

総説特集 おいしさの基礎、開発、マーケティング - 6

短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の取得と低臭納豆への利用*

竹村 浩**

((株) ミツカングループ本社)

納豆は、短鎖分岐脂肪酸（イソ酪酸、2-メチル酪酸、イソ吉草酸）を含有している。我々は、低臭納豆の商品化をおこなうにあたり、短鎖分岐脂肪酸が納豆の気になる臭いの原因となっているとの仮説を立て、短鎖分岐脂肪酸低含有納豆の開発を試みた。ロイシン脱水素酵素活性を欠損させた納豆菌は、短鎖分岐脂肪酸生成能を欠失していた。この納豆菌を用いて製造した納豆は、短鎖分岐脂肪酸をほとんど含有せず、かつ、低臭納豆としての品質を備えていた。本納豆菌を用いた納豆は、低臭納豆として商品化され、主力製品に育っている。

キーワード：納豆、納豆菌、短鎖分岐脂肪酸、低臭納豆、育種

はじめに

現在、日本には約720社の納豆メーカーがあり、1万種類以上の納豆が存在する。消費者は、これらの多種多様な納豆から自分の好みにあった納豆を自由に選んで食べることができるはずである。しかし、独特の臭いおよび糸引きという納豆そのものが持つ強烈な個性を前にすると、個々の納豆が持つ個性などないに等しいものとなる。そのため、他の納豆に対して差別化された品質を有する納豆は事実上存在しなかった。消費者はそのこと、即ち「納豆は皆同じ」であること、を良く知っており、もっぱら量と値段だけで納豆を選んで購入していた。

我々は、納豆の新製品を開発するにあたり、差別化された品質を有する納豆を開発することを目標とした。そして、納豆の最も大きな特徴の一つである「臭い」をターゲットとした差別化商品の開発を試みた。

本総説では、納豆の商品開発について理解する助けとなるように、納豆製造工程および納豆菌についての基本的な事項を概説し、その後本論の低臭納豆の開発事例について述べる。

1. 納豆の一般知識

1.1. 納豆の製造工程

納豆の製造は、大豆の選別→大豆の浸漬、蒸煮→納豆菌の噴霧、盛り込み→発酵、熟成→検査、包装、出荷という流れで行われる。以下、各工程について簡単に説明する。

1.1.1 大豆の選別

納豆の原料は、大豆と納豆菌であり、納豆菌を発酵の道具と考えるならば、大豆は唯一の原料と言える。大豆は、一部国産のものも使われているが、そのほとんどは、米国、中国等からの輸入品である。納豆生産に適した大豆は、一般に、糖分の含有量が多くて、脂肪分が少ない品種といわれている。しかし、ある大豆が納豆生産に適するかどうかは、納豆を作ってみなければ分からないというのが現実である。多くの大手メーカーでは、大豆の質と数量を確保するために、契約栽培を行っている。

原料として入荷した大豆は、まず選別かけられる。選別には大きく2つの目的がある。その一つは、異物、不良豆の除去である。代表的な異物には、石、植物の種子等があり、不良豆には、割れ豆、皮、変色

*Received June 25, 2001; Accepted July 5, 2001.

Isolation of branched short-chain fatty acids non-producing Natto bacteria and its application to production of Natto with light smells.

**Hiroshi Takemura: Mistukan Group Corporation, 2-6 Nakamura-cho, Handa, Aichi 475-8585, Japan; hitake@mitsukan.co.jp, Fax +81-569-24-5028

豆等がある。選別のもう一つの目的に、大きさの選別がある。納豆の豆は大きさにより、大粒（直径7.9 mm以上）、中粒（7.3-7.9 mm）、小粒（5.5-7.3 mm）、極小粒（4.9-5.5 mm）に分類される¹⁾。現在は、ご飯と一緒に食べたときに良くあうという理由で、小粒、極小粒が主流となっている。

1.1.2 大豆の浸漬、蒸煮

乾物の豆は、水に浸漬して膨潤させられる。浸漬は、通常一晩程度行われ、その過程で豆の重量は、約二倍になる。浸漬が終了した納豆は、圧力釜で蒸煮される。一般には、2-4俵（240-480 kg）の容量を持つ釜が使用される。

浸漬を長く行くと、豆は軟らかく煮上がる。また、蒸煮時間を長く、圧力を高くすると豆は軟らかく煮上がる一方で、煮豆の色が濃くなる。煮豆の硬さ、色をどの程度に仕上げるかは、最終的な納豆の品質と相談して決定される。

1.1.3 納豆菌の噴霧、盛り込み

かつては、納豆の発酵には、藁についている納豆菌が種菌として使用されていた。しかし、現在は、品質を安定させるため、純粋培養した納豆菌が種菌として用いられている。種菌は、蒸煮した煮豆に、1,000-10,000/g 程度噴霧される。種菌が噴霧された煮豆は、PSPトレイや紙カップ等の容器に充填され（盛り込まれ）、更に、たれ、からし等の添付物が投入された後、発酵室へと運ばれる。容器への盛り込みを発酵前に行なうのは、発酵した納豆を容器に充填することが困難なためである。

1.1.4 発酵、熟成

発酵は、35℃-40℃ でおよそ一晩行われ、この間に納豆菌は 1×10^{10} 個/g 程度まで増加する。発酵が進むと、煮豆は納豆に変化する。発酵が不十分だと糸引きが弱くなり、長く発酵しすぎると、アンモニアが発生し異臭の原因となる。どの程度で発酵を終了するかは、品質を見ながら決定することとなる。

発酵が終了すると、納豆は室から出されて、冷蔵庫で熟成される。熟成は、通常1日から数日行われる。室出し直後の納豆は、非常に生臭い感じの臭いがするが、熟成することにより臭いが落ち着いてくる。この間の成分の変化については、知見はない。

1.1.5 検査、包装、出荷

発酵が終了した納豆は、品質検査に供される。検査項目は、官能検査による納豆としての品質の確認、菌検査による雑菌汚染の有無の確認、揮発アンモニアの測定等がある。また、特殊な例としては、我々ミツカングループから発売している特定保健用食品であるビタミン K2 高含有納豆のビタミン K2 含量の検査がある。

検査に合格した納豆は、二次的な発酵を防ぐため低温下（15℃）で包装された後、出荷される。出荷後は、品質保持のため10℃以下で流通される。

1.2. 納豆菌について

納豆は、大豆の煮豆を納豆菌で発酵することによって作られる。従って、納豆菌は、納豆の品質を左右する最も重要な因子の一つである。そこで、納豆菌について簡単に解説する。

1.2.1 分類

納豆菌は、分類学的には枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に属する。枯草菌は、その名の通り、枯れ草、稲わら等に存在する非常に一般的な細菌である。日本では、北海道大学の沢村博士が、納豆菌の純粋培養を行い、*Bacillus natto*. var. *Sawamura* と命名したという歴史的な経緯があり、納豆菌と枯草菌は区別して扱われることが多い⁹⁾。しかし納豆菌と枯草菌には、分類学上意味があるような違いはない。あえて違いを述べるとすれば、ネパネバ、即ちγポリグルタミン酸を菌体外に大量作るという点で納豆菌は、普通の枯草菌と異なる。また、生育にビオチンを要求する点も一つの違いとされている⁹⁾。

一方、納豆菌が、分類学上枯草菌に属するという事実は、納豆菌の育種改良を行う上では非常に重要である。というのは、納豆は日本独特の食品であるため、納豆菌を研究対象として扱っている研究者の数が限られており、納豆菌に関する研究知見も限られたものとなっている。それに対して、枯草菌は代表的なグラム陽性細菌として世界中で遺伝学的、生化学的な研究の対象とされており、納豆菌とは比較にならない量の研究知見が存在する。納豆菌の育種改良を行うにあたっては、これらの枯草菌に関して存在する遺伝学的、生化学的知見が非常に役立つ。

1.2.2 孢子

枯草菌は、孢子を作るという特徴を持つ。当然、納豆菌も孢子を作る。納豆の中にある納豆菌は、栄養細胞と呼ばれる活動中の細胞である。栄養細胞は、その活動に必要な栄養が維持できなくなると孢子になる。孢子は、休眠中の細胞であり、いわば種の状態といえる。孢子は、熱に強く安定であるので、100℃近い高温の煮豆にかけても死なず、冷暗所で簡単に保管できるので、納豆の製造に種菌として使われる。

1.2.3 納豆製造における納豆菌の働き

納豆製造における納豆菌の働きは、煮豆を納豆に変えることにある。この過程、即ち発酵中に、煮豆に含まれる糖、タンパク、核酸等の成分が、ネバ、旨味成分、ビタミン K2、ナットウキナーゼといった納豆独特の栄養素や、ジアセチル、ピラジン、短鎖分岐脂肪酸等の臭いの成分に変換される^{3,8)}。

納豆菌が異なると納豆の品質も変わる。従って、納豆菌の種類を変えたり納豆菌を改良することによって納豆の品質を変えることができる。このことより、納豆の商品開発において納豆菌の選択や改良は非常に有効な手段だと言える。

3.低臭納豆の開発

以下、我々が行った納豆商品開発の事例について述べる。

3.1 納豆市場の特徴

まず、納豆の商品開発を行う上で、納豆市場の特徴を把握することは重要な事項である。図1は、納豆の購入理由についての調査結果である。納豆の購入理由をマルチアンサー形式（選択肢から該当するものを幾つでも選ぶ）で質問すると、「おいしい」、「体によい」、「安い」、「手軽」、「家族が好き」と多くの理由が出てくるが、シングルアンサー形式（選択肢から該当するものを1つだけ選ぶ）では、「体によい」が圧倒的に高い。この結果から、納豆は体によいという理由で購入される、健康イメージ食品であると分かる。これは、納豆市場の大きな特徴の一つである。

図2は、納豆の購入銘柄に関する調査結果である。半分以上の人が購入する銘柄をきめておらず、いつも同じ銘柄に決めているひとは、わずかに6%であった。この結果から、消費者の「納豆は皆同じで品質に大差がない」という意識が浮き彫りになってくる。

納豆購入理由(1999年10月：東阪名：N=450)

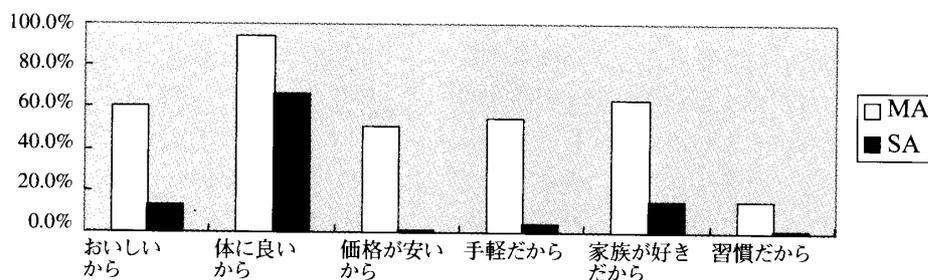


図1 納豆の購入理由。

MA:マルチアンサー、SA:シングルアンサー

納豆の銘柄決定率(首都圏:99年11月:N=151)

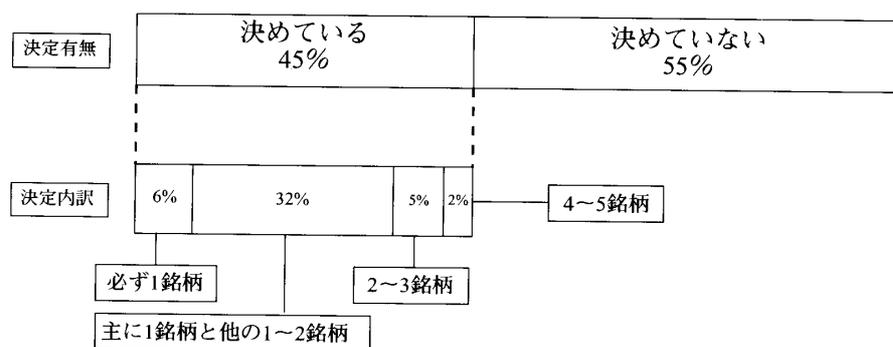


図2 納豆の購入銘柄。

また、その結果起こる「値段の安いものを買う」という消費者の行動が予測される。

図3は、都道府県庁所在地における一世体当たりの納豆購入金額を示したものである²⁾。良く知られているように、近畿地区を中心とした西日本で消費が少なく、関東、東北で消費量が多く、全国的に食されるようになった今日においても納豆が地域色の強い食品であることが分かる。西日本で消費量の少ない理由は、本来食習慣がなかったということもあるが、納豆の臭いが大きな障壁になっていることは周知の通りである。

以上のような納豆市場の特徴をふまえ、納豆の商品開発を行うにあたって以下のような方針を立てた。

まず、商品の切り口としては、西日本に多く存在すると考えられる「体にいいので納豆を食べたいのだが、臭いが苦手」という人を対象とした低臭納豆とした。また、従来の納豆に対して差別化された品質を有する、即ち、明らかに臭いが少ないと分かる納豆を開発することに目標を置いた。さらに、臭いが少ない機構がわかりやすく語れる、セールストークが作りやすい手段で低臭納豆を実現することに留意した。

3.2 納豆の香気成分

納豆臭の原因物質としては、アセトイン、ジアセチル、短鎖分岐脂肪酸、ピラジン類、アンモニア等が報告されており、おそらくこれらの成分が混合されて納豆臭が作り出されると理解されている^{3,8)}。低臭納豆の開発を目的とした研究は過去にもなされており複数の特許出願がなされているが、それらの研究はいずれもアンモニアを発生しにくい納豆菌を開

発するという手法をとっている。しかし、アンモニア臭は、適正な条件で発酵した納豆ではほとんど問題にならない。アンモニアは、発酵管理正しく行われずに過発酵になったり、製造後の保存状態が悪く品温が上昇して2次発酵が起こった場合に大量に発生し、クレームの原因となる。従って、アンモニア臭がしないという品質は、納豆が本来備えているべき基本的な品質であり、他の納豆に対して差別化できる品質とはいえない。そのため、我々は、アンモニア非生産菌の開発という手法はとらなかった。

我々は、納豆の揮発性成分中でも、短鎖分岐脂肪酸、特にイソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸に着目し、その低含有納豆を開発することとした。理由は、いずれも非常に強いかつ一般には不快とされる臭いのする化合物だからである。また、その手段として、短鎖分岐脂肪酸を生産しない納豆菌を開発するという方法をとった。

3.3 短鎖分岐脂肪酸非生産株の取得

納豆菌のイソ酪酸、イソ吉草酸、2メチル酪酸の生合成系については明らかになっていないが、分岐脂肪酸の合成系¹⁰⁾を介してバリン、ロイシン、イソロイシンから合成されたイソブチリル-CoA、イソバレリル-CoA、2-メチルブチリル-CoAが加水分解されて生じると推定される(図4)。

枯草菌においては、分岐アミノ酸の酸化的脱アミノ反応にはロイシン脱水素酵素および分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼが関与していると報告されている¹¹⁾。我々は、まずこの反応に関与する酵素の同定を行った。

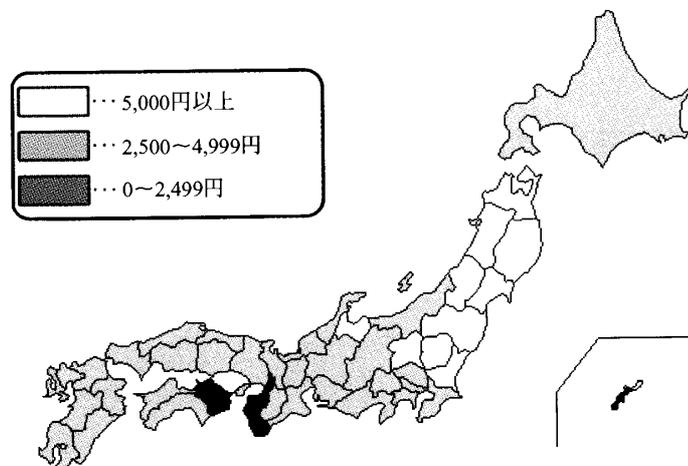


図3 都道府県庁所在地における一世体当たりの納豆購入金額²⁾。

短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の取得と低臭納豆への利用

3.3.1 分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子およびロイシン脱水素酵素遺伝子挿入変異株の分離

ロイシン脱水素酵素と分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼの短鎖分岐脂肪酸生成への関与を調べるために、両酵素遺伝子の破壊株の取得を試みた。手法としては、枯草菌において用いられている相同組み換え法を用いた。納豆菌 r22 株の分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子を破壊した株 (ywaA1) と、ロイシン脱水素酵素遺伝子を破壊した株 (yqiT1) をそれぞれ取得した (図5)。

3.3.2 分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子およびロイシン脱水素酵素遺伝子挿入変異株の短鎖分岐脂肪酸生産能

分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子およびロイシン脱水素酵素遺伝子の破壊が短鎖分岐脂肪酸の生産に及ぼす影響を調べるため、両破壊株の短鎖分岐脂肪酸生産能を調べた。

親株の r22 株、ywaA1 株および yqiT1 株を 100ml ブイヨン培地 (ywaA1 株および yqiT1 株の培地には 2mg/l のテトラサイクリンを添加) を含む 500ml 坂口フラスコで 37℃、24時間培養し、培養液の遠心上清液中の短鎖分岐脂肪酸量を測定した。

その結果、ywaA1 株は親株である r22 株と同等の短鎖分岐脂肪酸を培地中に生産したのに対し、yqiT1 株は r22 株の 1/5 以下しか生産しなかった (表1)。

この結果より、納豆菌においては、ロイシン脱水素酵素が短鎖分岐脂肪酸の合成において分岐アミノ酸の酸化的脱アミノを行う主要な酵素であることが判明した。

3.3.3 ロイシン脱水素酵素遺伝子欠失変異株の分離

yqiT1 株は、外来遺伝子を含む遺伝子組み換え菌であるので (図5) 試食に供するのに適さない。また、r22 株 (O-2株の形質転換効率を上昇させた変異株) は親株である O-2 株に較べて、納豆種菌とした場合、

その納豆品質が劣る。そこで、Stahl らの報告している相同組み換えによる欠失変異株の取得法¹²⁾ および永井らの開発した納豆菌ファージ ϕ BN100 を用いた形質導入法¹³⁾ を利用し、O-2 株のロイシン脱水素酵素遺伝子欠失変異株 B2 を取得した。B2 株は、ロイシン脱水素酵素遺伝子ほぼ中央部に存在する 237bp の EcoRV 断片を欠失しており (図5)、yqiT1 株と同様にロイシン脱水素酵素活性を欠失している (表2)。しかし、yqiT1 株と異なり、ベクター (pHG399 および pHY300PLK) 由来の外来遺伝子は含まない (図5)。

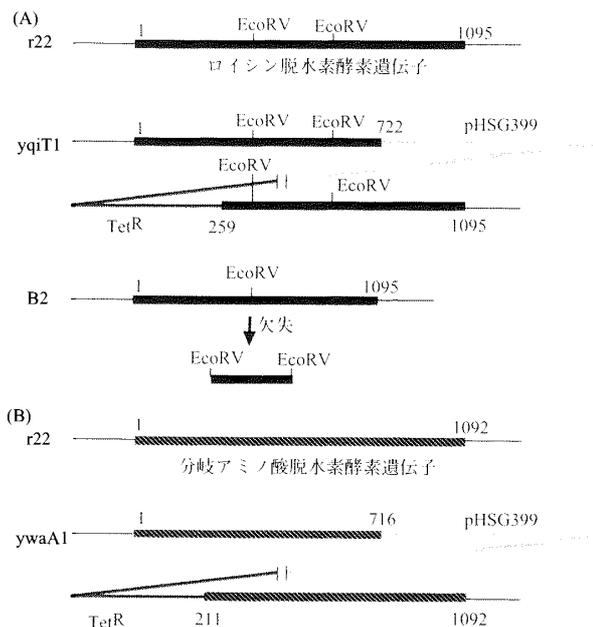


図5 ロイシン脱水素酵素遺伝子および分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼの破壊株の構築。(A) 納豆菌 r22, yqiT1, B2 のロイシン脱水素酵素遺伝子の構造、(B) 納豆菌 r22, ywaA1 の分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子の構造。図中の数字は、各遺伝子の塩基番号。TetR: テトラサイクリン耐性遺伝子。

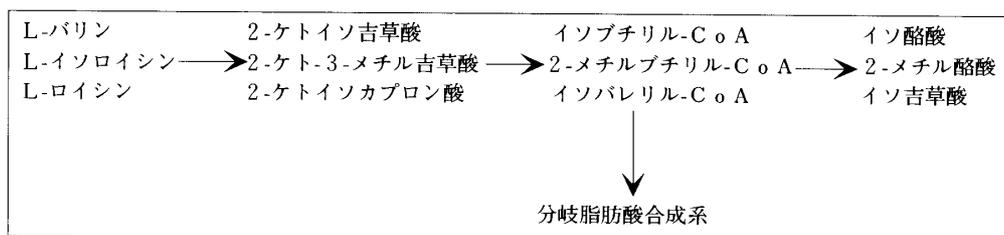


図4 短鎖分岐脂肪酸の推定される合成経路。

表1 'ロイシン脱水素酵素遺伝子挿入変異株、分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼ挿入変異株の短鎖分岐脂肪酸生産量。

菌株	短鎖分岐脂肪酸 (mg/l)		
	イソ酪酸	イソ吉草酸	合計
r22	91.8	176.2	268.0
yqiT1	22.7	25.8	48.5
ywaA1	125.5	162.7	288.1
培地	0.3	3.1	3.4

ブイオン培地、37℃、24時間振とう培養。
イソ吉草酸には2-メチル酪酸が含まれる。

3.3.4 ロイシン脱水素酵素遺伝子欠失変異株を用いて製造した納豆の評価

B2株を用いて製造した納豆の短鎖分岐脂肪酸含量を測定した。その結果、親株の短鎖分岐脂肪酸生産量が70.7mg/100g納豆であったのに対し、B2株で製造した納豆では0.7mg/100g納豆であった(表3)。この結果より、目的通りB2株は短鎖分岐脂肪酸をほとんど生産しないことが確認でき、所期の目的である短鎖分岐脂肪酸低含有納豆の生産が可能になった。

B2株を用いて作った納豆は、親株であるO-2株を用いて作った納豆と同等の外観、糸引き、味、食感等の品質を有しており、納豆として市販するに足りる品質を備えていると判断された。

一方臭いに関しては、O-2株で作った納豆と明らか違いが認められ、納豆の臭いが弱かった。

また、44人のパネラーにより代表的な市販納豆菌である宮城野菌で作った納豆との比較を官能試験で行った。その結果、外観、糸引き、食感、味ともにB2株で製造した納豆は宮城野菌で製造したそれと同等であると評価された。一方、臭いに関しては、B2株は宮城野菌に比べて、臭いが弱く、「香ばしい香り」が相対的に強く、「乳製品のような臭い」および「酸っぱい臭い」が少ないと評価された。この結果より、B2株を用いて製造した納豆は、納豆としての基本的な品質を保持し、かつ目的の「低臭納豆」というコンセプトが実現されていることが確認できた。

3.4 化学変異法による短鎖分岐脂肪酸非生産株の取得

B2株は異種の遺伝子を含まない(図5)遺伝子組み換え菌ではない。しかし、遺伝子組み換え技術を用いて育種した菌である。遺伝子組み換え食品の安全性や表示の問題が議論を呼んでいる今日状況において、健康イメージの強い食品である納豆にこのような納豆菌を用いることに対して、消費者の理解が得られるとは考えにくい。

そのため、通常の変異法を用いて、同様のロイシン脱水素酵素欠損株を分離し直した。

3.4.1 ロイシン脱水素酵素欠損変異株の取得

Willeckeらは、分岐脂肪酸合成系の酵素である分岐ケト酸脱水素酵素を欠損した枯草菌は生育に短鎖分岐脂肪酸を要求することを報告している¹⁴⁾。ロイシン脱水素酵素欠損株であるB2株も同様に短鎖分岐脂肪酸を生育に要求する。

そこで、短鎖分岐脂肪酸非存在下で生育できない変異株を選択することによりロイシン脱水素酵素欠損変異株を取得する事とした。

NTG変異処理したO-2株、18896コロニーを最少培地プレートおよび短鎖分岐脂肪酸(イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸、各0.1mM)を添加した最少培地にレプリカし、115株の短鎖分岐脂肪酸要

表2 ロイシン脱水素酵素活性。

菌株	mU/mg蛋白
O-2	52
r22	84
yqiT1	<2
B2	<2
N46	<2
N64	<2
N103	<2

表3 納豆中の短鎖分岐脂肪酸含量。

菌株	短鎖分岐脂肪酸 (mg/100 g)		
	イソ酪酸	イソ吉草酸	合計
O-2	40	30.7	70.7
B2	0.3	0.4	0.7
N46	検出されず	検出されず	検出されず
N64	2	2	4
N103	0.6	0.4	1

イソ吉草酸には2-メチル酪酸が含まれる

短鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の取得と低臭納豆への利用

求性変異株を選択した。

得られた115株のうち納豆製造適性を有していた32株についてロイシン脱水素酵素活性を測定し、3株(N46、N64、N103)がロイシン脱水素酵素活性を欠失していることを確認した(表2)。

3.4.2 化学変異により取得したロイシン脱水素酵素遺伝子欠失変異株を用いて製造した納豆の評価

得られた3株を用い納豆を製造し、納豆中の短鎖分岐脂肪酸を測定した(表3)。

3株とも親株であるO-2株に比べて、短鎖分岐脂肪酸の生産量が顕著に減っていた。但し、その減少の度合いに差があり、N46株、N103株は短鎖分岐脂肪酸生産能をほぼ完全に欠いているのに対し、N64株は短鎖分岐脂肪酸を少量生産した。しかし、その生産量は、親株であるO-2株に比べれば顕著に減少していた。

N46株、N64株、N103株を用いて製造した納豆は、官能検査の結果、いずれもB2株を用いて製造した納豆と、臭いの少なさ、外観、糸引き、食感、味ともに同等の品質を有していると評価された。このことより、目的通り、突然変異によりB2株と同等の低臭納豆菌が育種できていることが確認できた。

そして、さらに上記の3株について、納豆の品質を総合的に評価した結果、N64を最終的に選択した。

3.5 商品への応用

低臭納豆の商品化にあたって、マーケティング部門において商品コンセプトの再整理が行われた。納豆菌の開発時に想定していた西日本の納豆の臭いが苦手の消費者層がターゲットでは、市場が小さいとの判断された。そして、納豆の臭いは苦手ではないが、納豆を食べた後の口臭が気になるヘビーユーザーが多く存在することを調査により明らかにし、気になる臭いを抑えた納豆として、これらのヘビーユーザーを対象にした商品として発売した。

発売から既に1億食以上売り上げているが、納豆臭いというクレームは頂いておらず、低臭納豆というコンセプトが具現化されていることが、市場においても検証されている。

文 献

- 1) 納豆試験法研究会：原料大豆の試験法。納豆試験法 第1版(豆試験法研究会編)。光琳、東京 p.1-14 (1990)。

- 2) 総務庁統計局：家計調査年報 325 (1999)
- 3) 小幡弥太郎、俣野影典：納豆香気に関する研究(第一報)。農化 33, 567-569 (1959)
- 4) 小幡弥太郎、俣野影典：納豆香気に関する研究(第二報)。農化 33, 569-571 (1959)
- 5) 菅野彰重、高松晴樹、高野伸子：納豆菌が生産する市販納豆中の揮発性代謝産物の定量。日食工誌 31, 587-595 (1984)
- 6) 伊藤哲雄、菅原悦子、櫻井米吉、武山進一、内沢秀光、小田切敏：納豆菌によるピラジン類生成の培地組成について。農化 61, 963-965 (1987)
- 7) Sunagawa E, Ito T, Odagiri S, Kubota K and Kobayashi A: Comparison of compositions of odor components of natto and cooked soybeans. *Agric. Biol. Chem.* 49, 311-317 (1985)
- 8) Tanaka T, Muramatsu K, Kim HR, Watanabe T, Takeyasu M, Kanai Y and Kiuchi K: Composition of volatile compounds from chungkuk-jang and itohiki-natto. *Biochem. Biotech. Biochem.* 62, 1440-1444 (1998)
- 9) Hara T, Shiraishi A, Fujii H and Ueda S: Specific host range of *Bacillus subtilis* (natto) phages associated with polyglutamate production. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2373-2374 (1984)
- 10) 屋宏典：栄食誌 49, 259 (1996)
- 11) Oku H, Fujita K, Nomoto T, Suzuki K, Iwasaka H and Chinen I: NADH-dependent inhibition of branched-chain fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biotech. Biochem.* 62, 622-627 (1998)
- 12) Stahl ML and Ferrari E: Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an in vitro-derived deletion mutant. *J. Bacteriol.* 158, 411-418 (1984)
- 13) Nagai T and Itoh Y: Characterization of a generalized transducing phage of poly- γ -glutamic acid-producing *Bacillus subtilis* and its application for analysis of Tn917-LTV1 insertional mutants defective in poly- γ -glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4087-4089 (1997).
- 14) Willecke K and Pardee A B: Fatty acid-requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain α -keto acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 246, 5264-5272 (1971).

<著者紹介>

竹村 浩（たけむら ひろし）氏略歴

- 1988年 3月 大阪大学大学院工学研究科博士前期課程終了（発酵工学専攻）
- 1988年 4月 （株）中埜酢店入社
- 1990年 4月 東京大学農学部へ受託研究員として派遣
- 1992年 4月 （株）バイオ・ポリマーリサーチへ出向
- 1993年12月 博士（農学）（東京大学）
- 1996年 4月 （株）中埜酢店へ帰任
- 1998年12月 （株）ミツカングループ本社（社名変更の為）、現在に至る

