcohol, phenethyl alcohol, guaiacol, 4-VG

（製造・貯蔵条件が品質に及ぼす影響）

貯蔵条件が熟成酒の品質に及ぼす影響を調べるため、貯蔵期間が 3 ～53 年間の常温熟成酒（21 点）と低温（15℃以下）熟成酒（20 点）の成分分析を行った。その結果、主要香気成分の酢酸イソアミルは経年減少する傾向にあり、低温熟成酒では閾値以上を保持するものの、常温熟成酒では 11 年間で降は閾値以下となった。熟成香に寄与が大きいとされているソトロロン、DMTS、イソバレルアルデヒドは熟成の経過に従い経年増加傾向が認められた。カルバミン酸エチル含量は、低温熟成酒と常温熟成酒とも貯蔵期間に伴い増加傾向を示したが、常温熟成酒では貯蔵期間 10 年以下の平均含量が 200 μ g/kg（カナダの規制値）を超えたのに対

し、低温熟成酒では貯蔵期間 31 年以上で平均値が 200 $\mu\text{g/kg}$ を超えた。また、温度を変えた清酒の貯蔵試験の結果、甘臭・焦臭への関与が推定されるメチオナールは貯蔵温度の上昇とともに増加し、官能評価の老香と高い相関を示した。

さらに、同一製造場でほぼ同様の製法で作られ、貯蔵期間の異なる清酒 65 点の香気成分(合計 37 成分)の変動を調べた。その結果、純米大吟醸酒(50%)の氷温(-2°C)・瓶熟成(0, 5, 10, 15 年)では香気成分の経年変化は僅かで、熟成香に寄与するソトロン含量は 15 年間の貯蔵で 2.2 $\mu\text{g/L}$ に増加したものの、閾値(2.3 $\mu\text{g/L}$)は超えなかった。大吟醸酒(40%)の 5~10 $^{\circ}\text{C}$ の低温・瓶熟成(0, 3, 5, 10, 15 年)では、香気成分の変化は緩やかであり、ソトロン含量については 3 年、5 年貯蔵では閾値以下であるが、10, 15 年貯蔵で閾値の約 2~3 倍となった。純米大吟醸酒や大吟醸酒の低温熟成では、増加する香気成分^{*2}は多いが閾値を超える成分は少なかった。

純米大吟醸酒(35%)の常温・甕熟成(0, 10 年)では、精米歩合が低くても 10 年目のソトロン含量は閾値の 6 倍となり、温度の他、熟成に使用する容器も影響を与えることが推定された。また、アミノ酸や有機酸が多い酒ほど熟成が進みやすい傾向があり、熟成香への寄与が考えられる香気成分の多くが 3 年熟成で閾値を超え、成分組成も大きく変化した。アミノ酸や有機酸が多い全麴純米酒の常温・瓶熟成(9, 15, 17, 20 年)では、ソトロン、フルフラール、メチオナール、DMTS, ジメチルジスルフィド(DMDS) 等多くの香気成分が 15~17 年目でピークを迎え、その後減少し、特に DMTS 含量は 17 年貯蔵の 15.5 $\mu\text{g/L}$ (閾値の 86 倍)から 20 年貯蔵では 0.1 $\mu\text{g/L}$ に減少した。この原因としては 20 年貯蔵で顕著に認められた沈殿との関連性が考えられた。

*2 熟成の経過に伴い増加する成分: DMTS, DMDS, methional, ethyl lactate, 3-methylbutanal, sotolon, furfural, ethyl leucate, butyric acid, 2-methylbutyraldehyde, ethyl 2-methylbutyrate, isobutyraldehyde, ethyl isovalerate, ethyl isobutyrate, diethyl succinate, phenylacetaldehyde, ethyl phenylacetate, benzaldehyde, vanillin

(日本産蒸留酒の特性の解明に係る研究)

第 4 期では、本格焼酎・泡盛の品質を特徴付ける成分を明らかにすることで、本格焼酎・泡盛フレーバーホイールを作成した。第 5 期はそれらの成分を中心に焼酎の原料や製造方法ごとの特徴の解明や海外産蒸留酒との比較を実施している。

3 回蒸留泡盛は、「クリーンさ」と「なめらかさ」を兼ね備えた新しい酒質の泡盛を得ることを目標に新たに開発された製造方法である。3 回蒸留泡盛の特性を解明するため、市販されている 3 回蒸留泡盛とそれ以外の泡盛(一般酒で古酒でないもの)に含まれる成分を比較した。その結果、前年度までに実施した小規模蒸留試験と同様に、3 回蒸留泡盛では、果実様の香りに寄与するエステル類の増加や辛みや苦味に関係するイソアミルアルコールの減少が確認され、再留工程における当該成分の増減が 3 回蒸留泡盛の特徴に寄与していることが示唆された。

また、麦焼酎の麴は、麦麴又は米麴が使用されるが、地理的表示「吉岐」の生産基準では米麴の使用が定められている。そこで、原料の異なる麴の麦焼酎の成分等への寄与について、小規模蒸留器を用いて常圧蒸留により製造された本格焼酎で検討したところ、麦麴を用いた場合に燻製様の香りに寄与する 4-ビニルグアイアコール(以下、4-VG という)や煙様の香りを呈するフルフラールの含有量が高くなり、麴原料の違いが麦焼酎の香気特性に影響を与

えることが示唆された。また、4-VG の含有量にはもろみ中のフェルラ酸含有量が、フルフラールの含有量には麴のエンドキシラナーゼの活性が関与していることが推察された。

5 評価結果

- ・ 必要性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 効率性
☐高い ☐やや高い ☒妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 有効性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 総合評価
☐特に重要な課題であり、積極的に実施すべき
☒重要な課題であり、着実に実施すべき
☐計画を一部見直し、効果的、効率的な実施が求められる
☐研究内容等の見直しが必要

6 総合所見

酒類産業発展の観点から輸出促進は極めて重要な課題である。その際に消費者の嗜好性の解析、清酒の熟成と劣化防止、日本産蒸留酒の特性解明は長期的な競争力確保の視点から不可欠な課題と考えられる。研究も着実に進行していると考えられる。

課題名：技術力の維持強化に資する研究

1 実施者

向井伸彦、山田 修、岩下和裕、赤尾 健、奥田将生、正木和夫、五島徹也、小山和哉、飯塚幸子、高橋 圭、織田 健、金井宗良、岸本 徹、小林拓嗣

2 中期計画記載内容

酒類製造の技術基盤の強化に資する研究として、酒類に関係する成分の解明、醸造用微生物及び原料の特性の解明並びに醸造用微生物の育種及び利用等の基盤的研究を実施する。

また、酒類及び酒類原料の地域特性に関する研究等、地域ブランド等の価値向上に資する研究を実施する。

3 研究目的及び概要

酒類製造の技術基盤の強化のために、原料特性の解明及びその利用に関する基盤的研究を行う。清酒及び焼酎用の原料について、タンパク質、デンプン、無機成分等の各種成分や心白構造等について、品種・産地、栽培及び醸造過程での挙動や変動要因を解析する。また、醸造適性分析や気象からの米質予測を行うとともに原料の新規評価法を開発し、年次変動する原料特性に合わせた醸造方法の確立や醸造原料の開発促進・栽培方法の確立に貢献する。

原料米の地域性は、各地域の気候風土と各地域特有の原料米品種の両者の組み合わせにより形成される。さらに、清酒の品質については醸造技術や醸造微生物の影響も大きいことから、原料米自身の地域特性、品種特性が十分に解明されていない。醸造法の影響を小さくして地域や品種が原料特性、精米特性、醸造特性（清酒成分）に与える影響について検討する。全国各地で栽培されている山田錦を指標に、市販清酒の分析および醸造法を一定とした清酒製造により、醸造特性、清酒成分に与える産地の影響について検討する。さらに、主要な酒米（使用量の多い酒米）について、品種の違いが清酒成分に与える影響について検討する。特にこれまでの研究では、白米の形状はあまり考慮されてなかった。そこで、玄米の構造、精米特性について重点的に検討すると共に、原料米品種と玄米構造、さらに玄米形状に基づいた白米形状の制御について体系化を試みる。

黒麹菌については、酒類製造の技術基盤の強化を図るため、有用黒麹菌育種に関する基盤的研究を行う。黒麹菌の有性生殖の可能性について引き続き検討するとともに耐酸性酵素の遺伝子発現およびクエン酸生産に重要な転写因子について基礎的基盤的解析を行い、有用黒麹菌育種に資する。

黄麹菌等については、今後の麹菌研究の基盤となすため、*Flavi* 節群のゲノムシーケンス解析データについて精査するとともに、系統樹および種属についても精査する。また、麹菌の高度利用のために、他の菌株との比較から、麹菌のゲノムに特異的な遺伝子群について解析を行う。麹菌株群のゲノム系統解析とその利用については、麹菌 (*Aspergillus oryzae*) や *A. flavus* など *Flavi* 節の糸状菌 200 株以上のゲノムシーケンス情報を利用し、*Flavi* 節の糸状菌のゲノム進化の機構、系統について基盤的な研究を行う。特に、麹菌と *A. flavus* 菌株群の違いについては、環境適応や二次代謝成合性遺伝子クラスター等に重点を置いて比較解析を行う。

麹菌の網羅的な表現型のプロファイリングによる遺伝子構成と醸造特性の関連性の解明を

行い、麹菌の特性の情報基盤を整理し、酒類業界へ情報を提供する。社会実装を踏まえたパブリックアクセプタンスのある表現型、機能性を選定し、ゲノム編集育種による麹菌の有用菌株を作成する。これまでに集積された120株以上の麹菌のゲノム情報を活用し、各醸造用途での麹菌群の醸造のコアゲノムを明らかとし、菌株間での用途と遺伝子差に基づく表現型への影響を解析することで麹菌の特性を探る。さらに市販の種麹を含めて多様な菌株を収集し、製麹における表現型の解析によりプロファイリングを実施し、醸造用途と麹菌の性質の関係性を明らかとする。また、その情報を活かして、社会実装を想定した上でゲノム編集技術により麹菌の機能性、価値を高める有用育種を実施し、醸造特性を評価する。さらにゲノム編集後のオフターゲットやゲノム編集ツールの残存性検証のような安全性に関わる評価、ゲノム編集の効率化を通じて技術基盤の拡充を図る。

清酒酵母をはじめとする醸造酵母の菌株の管理、育種、選抜等の体系化と効率化を目的とする。そのために、これまで遺伝情報を活用した菌株の醸造特性等の汎用的な評価系の構築に取り組む。また、そこから得られた結果を利用した解析を通じ、醸造用酵母の細胞生理等に関する基礎的応用的な知見の拡大を目指す。酵母菌株の基盤情報として、遺伝情報及び醸造特性（製造工程等における発酵、代謝、成分生成、ストレス応答の面での特徴）情報の収集・蓄積を進める。また、遺伝情報と醸造特性情報とを関連付ける手法を開発し、菌株評価や育種の効率化を図るとともに、主要な醸造特性指標の細胞機構を解析する。これまで蓄積した技術や知見により、地域等の酵母菌株の活用等を支援する。

清酒の特徴香成分と官能評価特性との関連性を解析し、当該成分の生成機構解明と制御方法について検討する。清酒の差別化が可能となる特徴香とその官能評価特性との関連を解析し、当該成分の分析方法を開発するとともに、生成機構の解明と制御方法の確立を目指す。

栽培地の気象・土壌条件が醸造用ブドウ及びワインの品質に与える影響について解析し、産地特性を解明するとともに品質の向上に資することを目的とする。第4期中期計画期間において継続的に実施してきたブドウ及びワイン品質成分に関するデータベースを継続・拡張するとともに、栽培地における気象・土壌との関連解析を深め、品質成分に関する予測手法の開発にも取り組む。

嗜好性の高い国産クラフトビールを製造技術に貢献するため、特徴のある香気を付与する方法、ビールの劣化臭成分の抑制方法を検討する。ビール醸造に用いる原料や仕込技術がビールの品質に与える影響を、分析技術を用いて明らかにし、特徴的な香りを付与する技術、劣化を抑制する技術を検討する。特に特徴的なホップの香りを付与する技術、ビールの酸化劣化を抑制する技術検討を行う。

4 主な研究成果及び知見

（醸造原料の特性解明及びその利用に関する研究）

気象データから地域ごとの令和3年産及び令和4年産清酒原料米の酒造適性を予測し情報提供した。

清酒原料米のタンパク質については、これまでに蓄積された酒米早期分析データを用い、原料米の粗タンパク質含量と気象条件との関係性を見出すための手掛かりとして、粗タンパク質含量の年別平均値と夏季の気温の関係を調査した。その結果、冷夏とされた一部の年の粗タンパク質含量が高く、猛暑とされた年の粗タンパク質含量がやや高かったことから、一定の明確な関連性は見出されなかったものの、原料米の粗タンパク質含量にはイネの登熟期

にあたる夏季の気象が影響していることが示唆された。

さらに、これまでに蓄積された酒米早期分析データ及び地域気象観測データを用い、出穂日に基づき算出した気温条件と白米の粗タンパク質含量との関係性を米品種ごとに解析した。その結果、多くの品種で最低気温と粗タンパク質含量が正に相関する傾向が認められたことから、出穂期の夜間の気温が粗タンパク質含量に影響する可能性が示唆された。また、原料米タンパク質組成の解析から、精米によりタンパク質組成が変化する傾向があることが分かり、清酒品質に影響する可能性が示唆された。

新規酒米評価法については、これまでに尿素やアルカリを用いた簡易溶解性判定法を開発したが、当該判定法にデンプン糊化作用を有する塩酸グアニジン、DMSOなども利用できることを明らかにした。さらに、膨潤温度の測定により溶解性を簡便に判定できることを明らかにし、従来からの簡易評価法（熱分析：DSC や RVA）と比較して、測定時間は従来法の 30 分に対し新法では 40～50 分と若干長めだが、精度は同等で試料の粉碎は新法では不要、1 回に測定できる検体数は従来法の 1 検体に対し新法では 8 検体の同時測定が可能となった。また、これまでに検討してきた尿素やアルカリを用いた簡易溶解性判定法と比較しても、水分や精米歩合の影響を受けにくく、低コスト・簡便・迅速な方法へ開発を進めることができた。

焼酎原料米については、デンプン生合成系遺伝子が酒造適性に及ぼす影響を明らかにするため、遺伝的背景の異なる品種 29 試料を用いてデンプン組成・分子構造と酒造適性との関係を調べた。その結果、インディカ品種は、ジャポニカ品種と異なりアミロペクチン側鎖の短いものと長いものの両方があり、アミロペクチン側鎖の短いものでジャポニカ品種と同様に最大吸水率及び蒸米消化性が高かった。清酒原料米ではイネ栽培時の登熟期気温が消化性に影響することが明らかになっているが、泡盛原料米の場合これまでの研究により品種混合が確認されているため、遺伝的背景の違いによるアミロペクチン構造変化が消化性に影響する可能性が示唆された。

また、デンプン生合成系遺伝子 SSIIa 遺伝子型とデンプン組成・分子構造及び酒造適性との関係を調べた。SSIIa 遺伝子の強活性型 (Alk) は、インディカ品種のみにみられアミロペクチン側鎖が長く蒸米消化性が極端に低かった。SSIIa 遺伝子の弱活性型 (alk) は、ジャポニカ品種とインディカ品種の両方にみられ、アミロペクチン側鎖が短く蒸米消化性が高かった。泡盛原料米や海外の清酒醸造でインディカ米を使う場合、原料米の遺伝的背景の違いが消化性に影響する可能性が明らかになった。

今後も引き続き、清酒原料米については、タンパク質と精米・品質・気象条件との関係の解析及び新規な原料米醸造適性評価方法の開発に取り組むとともに、焼酎原料米については、デンプン生合成系遺伝子型の醸造適性へ及ぼす影響を解析する。

（原料米の地域性と清酒の品質との関係に関する研究）

これまでに開発した、UPLC-Q/TOF-MS を用いた醸造酒メタボライト分析法により、現在 339 成分（425 成分中）の検出を可能としている。今回、新たに醸造酒メタボライト分析法（従来法）の高感度化を行った（高感度醸造酒メタボライト分析法^{*1}）。まず、69 成分により検証し、高感度化及びダイナミックレンジが拡大されていることを確認した。さらに従来法で検出を検討した成分から順次検討を行い、222 成分（247 成分中）の検出を確認した。また、清酒香気成分のハイスループットかつ網羅的解析方法を開発するため、GC×GC-TOFMS を用いて香気成分の抽出・試料導入法を検討した。その結果、ヘッドスペース法による分析方法（HS-GC

×GC-TOFMS)の最適化により、分析時間を約30分に短縮し(3分の1に短縮)、ハイスルー
ット化を達成した。

白米形状が清酒成分に与える影響については、これまでにプラントレベルの仕込みで50%
原形白米と35%球形白米の比較のみを行っていた。50%扁平白米と35%、50%球形白米を用
いた清酒の成分比較を行った。その結果、50%扁平白米を用いた清酒の成分は、35%球形白米
を用いた清酒成分と高い類似性を示した。

原料米産地と清酒成分との関係については、特定名称酒のモデルとするため50%白米を用
い、製造方法を統一した小仕込みにおいて、原料米(H30年産:4県5サンプル、R1年産:
7県8サンプル、R3年産:8県9サンプル山田錦)を用いて検討を行なった。その結果、高
精白を行った場合、原料米産地により米麴力価などの醸造特性や、製成酒の一般分析値、一
般香気成分に影響があることが明らかになった。なお、これらの玄米の形状を比較したとこ
ろ、緯度・経度が高くなるとともに、より球形となる傾向がある事も明らかとなった。

今後は、蓄積したさまざまな醸造上の特性に関するデータに加え、清酒メタボロームデー
タを取得し、気象との関係についての解析を進める予定である。

*1 高感度醸造酒メタボライト分析法は、醸造酒メタボライト分析法(従来法)に比べて高感度
化を行った方法で、従来法では感度以下だったものが検出できるようになると考えられる。69成分
の定量解析では、約50%の成分で感度が10倍上昇し、ダイナミックレンジも上昇している(検出
感度、定量性の上昇)。一方で、10%の成分では感度が減少している。なお、標準品による検出につ
いては地道な検証が必要で、従来法で5年間をかけて検証した425成分について順次検証を行って
いる。現在までに247成分の検証を行っている。

(黒麹菌に関する研究)

これまでに、黒麹菌の遺伝子破壊、外来遺伝子導入など遺伝子解析に利用可能な形質転換
用の新規マーカーとして、亜リン酸資化性に関わる亜リン酸デヒドロゲナーゼの利用が可能
となった。また、ヤタラーゼプラスを使用した質転換効率の改善を行ってきた。

黒麹菌の転写調節因子の解析については、糖質関連酵素の発現に重要な転写調節因子であ
る *amyR* 破壊株の米麴における糖質分解系酵素の発現低下とクエン酸の生産が低下の関係性
について解析し、クエン酸の生産量の低下は、直接的な転写調節ではなく炭素源の供給律速
が要因となっていることが示唆された。

また、転写調節因子 *xlnR* 遺伝子の破壊株の製麴試験では、米麴では、*xlnR* 遺伝子の破壊
によるキシラナーゼ活性の変化は見られなかったが、麦麴では、キシラナーゼ活性が大幅に
低下することが明らかとなった。そのキシラナーゼ活性の低下の原因をRNA発現の網羅的解
析により調べ、主要なキシラナーゼの発現低下が予想された。黒麹菌ゲノムには複数のキシ
ラナーゼ遺伝子がコードされており、それぞれの役割の違いについては、現在調べていると
ころである。

さらに、黒麹菌ゲノムにコードされるカルバミン酸エチル分解酵素を黄麹菌で発現させ、
その精製酵素の性質を調べた結果、既報告ではカルバミン酸エチル分解酵素は4量体とされ
ているが、当該酵素は2量体であることが明らかとなった。

黒麹菌の有性生殖については、*Aspergillus* 属のカビでは *MAT1-1* の性質を持つ株と *MAT1-2*
の株で有性生殖(交配)できるが、黒麹菌では現在まで有性生殖が報告されていない。分生
子等を除去した菌核様構造体から分離・培養した菌株をPCR法により解析した結果、極度に

効率は低いが *MAT1-1* 株と *MAT1-2* 株間で有性生殖による染色体交換が行われた可能性が示唆されていた。しかし、同実験を再現した結果、菌核様構造体の形成は確認できたものの、当該構造体から菌株を分離・培養できず再現性が確認されなかった。白麴菌はすでに 100 年近い継代培養による変異が蓄積していること、また、塚原らによる黒麴菌の系統解析では大きく 2 つの系統になり *MAT1-1* 株と白麴菌は各々属する系統の違いが障壁となったことなどが可能性として考えられる。

（麴菌のゲノム情報の収集）

これまでに黄麴菌 (*A. oryzae*) については RIB40 のゲノムシーケンスがなされ、公開されるとともに、様々な由来（分離源）の黄麴菌のゲノムシーケンスが行われつつある。そこで、当研究所で保有している多くの菌株ライブラリーに加え、収集可能な海外の黄麴菌を収集し 140 株についてゲノムシーケンスを行った。さらに、使用機器、リードの精度、アセンブル方法、遺伝子予測方法等が異なるデータベース上のシーケンス情報について、保存された任意の 20 遺伝子の配列をもとに黄麴菌としての確認を行い、次に確認された菌株のシーケンス配列の精度を検証した。十分な精度を有する 218 株のゲノムデータについて遺伝子予測方法を統一して再度の遺伝子予測を行った上で、パンゲノム解析^{*1}をおこなった。そのうち、保存性が高い遺伝子（コアゲノム）をベースに各種方法の系統解析を実施した。その結果、いずれからでも得られる系統樹は非常に類似し、過去の一部の菌株を使用した系統解析の結果と一致するとともに、新たな系統も見出された。また、これまでと同様に、各系統は麴菌の用途と関連する結果となった。これに先行して、これまでに DNA マイクロアレイの結果から知られていた、黄麴菌 13 系統の代表株のゲノムデータを用いた醸造関連遺伝子の解析から、系統ごとの特定の変異パターンを見出していた。そこで、アミラーゼなど 40 の醸造関連遺伝子について、全菌株のコピー数や配列の変異などを解析したところ、アミラーゼの転写因子である *amyR*² や固体培養での遺伝子発現に関与する *f/bC*³ 等でクレード特異的な多くの配列変異が明らかとなるとともに、菌株の特性との関係が示唆された。今後は、シーケンスの精度が確認された全菌株について、国内外の研究者への情報提供や様々な検索や解析が可能なデータベースの開発を行う。また、黒麴菌 (*A. luchuensis*) については、12 株の系統解析を実施したところ、黒麴菌、白麴菌のクレードに分かれた。引き続き、黒麴菌の標準株のゲノム情報基盤を構築するとともにデータ収集を図ることとする。

*1 同一生物種属について広く全ゲノム情報を収集し、種族内での進化系統解析や共通する遺伝子群（コア遺伝子）や系統特異的な遺伝子群の解析など、種族全体にわたる広範な比較ゲノム解析のこと。

*2 α -アミラーゼなどアミラーゼ類の遺伝子発現制御因子。

*3 固体培養特異的な *glaB* 遺伝子などの発現制御に係る制御因子。

（麴菌のゲノム編集育種）

ゲノム編集を利用した麴菌の育種法による醸造の主要酵素の生産性改変の基盤を構築するため、麴菌株の非相同末端結合遺伝子 (*ligD*) を破壊することで相同組換え系を構築し、さらに新たな遺伝子マーカー (*niaD*) の付与を行った。今後、構築した系を利用した遺伝子組み換えにより様々な部位を改変した株の酵素生産性を評価・確認後、ゲノム編集により同部位に変異を導入する予定である。また、これまでに開発したゲノム編集技術及び相同組換え

の技術を活用して、麴菌において誘導性プロモーターの制御下で有用物質（エルゴチオネイン）の生産系を構築し、生産量が約 34 倍に向上していることを確認した。加えて、ゲノム編集を利用した遺伝子発現を変化させる新たな麴菌の育種法を開発し、実用株で検証した。アミラーゼ及びグルコアミラーゼについてはゲノム編集による発現抑制領域の欠失やプロモーターの強化により、酵素力価の向上した株を得る一方、主要醸造酵素 4 種のうち 3 種（酸性カルボキシペプチダーゼを除くアミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ）の遺伝子をゲノム編集で破壊し、酵素生産性が変化した株を造成した。今後、これらの株を用いた製麴・小仕込み試験により醸造特性を解析する予定である。

また、オフフレーバー低減を目的として実用株の *mreA* 破壊の共ゲノム編集を実施し、製麴での当該酵素活性とイソバレルアルデヒドの低減、清酒小仕込み試験により製成酒中のイソバレルアルデヒド量の低減を確認した。また、同株の全ゲノムシーケンスによるオフターゲット^{*4}解析を実施しオフターゲット変異が生じていないことを確認した。

^{*4} 変異目的以外の部位へ予期せぬ変異が起こること。

（各種酵母菌株のゲノム情報の収集及び解析）

ゲノム情報については、公設試験研究機関の菌株、各種の実用酒造菌株、酒造環境分離株、自然界分離株、育種改良菌株等を対象に、R3 年度には 111 点、R4 年度には 49 点のゲノム配列を取得し、参照配列にマッピングし、変異箇所を同定後、必要に応じて系統解析、変異分布解析、異数性解析等を実施した。

分子系統解析については、令和 3 年度に 33 株の自然環境分離株（野生酵母）を含めて解析した結果（約 300 株）、ほぼ花由来の酵母から成る単系統群が観察され、花由来の酵母群が存在する可能性が考えられたが、その他の由来の野生酵母は点数も少なく傾向は見出されていなかった。そこで令和 4 年度は、日本各地で様々な自然環境から分離された酵母の遺伝的背景の全体像を把握するとともに、これらの酵母の分離は酒類製造等への利用も背景にあることから醸造特性についても調べることにした。令和 3 年度度までに、分離機関やカルチャーコレクションから自然環境分離株 81 菌株の分与を受けた（いずれもゲノム配列解読済み）。これらの菌株の分離源は花 47 株、植物（花以外）4 株、果実 12 株、樹木 6 株、落葉／土壌 9 株、水圏 1 株、昆虫 2 株であり、これら 81 菌株を系統解析に加えて行った（約 200 株、内自然環境分離株 81 株、内分離源が花のもの 47 株）。その結果、その他の自然環境由来の酵母にも当該単系統群に分類される菌株が多く見出され（花由来の酵母群 45 株に花以外に由来する酵母 34 株中 16 株）、従来の花由来の酵母群の中に花以外の亜系統群も認められなかったことから、これらが野生酵母の主な系統である可能性が示唆された。

これらの菌株について、同一条件下での清酒小仕込み試験（n=2）を行った。清酒小仕込み試験の結果、対照の清酒酵母きょうかい 7 号と比較して発酵力は低く、清酒の酸度は高いものの、アミノ酸度、エステル、高級アルコール類は低い傾向となった。このような結果は、製造場の蔵付き酵母の非協会系酵母の結果と類似しているが、ゲノム情報による系統解析では分離しており、遺伝的背景は異なると考えられた。なお、菌株提供者には発酵試験結果等を返送した。

（醸造に関する遺伝子及び特性を関連付ける遺伝子マッピング系の検討）

遺伝子マッピング系として、量的遺伝子形質座（Quantitative Trait Loci : QTL）解析及

びゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study: GWAS）を検討することとした。QTL 解析と GWAS には、それぞれ長所短所があり、それらを相互に補完させながらの運用を目指している。

QTL 解析系については、構築済みの清酒酵母と実験室酵母との交配株由来一倍体を用いた系の改良を行った。具体的には、QTL 解析系の検出力及び分解能向上を目的に、解析に用いる一倍体を 100 から 400 株に増やすとともに、一塩基多型（以下、SNP という）をマーカーとしてゲノム全域（約 12 Mbp）に均一かつ密に約 2800 箇所設定することで、既存の QTL 解析系を刷新した。また、改良前 QTL 解析系から原因遺伝子が分かっている S-アデノシルメチオニン（以下、SAM という）高蓄積能を指標に、当該 QTL 解析系の実証試験を行った。その結果、今回の改良の前後で QTL 領域の候補遺伝子数が 165 個から 19 個に減少し、QTL 解析系の遺伝子マッピング系としての分解能の向上と有用性を確認した。次に、当該 QTL 解析系を用いて、一倍体 400 株での清酒小仕込み試験の発酵プロファイルや製成酒の各種分析値を表現型として QTL 解析を行った。その結果、日毎炭酸ガス減量及び有機酸について、各表現型に寄与する有意な QTL を複数同定し、さらに各 QTL から複数の候補遺伝子を選抜することができた。今後は、遺伝子置換株等の解析により、炭酸ガス減量（日毎）及び有機酸生成に寄与する複数の遺伝子の同定が期待できる。

GWAS については、ゲノム情報を取得した菌株を対象に、これまでに蓄積した清酒醸造特性等の表現型情報を整理、あるいは新たに取得・整理した。得られた約 300 菌株のデータを、解析に適した形に変換（＝数値による 5 段階の階級化）し、解析態勢を整えた。今後、表現型項目の追加、選別、階級化の境界値の最適化、対象菌株の遺伝的多様性の範囲などの検討を行いながら、解析系の運用を進める。

（酵母のエタノール高発酵性の解析）

現在までに清酒酵母に特徴的な遺伝子及び変異がいくつか同定されているが、その遺伝子及び変異と醸造特性との関係性は未解明な部分が多い。そこで、清酒酵母に特徴的でエタノール高発酵性への寄与が知られている *ERC1* 遺伝子と *RIM15* 遺伝子とのエタノール発酵制御における関連性を検討するため、実験室酵母の各遺伝子をそれぞれ清酒酵母型に改変した株を用いて総米 400g の清酒小仕込み試験を行った。*RIM15* 破壊株（清酒酵母型 *RIM15* は C 末欠損）は清酒もろみの中盤から後半にかけて特に高いエタノール発酵性を示すことが知られているが、清酒酵母型 *ERC1* 保有株（正常に機能する *RIM15* を保有）は清酒もろみの前半で特に高い発酵性を示し、清酒酵母型 *ERC1* 保有株において更に *RIM15* を破壊した株は、*RIM15* 単独破壊株が示す発酵挙動とほぼ同様であった。以上の結果より、清酒酵母型 *ERC1* 遺伝子又は *RIM15* 遺伝子の機能欠失による発酵促進機構において、シグナル伝達系のより下流に存在すると考えられる *RIM15* 遺伝子欠損の影響が支配的であることが示唆された。

（清酒酵母の胞子発芽異常に関する解析）

清酒酵母は減数分裂による染色体組み換えに異常があり、胞子形成率と胞子発芽率が低く、清酒酵母の交配育種の障壁となっている。現在までに、減数分裂前の DNA 二重鎖切断に寄与する実験室酵母型の *SPO11*（以下、*XSPO11* という）の発現によって清酒酵母の胞子発芽率の改善が報告されているが、それでも発芽率は 10% と低く *SPO11* 以外の遺伝子の関与も示唆されている。そこで、清酒酵母の胞子発芽異常に関与する新規原因遺伝子を探索した。様々な

清酒酵母に *XSP011*（発芽率の高い実験室酵母の *SP011*）を発現させた際、菌株間で孢子発芽率に差がみられた。そこで菌株間の比較ゲノム解析を実施した結果、孢子発芽率への関与（発芽率が低い菌株での機能異常）が予想される複数の候補遺伝子を抽出し、孢子発芽率の低い菌株を中心に *XSP011* と候補遺伝子を共発現させて孢子発芽率を調べた結果、*XSP011* と相乗効果を示す遺伝子を同定した。さらに、本遺伝子に異常のある清酒酵母菌株 2 株に、*XSP011* と共に本遺伝子の正常型を導入した結果、*XSP011* 単独導入時と比較し孢子発芽率が各々 2.1 倍、2.7 倍向上した。本遺伝子はオートファジーに関係することから清酒酵母の孢子発芽異常とオートファジーとの関連性が示唆された。

（清酒の特徴香についての研究）

近年、業界ではマスカット様、ライチ様、柑橘様などと表現される新しい果実様の香りを有する、特徴ある製品の製造技術開発に対する要望が高まりつつある。これまでに、これらの新しい特徴香を生成できる醸造条件として、ワイン用酵母発酵助成剤を添加した一段仕込みと三段仕込み（留で添加）による小仕込み試験を行った結果、発酵助成剤の添加によるエステル含量の増加効果、官能評価におけるマスカット様・柑橘様などの香気特性の指摘が認められ、また、一段仕込みでその傾向が強くなるなど、ワイン用酵母発酵助成剤の有効性を確認している。

発酵助成剤の添加時期を水麴または添の時期に変えた三段仕込みによる小仕込み試験を行った結果、発酵経過やエステル含量などの香気成分に添加時期による差異は認められなかった。パイロットスケールで実施したワイン用酵母発酵助成剤を添加した清酒醸造試験の製成酒について、有機酸組成及びアミノ酸組成分析などのほか、貯蔵劣化試験や滓下げ試験など実用化に向けての検討も行った。その結果、製成酒の有機酸組成は、発酵助成剤の添加によりピルビン酸含量が大きく減少、リンゴ酸、コハク酸含量が増加し、製成酒のアミノ酸組成は、発酵助成剤の添加により Met、Arg、Ala などが減少、Pro、Lys、His、Gln、Glu、Asp などが増加した。また、貯蔵劣化試験の結果、発酵助成剤の添加により DMTS 濃度は高くなった。瓶火入れ後、約 6 か月間貯蔵した試料の滓下げ試験を行ったが、発酵助成剤の添加が滓下げ処理を妨げることはなく、ワイン用酵母発酵助成剤の添加は清酒に当該新規果実様特徴香を付与する醸造方法として実用可能であることを確認した。さらに、添加した発酵助成剤についても発酵に関与すると思われるミネラルやビタミンなどの成分分析を実施したところ、Mn、Zn、チアミン、パントテン酸及び葉酸などの含有量が高いことから、これらが発酵促進に影響したと考えられた。清酒の新規果実様特徴香は、消化されにくいプロテインボディ I の比率が多いタンパク質組成変異米の利用やワイン用酵母発酵助成剤の添加により付与されることから、原料米からのアミノ酸供給の抑制や酵母の発酵促進などによる酵母のアミノ酸不足が関与すると考えられた。

マスカット様の香気成分の簡易分析法の開発については、その寄与成分の一つであると考えられる 4MMP の誘導体化の後、Twister 法により濃縮し、分析機器として GC-MS/MS を用いて試みたが、精度や再現性に問題があり課題として残っている。今後は、4MMP の他に新規果実様特徴香に寄与する成分を探索し、官能評価特性との関連性を解析するとともに、分析方法について検討を行う予定である。

（原料産地と日本ワイン及びブドウの品質との関係解析に関する研究）

これまでにワイン用ブドウ産地によるワインの品質の違いを明らかにするため、「日本ワインのテロワール解明に係る研究コンソーシアム」を組織し、全国各地のソーヴィニヨン・ブラン、デラウエア、甲州、シャルドネ、メルロー、ピノ・ノアール、マスカット・ベリーAを品種ごとに醸造条件をそろえ、小仕込み試験を行った。各品種のワインの分析値及び官能評価値を用いた主成分解析を行った結果、多くの品種において北海道を含む冷涼な地域と西日本などの温暖な地域では、プロットがある程度偏在するなどの傾向があることが示された。次に、令和2年度、3年度に試験醸造された全国各地のソーヴィニヨン・ブラン及びデラウエアを原料としたワインの香気成分を分析し、官能評価及び一般成分等とともに解析を行った。ソーヴィニヨン・ブランのワインでは、2ヶ年では地域や年次の影響がみられたが、冷涼な地域では官能評価におけるチオール香、柑橘香、フレッシュな果実香などの評価値が高く、温暖な地域では、熟した果実香などが高い傾向がみられた。冷涼地のワインでは、数種類のテルペン化合物、エステル等が高い濃度を示す一方、温暖な地域のワインでは、数種類のラクトン、バニリン等が高い濃度を示すことが明らかとなった。官能評価と香気成分との関連解析を行った結果、「フレッシュな果実香、甘い果実香」の評価は、エステル類、ラクトン類及び揮発性フェノール類と正の相関を示すなど、各官能評価項目と成分との関連が示唆された。これらの結果から、地域の気象条件はワインの香気成分等へ影響し、ワインの官能的な特徴の違いに寄与していることが示唆された。

また、デラウエアでは、2ヶ年にわたる成分及び官能評価の結果を解析し、地域間差に関連する成分を抽出したところ、冷涼地でフレッシュな果実香が高く、ソーヴィニヨン・ブランと共通するエステル、テルペン等の香気成分が高蓄積することが見いだされた。

今後、令和4年度のサンプルについても分析を行い、3ヶ年のデータを取りまとめるとともに、気象データとの関連解析を行い、各種成分への影響について検討を行う。

（国産クラフトビールの特性解明に係る研究）

ビールの酸化劣化臭として代表的な「カラメル・飴様」の香りへの寄与が報告されている14成分の定量方法を検討した^{*1}。既知の報告で使われているGC-MSによる方法では夾雑ノイズの影響で定量性が低くなる成分（6成分）もあったため、GC-MS/MSを用いて内部標準及びカラムを検討した。その結果、極性と沸点が異なる14成分を、広い濃度範囲（ppt～ppb）で精度良く（14成分の検量線の直線性はいずれも $R^2=0.99$ 以上）で分析する方法を確立した。特に日光臭の要因物質としても知られる3-methyl-2-butene-1-thiol (MBT)の正確な定量は特殊な大型の分析装置を必要としたが、Purge&Trap法にて捕集方法と内部標準の検討により、GC-MS/MSでも精度と定量性が高い分析方法を実現した。

当該14成分の生成は、ビールのアミノ酸、糖、脂質、苦味物質に起因すると考えられ、ビールの仕込み工程では、主として麦芽のタンパク質分解工程の条件が重要と予想される。今後、アミノ酸の生成量に影響するタンパク質分解工程の温度が異なるピルスナータイプビールを作成し、保管劣化後の特性差異を評価する予定である。

また、仕込み工程が酸化劣化臭に与える影響を調べた。ビール製造の仕込工程は、一般的にタンパク質分解工程、糖化工程、麦汁ろ過工程、煮沸工程で構成される。仕込工程の開始（導入）をマッシュインというが、マッシュイン温度は、最初に活性化させるべき酵素の最適温度に設定される。マッシュイン温度は、通常はアミノ酸供給を目的としてプロテアーゼの最適温度（35～45℃）に設定されるが、実際は醸造所の経験に基づいて設定温度は比較的広い温度帯となっている（多くの場合は約35℃から約65℃の温度帯）。マッシュインの温度

で作用する酵素も異なり麦汁成分やビール香味に影響すると考えられることから、当該温度を 35℃、50℃、65℃に設定してビール製造し、その風味特性と安定性を調べた。

マッシュイン温度を 35℃又は 50℃（プロテアーゼが作用しうる温度）とした場合、麦汁のエキス収量は高くなり、ビールはエステルとアミノ酸の濃度が高く、官能ではフルボディー、エステルの特徴を有する傾向が認められた。マッシュイン温度を 65℃（プロテアーゼが作用しにくい温度）とした場合、エキス収量は低くなり、ビールのアミノ酸は少なく、官能では軽い味わいでトーストのような香りを特徴として有する傾向が認められた。マッシュイン温度を 65℃とした場合でも発酵には支障は認められなかったことから、アミノ態窒素は酵母への栄養供給は律速とならず、特にアミノ態窒素の供給が多い麦芽 100%ビールの仕込みでは、マッシュイン温度を 65℃としても問題はないと考えられた。

次に、30℃で 1 ヶ月間保存したビールの劣化臭成分 14 成分を測定した^{*1}。いずれのマッシュイン温度のビールでもストレッカーアルデヒドの生成量は多くなるが温度による差は認められなかった。マッシュイン温度を 65℃としたビールでは、それらの成分も含めて複合的に寄与する蜂蜜とシェリー様の香りを有する傾向があった。マッシュイン温度 35℃又は 50℃としたビールはカードボード臭の香りを有する傾向となり、カードボード臭の原因成分の (E)-2-nonenal の生成量とマッシュイン温度とに負の相関が認められた。また、アルデヒド濃度はアミノ酸濃度に影響されると報告されているが、マッシュイン温度と発酵後のアルデヒド生成量に相関は認められなかった。これは麦汁中のアミノ酸濃度が高い場合も発酵中に消費され、発酵後にはアルデヒドの生成に影響するほどのアミノ酸が残存しなかったためと思われる。以上の解析により、マッシュイン温度を 65℃まで上げることで、発酵に支障をきたすことなく、カードボード臭の原因成分の (E)-2-nonenal の生成量を抑えることができることが分かった。

ビール及びワインに特徴的な香りを付与する 3-mercaptohexan-1-ol（以下、3MH という）や 4MMP などのチオール化合物は、ppt レベルの低い官能閾値を有している。チオール化合物は発酵後に大幅に増加するため、発酵中に前駆体から生成すると考えられており、特にワインでは、原料のブドウ果汁中にアミノ酸とチオール化合物との抱合体が 1998 年に報告されたことから、酵母の β リアーゼの作用による前駆体（アミノ酸とチオール化合物との抱合体）からのチオール遊離という生成機構が受け入れられて来た。一方、ビール及びワインにおいて当該前駆体の寄与度(%)は、発酵中の全増加量の 3～7%であることも報告され、他の前駆体の存在も予想されている。そこで、新規な前駆体を解明するため、ホップ中のジスルフィド結合型チオールの存在を探索した。試料に無ホップ麦汁とホップ懸濁水溶液を用いて、ジスルフィド (S-S) 結合に特異的な還元剤である Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) を処理し、3MH を測定した。その結果、ホップ懸濁水溶液の TCEP 処理により、3MH 濃度は 8.9～9.9 倍増加することから、ホップに S-S 結合型 3MH が存在すると考えられた。また、無ホップ麦汁とグルコースを加えたホップ懸濁水溶液の発酵比較試験から、ホップ懸濁水溶液の発酵中に増加した 3MH のうち約 71%～68%が S-S 結合型 3MH であり、これまで報告されていた前駆体の寄与度(3～7%)に比べて大きくなった。以上の結果から、ビールの 3MH の主要な前駆体はジスルフィド結合型チオールであることを明らかとした。

*1 14 成分とは、dimethyl trisulfide, 3-methyl-2-butene-1-thiol (MBT), γ -nonalactone, (E)- β -damascenone, sotolon, ethyl 2-methylbutyrate, ethyl 2-methylpropionate, methional, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, furfural, benzaldehyde, 2-phenylacetaldehyde,

(E)-2-nonenal のこと。

5 評価結果

- ・ 必要性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 効率性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 有効性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 総合評価
☐特に重要な課題であり、積極的に実施すべき
☒重要な課題であり、着実に実施すべき
☐計画を一部見直し、効果的、効率的な実施が求められる
☐研究内容等の見直しが必要

6 総合所見

酒類に関する高度な知見を有している酒類総合研究所が技術支援を行うことは、酒文化を守るとの観点からも極めて重要なことである。本課題では、醸造原料（原料米、ブドウ）、醸造微生物（酵母、麹菌）、酒類の特徴香成分の分析や官能評価など、酒類製造技術を網羅する広範囲な分野を研究対象としている。現在までに数々の有益な成果が見出されており、その中には酒類業界に大いに役立っているものも認められる。今後も引き続き酒類総合研究所が実施すべき重要な課題であり、着実に実施するべきと認める。

課題名：酒類の品質及び安全性の確保に関する研究

1 実施者

赤尾 健、高橋正之、清水秀明、金井宗良

2 中期計画記載内容

酒類の品質及び安全性を確保するため、製造工程中の微生物叢等の実態把握及び研究を実施する。

なお、新たに酒類の品質又は安全性に関わる重大な問題が明らかになった場合は、優先して取り組み、消費者等へ情報を発信する。

3 研究目的及び概要

酒類の品質確保のため、乳酸菌や野生酵母などの醸造環境に由来する微生物の特性や分布、品質への影響を解析し、酒類の品質安定化及び品質劣化抑制のための技術開発を行う。乳酸菌や野生酵母などの微生物について醸造環境における実態を詳細に調査する。特に、生酛系酒母、酵母無添加酒母など、品質に対する醸造環境由来の微生物の寄与が大きく、その群集構造が未知あるいは複雑な製造法について、群集構造やその挙動を明らかにする。また、主要な醸造環境微生物が品質や安定的製造に与える影響を評価するとともに、遺伝的特徴や生理的特徴、醸造特性等を詳細に解析する。それらの成果を利用し、酒類製造時に微生物を安定的に活用・制御できる技術の開発に取り組む。

日本ワインの品質向上及び技術基盤の強化を図るため、亜硫酸及び市販酵母を使用しない場合のワイン発酵中の微生物菌叢と品質の関係の検証し、当該製造法のリスク要因を整理するとともに、安定的にワイン製造を行う要件について検討を行う。亜硫酸や市販ワイン酵母を使用しないワイン造りが、どのような菌叢推移で発酵が進み、最終的どのような品質になるか確認するため、次世代シーケンスを用いた菌叢解析を行うとともに、官能評価などで品質を確認する。また、当該製造法のリスク要因を整理し、安定的にワイン製造を行う要件についても検討を行う。

4 主な研究成果及び知見

（生酛乳酸菌関係）

全国各地の清酒製造場の生酛系酒母から乳酸菌を培養法により単離した。16S rDNA の全長配列に基づく系統解析により菌種を同定した結果、*Latilactobacillus sakei* や *Leuconostoc mesenteroides* を含む 6 種 18 株の酒母由来乳酸菌株が取得できた^{*1}。清酒製造場毎に生育する乳酸菌や菌叢変遷には多様性があることが示され、この結果は次世代シーケンサーを用いた網羅的菌叢解析による結果とも一致していた。得られた単離乳酸菌株については、形態観察、糖発酵性試験で一般的な特徴を把握するとともに、亜硝酸耐性試験を行い、一般的な生酛系酒母環境中で生育可能であることを確認した。また、単離乳酸菌株に基準株 2 株を加えた 20 株について、ジャーファーメンターを用いて pH 一定での低温条件（4℃、6℃、9℃）の生育速度を解析したところ、概して *Leuconostoc* 属全 12 株が低温で生育が良好なものの、*Latilactobacillus* 属 7 株のうち 4 株は 9℃で辛うじて生育し、*Enterococcus* 属 1 株は生育しなかった。生酛系酒母の初期の品温は低温に保持して環境由来の乳酸菌の自然増殖を待つ

ことから、初期の品温推移が初期の菌叢に影響を与えている可能性が示唆された。今後も、引き続き単離した乳酸菌の生育速度解析を進めるとともに、生産される成分等についても検討を進める予定である。

なお、本研究で全ゲノム配列を基にバクテリアを正確に同定するため入力配列間で増幅産物のサイズか内部配列の違いが最大化するような増幅産物が得られるプライマーセットを設計するアルゴリズムを開発した^{*2}。開発したツールは SHRS と命名してインターネット上の The Python Package Index に登録した。これにより MIT ライセンスの下で自由に使用することができる。

*1 6種は次のとおり、*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc mesenteroides* のこと。

*2 亜種かそれ以下の分類群でのバクテリアの同定のためには、MLST 法や AFLP 法のようなコストや時間のかかる分析を行う必要があるが、当該アルゴリズムにより設計したプライマーセットにより *Lactobacillus delbrueckii* 6 亜種を解析した結果、6 亜種は明確に分類され、その解像度は MLST 法と同程度であった。

（酒造環境酵母関係）

全国で酵母無添加仕込を採用する清酒製造場が増加傾向にあることから、そのような条件で生育する酵母の実態解明を目的として、令和4年度までに24製造場の酵母無添加酒母または醪から酵母菌株を分離した。簡易判別試験の結果、15場では協会系酵母が優勢であり、従来から使用されている純粋培養された協会系酵母の蔵付酵母化が示唆された。一方、残りの9場では非協会系酵母が優勢であり、これらが蔵付酵母化していると考えられた。

非協会系酵母が優勢な製造場の分離株から、各場ごとに数菌株を無作為に選び、清酒小仕込み試験を行ったところ、対照菌株（きょうかい7号）と比較して、概して発酵力は十分なもののやや低く、製成酒の酸度が高く、アミノ酸度が低く、エステル含量が低い等の醸造特性の傾向が認められ、各菌株の傾向を把握した上での発酵管理や品質設計等が重要と考えられた。

また、清酒の生酏系酒母製造の最終段階である温み取り（加熱処理）工程について調べた。正常に育成された生酏系酒母では当該工程は不要とされ、ほとんど行われなくなっていた。しかし、最近の酵母無添加仕込において、実施する製造場が多数見られたことから、改めて、温み取り工程が酒母中の酵母に及ぼす影響を評価することとし、短期間で再現性の良い生酏系酒母の環境の実験系を構築した。酵母が十分に増殖し、アルコール10%弱及びボーメ10強を目安に品温20℃からスタートして温み取り（30℃、32℃、35℃で16時間保持）工程を行った結果、協会系清酒酵母（きょうかい6号、7号、9号、10号）では、当該工程を行わない場合に比べて酵母生存率は温度が高いほど低下したことから（今年度の死滅率平均値の結果は30℃:34%、32℃:20%、35℃:12%）、温み取り工程による協会酵母の生菌数低下も、ほとんど行われなくなった一因と考えられた。今後は、非協会系清酒酵母についても温み取り工程の影響を評価する予定である。

小課題番号12：亜硫酸及び市販酵母不使用のワインの品質確保に関する研究

研究所の圃場のブドウを用いて亜硫酸及び市販ワイン酵母無添加による小規模試験（以下「無添加ラボ仕込み」という）を行ったところ、12点の内、11点でアルコール発酵が起こっ

た。*Saccharomyces cerevisiae*が優勢になったのは7点、non-*Saccharomyces*が優勢になったものが4点、また、乳酸菌が増殖し、発酵が停止した醪が1点あった。当該ワインのうち、発酵が停止した1点、品質に難があった2点を除いた9点（*S. cerevisiae*が優勢になったもの7点 non-*Saccharomyces*が優勢になったもの2点）を、官能評価で比較したところ、「複雑さ」のスコアは無添加ラボ仕込みワインが高かったが、「品種特性」「クリーン」のスコアは亜硫酸及び市販ワイン酵母を添加したワインの方が高かった。今回の試験では、プレス機や除梗破碎機など通常のワイン製造で用いる醸造機器は使用せず、果汁・果醪調整に用いた器具は殺菌した器具を用いたことから、醸造場に住み着いた微生物の影響はなく、ブドウ由来の微生物が発酵を担ったと考えられるが、当該方法でワインを製造すると、発酵が途中で停止するリスク、*S. cerevisiae*が優勢になったとしても市販ワイン酵母を添加した場合に比べて品種特性が引き出せないリスクなどが認められた。

また、同一ブドウを用いて、ワイナリーでの醸造と当所での小規模試験醸造の菌叢を比較した。その結果、ワイナリーの醸造では、調査したブドウ4品種全てで *S. cerevisiae*が50%以上となった。一方、当所の小規模試験醸造では、*S. cerevisiae*が50%以下のものが多く見られた（26点の内16点）。ワイナリーでは発酵前（仕込時点）で *S. cerevisiae*の割合が多かったことから、ワイナリーに棲みついている *S. cerevisiae*が果汁・果醪調整段階で入り込み、発酵中に優勢になった可能性が考えられた。しかし、研究所の小規模試験醸造においてアルコール発酵を担った *S. cerevisiae*はブドウ由来と考えられる結果もあったことを考えあわせると、アルコール発酵を担う *S. cerevisiae*の起源は、ブドウ畑の場合とワイナリーの施設等の場合の両方に由来する可能性があるものの、ワイナリーの施設等の影響は小さくないと考えられる。今後はワイナリーの器具等の拭き取り調査を行い、発酵中に優勢となった酵母の由来及びワイナリーでの挙動を解析する。

5 評価結果

- ・ 必要性
■高い □やや高い □妥当な範囲 □やや低い □低い
- ・ 効率性
□高い □やや高い ■妥当な範囲 □やや低い □低い
- ・ 有効性
□高い □やや高い ■妥当な範囲 □やや低い □低い
- ・ 総合評価
□特に重要な課題であり、積極的に実施すべき
■重要な課題であり、着実に実施すべき
□計画を一部見直し、効果的、効率的な実施が求められる
□研究内容等の見直しが必要

6 総合所見

酒類の品質及び安定性の確保、亜硫酸及び酵母不使用のワインの品質確保についてはいずれも重要な課題と認識される。着実な取り組みは評価される。

課題名：酒類の適正課税及び適正表示の確保に資する研究

1 実施者

奥田将生、赤松史一、長船行雄、向井伸彦、山田 修

2 中期計画記載内容

法令等で定められている酒類の表示の適正性の確保に資するため、酒類及び酒類原料の判別手法等の開発・高度化及び分析・鑑定の理論的裏付けとなる研究・調査等を実施する。

3 研究概要及び目的

酒類及び酒類原料の無機成分及び安定同位体比等の化学分析を行い、原料、製造工程、産地による酒類成分への影響を解明し、酒類の適正表示に貢献する。酒類原料について、原料植物の生育環境、発酵等の製造工程、原料原産地の地理的要因が安定同位体比及び無機成分へ及ぼす影響を明らかにする。これら原料の特徴が製品に反映されるかを解析し、酒類の品目判別や原材料判別の高度化、日本産酒類等の地理的表示など、適正表示を担保するための分析鑑定技術に資する基盤的知見を得る。

4 主な研究成果及び知見

（産地等の分析・鑑定の理論的裏付けとなる研究）

日本列島は、糸魚川静岡構造線を境に東北日本と西南日本で地質が異なっており、清酒の仕込水は地質に影響を受けると考えられる。そこで、東北日本と西南日本で生産された市販清酒 553 試料について 21 無機元素濃度を比較した。仕込水に由来する元素に着目すると、東北日本と西南日本では、ケイ素、バナジウム、マグネシウムは東北日本が、ストロンチウム、バリウム、リチウムは西南日本で高い傾向がみられた。地域単位では、バナジウムは富士山周辺と九州地方で、リチウムは中国・九州地方でやや高い傾向があり、ケイ素は四国で低く九州でやや高い傾向がみられた。

市販清酒の元素濃度を日本地図上にマッピングし全国地球化学図の元素濃度地図と比較した。バナジウムは富士山周辺地域で濃度が高く、全国地球化学図の濃度分布と類似する傾向がみられた。リチウムは、バナジウムほど明確ではないが、全国地球化学図の濃度分布に類似し西日本で高い傾向がみられた。すなわち、清酒中のリチウムやバナジウム濃度は、産地の地質の影響を受けている可能性が示唆された。

今後も国内産地の特徴を明らかにするため、引き続き全国的規模で清酒無機成分を解析するとともに、ストロンチウム同位体比についても検討する予定である。

（酒類原料の判別手法等の開発・高度化に関する研究）

これまでに、ワインのエタノールの炭素安定同位体比から原料ブドウの糖類の炭素安定同位体比を推定する方法を開発した。当該推定法は、ワインのエタノールの基質となった糖類の炭素安定同位体比をワインから直接推定可能とするものであり、今後の日本ワインの補糖量推定の基盤となる知見が得られている。ブドウ果汁に含まれる糖類の炭素安定同位体比の変動について、同一園場から3年間収穫された白ワイン用ブドウ5品種を用いて収穫年と品種の影響を評価した。その結果、白ワイン用ブドウ品種の果汁に含まれる糖類の炭素安定同

位体比は、降雨量の少ない年ほど高い値を示し、品種間に有意差が認められた。以上のことから、ブドウ果汁の糖類の炭素安定同位体比を反映する国産白ワインのエタノールの炭素安定同位体比は、原料ブドウの品種及び収穫年の影響を受けて変動することが示唆された。

また、ブドウ果汁に含まれる糖類の炭素安定同位体比の変動について、同一圃場から3年間収穫された赤ワイン用ブドウ5品種を用いて収穫年と品種の影響を評価した。その結果、赤ワイン用ブドウ品種の果汁に含まれる糖類の炭素安定同位体比は、白ワイン用ブドウと同様に品種と収穫年によって異なっていた。

各品種の異なる収穫年のブドウ果汁に含まれる糖類の炭素安定同位体比の範囲の把握により、製成ワインのエタノールの炭素安定同位体比の範囲が推定可能となり、日本ワインの補糖量推定の基盤となるデータを取得できた。

加えて、瓶内二次発酵と二酸化炭素注入で製造された発泡性清酒の二酸化炭素の炭素安定同位体比分析を行い、比較を行った。その結果、瓶内二次発酵で製造された発泡性清酒の二酸化炭素の炭素安定同位体比は、二酸化炭素注入で製造された発泡性清酒よりも高い値を示した。発泡性清酒の主要な製造方法である瓶内二次発酵と二酸化炭素注入は、製品に含まれる二酸化炭素の炭素安定同位体比の違いによって判別できる可能性が示唆された。

今後は、純米酒の炭素安定同位体比の基盤データとなる原料米の糖分解にともなうグルコースの炭素安定同位体比の変動を明らかにする予定である。

5 評価結果

- ・ 必要性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 効率性
☐高い ☐やや高い ☒妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 有効性
☐高い ☒やや高い ☐妥当な範囲 ☐やや低い ☐低い
- ・ 総合評価
☐特に重要な課題であり、積極的に実施すべき
☒重要な課題であり、着実に実施すべき
☐計画を一部見直し、効果的、効率的な実施が求められる
☐研究内容等の見直しが必要

6 総合所見

本課題における無機成分、安定同位体成分の解析による原料の産地特定が、正確に行えるようになれば酒類の適正表示に貢献できると考えられ、現在まで比較的順調に成果が得られつつあると考えられる。