

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4931914号
(P4931914)

(45) 発行日 平成24年5月16日 (2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日 (2012.2.24)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 2 3 C 9/127 (2006.01)	A 2 3 C 9/127

請求項の数 10 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2008-514091 (P2008-514091)	(73) 特許権者	507394503
(86) (22) 出願日	平成18年5月30日 (2006.5.30)		カンパーニ ジェルヴェ ダノン
(65) 公表番号	特表2008-545422 (P2008-545422A)		COMPAGNIE GERVAIS D
(43) 公表日	平成20年12月18日 (2008.12.18)		ANONE
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/062715		フランス、エフ-75009 パリ、ビー
(87) 国際公開番号	W02006/128864		ディー オスマン、17
(87) 国際公開日	平成18年12月7日 (2006.12.7)		17, Bd Haussmann, F-7
審査請求日	平成21年4月30日 (2009.4.30)		5009 Paris, FRANCE
(31) 優先権主張番号	0505497	(74) 代理人	100065248
(32) 優先日	平成17年5月31日 (2005.5.31)		弁理士 野河 信太郎
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	ドリュエヌ、アン
微生物の受託番号	CNCM CNCM 1-3213		フランス、エフ-91440 プレスーシ
			ユル-イヴェット、アレ ド ラ ロズレ
			、12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非リン酸化性ラクトースパーミアーゼを有する乳酸菌の変異株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクトースパーミアーゼのIIAドメイン中の位置552のヒスチジンをコードするコドンの変異が親の株のゲノムDNAに導入され、該変異が非リン酸化性アミノ酸への該ヒスチジンの置換を誘発することを特徴とする、由来する親の株よりも低い後酸性化を有する変異ストレプトコッカス・サーモフィラス株を得る方法。

【請求項 2】

変異がヒスチジンコドン552の代わりにアラニンコドンを導入することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

請求項1又は2に記載の方法により得ることができるストレプトコッカス・サーモフィラス株。

【請求項 4】

β -ガラクトシダーゼ活性を有することを特徴とする請求項3に記載のストレプトコッカス・サーモフィラス株。

【請求項 5】

CNCMに番号I-3213の下で2004年5月10日に寄託されたストレプトコッカス・サーモフィラスの変異株であることを特徴とする請求項4に記載のストレプトコッカス・サーモフィラス株。

【請求項 6】

10

20

請求項3～5のいずれか1項に記載の少なくとも1種の細菌株を含む乳酸発酵素。

【請求項7】

請求項3～5のいずれか1項に記載のストレプトコッカス・サーモフィラスの少なくとも1種の変異株を、エル・ブルガリカスの少なくとも1種の株と組み合わせて含むことを特徴とする請求項6に記載の乳酸発酵素。

【請求項8】

請求項6又は7に記載の乳酸発酵素を用いて乳を発酵させる工程を含む、発酵乳製品を製造する方法。

【請求項9】

請求項8に記載の方法により得ることができる発酵乳製品。

10

【請求項10】

ヨーグルト、発酵乳、発酵飲料、ケフィア、チーズ及び発酵幼児用乳から選択されることを特徴とする請求項9に記載の発酵乳製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳発酵の分野に関する。より具体的には、本発明は、ラクトース輸送活性が改変された変異ラクトースパーミアーゼを発現するストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) の新規な変異体に関する。これらの株及びこれらを含む発酵素 (ferments) を用いて、良好な保存特性を有する発酵乳製品を得ることができる。

20

【背景技術】

【0002】

ヨーグルトは、通常、ストレプトコッカス・サーモフィラス株及びラクトバシラス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) 株から選択される種々の乳酸菌の組み合わせを用いて乳を発酵させることにより得られる。約40～45℃の温度で行われる発酵の間に、これらの細菌は、主に、エネルギー基質としてラクトースを用い、乳の凝固を導く乳酸を産生する。pHが約4.8～4.5の値に達すると、この発酵工程(「酸性化」としても知られる)は、生成物を冷却することにより停止される。次いで、生成物は、残りの加工及び包装プロセスの間、その消費まで冷却される。

しかし、冷却は、乳酸発酵を完全に停止はしない。生成物を4℃に保っていても、その酸性度が時間の経過とともに徐々に増加することが観察される。

30

【0003】

後酸性化(post-acidification)として知られるこの現象は、生成物の貯蔵の間のその感覚刺激性の性質の低下の原因である。

後酸性化は、制御された酸性化工程の最後に生成物中に残存するラクトースの細菌による使用に本質的に起因する。これを避けるために、ラクトースを発酵しないか又はほとんど発酵しない乳酸菌株の使用が提案されている。

【0004】

ストレプトコッカス・サーモフィラス及びラクトバシラス・ブルガリカスにおけるラクトース発酵に必須の酵素は、ラクトースパーミアーゼをコードするlacS遺伝子とβ-ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子とを含むラクトースオペロンによりコードされる。これらのタンパク質は、それぞれ、ラクトースの輸送及び加水分解を担う。乳酸菌の後酸性化をしない株を得るために、よって、これらの酵素の少なくとも1つの活性に影響を及ぼした人工的な変異体を作り出すか又は天然変異体を選択することが提案されている。

40

【0005】

特許EP 1078074号(ジェルヴェダノン社)は、ラクトースオペロンの遺伝子の少なくとも1つにナンセンス変異を含むβ-ガラクトシダーゼ活性を欠損したエル・ブルガリカス変異体に関する。この特許は、より具体的には、配列の分析が2つの点突然変異を明らかにする変異体について記載している：一方はβ-ガラクトシダーゼ遺伝子に停止コドンを導入して、この変異体のラクトースを用いる能力の無力化を誘発し；他方の変異はパーミアー

50

ゼ遺伝子にアミノ酸の変更を誘発する(位置122においてLys→Asn)。EP 1078074号は、変異体の表現型に対するこの変異の影響について全く報告していない。

【0006】

WO 01/88150は、ラクトバシラス株の変異体について記載している。これらの変異体はラクトースを用いることができないが、 β -ガラクトシダーゼを発現する能力は保持している。WO 01/88150は、問題の変異の性質又は位置について特定していないが、これがラクトースオペロンの構成性遺伝子の1つ、例えば糖化酵素、又はラクトースオペロンの調節領域、又はラクトースオペロンの発現の制御に関与する遺伝子内に位置しているであろうことを単に記載しているのみである。

【0007】

上記の文献に記載される変異体は、共通して、ラクトースを全く用いることができないという特性を有する。これらは、ラクトース以外の糖、一般的にグルコースが乳に補充されている場合のみ、その上で増殖できる。これらの変異体の酸性化及び後酸性化の特性は、添加されるグルコースの量により制御される。

【0008】

これらの変異体の代替物を提供するために、本発明者らは、第一に、野生株のものに匹敵する増殖の間にラクトースを用いる能力があり、第二に、後酸性化現象を低減するか又はなくすように定常期の間にラクトースを用いる能力が制限された乳酸菌株を得ることができるかについて検討した。この目的をもって、本発明者らは、乳酸菌細胞、特にエス・サーモフィラス細胞の中にラクトースを運び込む調節機構に対して働きかける可能性に興味を持った。

【0009】

細胞外のラクトースのエス・サーモフィラス細胞内への輸送は、ラクトースパーミアーゼLacSにより行われる。このラクトース輸送は、プロトンを用いる共輸送又はラクトース分解により得られる細胞内ガラクトースを用いる対向輸送により行われる。

ラクトース輸送は、2つの現象に依存する：第一に、ラクトースパーミアーゼのリン酸化状態であり、第二に、このラクトースパーミアーゼをコードするlacS遺伝子の発現である。これらの2つの側面について、以下に詳細に記載する。

【0010】

ラクトースパーミアーゼのリン酸化

LacSタンパク質は、転座ドメインと調節ドメイン(IIA)とで構成される。これらのドメインは、種々のヒスチジン残基を含有し、そのリン酸化がラクトース輸送の調節に関与する。特に、IIAドメインは、ヒスチジン552上でリン酸化され得る。このリン酸化は、それ自体が予めリン酸化されているHPrタンパク質(ヒスチジン含有ホスホキャリアタンパク質)により行われる。

【0011】

HPrは：

- ATP依存性タンパク質キナーゼによりセリン上でリン酸化され得る；HPr(Ser-P)の加水分解の逆反応は、ホスファターゼ活性(HPr(Ser-P)ホスファターゼ)により触媒される；

- ヒスチジンHPr(His~P)上で、ホスホエノールピルベートから生じるホスホリル基を用いて、酵素I (EI)によりリン酸化され得る。

ヒスチジン上でリン酸化された形のHPrのみが、ヒスチジン552上でのラクトースパーミアーゼのリン酸化を可能にする。

【0012】

LacSタンパク質の膜環境及びHPr(His~P)によるそのリン酸化を再構築するプロテオリポソームのインビトロモデルについて、このリン酸化は、プロトンを用いる共輸送によるラクトース輸送に対して影響しないが(Gunnewijk及びPoolman, 2000a)、ラクトース／ガラクトース交換の流れを約2倍増加させることが観察されている。

【0013】

lacS遺伝子の転写

ラクトースオペロンの転写は、ラクトース含有培地での増殖により誘発される。lacS及びZの遺伝子のプロモーターは、CcpAによる調節を可能にするcre (カタボライト応答性エレメント)部位を含有する。CcpAは、lacS発現及びlacZ発現を抑制する。一方、CcpAは、ラクトースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の転写に対する活性化効果を有する(van den Bogaardら, 2000)。

【0014】

HPr(Ser-P)の形は、CcpAと相互作用可能である。これらのタンパク質と一緒に、cre部位と複合体を形成することを可能にし、それによりlacS遺伝子の転写の抑制をもたらす(Jonesら, 1997)。

【0015】

HPr(Ser-P)の形は、エス・サーモフィラス培養の指数増殖期の最初に優勢であり、指数増殖期の経過の間に減少する一方で、HPr(His~P)の形が対数期の間に出現して、安定期に入るところで最大になることが観察されている(Gunnewijk及びPoolman, 2000b)。HPr(Ser-P)からHPr(His~P)への変化は、培養培地中のラクトースの減少及びガラクトースの増加、並びにラクトースパーミターゼの発現における非常に大きな増加と並行して起こる。

よって、HPrタンパク質のリン酸化状態は、まず、LacSタンパク質の発現レベル、及び次にその活性の調節による培地中のラクトースの減少を補うことによる、ラクトース輸送の調節における役割を担う。

【0016】

上記の報告された知見に基づいて、Gunnewijk及びPoolmanは、以下のモデルを提案している：培地中にラクトースが豊富に存在するときは、lacS遺伝子の発現はHPr(Ser-P)/CcpA複合体により抑制される。発酵の間に、培地中でのガラクトースの蓄積及び利用可能なラクトースの減少が、細菌がラクトースを浸透させる能力の減少をもたらす(よって、培地中の酸性化が減少する)。この減少が、糖分解活性の縮小、及びATP濃度の減少とそれに伴う無機リン酸塩濃度の増加をもたらし、HPr(Ser-P)キナーゼ活性の縮小を導いて、HPr(Ser-P)ホスファターゼ活性の利益をもたらし、これはHPr(Ser-P)濃度の縮小の効果を有するであろう。このHPr(Ser-P)濃度の縮小は、lacS遺伝子のカタボライトリプレッションを取り除き、結果として、ラクトースパーミターゼの産生を増加させる。並行して、HPr(His~P)における増加は、ラクトースパーミターゼのヒスチジン552上でのリン酸化を増加させること、よって、ガラクトースを用いる対向輸送によりラクトースを輸送する能力を増加させることを可能にする。

【0017】

HPr(His~P)によるヒスチジン552上でのラクトースパーミターゼのリン酸化が、培地中の基質の量が減少するときに細胞内でのラクトースの流れを増加させることを示唆するこのモデルは、もしこのリン酸化が妨げられれば、対数期の最後での酸性化を遅延させ得ることを仮定することを可能にする。しかし、これはインビトロ実験に部分的に基づいており、インビボでのラクトースの運び込みにおいて、ラクトースパーミターゼの発現の増加に比例して、そのリン酸化の増加によりインビボで行われる真の部分を予め判定することを可能にしない。さらに、LacSの発現及びリン酸化の増加に対するHPr(Ser-P)及びHPr(His~P)の濃度の影響に関する観察は、対数期又は安定期の最初での細菌に対して行われた。安定期のより進行した段階でのHPrのこれらの2つの形の濃度に関する指摘はない。

【0018】

ヒスチジン552上でのLacSリン酸化がないことの影響に関して入手可能な唯一の情報は、Poolmanら(Poolmanら, 1992)による文献にあり、これは、種々のヒスチジン残基上で変異したストレプトコッカス・サーモフィラスLacS酵素をコードする配列を含む種々のプラスミドについて記載している。これらのプラスミドは、内因性lacS遺伝子が予め欠失された大腸菌(E. coli)株を形質転換するために用いられている。種々の変異体で形質転換された株でのラクトース輸送は、ストレプトコッカス・サーモフィラスの野生型LacS酵素をコードするプラスミドを有する同じ大腸菌株において観察されるものと比較して評価され

10

20

30

40

50

る。元来のヒスチジンをアルギニンで置き換えたH552R変異体に関して、顕著な差異は観察されない。Poolmanらは、この結果を、大腸菌のHPr(His~P)によるストレプトコッカス・サーモフィラスの野生型LacS酵素のリン酸化の効果が無い、又はこのリン酸化がラクトース輸送において役割を演じていないという事実によるのではないかとした。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

しかし、本発明者らは、ヒスチジン残基上でのLacSのリン酸化を妨げる変異が変異細菌の酸性化及び後酸性化の特性に対する影響を有し得るかについて研究した。

この研究のために、本発明者らは、ストレプトコッカス・サーモフィラスの工業的な株を選択した。CNCMに2002年12月12日にI-2967の番号の下で寄託されたこの株は、有利なテクスチャを有する発酵乳製品を得ることを可能にする。しかし、この株は、かなりの後酸性化を導く。

【0020】

本発明者らは、野生型ラクトースパーミアーゼの代わりに、ヒスチジン552上でリン酸化されることができない変異ラクトースパーミアーゼを発現する、この株の変異体を構築して特徴決定した。

この変異株は、親の株のものとは異なる酸性化曲線を示すことに、本発明者らは注目した。酸性化は、親の株よりも変異体の場合により遅く開始され、変異体の最大酸性化速度は、より遅い。しかし、平衡pHには、2つの株について発酵の6時間後に到達する。2つの株の間で最も顕著な差異があるのは、後酸性化に関することである。同じ貯蔵条件(10℃での28日間の貯蔵)下で、 Δ pH (D0でのpHとD28でのpHとの差)は、親の株の場合はほぼ0.6であるが、変異株の場合はほぼ0.4である。後酸性化におけるこの差は、細菌の生存に関する差異から来していない。細菌の生存は、実際のところ、2つの株において等しい。さらに、変異体を用いて得られた発酵生成物は、親の株を用いて得られたものと同等のテクスチャの質を有している。

【課題を解決するための手段】

【0021】

よって、本発明は、まず、ラクトースパーミアーゼのIIAドメイン中のHPr(His~P)-リン酸化性(phosphorylatable)ヒスチジンをコードするコドンの変異が、親の株のゲノムDNA、特に染色体DNAに導入されており、該変異が、非リン酸化性(non-phosphorylatable)アミノ酸へのヒスチジンの置換を誘導することを特徴とする、由来する親の株よりも低い後酸性化を有する変異乳酸菌株を得る方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本発明の好ましい実施形態によると、上記の株は、ストレプトコッカス・サーモフィラス株であり、該変異は、ラクトースパーミアーゼの位置552のヒスチジンの、非リン酸化性アミノ酸への置換を誘発する。

上記の非リン酸化性アミノ酸は、セリン、チロシン、ヒスチジン、スレオニンのいずれでもない任意のアミノ酸であり得る。アラニンが好ましく選択される。

【0023】

有利には、ラクトースパーミアーゼの位置552のヒスチジンをコードするコドンは、アラニンをコードするコドンで置換される。この変異は、得られる変異体のスクリーニングを促進するBstUI制限部位を作り出す。

【0024】

本発明に従う方法は、当業者に公知の部位特異的突然変異誘発、特にPCR突然変異誘発の通常の技術を用いて行うことができる。

このようにして得られた変異DNAを、次いで、細菌染色体中への遺伝子の組込みのためのベクターに挿入する。この組込みは、好ましくは、ベクターが有する挿入断片の、細菌染色体の相同領域との組換えにより行われる。

【0025】

通常、変異DNAは、選択マーカー(例えば、抗生物質耐性の遺伝子)を有する組み込み可能ベクターに挿入され、このベクターは、変異を行うことが望まれる細菌に導入される。該細菌を、その後、選択培地上で培養し(例えば、選択マーカーが抗生物質耐性遺伝子である場合は、対応する抗生物質の存在下で)、挿入断片と細菌染色体の相同領域との間の相同的組換えによりベクターを組み込んだ、これらの条件下で増殖可能な細菌を得る。染色体に組み込まれる構造は、まず、挿入断片に由来する変異された配列と、次に、宿主細菌の相同配列とに接するベクターの配列からなる。

【0026】

このようにして選択された細菌は、ベクターに由来する配列を切り出すことを可能にするために非選択培地上で培養するが、この切り出しは、これらの配列に接する領域同士間での相同的組換えにより起こる。この組換えが起こった細菌の半分は、宿主細菌に由来する「野生型」配列を含み、残りの半分は、挿入断片に由来する変異配列を含む。変異を有する細菌は、次いで、いずれの適切な手段により選択される。例えば、変異が制限部位を創り出す場合、選択は、変異領域のPCR増幅産物中のこの制限部位の存在に基づいて行うことができる。

【0027】

組込みベクターは、多くの乳酸菌について利用可能である。通常、ある細菌種についての組込みベクターは、この種の細菌に導入可能であるが、そこで複製できない。

ストレプトコッカス・サーモフィラスにおいて組込みベクターとして用いることができるベクターの例としては、Pgем5、Puc19 (Molletら, 1993)及びPnd324 (Duanら, 1999)が挙げられる。

【0028】

有利には、形質転換効率を増加させるために、選択された細菌において条件付きで複製するベクターを、組込みベクターとして用いることができる。この場合、ベクターが導入された細菌は、まず、その複製を許容する条件下で培養し、このことにより、これらの形質転換された細菌中で該ベクターが確立されることが可能になり；次いで、細菌を、ベクターの複製を許容しない条件下で培養し、通常の組込みベクターの場合と同様に、ベクターが染色体に組込まれた細菌の選択を行うことができる。

【0029】

多数の乳酸菌において組込みベクターとして用いることができる条件付き複製ベクターの例としては、Biswasら及びMaguinら(Biswasら, 1993; Maguinら, 1996)により記載され、PCT出願WO 93/18164にも記載される熱感受性ベクター、又はベクターpwv01 (Lawら, 1995)及びPuc122 (Frereら, 1998)が挙げられる。

【0030】

本発明の主題は、本発明の方法により得ることができる乳酸菌株でもある。

この株は、その染色体DNA中に、ラクトースパーミアーゼのIIAドメインのHPr(His~P)がリン酸化できるヒスチジンをコードするコドンの変異を含み、該変異は、該ヒスチジンのリン酸化され得ないアミノ酸への置換を誘発することを特徴とする。

【0031】

本発明の好ましい実施形態において、上記の株は、ラクトースパーミアーゼ遺伝子が、タンパク質の位置552でのヒスチジンの、非リン酸化性アミノ酸への置換を誘発する変異を含むストレプトコッカス・サーモフィラス株である。

本発明による乳酸菌株は、ブダペスト条約に従って、2004年5月10日に、25 rue du Docteur Roux, Paris のCNCM (国立培養微生物コレクション(Collection Nationale de Culture de Microorganismes))にI-3213の番号で寄託された。これは、部位特異的突然変異誘発によりヒスチジン552のコドンをアラニンコドンで置換する変異を導入することによる、CNCM I-2967株(CNCMに2002年12月12日に寄託)に由来するエス・サーモフィラスの変異株である。

【0032】

本発明による乳酸菌株は、増殖期の間に、それが由来する親の株のものに類似のラクトースパーミアーゼ活性を有する。よって、これらは、それが由来する親の株のものに匹敵するラクトース資化及び酸性化能力を有する。一方、安定期の間のラクトースパーミアーゼ活性は親の株のものに比較して低減されており、このことは後酸性化の低減を導く。

【0033】

有利には、本発明による乳酸菌株は、 β -ガラクトシダーゼ活性を有する乳酸菌に由来し、この活性を保持している。これらは、ラクトースでない糖を補充していない乳で、通常、増殖できる。

好ましくは、本発明による細菌株は、食品工業に適する変異体(又は食品グレード変異体)である。これらは、有利な乳製品発酵特性を有する特徴付けられた細菌株に由来することが有利である。

10

【0034】

本発明は、上記の少なくとも1つの細菌株を含む乳酸発酵素にも関する。具体的な実施形態によると、本発明による乳酸発酵素は、ヒスチジン552が非リン酸化性残基で置換されたラクトースパーミアーゼを発現するエス・サーモフィラスの少なくとも1つの変異株を、後酸性化が任意に低減されていてもよい(例えば、本発明によるラクトースパーミアーゼの変異に起因するか、又は β -ガラクトシダーゼ不活性化変異に起因する)少なくとも1つのその他の乳酸菌株、例えばエル・ブルガリカス株と組み合わせて含む。

【0035】

乳が上記の乳酸発酵素を用いて発酵される工程を含む発酵乳製品を製造する方法も、本発明に一体化した部分であり、このような方法により得ることができるいずれの発酵乳製品は、例えばヨーグルト、発酵乳、発酵飲料、ケフィア、チーズ又は発酵幼児用乳である。

20

【0036】

図により説明される以下の実験実施例は、本発明のある態様をより詳細に開示するが、本発明の主題を限定するものではない。

図の凡例

図1：I-3213変異体のlacS遺伝子の配列の、親のI-2967株のlacS遺伝子の配列との比較。

図2：I-3213変異体及び親のI-2967株を用いて得られた酸性化曲線の比較。

図3：I-3213変異体及び親のI-2967株の酸性化速度の比較。

30

図4：生成物の貯蔵の間のDornic酸性度のモニタリング。I-3213変異体と親のI-2967株の比較。

図5：生成物の粘度 η の測定の原理。

【実施例】

【0037】

実施例

実施例1： 変異体の作製

出発株は、2002年12月12日にCNCMに寄託されたI-2967エス・サーモフィラス株である。

lacS遺伝子の配列において、ヒスチジン552(リン酸化されることができるヒスチジン)のコドン、二重組換えによりアラニンコドンで置き換えた。さらに、変異を行って(コドン552の2番目のヌクレオチドを、アデニンの代わりにシトシンで置き換えた)、BstU1制限部位を遺伝子中に創出した。このことにより、lacS遺伝子中に所望の変異を組込んだクローンを選択することが可能になった。

40

【0038】

変異の安定性は、6回の連続する植え継ぎ培養の後にLacS遺伝子の配列決定を行うことにより、得られたクローンのうちの1つ(2004年5月10日にCNCMにI-3213の番号の下で寄託した)を用いて確認した。図1は、I-3213変異体のlacS遺伝子の配列(配列番号2)の、親のI-2967株のlacS遺伝子の配列(配列番号1)との比較を示す。変異は、明らかに存在する：ヒスチジン552のコドンは、今ではアラニンをコードしている。lacS遺伝子中のどこにも望ましくない変異は存在しない。

50

【0039】

I-3213変異体は、農作食物(agrofood)の使用に適する。なぜなら、lacS遺伝子の変異を組み込むために用いられたプラスミドの残存配列を全く含まないからである。

【0040】

実施例2：I-3213変異体に対して行った生理的試験

I-3213変異体が親のI-2967株よりも後酸性化をより少なく行うことを確かめるために、純粋な株において生成物を産生させ、D+28まで監視する：酸性化、後酸性化、生存及びテクスチャ。

【0041】

2.A - プロトコル

10

- 2回の植え継ぎ培養による株の再生。
- 85 ° Dの酸性度($10^8 \sim 10^9$ CFU/mlに相当する)に達するまでの44°Cのインキュベーションでの酵母エキスを補った滅菌乳上での発酵素の調製。
- 95°Cにて10分間低温殺菌した120 gの脱脂粉乳+930 mlの水+1 gのN3ゼラチンペプトン(Organotechnie)の混合物への1% (v/v)の発酵素の接種。
- 4.65のpHに達するまでの44°Cのインキュベータ中でのジャーのインキュベーション。
- ジャーを30分間氷水中に入れることによる発酵の停止。
- 10°Cの低温貯蔵での28日間の生成物の貯蔵。

【0042】

20

2.B - モニタリング- I-2967株と比較した変異体による酸性化の比較

2.B.1. 酸性化曲線

CINACシステム(酸性化動態、Alliance Instruments)を用いて、時間経過とともにpHを連続的に測定する。よって：

- 各株の酸性化曲線、
 - 酸性化速度を与える1次時間導関数
- を得ることができる。

【0043】

2.B.2. pHの測定

生成物の貯蔵の間のpHの変化は、Mettler ToledoからのMP220 pHメータを用いて監視する。

30

【0044】

2.B.3. Dornic酸性度の測定

Dornic酸性度(D°)の測定は、 H_3O^+ イオンのモル濃度を滴定することを可能にする。Dornic度の数は、10.32 gの乳を中和するのに必要とされる0.1 Nの濃度の水酸化ナトリウム溶液のミリリットルの1/10の数に相当する。中和度は、着色指示薬であるフェノールフタレインを用いて視覚化される。色が変わる領域周辺(pH 8.2)では、フェノールフタレインは無色からピンク色になる。1 Dornic度は、乳1リットル当たり100 mgの乳酸を表す。

【0045】

2.B.4. 産生試験のためのミックスの調製

40

乳培地を、120 gの脱脂粉乳(Milex 240, Arla Food Ingredients)+930 mlの脱イオン水+1 gのN3ペプチド(Vital Armor 950, Armor Proteins)から再構築する。ミックスを、完全に均質化するまで混合する。次いで、培地を周囲温度にて30分間再水和し、95°Cにて10分間低温殺菌する。

【0046】

2.B.5. 株の生存

生存測定は、スクロース含有M17寒天培地上で行う。らせんプレーター(AESからのWASP)による表面の単離。 H_2CO_2 の下で37°Cでのインキュベーション。インキュベーション72時間後の読み取り。

純粋株の酸性化曲線を、二重に作成した。

50

【0047】

2.B.6. 解釈

図2及び3に示す結果は、I-3213株が、より顕著な尿素効果及びより低い最大酸性化速度とともに、親の株よりも遅い酸性化曲線を有することを示す。しかし、両方の株はpH 4.50に6時間で到達する。

【0048】

2.C - モニタリング - I-3213変異体とI-2967株の後酸性化の比較

図4は、I-3213変異体及び親のI-2967株を用いる発酵により得られた生成物を比較することにより、生成物の貯蔵の期間中のDornic酸性度をモニタリングした結果を示す。

発酵の停止直後(D0)及び10℃で28日間の貯蔵後のpHの測定に関する結果を、以下の表1に示す。

【0049】

【表1】

	pH D0	pH D28
I-2967 a	4.65	4.07
I-2967 b	4.64	4.08
I-3213 a	4.60	4.27
I-3213 b	4.65	4.19

表1

【0050】

これらの全ての結果は、変異体が、親の株よりも低い後酸性化を有することを確認する。

【0051】

2.D - モニタリング - 変異体及びI-2967の生存の比較

次の表2は、10℃で28日間の貯蔵後の1 mlの生成物に存在する細菌コロニーの数を示す。

【0052】

【表2】

	CFU/ml D28
I-2967 a	1.4×10^7
I-2967 b	7.6×10^7
I-3213 a	7.4×10^7
I-3213 b	1.0×10^8

表2

【0053】

これらの結果は、変異体の生存が、発酵の停止に続く28日間の貯蔵の後で、親の株のものと同程度に良好であることを示す。

【0054】

2.E - モニタリング - 変異体を用いて得られた生成物及び親のI-2967株を用いて得られた生成物のテクスチャの比較

テクスチャ測定は、単一製造からの生成物に対して行った。全ての測定は、三重で行った(測定当たり3つのジャー)。

D+7での生成物に対して、テクスチャを測定する3つの方法を行った：

- TAXT2を用いる針入度測定(10℃)
- Rheomat 260での手動攪拌後のフローの測定(4℃)
- MCR300での遠心分離後の乳清(serum)に対する粘度の測定(20℃)

テクスチャ測定のためのこれらの種々の技術については、以下に詳細に記載する。

【0055】

2.E.1 - 凝結(set)生成物の乳清に対する粘度測定

この方法の利点は、これらの株により発酵された乳の流動学的特徴を確かめるために、凝結生成物の乳清を分析することにある。

この分析方法は、まず、凝結生成物から乳清を回収することを可能にする。このために、ある量、約50 gの生成物を、周囲温度にて631 gで10分間遠心分離し、このことにより株により発酵された乳のゲルの内部に存在する乳清を回収することができる。次いで、乳清を回収し、生成物の残渣の大部分を除去するために同じ遠心分離に付す。これらの粒子の残りは、沈降して壊れやすいペレットを形成する。

【0056】

次いで、乳清の粘度を20℃にて1分について100 s⁻¹の固定剪断勾配(fixed shear gradient)で測定する。3回の測定を、同じ株により同じ条件下で発酵された乳の3つのジャーについて行う。この分析に用いる装置は、DG 26.7/TEZ 150 p-cタイプのダブルギャップ同軸ジオメトリと、ペルティエ効果温調システムとを備えたAnton Paar Physica (登録商標) MCR 300レオメータである。この回転システムは、1秒当たり1点の収集で定常剪断速度での乳清の粘度を評価することを可能にする。

10

【0057】

一般的に、この測定の最初の2つの値は、回転システムの初期化により矛盾してゆがんだものである。結果として、各乳清の粘度[Vs]は、装置により保持された最初の2つ以外の値の平均により決定される。

【0058】

20

2.E.2 - 針入度測定(Fgel-Dgel-F15mm)

この測定に用いる装置は、Thermo Rheo TAXT2ペネトロメータ(Anton Paar Physica, Austria)である。

直径約1 cmのシリンダが、15 mmの深さまで一定の速度でゲル(10℃の温度)の中に貫入する。スピンドルが生成物中に入っていくときに、ゲルは抵抗を示し、これは破壊する前に変形する。これにより得られる力を測定する。

【0059】

得られるパラメータは、以下のとおりである：

Fgel = ゲルが破壊するときにスピンドルにより印加された力の値に対応するゲル強度(g) (曲線の最初のピーク)。

30

Dgel = ゲルが破壊するときにスピンドルが貫入した深さに対応するゲル強度での距離(mm)。

F15 = スピンドルがその工程の終点にあるときに測定される力に対応する、15 mmでの力(g)。

【0060】

2.E.3 - フローの測定 - 流動粘度

この方法は、4℃にて30分間の手動の攪拌及びインキュベーションの後の、凝結生成物の粘度を決定することからなる。同じ株で同じ条件下で発酵された乳の3つのジャーに対して、4℃にて3回の測定を行う。この分析に用いる装置は、DIN 145タイプの同軸システムを備えたMettler (登録商標) RM 260冷却粘度計である。この回転システムは、一次剪断勾配の関数としての生成物の破壊(destructuring)、すなわち所定の勾配でのひずみを観察することを可能にする。

40

【0061】

結果は、0~20 s⁻¹の間で上行又は下行する傾斜(ramp)の連続的フロー曲線の形で得られる。生成物は、1分間の0から20 s⁻¹の漸増する剪断勾配に付される。この段階は、上行傾斜に相当する。次いで、これを1分間の20から0 s⁻¹に下行する剪断勾配に付し、これは下行傾斜に相当する。

各下行曲線は、Cassonモデルに従ってモデル化される：

【0062】

【数 1】

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta \times D}$$

τ : ひずみ (Pa)

τ_0 : 生成物フロー閾値 (Pa) [閾値4]

η : 生成物粘度 (Pa.s) [V4]

D : 剪断勾配 (s^{-1})

【0063】

曲線の下行部分についての一次回帰直線が従うこのCassonモデリングは、回帰直線の傾きに相当する生成物の粘度 η である重要なパラメータを取り出すことを可能にする。

10

図5は、このモデリングに従って粘度を計算する方法を示す。

【0064】

2.E.4 - 結果

各測定法を用いて得られる結果を、以下の表3に示す。

【表 3】

モデル化されたパラメータ	I-2967	I-3213
乳清粘度 (mPa.s)	2.18	2.31
Fgel (g)	33.58	33.18
Dgel (mm)	3.29	2.96
F 15mm (g)	39.23	38.78
流動粘度	1154	1171

20

表 3

【0065】

分散の分析 ($P < 0.05$) は、テクスチャ測定の結果に対して行う (各パラメータについて、値はスチューデントの検定により比較する) :

- ゲル強度、ゲル強度の距離及び15 mmでの力のパラメータは、2つの株が著しくは異なることを示す。

30

- フロー測定により導かれる粘度パラメータは、2つの株が著しくは異なることを示す。

- 非常に再現性がある乳清の粘度は、2つの株の間で著しい差を示すが、変異体はI-2967株よりも高い粘度を有し、このことは、テクスチャの損失がないことを証明する。

【0066】

2.E.5 - 解釈

変異体及び親の株を用いて得られた発酵生成物に対して行われたテクスチャ測定は、変異によるテクスチャの損失がないことを示すことを可能にする。

【0067】

2.F - 結論

40

I-2967株のリン酸化され得ないラクトースパーミラーゼ変異体は、二重組換え事象により得られた。

I-3213と呼ばれるこの変異体は :

- 親の株のものとは異なる酸性化曲線 (速度は低下している)、

- D28でより低い後酸性化、

- 親の株のものと類似のテクスチャ、及び

- D28での良好な生存性

を有する。

【0068】

【表 4】

参考文献

- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D. 及び Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, **175**, 3628-3635.
- Duan, K., Liu, C.Q., Liu, Y.J., Ren, J. 及び Dunn, N.W. (1999) Nucleotide sequence and thermostability of pND324, a 3.6-kb plasmid from *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 36-42.
- Frere, J., Benachour, A., Giard, J.C., Laplace, J.M., Flahaut, S. 及び Auffray, Y. (1998) A new theta-type thermosensitive replicon from *Lactococcus lactis* as an integration vector for *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett*, **161**, 107-114. 10
- Gunnawijk, M.G. 及び Poolman, B. (2000a) HPr(His approximately P)-mediated phosphorylation differently affects counterflow and proton motive force-driven uptake via the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem*, **275**, 34080-34085.
- Gunnawijk, M.G. 及び Poolman, B. (2000b) Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem*, **275**, 34073-34079.
- Jones, B.E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. 及び Klevit, R.E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem*, **272**, 26530-26535.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G. 及び Leenhouts, K. (1995) A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol*, **177**, 7011-7018. 20
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S.D. 及び Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, **178**, 931-935.
- Mollet, B., Knol, J., Poolman, B., Marciset, O. 及び Delley, M. (1993) Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, **175**, 4315-4324.
- Poolman, B., Modderman, R. 及び Reizer, J. (1992) Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues. *J Biol Chem*, **267**, 9150-9157.
- van den Bogaard, P.T., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P. 及び de Vos, W.M. (2000) Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol*, **182**, 5982-5989. 30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 9 】

【図 1】 I-3213変異体の lacS遺伝子の配列の、親の I-2967株の lacS遺伝子の配列との比較

。

【図 2】 I-3213変異体及び親の I-2967株を用いて得られた酸性化曲線の比較。

【図 3】 I-3213変異体及び親の I-2967株の酸性化速度の比較。

【図 4】 生成物の貯蔵の間のDornic酸性度のモニタリング。I-3213変異体と親の I-2967株の比較。 40

【図 5】 生成物の粘度 η の測定の原理。

【図 1】

```

>I-2967      TCCACACCTCTTG 14
>I-3213      CTTCACATATCTTGACTGAGTGAACCTCTTCTCATTCCACACCTCTTG 52

>I-2967      TGTTCCTGTGTCTCTTTATGATTAATCTGACTCAGTAGAATATGGTCAATG 66
>I-3213      TGTTCCTGTGTGTCTTTATGATTAATCTGACTCAGTAGAATATGGTCAATG 104

>I-2967      GAAAACGGACACCGCTGATGAATCACTTACTTTGTCACTGTGGCCTTAAT 118
>I-3213      GAAAACGGACACCGCTGATGAATCACTTACTTTGTCACTGTGGCCTTAAT 156

>I-2967      GATAAATCTGGTGGTGGATGTCAACATGGCTTGTTCATCATTTGCCGTAG 170
>I-3213      GATAAATCTGGTGGTGGATGTCAACATGGCTTGTTCATCATTTGCCGTAG 208

>I-2967      CTGCGGTATGACACAGAGTGCCTCAGCATCAACATTAACAACATCAACA 222
>I-3213      CTGCGGTATGACACAGAGTGCCTCAGCATCAACATTAACAACATCAACA 260

>I-2967      GTTATCTTTAAGCTTGGCATGTTTGTCTTCCCGACGACACAAATGCTTATC 274
>I-3213      GTTATCTTTAAGCTTGGCATGTTTGTCTTCCCGACGACACAAATGCTTATC 312

>I-2967      GGTGCTTCATTTGTGTCTGTAATAATCACTTTGACTGAAGCACTCAGGCTA 326
>I-3213      GGTGCTTCATTTGTGTCTGTAATAATCACTTTGACTGAAGCACTCAGGCTA 364

>I-2967      AAATTTGTGAAGAAATGGACAACTGCTTTAGCGTAGCACTTCTGAAATGA 378
>I-3213      AAATTTGTGAAGAAATGGACAACTGCTTTAGCGTAGCACTTCTGAAATGA 416

>I-2967      AGTTAAAGCTAACTGCTATCTCTGTGAACCCCTACACCTGCTTATTTGGTT 430
>I-3213      AGTTAAAGCTAACTGCTATCTCTGTGAACCCCTACACCTGCTTATTTGGTT 468

>I-2967      GATCTCTCAAGTCTTAATGATGAACACTTTGCTTCAGGTAGCATGGGTAAAG 482
>I-3213      GATCTCTCAAGTCTTAATGATGAACACTTTGCTTCAGGTAGCATGGGTAAAG 520

>I-2967      GTTTCGCATTAAACCTACTGATGAGCGTCTTTTGACACCAATTAAGTGGTAC 534
>I-3213      GTTTCGCATTAAACCTACTGATGAGCGTCTTTTGACACCAATTAAGTGGTAC 572

>I-2967      CATTCGTCAAAATCTTCTCTACGCCCATGAGTGTGATTGAAGTGAAGAT 586
>I-3213      CATTCGTCAAAATCTTCTCTACGCCCATGAGTGTGATTGAAGTGAAGAT 624

>I-2967      GGTGCTATGTTCTTATCCAGTTGGCATCGGAACAGTTAAACTTAATGCTG 638
>I-3213      GGTGCTATGTTCTTATCCAGTTGGCATCGGAACAGTTAAACTTAATGCTG 676

>I-2967      AAGGATTCATTAGTTACGTAGAACAGGTGATCATGTTGAAGTTGGACAAA 689
>I-3213      AAGGATTCATTAGTTACGTAGAACAGGTGATCATGTTGAAGTTGGACAAA 727

>I-2967      AACTTCTCTGAGTCTGCTCACCATTATTAAGAAAAAGTCTTGTGATGACA 740
>I-3213      AACTTCTCTGAGTCTGCTCACCATTATTAAGAAAAAGTCTTGTGATGACA 778

>I-2967      CAGTACTTGCACTTACTTAATCAGAAAAATCGGTGCTTTCCATCTTG 791
>I-3213      CAGTACTTGCACTTACTTAATCAGAAAAATCGGTGCTTTCCATCTTG 829

>I-2967      AACAAAAAGTTGGAGAAAAGTAGAAGCTTTGTCTGAAGTTATTACCTTCAA 843
>I-3213      AACAAAAAGTTGGAGAAAAGTAGAAGCTTTGTCTGAAGTTATTACCTTCAA 881

>I-2967      AAAAGGAGAAATATCTATGAACATGACTGAAAAAATCAAACTTATTTAAAC 895
>I-3213      AAAAGGAGAAATATCTATGAACATGACTGAAAAAATCAAACTTATTTAAAC 933

>I-2967      GATCCAAAGATTGTTAGCGTTAATACTGTTGATGCTCACTCAGATCAATAG 946
>I-3213      GATCCAAAGATTGTTAGCGTTAATACTGTTGATGCTCACTCAGATCAATAG 984

```

Figure 1

```

>I-2967      TATTTTGAATCTCTTGAAGAATTTCTGAAGGGGAGATGAAGTTAAGACAAT 998
>I-3213      TATTTTGAATCTCTTGAAGAATTTCTGAAGGGGAGATGAAGTTAAGACAAT 1036

>I-2967      CTCTTAATGGAAAAATGAAAAATCACTATGCTCAGAAATACAAATCAGGTTTT 1050
>I-3213      CTCTTAATGGAAAAATGAAAAATCACTATGCTCAGAAATACAAATCAGGTTTT 1088

>I-2967      AAAAGACTTTTATAAAAACAGAAATTTGATGAACTGATTGAAATTCATCAAT 1102
>I-3213      AAAAGACTTTTATAAAAACAGAAATTTGATGAACTGATTGAAATTCATCAAT 1140

>I-2967      GTACCAGGTCACTTAGAGCTTCAAGGTTTGGTCTCCACAAATATGTGAATA 1154
>I-3213      GTACCAGGTCACTTAGAGCTTCAAGGTTTGGTCTCCACAAATATGTGAATA 1192

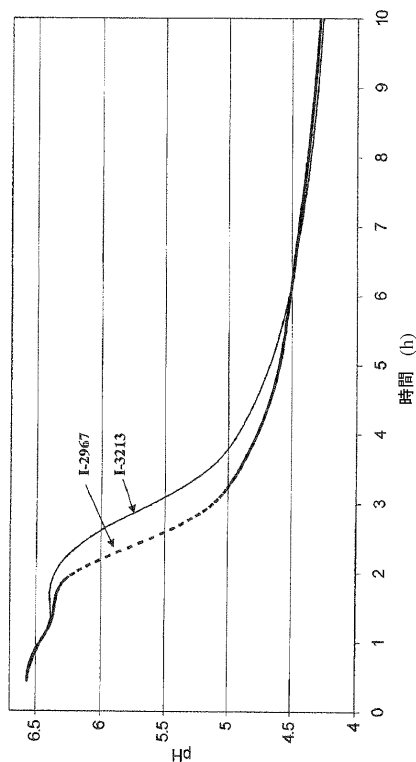
>I-2967      CCCAATATCCTTGGGATGTTAAAGATTCCTCTGCTCCACCTCAAGTTCCCTCA 1206
>I-3213      CCCAATATCCTTGGGATGTTAAAGATTCCTCTGCTCCACCTCAAGTTCCCTCA 1244

>I-2967      AGAATCAAAATGCTG 1220
>I-3213      AGAATCAAAATGCTGTGCTATCATACGTTAAACAT 1278

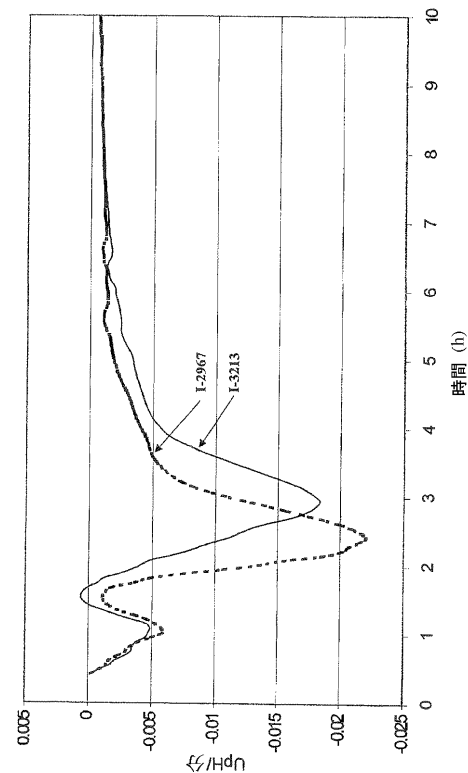
```

Figure 1 (suite)

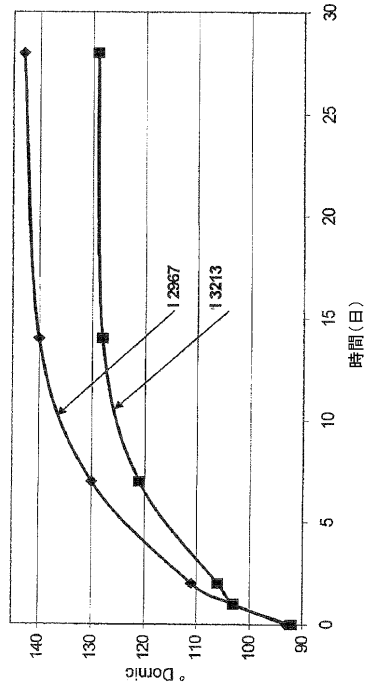
【図 2】



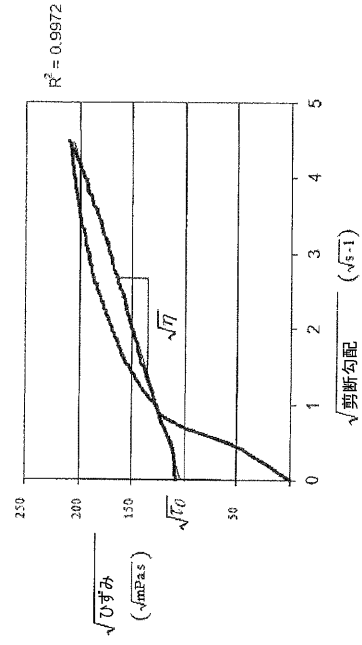
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0004931914000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ガロール, ペギー
フランス、エフー９１３１０ モンレリー、リュ デ グランデ ヴィーニュ、１４
- (72)発明者 フォーリー, ジャンーミシェル
フランス、エフー７８３５０ ジュイーアーンジョサス、リュ ラマルティース、３
- (72)発明者 リカウ, ナディーヌ
フランス、エフー９１９４０ レ ウリス、アレ ラヴェル、２、レルミタージュ

審査官 白井 美香保

- (56)参考文献 特表２００２－５１６１１０（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５２４３２６（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－３１６９４８（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０５６３９６４８（ＵＳ，Ａ）
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, ２０００年, vol.275 no.44, pp.34073-34079
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, １９９２年, vol.267 no.13, pp.9150-9157
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, １９９５年, vol.92, pp.778-782

- (58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
- IPC
C12N 15/00-15/90
DB名
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
PubMed
WPI