

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3795245号
(P3795245)

(45) 発行日 平成18年7月12日(2006.7.12)

(24) 登録日 平成18年4月21日(2006.4.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

A 2 3 L 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 R 1/125 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

A 2 3 L 1/20 1 O 9 Z

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:125

請求項の数 4 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平11-6658
 (22) 出願日 平成11年1月13日(1999.1.13)
 (65) 公開番号 特開2000-224982(P2000-224982A)
 (43) 公開日 平成12年8月15日(2000.8.15)
 審査請求日 平成15年6月5日(2003.6.5)

微生物の受託番号 FERM BP-6605

(73) 特許権者 398065531
 株式会社ミツカングループ本社
 愛知県半田市 中村町2丁目6番地
 (74) 代理人 100097825
 弁理士 松本 久紀
 (74) 代理人 100075775
 弁理士 戸田 親男
 (72) 発明者 竹村 浩
 愛知県半田市大和町1-22-1
 シティハイツカワイ3-C
 (72) 発明者 安藤 記子
 愛知県半田市天王町2-27-11
 ハイツみその105
 (72) 発明者 塚本 義則
 愛知県半田市清城町3-3-23
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を低下ないし欠損させてロイシンデヒドロゲナーゼの酵素活性を低下ないし失活せしめたことを特徴とするムレ臭が低下したまたはムレ臭のない納豆を生産する納豆菌。

【請求項2】

ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を低下ないし欠損させてロイシンデヒドロゲナーゼの酵素活性を低下ないし失活せしめたことを特徴とする短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌。

【請求項3】

Bacillus subtilis O-2株を親株とし、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を欠損させてロイシンデヒドロゲナーゼの酵素活性を失活せしめたことを特徴とするムレ臭が低下したまたはムレ臭のない納豆を生産する短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌 Bacillus subtilis B2(FERM BP-6605)。

【請求項4】

ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を低下ないし欠損させてロイシンデヒドロゲナーゼの酵素活性を低下ないし失活せしめることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の納豆菌の育種方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

20

【発明の属する技術分野】

本発明は、納豆の不快臭のひとつであるムレ臭の低下ないし消失システムに関するものである。特に本発明は、納豆のムレ臭の原因物質が短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸）であることをはじめに見出しただけでなく、その生成メカニズムをはじめて解明してそれに関与する酵素に着目し、該酵素活性を遺伝子操作などによって低下ないし失活せしめることによりムレ臭の低下ないし消失を確認し、これらの新規知見に基づきはじめに完成されたものである。

【0002】

すなわち、本発明は、納豆のムレ臭原因物質である短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸）の生産能が低下または消失した納豆菌とその開発方法ならびにその菌を用いたムレ臭低下納豆の生産に関する。さらに詳しくは、短鎖分岐脂肪酸（short branched chain fatty acids）生産酵素遺伝子であるロイシンデヒドロゲナーゼ（leucine dehydrogenase, EC 1.4.1.9）遺伝子および／または分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ（branched chain α -keto acid dehydrogenase, EC 1.2.1.25）遺伝子の機能を低下または欠損させ、それらの酵素活性を低下または失活させることによる短鎖分岐脂肪酸生産能を低下または消失させたムレ臭低下納豆菌の開発方法とその菌ならびにその菌を用いて生産されたムレ臭が低下したまたはムレ臭がない納豆の生産に関する。

10

【0003】**【従来の技術】**

納豆は、大豆を原料に納豆菌による発酵を行って生産され、納豆菌がつくる粘質物と共に、その臭いに特徴のある食品である。納豆中には、ピラジン類、アセトイン、ジアセチル、酢酸、プロピオン酸、短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸）、アンモニアなどを中心とした種々の揮発性成分が含有されていることが知られているが（日本食品工業学会誌、31巻、p. 587-595（1984））、これらの内のピラジン類、ジアセチルなどは、納豆好きの消費者に好まれるいわゆる納豆臭の主成分であるといわれている。

20

【0004】

その一方で、いわゆるアンモニア臭やムレ臭は代表的な不快臭であるといわれており、なるべくこれらの不快臭の原因となる物質の含量の低い納豆を開発することができれば、納豆の品質を向上させることができると期待できる。

30

【0005】

このような観点から、不快臭の一つであるアンモニア臭を抑制する方法としては、特開昭64-86854、特開平1-191655、特開平4-173069、特開平6-269281、特開平8-154616、特開平8-275772などに開示の如く、発酵中や保存中にアンモニアをあまり生産しないように改良した納豆菌を開発し、その納豆菌を使用して納豆を生産しようとする試みが多くなされてきている。これらの殆どは、納豆菌が本来保有するプロテアーゼ活性を低下させた納豆菌を開発し、このようなプロテアーゼ活性低下納豆菌を用いて納豆を生産する方法であった。このような方法により、アンモニアの生産がある程度抑えられ、アンモニア臭が低下した納豆を製造できることが期待されている。

40

【0006】

しかし、納豆のもう一方の代表的不快臭であるムレ臭を抑えることについては、これまでに全く検討されていなかった。むしろムレ臭の原因物質を特定することも出来ておらず、従ってムレ臭を抑制する方法の開発も大幅に遅れているのが現状であって、ムレ臭低下納豆の製造方法の開発が望まれていた。

【0007】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、納豆の有用性、特に嗜好食品としてのみでなく健康保健食品としての面からの有用性にも鑑み、更なる摂取量の増加を図る目的でなされたものであり、その際において、従来未解決のまま残されていたムレ臭の消失という技術課題を解決する目的でなされた

50

ものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するため、先ずはじめに、納豆におけるムレ臭の原因物質を特定すべく各方面から鋭意検討を重ねた結果、短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸）であることをはじめてつきとめた。そして、分岐アミノ酸を出発物質とする短鎖分岐脂肪酸の生合成経路について、図1のような仮説を設定した。そしてこの仮説にしたがってロイシンデヒドロゲナーゼ/分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損させることにより、短鎖分岐脂肪酸の少なくともひとつを生産できないように育種した短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌を開発するのにはじめて成功し、その納豆菌を用いて納豆を製造したところ、上記仮説どおり、ムレ臭が著しく低下した納豆であることがはじめて確認できた。

10

【0009】

その結果、ムレ臭の原因物質が短鎖分岐脂肪酸、すなわちイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸であることをつきとめることができ、同時に上記仮説の正しいことが確認された。そして、納豆菌においてロイシンデヒドロゲナーゼおよび/または分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を低下または欠損する手法も確立して、ムレ臭の生産能が低下または消失した納豆菌という従来未知の新規納豆菌を創製するのにはじめて成功し、そして更に、このようにして開発した新規納豆菌を用いることにより、ムレ臭の低下ないし消失した納豆という新規食品の製造が可能であることも確認し、遂に本発明の完成に至ったものである。

20

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明で育種改良に用いるもとの納豆菌には特に制限はないが、通常納豆工業で使用されている発酵能力に優れた納豆菌や、自然界から分離取得された納豆菌、市販の納豆から分離した納豆菌、およびさらに改良を重ねた優れた納豆菌を用いるのが望ましい。

【0011】

納豆菌は、枯草菌 *Bacillus subtilis* に分類されているが、粘質物（糸引物質）などの納豆としての特徴をつくり出すことができ、納豆発酵での主体をなす細菌であって、また生育にピオチンを要求するとされるなどの特性を有していることなどから、*Bacillus natto* に分類されたり、枯草菌の変種として *Bacillus subtilis* var. *natto* あるいは *Bacillus subtilis* (*natto*) などと分類する文献もある。納豆菌としては、例えば *Bacillus natto* IFO 3009、*Bacillus subtilis* IFO 3335、同 IFO 3336、同 IFO 3936、同 IFO 13169 などがあるほか、上記した各種納豆菌が広く使用される。

30

【0012】

具体的には、市販納豆から分離した O-2 株、市販の納豆菌高橋 3 号菌（T₃ 株、東京農業大学菌株保存室）、宮城野納豆菌（宮城野納豆製造所）等、各種の納豆菌が適宜使用できる。

40

【0013】

本発明では、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子および/または分岐ケト酸デヒドロゲナーゼの遺伝子を欠損させ、これらの酵素活性を失活させた納豆菌を育種することにより短鎖分岐脂肪酸すなわちイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸を生産しない納豆菌を取得するのである。育種の方法のひとつとしては、スタールらが *Bacillus subtilis* において開発した相同組換え能を利用した遺伝子失活法（J. Bacteriol., Vol.158, p.411-418(1984)）を納豆菌用に改変した方法が用いられる。

【0014】

本方法が納豆菌においても有効であることは本発明者らにより初めて立証されたことであ

50

る。本方法の利点は狙いを定めた遺伝子だけを特異的に欠損させることが可能であり、そのため納豆菌などの工業的に利用される微生物においては、他の優れた特性は壊さずに、欠点となっている性質に關与する遺伝子だけに変異を起こさせて改良することができることである。また本方法は、最終的には、育種のための遺伝子破壊などの目的で納豆菌に導入した異種遺伝子を完全に除去することができる方法であるため、異種蛋白質が発現されることは全くなく、育種された菌は遺伝子組換え菌とはならないなどの、特に食品として利用する場合に重要な長所を有している。

【0015】

また、このような遺伝子組換え法を納豆菌で利用するには、納豆菌への遺伝子導入のための形質転換系が必要であるが、本発明者らは、形質転換能の向上した納豆菌を取得することにより、納豆菌の実用的なレベルの形質転換系を開発することも可能としており、この形質転換系を利用してプラスミドベクターを納豆菌に効率良く導入し、目的の遺伝子欠損株を育種することが出来たのである。

10

また、納豆菌の遺伝子組換え系の一つとしては、Appl. Environ. Microbiol., Vol.63., p.4087-4089(1997)に記載のファージベクターを利用した形質導入法 (transduction) が既に開発されており、本発明ではこの方法も利用される。

【0016】

なお、上記のような遺伝子組換え技術以外によっても、すなわち、既に目的遺伝子の機能が低下または欠損している納豆菌を自然界から選抜するいわゆるスクリーニング法や、ニトロソグアニジン (NTG) やエチルメタンスルホン酸 (EMS) 等による薬剤変異法や、 γ 線や紫外線等を用いる方法などによってこれらの遺伝子を変異させて機能を低下または欠損させるなどの、従来から実施されているような他の方法によっても育種が可能である。

20

このような通常の変異手段によれば、ロイシンデヒドロゲナーゼ及び/または分岐ケト酸デヒドロゲナーゼの酵素活性が完全に失活した納豆菌以外にも、これらの酵素活性が中間程度に低下した納豆菌も取得することができる。このような納豆菌を用いて納豆を生産する場合は、ムレ臭原因物質である短鎖分岐脂肪酸の含有量が中間程度に低下した納豆が製造可能となる。

本発明においては、このようにして得た短鎖分岐脂肪酸すなわちイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸の生産能が低下ないし消失した納豆菌を使用する。

30

【0017】

このようにして開発された短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の納豆生産への利用は、従来から実施されている方法を採用すれば良く、何ら制限がない。このようにして短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌を用いて生産した納豆と、従来から利用されている通常の納豆菌を用いた納豆とを比較すると、短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌で製造した納豆は、短鎖分岐脂肪酸をほとんど含有しておらず、いわゆるムレ臭がほとんどないことが確認される。

また、短鎖分岐脂肪酸の生産能が低下または消失した上記の納豆菌を通常の納豆菌と適当な比率で混合して使用して納豆の発酵をさせることによっても、納豆のムレ臭原因物質である短鎖分岐脂肪酸の含有量が通常の納豆よりも低下しており、かつ任意の含有量の納豆を製造することができる。

40

【0018】

ここに開発された短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌は、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子及び/または分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が欠損しており、これらの酵素活性がほとんど消失した納豆菌である。このような納豆菌を用いて生産された納豆は、短鎖分岐脂肪酸すなわちイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸をほとんど含有しておらず、そしてムレ臭が低下した納豆であることが確認されたことから、納豆のムレ臭の原因物質がイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸などの短鎖分岐脂肪酸であることが明白となり、ここに、これらの短鎖分岐脂肪酸は納豆菌においては、図1に示すような代謝経路により生産されることが初めて確認されたのである。

【0019】

50

したがって、ムレ臭が低下ないし消失した納豆を生産する目的で短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸の少なくともひとつ）の生産能が低下または消失した納豆菌を開発するには、図1に示すような代謝経路に係わる酵素群の内の一つもしくはそれ以上の酵素の活性を失活させれば良いことが示されたことになる。そして本発明に係る納豆菌を育種するには、遺伝子組み換えの手法によるだけでなく、通常行われている変異手段によればよく、あるいは、自然界から分離してもよい。

これらの短鎖分岐脂肪酸の生産能が低下または消失した納豆菌を用いて納豆を製造する方法以外にも、通常の納豆菌を用いた納豆の製造における発酵条件を種々工夫するなどして短鎖分岐脂肪酸の生産を抑制したり、さらに通常の納豆の発酵が終了した後に、納豆を吸引・吸着などの物理的手段などによって処理するなどの方法によっても、納豆中のムレ臭原因物質である短鎖分岐脂肪酸の含有量を低下または消失させて、ムレ臭が低下したまたはムレ臭がない納豆を製造することが可能である。

【0020】

【実施例】

以下、本発明の実施例を示す。

【0021】

【実施例1】

▲1▼使用菌株等

納豆菌O-2株は、市販納豆から常法により分離した納豆菌である。納豆菌r22株はO-2株の形質転換能を高めた変異株であり、後述の如く、O-2株をニトロソグアニジン（NTG）を用いて化学変異処理することにより取得した。大腸菌BMH71-18mutS、枯草菌ベクターpHY300PLKおよび大腸菌ベクターpHSG399は宝酒造株式会社より購入した。

培地は、納豆試験法（光琳）p.85-97（1990）記載の肉汁培地、孢子形成培地、NP再生培地等を用いた。ただし、必要な場合は、テトラサイクリン（2μg/ml）や短鎖分岐脂肪酸（イソ吉草酸、2-メチル酪酸、イソ酪酸、各0.1mM）を添加した。

【0022】

納豆菌r22株は、以下の方法で取得した。すなわち、市販納豆分離菌O-2株を、常法に準じ、NTG変異処理（NTG濃度160μg/ml、30・1hr、生存率7.3%）した。その結果得られた変異処理菌（ 5×10^6 個）を、Mol. Gen. Genet., Vol.168, p.111(1979)に記載のBacillus subtilisの方法に準じたプロトプラスト法により枯草菌ベクターpHY300PLKで形質転換した。この場合、形質転換後のプロトプラストの再生培地はNP再生培地を用い、テトラサイクリン耐性を指標として数十株の形質転換株を得た。これらの株は親株O-2株に比較して形質転換能が向上していることが期待されたが、これらの株にはベクターpHY300PLKが導入されており、このことが形質転換に利用する際に障害となるのでベクターpHY300PLKを除去する必要があった。

【0023】

ベクターpHY300PLKの除去は、納豆菌O-2株が孢子を形成する際にベクターpHY300PLKが欠落しやすい性質を本発明実施の中で見出し、利用することにした。そこで、これらの形質転換株の内30株を選択し、孢子形成培地で培養して孢子を形成させた。その後、それぞれの形質転換株から得られた孢子各16個を培養後、ベクターpHY300PLKの保持の有無を調べた結果、30株中の21株についてベクターpHY300PLKの除去に成功したことが確認できた。

【0024】

さらに得られた21株のベクター除去株について、プロトプラストを作成し、ベクターpHY300PLKで再度形質転換し、親株O-2よりも形質転換能が向上しているかを比較し、15株で形質転換能が向上していることを確認した。さらに、これら15株について常法による納豆製造試験を行い、発酵能や品質評価を比較検討した結果、外観上納豆と

10

20

30

40

50

なったものを製造できる株は4株だけであった。さらにこれら4株中2株は納豆の香りで硫黄臭などの不快臭の強い品質の悪いものしか製造できず、また1株は糸引きが極端に悪くなったものであった。残る1株(r22株と命名)のみが9名のパネラーによる評価の結果、親株O-2株を用いて製造した納豆よりは少し品質が劣るものの、納豆として許容される範囲の品質のものを製造できた。

【0025】

r22株で製造した納豆を親株O-2株で製造した納豆と比較した品質評価結果を表1に、またr22株の形質転換能を親株O-2株と比較した結果を表2に示した。なお、表1において、評価点は、対照(O-2株で製造)を3とした5段階評価の結果で示した。但し、総合評価は、対照(O-2株で製造)を0とした±5段階評価の結果で示した。

10

【0026】

【表1】

表1 納豆（r 2 2株で製造）の品質評価

品質特性	平均点	パネラー								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
豆色濃淡	3. 4	4	3	3	3	4	3	3	4	4
豆色嗜好	2. 9	3	3	3	3	3	3	3	3	2
香り嗜好	2. 9	4	2	4	3	2	3	4	2	2
糸引強さ	2. 8	3	3	3	3	3	2	3	3	2
糸引嗜好	3. 2	3	3	3	3	3	4	3	3	4
食感硬さ	3. 1	3	3	3	4	2	3	3	3	4
食感嗜好	3. 0	3	3	3	2	4	4	3	3	2
呈味嗜好	2. 7	4	3	2	2	2	3	3	3	2
総合評価	- 0. 2	1	- 1	0	0	- 1	1	0	0	- 2

【 0 0 2 7 】
【 表 2 】

表2 形質転換能の比較

菌 株	形質転換効率 (／ μ g DNA)
O-2株	<0.01
r22株	300

(注) 大腸菌で調製したpHY300PLKで形質転換した

10

【0028】

▲2▼ ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株の分離

ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株は、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子(yqiT)内部の約0.24kbのEcoRV断片を以下の方法で脱落させることにより分離した。

【0029】

i) ベクター構築(図2、図3)

Jpn. J. Genet. Vol.61, p.515-528に記載された、pHY300PLKの塩基配列を基に、5'-AAAAAGAAATTCCTGTTATAAAAAAG-3'、および、5'-AAAAAGAAATTCCTATTATTGCAATGTGGT-3'の2種のオリゴDNAを調製し、pHY300PLKを鋳型に用い、常法どおりPCRを行い、pHY300PLK上のテトラサイクリン耐性遺伝子全長を増幅すると共に両末端に、制限酵素EcoRIの認識サイトを導入した。得られたDNA断片を制限酵素EcoRIで切断後、プラスミドpHSG399のEcoRIサイトに導入し、プラスミドpHSG399Tを得た。(図3)

20

【0030】

アミノ酸配列のデータベースSWISS-PLLOTに登録されている(登録番号P54531)Bacillus subtilisのロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列を基に、5'-GCCGGATCCATGGAACCTTTTAAATATAT-3'、および、5'-GCCGGATCCCTTAACGTCTGCTTAATACAC-3'の2種のオリゴDNAを合成し、O-2株の全DNAを鋳型に、通常の条件でPCRを行い、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子のオープンリーディングフレーム全長(1095塩基)を増幅すると共に、両端に制限酵素BamHIの認識サイトを導入した。得られた断片をpHSG399のBamHIサイトに導入し、pHSG399yqiTを得た。(図2)

30

【0031】

pHSG399yqiTを制限酵素EcoRVで切断後、アガロース電気泳動した。2本生じるバンドのうち、長いほうのバンド(約3.1kb)をアガロースから回収し、セルフライゲーションし、大腸菌を形質転換することによりpHSG399yqiT上のロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子のほぼ中央部に存在する約0.24kbのEcoRV断片を脱落させたプラスミドpHSG399yqiTΔEcoRVを得た。(図2)

40

【0032】

pHSG399yqiTΔEcoRVをBamHIで切断し、電気泳動後、約0.86kbの断片を回収し(この断片は、中央部の0.24kbEcoRV断片が脱落したロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子)、pHSG399TのBamHIサイトに導入した。得られたプラスミドはpHSG399TyqiTΔEcoRVと命名し、以下の実験に供した。(図3)

【0033】

ii) 形質転換(図4、図5)

50

プラスミド p H S G 3 9 9 T y q i T Δ E c o R V を大腸菌 B M H 7 1 - 1 8 m u t S を宿主にして調製した。本大腸菌は r e c A + 株であるので、p H S G 3 9 9 T y q i T Δ E c o R V の 2 量体が得られる。得られた 2 量体を用いて、納豆菌 r 2 2 株を常法どおりプロトプラスト法により形質転換した。形質転換体の選択は、テトラサイクリン耐性を指標に行った。得られた形質転換体では、染色体上のロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子と p H S G 3 9 9 T y q i T Δ E c o R V 上のロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の間で 1 回又はそれ以上の回数の相同組換えが起こり、p H S G 3 9 9 T y q i T Δ E c o R V が染色体上のロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子に組み込まれている。

【 0 0 3 4 】

複数の形質転換株より全 DNA を調製し、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の増幅に使用した合成 DNA を用い P C R を行った。増幅された断片のパターンをアガロースゲル電気泳動により解析し、各形質転換株で何回組換えが起こっているか確認した。そして、2 回組換えが起こっている株を選択し、y q i T 7 株と命名した。(図 5)

10

【 0 0 3 5 】

iii) 形質導入 (図 5)

上記の形質転換に用いた r 2 2 株よりも、親株である O - 2 株の方が、品質のよい納豆を生産する能力があるため、y q i T 7 上に挿入された p H S G 3 9 9 T y q i T Δ E c o R V を Appl. Environ. Microbiol., Vol.63, p.4087-4089(1997) 記載の、納豆菌ファージ φ B N 1 0 0 を用いた形質導入法 (t r a n s d u c t i o n) により、O - 2 株に導入した。得られた形質導入株を y q i T t 1 株と命名した。

20

【 0 0 3 6 】

iv) 脱落株の選択 (図 5)

y q i T t 1 株上の p H S G 3 9 9 T y q i T Δ E c o R V 挿入は、染色体上で相同組換えが起こると脱落する。そして、脱落した株では、結果として、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子上の 0 . 2 4 k b E c o R V 断片が脱落し、ロイシンデヒドロゲナーゼ遺伝子の欠損株が取得できる。この相同組換えによる脱落株は、テトラサイクリンを含まない栄養培地上中で、約 1 0 世代液体培養する事により、約 0 . 1 % の確率で得られる。得られた株を B a c i l l u s s u b t i l i s B 2 (以下、B 2 株) と命名し、以下の実験に供した。本菌株は、F E R M B P - 6 6 0 5 として、工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託した。

30

【 0 0 3 7 】

v) ロイシンデヒドロゲナーゼの酵素活性

納豆菌 O - 2 株および B 2 株を 1 0 0 m l の肉汁培地 (各 0 . 1 m M のイソ酪酸、イソ吉草酸、2 - メチル酪酸を含む) 入りの坂口フラスコ中で 3 7 °C、振とう培養した。定常期初期 (O D 6 6 0 が約 1) まで菌が生育した時点で、集菌し、1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2、0 . 0 0 2 % β - メルカプトエタノールを含む) に懸濁後、フレンチプレスにて、菌体を破碎した。菌体破碎液を 3 . 5 k r p m、1 5 分遠心分離し、上清を粗酵素液として用いた。

【 0 0 3 8 】

酵素活性は、J. Ferment. Bioeng., Vol.69, p.199-203(1990) に記載の方法に従って測定した。表 3 に結果を示す。

40

【 0 0 3 9 】

【表 3】

表3 ロイシンデヒドロゲナーゼの酵素活性

菌 株	酵素活性 (U/m g 蛋白)
O-2株	0.020
B2株	検出されず

10

【0040】

O-2株では、活性が検出されたのに対し、B2株では、活性が検出されず、B2株がロイシンデヒドロゲナーゼ失活株となっている事が確認された。

【0041】

vi) 短鎖分岐脂肪酸要求性の確認

ロイシンデヒドロゲナーゼが失活すると、分岐アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）から、分岐脂肪酸の合成ができなくなるため、最少培地上での生育に短鎖分岐脂肪酸を要求するようになる（J. Biol. Chem., Vol.246, 5264-5272(1971)）。

【0042】

O-2株およびB2株について、短鎖分岐脂肪酸を生育に要求するかどうかを、短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸、各0.1mM）を含む最少培地および含まない最少培地上で確認した。尚、O-2株は、グルタミン酸を生育に要求するため、最少培地には10mg/lのグルタミン酸ナトリウムを添加した。O-2株は短鎖分岐脂肪酸の有無に関係なく生育したのに対し、B2株は、イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸の3種の短鎖分岐脂肪酸のうち、いずれか1つ以上を添加した培地でのみ生育した。本結果により、B2株が、短鎖分岐脂肪酸合成能を失った短鎖分岐脂肪酸要求株であることが確認された。

20

【0043】

vii) 納豆製造（官能検査、短鎖分岐脂肪酸分析）

B2株を用い、常法に従って納豆を製造し、納豆中の短鎖分岐脂肪酸含量の測定を以下のごとく行った。対照としては、市販の宮城野納豆菌を用いた。

30

【0044】

試作した納豆検体約20gをブレンダーで粉碎した。粉碎した納豆約2gに4倍量の蒸留水を加え、納豆を良く分散させた後、4℃で、約2時間放置し、短鎖分岐脂肪酸を溶出させた。1.5mlのテストチューブに移し、4℃で、15000rpm、10分遠心し、上清を回収した。得られた上清液を0.20μmのセルロースアセテートフィルターで濾過し、HPLCによる短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸）の分析に供した。なお、イソ吉草酸と2-メチル酪酸は、ピークが重なるため、両物質の総和をイソ吉草酸として計算した。結果を表4に記す。

【0045】

40

【表4】

表4 短鎖分岐脂肪酸の定量

発酵菌株	イソ吉草酸*	イソ酪酸
宮城野菌	79.6mg/100g納豆	72.6mg/100g納豆
B 2 株	0.3mg/100g納豆	0.4mg/100g納豆

* : 2-メチル酪酸を含む

10

【0046】

B 2 株を用いて製造した納豆には、短鎖分岐脂肪酸はほとんど含まれていなかった。B 2 株を用いて製造した納豆の品質は、専門のパネラーによる官能検査の結果、外観、糸引きの強さ、味、ともに、宮城野納豆菌を用いて作成した対照と同等のものであった。香りに関しては、独特のムレ臭が抑えられていた。

【0047】

【実施例2】

▲1▼使用菌株等

納豆菌 O - 2 株は、r 2 2 株、大腸菌 B M H 7 1 - 1 8 m u t S、枯草菌ベクター p H Y 3 0 0 P L K、大腸菌ベクター p H S G 3 9 9 及び培地などは実施例 1 と同様に実施した。

20

【0048】

▲2▼ 分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株の分離

分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株は、分岐ケト酸デヒドロゲナーゼオペロン上の E 2 サブユニット遺伝子 (o d b 2) 内部の約 0 . 5 3 k b の C f r 1 0 I 断片を以下の方法で脱落させることにより分離した。

【0049】

i) ベクター構築 (図 6)

Eur. J. Biochem., Vol.213, p.1091-1099(1993)に報告されている B a c i l l u s s u b t i l i s の分岐ケト酸デヒドロゲナーゼオペロン上の E 2 サブユニット遺伝子 (o d b 2) の塩基配列を基に、5' - G C C G G A T C C A T G G C A A T T G A A C A A A T G A C - 3'、および、5' - G C C G G A T C C T T A G T A A A C A G A T G T C T T C T - 3' の 2 種のオリゴ DNA を合成し、O - 2 株の全 DNA を鋳型に、通常の条件で P C R を行い、分岐ケト酸デヒドロゲナーゼの E 2 サブユニットのオープンリーディングフレーム全長 (1 2 7 5 塩基) を増幅すると共に、両端に制限酵素 B a m H I の認識サイトを導入した。得られた断片を p H S G 3 9 9 の B a m H I サイトに導入し、p H S G 3 9 9 o d b 2 を得た。

30

【0050】

p H S G 3 9 9 o d b 2 を制限酵素 C f r 1 0 I で切断後、アガロース電気泳動した。2 本生じるバンドのうち、長いほうのバンド (約 3 . 0 k b) をアガロースから回収し、セルフライゲーションし、大腸菌を形質転換することにより p H S G 3 9 9 o d b 2 上の E 2 サブユニット遺伝子のほぼ中央部に存在する約 0 . 5 3 k b の C f r 1 0 I 断片を脱落させたプラスミド p H S G 3 9 9 o d b 2 Δ C f r 1 0 I を得た。

40

【0051】

p H S G 3 9 9 o d b 2 Δ C f r 1 0 I を B a m H I で切断し、電気泳動後、約 0 . 7 4 k b の断片を回収し (この断片は、中央部の 0 . 5 3 k b の C f r 1 0 I 断片が脱落した E 2 サブユニット遺伝子)、p H S G 3 9 9 T の B a m H I サイトに導入した。得られたプラスミドは p H S G 3 9 9 T o d b 2 Δ C f r 1 0 I と命名し、以下の実験に供した。(図 7)

50

【 0 0 5 2 】

ii) 形質転換 (図 8)

プラスミド p H S G 3 9 9 T o d b 2 Δ C f r 1 0 I を大腸菌 J M 1 0 9 を宿主にして調製した。得られたプラスミドを用いて、納豆菌 r 2 2 株を常法どおりプロトプラスト法により形質転換した。形質転換体の選択は、テトラサイクリン耐性を指標に行った。得られた形質転換体では、染色体上の E 2 サブユニット遺伝子と p H S G 3 9 9 T o d b 2 Δ C f r 1 0 I 上の E 2 サブユニット遺伝子の間で 1 回相同組換えが起こり、p H S G 3 9 9 T o d b 2 Δ C f r 1 0 I が染色体上の E 2 サブユニット遺伝子に組み込まれている。

【 0 0 5 3 】

複数の形質転換株より全 DNA を調製し、E 2 サブユニット遺伝子の増幅に使用した合成 DNA および、市販の M 1 3 用プライマー M 4、RV を用い PCR を行った。増幅された断片のパターンをアガロースゲル電気泳動により解析することにより、E 2 サブユニット遺伝子上の C f r 1 0 I サイトの上流 (5 ' 末端側) で組換えが起こっているのか、下流 (3 ' 末端側) で組換えが起こっているのか確認した。E 2 サブユニット遺伝子の C f r 1 0 I サイトの下流で組換えが起こっている株 1 株を選択し、o d b 2 - 1 株と命名した。

10

【 0 0 5 4 】

iii) 形質導入 (図 8)

上記の形質転換に用いた r 2 2 株より、親株である O - 2 株の方が、品質のよい納豆を生産する能力があるため、o d b 2 - 1 株の遺伝子上に挿入された p H S G 3 9 9 T o d b 2 Δ C f r 1 0 I を Appl. Environ. Microbiol., Vol.63, p.4087-4089(1997) 記載の納豆菌ファージ φ B N 1 0 0 を用いた形質導入法 (t r a n s d u c t i o n) により、O - 2 株に導入した。得られた形質導入株を o d b 2 t 1 株と命名した。

20

【 0 0 5 5 】

iv) 脱落株の選択 (図 8)

o d b 2 t 1 株上の p H S G 3 9 9 T o d b 2 Δ C f r 1 0 I 挿入は、染色体上で重複している E 2 サブユニット遺伝子の 5 ' 末端から C f r 1 0 I サイトの間に相同組換えが起こると脱落する。そして、脱落した株では、結果として、E 2 サブユニット遺伝子上の 0 . 5 3 k b の C f r 1 0 I 断片が脱落し、E 2 サブユニット遺伝子の欠損株が取得できる。相同組換えによる脱落株は、テトラサイクリンを含まない栄養培地上中で、約 1 0 世代液体培養する事により、約 0 . 1 % の確率で得られる。得られた株を B a c i l l u s s u b t i l i s B 5 (以下、B 5 株) と命名し、以下の実験に供した。本菌株は、F E R M B P - 6 6 0 6 として、工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託した。

30

【 0 0 5 6 】

v) 短鎖分岐脂肪酸要求性の確認

分岐ケト酸デヒドロゲナーゼが失損すると、分岐アミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、バリン) から、分岐脂肪酸の合成ができなくなるため、最少培地上での生育に短鎖分岐脂肪酸を要求するようになる (J. Biol. Chem., Vol.246, p.5264-5272(1971)) 。 O - 2 株および B 5 株について、短鎖分岐脂肪酸を生育に要求するかどうかを、短鎖分岐脂肪酸 (イソ酪酸、イソ吉草酸、2 - メチル酪酸、各 0 . 1 m M) を含む最少培地および含まない最少培地上で確認した。尚、O - 2 株は、グルタミン酸を生育に要求するため、最少培地には 1 0 m g / l のグルタミン酸ナトリウムを添加した。

40

【 0 0 5 7 】

O - 2 株は、短鎖分岐脂肪酸の有無に関係なく生育したのに対し、B 5 株は、イソ酪酸、イソ吉草酸、2 - メチル酪酸の 3 種の短鎖分岐脂肪酸のうち、いずれか 1 つ以上を添加した培地でのみ生育した。本結果により B 5 株が、短鎖分岐脂肪酸合成能を失った短鎖分岐脂肪酸要求株であることが確認された。

【 0 0 5 8 】

vi) 納豆製造 (官能検査、短鎖分岐脂肪酸分析)

50

B 5 株を用い、常法に従って納豆を製造し、納豆中の短鎖分岐脂肪酸含量の測定を以下のごとく行った。対照としては、市販の宮城野納豆菌を用いた。

【 0 0 5 9 】

試作した納豆検体約 2 0 g をブレンダーで粉砕した。粉砕した納豆約 2 g に 4 倍量の蒸留水を加え、納豆を良く分散させた後、4 で、約 2 時間放置し、短鎖分岐脂肪酸を溶出させた。1 . 5 m l のテストチューブに移し、4 で、1 5 0 0 0 r p m、1 0 分遠心し、上清を回収した。得られた上清液を 0 . 2 0 μ m のセルロースアセテートフィルターで濾過し、H P L C による短鎖分岐脂肪酸（イソ吉草酸、2 - メチル酪酸、イソ酪酸）の分析に供した。

【 0 0 6 0 】

なお、イソ吉草酸と 2 - メチル酪酸は、ピークが重なるため、両物質の総和をイソ吉草酸をスタンダードとして計算した。結果を表 5 に記す。

【 0 0 6 1 】

【表 5】

表 5 短鎖分岐脂肪酸の定量

発酵菌株	イソ吉草酸 *	イソ酪酸
宮城野菌	79.6mg/100g納豆	72.6mg/100g納豆
B 5 株	1.5mg/100g納豆	3.1mg/100g納豆

* : 2 - メチル酪酸を含む

【 0 0 6 2 】

B 5 株を用いて製造した納豆には、短鎖分岐脂肪酸はほとんど含まれていなかった。

B 5 株を用いて作製した納豆の品質は、専門のパネラーによる官能検査の結果、外観、糸引きの強さ、味、ともに、宮城野納豆菌を用いて作成した対照と同等のものであった。香りに関しては、独特のムレ臭が抑えられていた。

【 0 0 6 3 】

【発明の効果】

本発明により、納豆の不快臭のひとつであるムレ臭の原因物質である短鎖分岐脂肪酸の生産量の非常に低い納豆菌を育種開発する方法が提供され、その方法により開発された短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌を用いて納豆を生産することにより短鎖分岐脂肪酸含量が非常に低くムレ臭の著しく少ない納豆が製造可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】納豆菌における短鎖分岐脂肪酸の合成経路を示す。

【図 2】ロイシンデヒドロゲナーゼ欠損変異株取得の為のベクター構築過程の概略（ 1 ）を示す。

【図 3】ロイシンデヒドロゲナーゼ欠損変異株取得の為のベクター構築過程の概略（ 2 ）を示す。

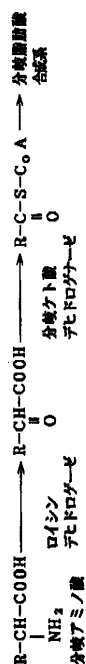
【図 4】ロイシンデヒドロゲナーゼ欠損変異株取得の為の脱落株の構築過程の概略（ 1 ）を示す。

【図 5】ロイシンデヒドロゲナーゼ欠損変異株取得の為の脱落株の構築過程の概略（ 2 ）を示す。

【図 6】分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ欠損変異株取得の為のベクター構築過程の概略（ 1 ）を示す。

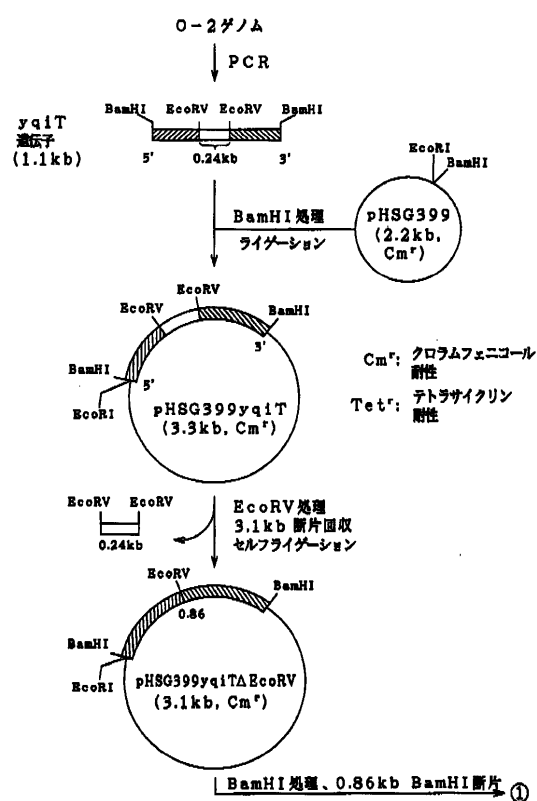
【図 7】分岐ケト酸デヒドロゲナーゼ欠損変異株取得の為のベクター構築過程の概略（ 2 ）を示す。

○

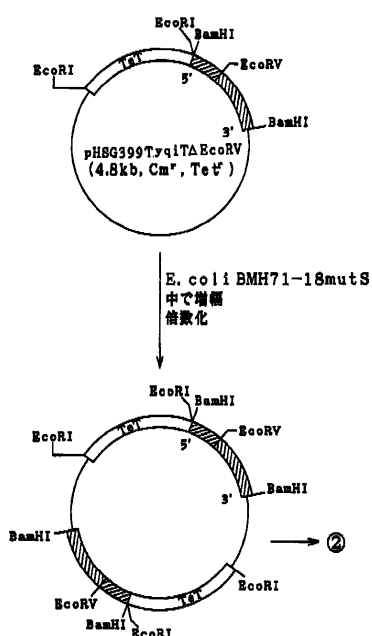
$$\text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \xrightarrow{\text{R}-\text{CH}-\text{COOH}} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \xrightarrow{\text{R}-\text{CH}-\text{COOH}} \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_5 \xrightarrow{\text{R}-\text{CH}-\text{COOH}} \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_5 \xrightarrow{\text{R}-\text{CH}-\text{COOH}} \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_5$$


R	分枝アミノ酸	短鎖分枝脂肪族
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH} - \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	バリン	イソ酪酸
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CHCH}_2 - \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	ロイシン	イソ亮氨酸
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH} - \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{CCH}_2 \end{array}$	イソロイシン	2-メチル酪酸

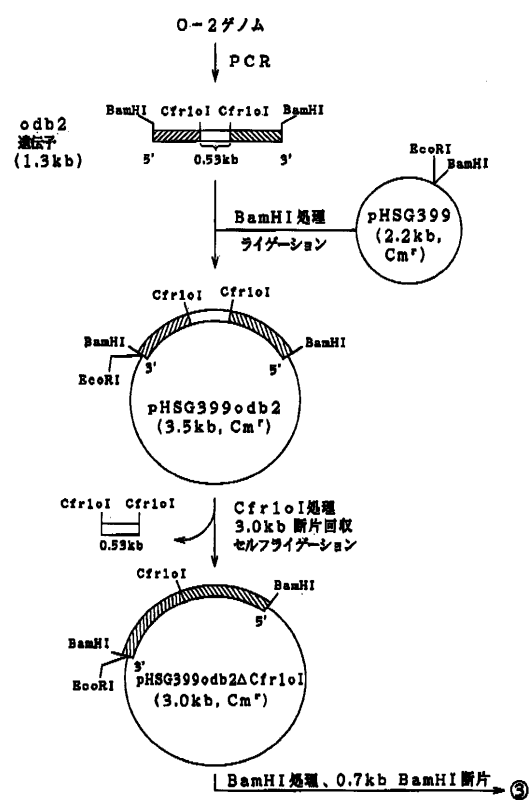
【 圖 2 】



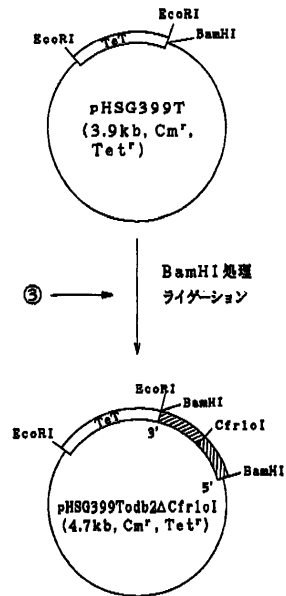
【 図 4 】



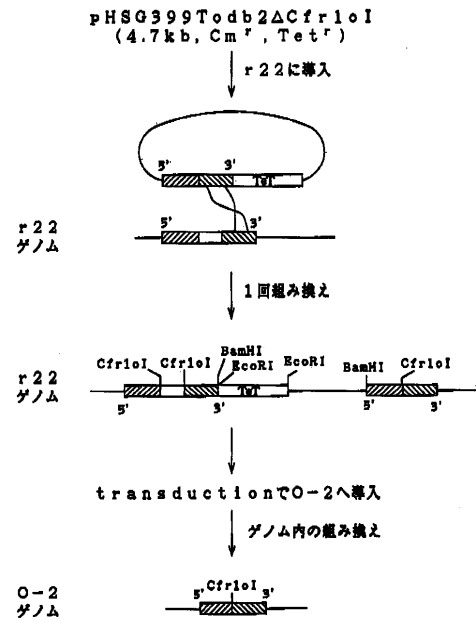
【 図 6 】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特開平06-169719(JP,A)

特開昭63-024870(JP,A)

J. Biol. Chem., 米国, 1971年, Vol.246, No.17, 5264-5272

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/21

A23L 1/20

C12N 15/09

CA(STN)

BIOSIS(STN)