

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 を用いた細胞融合法と育種法による耐熱性食酢菌の創出と田村造酢（株）監修による食酢醸造試験

岡本 成平^{1*}、山本 美佳^{2*}、塩村 紗奈²、熊田 彩花²、状家 佳苗²、
上野 未菜子²、田村 章広³、武部 聡^{1、2}、東 慶直^{1、2}

要旨

発酵産業はビールやヨーグルト、醤油や食酢といった食品生産だけではなく、医薬品や工業製品の原料生産も含む巨大産業である。その近代的な生産現場においては高い生産性を維持するために、発酵熱による発酵槽の過高温を抑制する大規模な冷却装置が導入され、徹底した温度管理が行われている。一方、伝統的発酵産業では、その過高温が原因となり醸造菌の増殖停止や死滅が発生することもあり、夏期には醸造を休止するところも多い。本研究では、発酵生産時の冷却コスト（つまりはCO₂の排出）の削減と高温発酵による生産効率の向上を目的として、食酢醸造における優占種である *Acetobacter pasteurianus* を利用し、育種法と細胞融合法を用いて食酢合成能を有する耐熱性酢酸菌株の開発とその耐熱性発酵菌の社会実装にむけた無冷却高温発酵実験を実施した。

育種法には *A. pasteurianus* NBRC 3283 から分離された Ap32 株（食酢合成能あり、常温性）を用いて、生育限界温度を超えて増殖が可能な耐熱性育種株 MU 株を樹立した。さらに MU 株を高濃度エタノール存在下で繰り返し静置培養することにより、高い食酢合成能を有する耐熱性育種株（JK 株）の獲得に成功した。細胞融合法では Ap32 株と耐熱性育種株 Ap01/42C 株（食酢合成能なし）を細胞融合し、食酢合成能を有する耐熱性細胞融合株（mika 株）の樹立に成功した。酢酸菌を用いた育種法では、生育限界温度という多因子性形質に対する酢酸菌の高い柔軟性（ゲノム易変異性）が再確認された。今後はゲノム解析による耐熱性形質を付与する遺伝子群の同定を進める。また、細胞融合法では遺伝子組換えに頼らない簡便な形質導入法の開発に繋がる可能性を示すことができた。一細胞ゲノム解析などの技術を利用し、細胞融合及びゲノム融合の動的解析を進めたい。

発酵槽に冷却装置を設置しない伝統的な食酢醸造を行う田村造酢（株）では、発酵熱により発酵槽が過高温となるため猛暑期には食酢醸造は行われない。そこで耐熱性発酵菌の社会実装にむけた無冷却高温発酵実験として、2014年の8月と9月に JK 株と mikka 株を用いた 250 L 大型発酵試験と JK 株を用いた日本酒を原料とする 320 L 食酢醸造試験を行った。いずれの発酵実験においても酢酸度は目標となる数値まで上昇した。しかし、2014年の夏は異常な冷夏であり、田村造酢（株）の種菌を用いた場合でさえも発酵槽の過高温は発生せず、耐熱性菌の耐熱性形質が発揮される条件は得られなかった。耐熱性発酵菌の社会実装にむけて、耐熱性形質の有効性を確認するための無冷却高温発酵実験を引き続き計画している。

キーワード：酢酸菌、高温耐性、細胞融合、育種、食酢醸造

原稿受付 2014年12月2日

本研究は近畿大学大学院生物理工学戦略的研究（平成26年13-IV-14）の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻，〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部食品安全工学科，〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 田村造酢株式会社，〒649-7113 和歌山県伊都郡かつらぎ町妙寺 285

*両著者はこの研究に等しく貢献した。

1. 緒論

発酵産業で用いられる醸造環境は発酵微生物にとって多種多様なストレスの原因となり、増殖や発酵の停止、時として微生物の死滅に至ることもある。従って近代的な発酵事業では様々なストレスを軽減する発酵管理が行われる。日本の食文化に欠くことの出来ない食酢の醸造では、環境要因を原因とするストレスのなかでも最も注意が払われるべきは発酵熱による発酵槽の過高温化である。その対策として、つまり効率的な食酢生産の維持と酢酸菌の死滅を防ぐことを目的として、発酵槽の厳密な温度管理が行われる。これには多大な冷却エネルギーを必要とし、すなわち CO₂ の排出の原因となっている。同様に酢酸発酵では基質であるエタノールや産物としての酢酸が、酢酸菌にとって重大なストレスとなる。これらのストレスに対する耐性を有する発酵微生物の創出は、冷却コストの削減、CO₂ の排出量の抑制、発酵産業の乏しい熱帯・亜熱帯地域での発酵産業の振興に繋がると考えられる。また、地球温暖化の進行を食い止める対策が遅々として進まない中、伝統的発酵産業を堅持するためにも発酵菌の耐熱化は重大な課題である。

食酢醸造法には、大きく分けて3つの方法、表面発酵法と深部発酵法、固定化発酵法がある。深部発酵法や固定化発酵法は近代的な食酢発酵法であり、アセテーターといった大型発酵装置を利用し高効率な酢酸発酵を行うことで食酢の大量生産・大量消費を可能としている。表面発酵法は古くから世界中で行われている酢酸発酵法で、世界各地の食酢醸造所で伝統的な特色のある食酢の生産に使用されている方法である。この表面発酵法では酢酸菌が液表面上にチリメン状の菌膜を形成し好氣的な酢酸発酵を行う。つまり、表面発酵法では酢酸菌の菌膜形成能は酢酸発酵に必要不可欠な形質である⁽¹⁾。酢酸菌が行うこの好氣的な酢酸発酵は、ペリプラズム層に局在する2種類の酵素複合体によって実行される。まず、ピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とする膜結合型アルコール脱水素酵素(PQQ-ADH)によって、基質となるエタノールが酸化されアセトアルデヒドとなる。続いてモリブドプテリンシチジンヌクレオチド(MCD)を補酵素とする膜結合型アルデヒド脱水素酵素(MCD-ALDH)によって、アセトアルデヒドが酸化され酢酸が生成される⁽²⁾。食酢醸造槽中のエタノールやアセトアルデヒド、酢酸は極めて高い抗菌活性を有し、これらのストレスに対する高い耐性が酢酸菌の形質的特徴となっている。

しかし、酢酸菌の菌膜形成能やエタノール資化能などの形質は、培養を繰り返すと容易に欠失してしまうことが知られている⁽³⁾。日本の食酢醸造槽から分離された *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 を用いて、そのゲノム解析に基づくゲノム易変異性の解析がなされた⁽⁴⁾。まず、そのゲノムに存在する総遺伝子の約9%がトランスポゾンであり頻りに遺伝子を破壊している様子が観察された。また、6個のプラスミドが存在し培養条件によっては欠失しやすいことと極めて易変異性の繰り返し配列がゲノムに存在することが明らかとなった。さらに、複製時の修復に係わる因子にも変異が確認されている。これらが酢酸菌の易変異性の遺伝的背景となっていると考えられる。一方、このゲノムの易変異性を利用して、耐熱化育種が行われた。*A. pasteurianus* NBRC 3283 から分離されたジェノタイプの異なる7株のうち、菌膜形成能を示さず生育限界温度が39°Cである Ap01 株を親株として、段階的に高温度環境下で培養を繰り返すことにより、生育限界温度が42°Cである耐熱性育種株 Ap01/42C 株が樹立された⁽⁴⁾。酢酸菌の特徴としてのゲノム易変異性は、すなわち柔軟な環境適応能力と言い換えることが可能であることを示している。

ところで、微生物の形質改良には伝統的に行われてきた育種法と遺伝子組換え法がある。育種法は、遺伝子組換え法と比較して、食品利用における法律上の制限と安全性への懸念・心的抵抗が小さい。一方で、各事業者の多様な発酵生産を維持する場合、遺伝子組換え法に比べて育種法では微生物の形質転換に多大な労力が必要となる。そこで、遺伝子組換え法に代わる高い汎用性と多様性維持を可能とする方法であり、育種法と同様に多因子性の形質の変化を期待できる細胞融合法によって耐熱菌の創出を試みた。本研究では、Ap01 株と Ap01/42C 株に加え、*A. pasteurianus* NBRC 3283 から分離された Ap01 株と異なるジェノ

タイプの Ap32 株を細胞融合法^(5,6)と育種法^(4,7)に供与し、耐熱性食酢醸造株の創出を行った。さらに、獲得した耐熱性食酢醸造株の社会実装を目指し、実験室外における大型食酢発酵実験を実施した。

2. 材料と方法

2. 1 菌株

Acetobacter pasteurianus IFO 3283-01 (Ap01) (NBRC 105184)と *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-32 (Ap32) (NBRC 105190)は *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 から分離されたジェノタイプの異なる株であり、*Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-01/42C (Ap01/42C) (NBRC 105185)は Ap01 株から耐熱育種された株である。以上の酢酸菌及び、*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 101557 (醸造協会酵母 7 号)は National Biological Resource Center of Japan (NBRC) から分譲された。田村造酢株式会社で使用されている酢酸発酵の種菌は、複数の菌種が混合されたものだと考えられており、当該会社で保管されている。

2. 2 試薬

酢酸と寒天粉末、D-グルコース、エタノール、グリセロール、硫酸マグネシウムはナカライテスクから、麦芽抽出物とトリプトン、酵母抽出物は Becton Dickinson から、乳酸とポリエチレングリコール (PEG) 4,000 は和光純薬工業から、鶏卵白由来リゾチームとリン酸緩衝食塩水(10×PBS)は SIGMA から、Pure gene Yeast/Bact kit は QIAGEN から、 α 化米 AA-70 と乾燥麴 T-90 は徳島製麴株式会社から購入した。

2. 3 培養条件

酢酸菌の通気培養には、YPGD 液体培地 (1.0% 酵母抽出物、1.0% トリプトン、2.0% グリセロール、0.5% D-グルコース) 5 mL を 18 mm 径試験管に入れて植菌した後、多孔性シリコン栓により通気を確保し、30°C で震盪培養 (200 rpm) した。高温環境下での菌膜形成培養には、500 mL 容ビーカーに YPGD 液体培地 200 mL を入れて植菌した後、アルミ箔で上部を覆い、41°C で静置培養を行った。

2. 4 細胞融合法による耐熱性菌膜形成株の樹立

2. 4-1 プロトプラストの作製

YPGD 液体培地 5 mL で前培養した Ap01/42C 株と Ap32 株を、それぞれ 500 mL 容三角フラスコに入れた YPGD 液体培地 100 mL に植菌し、30°C で 200 rpm で震盪培養した。OD₅₉₅ 値が Ap32 株で 1.08、Ap01/42C 株で 0.72 の時に、それぞれの培養液を 50 mL を、8,400 × g で 10 分間、4°C で遠心分離し集菌した。菌体を 2 倍濃度の PBS (2×PBS、pH 約 7.4、溶質 Na⁺, 145 mM; K⁺, 4 mM; PO₄²⁻, 10 mM; Cl⁻, 150 mM) 5 mL で懸濁し、再び 8,400 × g、10 分間、4°C で遠心分離することにより洗浄した。この操作をさらに 1 回行い、最終的に 2×PBS 4 mL により各々の菌体を懸濁し、これをリゾチーム処理用の細胞懸濁液とした。

リゾチーム処理によるプロトプラスト化に必要な時間の検定は、10 mg/mL リゾチーム 60 μ L をリゾチーム処理用の細胞懸濁液 3.0 mL に添加し 37°C に静置し、15 分毎に試料 37.5 μ L を超純水 337.5 μ L と 2×PBS 375 μ L のそれぞれに加え、顕微鏡で観察するとともに、分光光度計を用いて OD₅₉₅ を測定した。ネガティブコントロールとして細胞懸濁液 1.0 mL をリゾチーム未処理のまま 37°C に静置した。

プロトプラスト化率と細胞壁の再生率の検定には、細胞懸濁液 3.0 mL に 10 mg/mL リゾチーム 60 μ L を添加し 37°C で 1 時間処理することにより作製したプロトプラストを用いた。プロトプラスト化率の測定には、プロトプラスト化試料とネガティブコントロールからそれぞれ 0.1 mL を分注し、超純水 0.9 mL で希釈し、30°C で 4 時間静置した。細胞壁の再生率の検定のためには、プロトプラスト化試料 0.1 mL を YPGD 液体培地 0.9 mL で希釈し、30°C で 4 時間静置した。両検定とも、そのあと各試料を超純水で 10 倍毎に 10

倍から 10^5 倍に希釈し、 $5 \mu\text{L}$ ずつ YPGD 寒天培地に滴下し、 30°C で 2 日間培養した。CFU (Colony Forming Unit) からプロトプラスト化率と細胞壁の再生率を導いた。

2. 4-2 細胞融合とジェノタイプング

細胞融合はプロトプラスト-PEG 法に則った⁽⁸⁾。まず、4-1 と同様に Ap01/42C 株と Ap32 株の細胞懸濁液 3.0 mL に 10 mg/mL リゾチーム $60 \mu\text{L}$ を添加し 1 時間 37°C に静置し、プロトプラストを作成した。2 菌のプロトプラストを $250 \mu\text{L}$ ずつ氷上で混和し、遠心分離により ($1,960 \times g$ で 10 分間、 4°C) 細胞を沈殿させた上で、上清 $400 \mu\text{L}$ を取り除き、残りの上清を用いて再び細胞を懸濁した。そこに PEG 20% 水溶液 $300 \mu\text{L}$ を加え、1 分間室温で静置し細胞融合処理とした。さらに YPGD 液体培地 $300 \mu\text{L}$ を加え、 30°C で 4 時間静置培養することにより細胞壁の再生を促した。細胞壁の回復処理を終えた試料 $7 \mu\text{L}$ を 1% 酢酸と 1% エタノールを加えた YPGD (A1%, E1%) 液体培地 5 mL に植菌し、 42°C で 30 日間静置培養した。菌膜形成が見られたサンプルから菌膜を回収し、 200 mL の YPGD (E1%, A1%) 液体培地を用いて 42°C で静置培養し、形成された菌膜を mika_f7-1 株とした。さらに、mika_f7-1 株を 200 mL の YPGD (E1%, A1%) 液体培地で培養した後、YPGD (E2%, A1%) 液体培地を用いて 42°C で静置培養を 2 回繰り返し、得られた菌膜を耐熱性食酢醸造用 mika_f7-2 株として 250 L 大型発酵試験に用いた。

細胞融合株のジェノタイプングには、mika_f7-1 株の菌膜から QIAGEN 社の Pure gene Yeast/Bact kit を用いて、添付されたプロトコルに従いゲノム DNA の抽出を行った。Ap32 株及び Ap01/42C 株の 2 菌間のゲノムに存在する 5 ヶ所の変異点を鑑別するためのプライマーを作製し、Ap32 株及び Ap01/42C 株を対照として PCR を行った。PCR にはタカラバイオ社の TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch を用い、酵素には $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性をもたない Promega 社の Taq DNA Polymerase を用いた。その PCR は 95°C 5 分間の処理の後、(95°C 、30 秒) - (58°C 、30 秒) - (74°C 、2 分) のサイクルを 25 回実行した。PCR 産物の存在と大きさの解析は、1% 精製アガロース/TAE を用いた電気泳動 (100 V 、30 分) により行った。

2. 5 Ap32 の高温適応育種による MU03'-01 株の樹立と菌膜形成及びエタノール耐性育種

菌膜形成能をもつ Ap32 株の高温適応育種には、まず Ap32 株を YPGD 寒天培地上で生育限界温度である 39°C で増殖させた後、YPGD 寒天培地を用いて 40°C で培養した。出現した 3 個のコロニー (MU01, MU02, MU03) を YPGD 液体培地に植菌し 40°C で培養し、さらに同様に 3 回継代培養した。3 回目の継代培養で MU03 株を MU03 株と MU03' 株に分けた。これらの MU01 株と MU03 株、MU03' 株を YPGD 液体培地に植菌し 41°C で 6 回継代培養し、さらに YPGD 液体培地を用いて 42°C で 4 回継代培養した。これら培養液から YPGD 寒天培地を用いて 42°C で MU01-1 株、MU01-2 株、MU03-2 株、MU03'-1 株、MU03'-2 株を分離した。YPGD 寒天培地を用いて 30°C 、 42°C 、 43°C 環境下で培養を行い生育限界温度の確認を行った。この 6 株を 1% 酢酸添加 YPGD (E0%, A1%) 液体培地によって 42°C で培養し、最も菌膜の形成能が高い MU03'-01 株を用いて、菌膜形成及びエタノール耐性育種を行った。この育種には、YPGD (E0%, A1%) 液体培地に添加するエタノール濃度を 1% から 1% ずつ上昇させ、最終的に YPGD (E3%, A1%) 液体培地において 42°C で増殖し菌膜を形成する耐熱性食酢醸造用 JK_02 株を樹立した。

2. 6 250 L 大型発酵試験

250 L の大型発酵試験は、断熱材として 30 mm 厚の発泡材で全面を覆ったポリプロピレン製の 400 L の水槽 (底面 $1295 \text{ mm} \times 860 \text{ mm}$ 、高さ 457 mm) を田村造酢 (株) の醸造蔵内に設置し実施した。まず、田村造酢 (株) 敷地内の井戸からくみ上げた未精製で未殺菌の井水 150 L を発酵槽に入れ、必要な培地試薬を溶解したうえで、 85°C の熱水を 50 L を加え水温を 38°C とした。最終的に、酢酸発酵培地 (0.5% 酵母抽出物、0.5% トリプトン、0.5% グル

コース、1% 酢酸) 200 L を一次仕込みとした。そこに酢酸発酵の基質として、細胞融合による mika_f7-2 株用には 2%エタノール、育種した JK_02 株用には 3%エタノールを加えた。

一方、種菌は近畿大学生物理工学部食品安全工学科食品ゲノム解析室において、mika_f7-2 株は 200 mL の YPGD(E2%, A1%)液体培地を用いて、JK_02 株は 200 mL の YPGD (E3%, A1%) 液体培地を用いて 41°Cで 3 日間の培養により準備した。その培養液を田村造酢(株)まで輸送し、mika_f7-2 株の培養液 10 mL を 100 mL の YPGD (E2%, A1%)液体培地に、JK_02 株の培養液 10 mL を 100 mL の YPGD (E3%, A1%) 液体培地に植菌し、41°Cで 3 日間の前培養を行った。十分な菌膜形成を確認した後、菌膜の全てを 200 L の酢酸発酵培地に植菌した。

発酵開始 4 日目に水温の低下による活性の低下を防ぐことを目的として、mika_f7-2 株では 2%エタノールと 1% 酢酸を含む 80°Cの溶液 50 L を、JK_02 株では 3%エタノールと 1%酢酸を含む 80°Cの溶液 50 L を加え、総量 250 L の培地の水温を再び 38°Cとした。酢酸発酵の確認のために 1 日毎に 10 mL のサンプリングを行い、今後の成分解析用に保存した。酢酸度の計測は農林水産省が定めた醸造酢の日本農林規格に記載されている中和滴定を利用した酢酸度測定方法⁹⁾に則り定期的に行った。また菌膜形成を確認するためにカメラにより培地表面を観察記録した。培地表面温度及び室温の記録には Thermo Recorder (TR-71wf)を設置し 5 分毎の温度を測定記録した。

2. 7 食酢原料用純米酒風アルコール含有培地(日本酒)の作製

醸造協会酵母 7 号を、前培養として YPDM 液体培地 (0.3%酵母抽出物、0.5%トリプトン、1.0%グルコース、0.3%麦芽抽出物) 2 ml に植菌し、30°C、200 rpm で 18 時間振盪培養した。本培養として 1 L 容三角フラスコ 2 個にそれぞれ YPDM 液体培地 500 ml を入れ、前培養液を 1 ml ずつ植菌し、30°C、200 rpm で 3 日間振盪培養した。この後使用される水にはすべて、田村造酢(株)の井水を用いた。酒母の仕込みとして、70 L 容発酵桶に水 4.1 L と α 化米 2.0 kg、乾燥麴 1.0 kg、本培養液全量 1.0 L を混合し 20°Cで 1 時間静置した後、乳酸 29.3 mL を混合し 20°Cで 3 日間発酵させた。初添として、新しい 70 L 容発酵桶 2 個それぞれに水 7.1 L と乾燥麴 1.3 kg、 α 化米 3.0 kg を混合し、酒母を発酵桶 2 個に等量ずつ混合し 20°Cで 2 日間発酵させた。留添として、新しい 70 L 容発酵桶を 5 個用意し、それぞれに水 17.2 L と乾燥麴 1.7 kg、 α 化米 6.1 kg を混合し、初添を等量ずつ混合し 25°Cで 10 日間発酵させた。この醪(もろみ)を日本酒搾り用の綿製の布袋に注ぎ、日本酒を 25°C一晩かけて自然落下させた。さらに圧搾により日本酒を分離した。これら搾り出された日本酒を合わせて一番搾りとした。布袋に残った酒粕を水 20 L に溶かし、25°Cで 1 晩発酵させた後、一番搾りと同様にこの発酵液から日本酒を搾り、二番搾りとした。この一番搾りと二番搾りを混合した合計 120 L の日本酒を 63°Cで 2 時間加温し殺菌処理した後、食酢醸造試験に用いた。本実験における日本酒の製造は、和歌山税務署酒類指導官部門および経済産業省近畿経済産業局アルコール室の指導を受け、適切な方法で実施された。

2. 8 320 L 食酢醸造試験

JK_02 株をさらに YPGD (E3%, A1%) を用いて 41°Cで 2 回継代培養し得られた JK_03 株と田村造酢(株)で柿酢醸造に用いられている食酢醸造用種菌を用いて食酢醸造試験を行った。前培養の準備方法は 2. 6 250 L 大型発酵試験と同様である。本実験に使用する発酵槽は 2. 7 で用いた 2 つの発酵槽を十分に洗浄した後に滅菌することなく使用した。

発酵槽それぞれに作製した日本酒 60 L と田村造酢(株)の井水 100 L を加え、さらにそれぞれに 79°Cの熱水を 80 L 加えることにより、38°Cの食酢醸造用原料 240 L を準備した。さらに、酵母抽出物を 0.3%、硫酸マグネシウムを 0.01%になるように添加した。発酵開始 4 日目に水温の低下による活性の低下を防ぐため、1% 酢酸と 3%エタノールを含んだ 85°Cの溶液 80 L を加え、水温を再び 38°Cとした。サンプリング及び実験記録の方法は「2. 6 250 L 大型発酵試験」と同様である。

3. 結果

3. 1 耐熱性育種株 Ap01/42C と菌膜形成株 Ap32 の細胞融合による耐熱性菌膜形成株の樹立

3. 1-1 プロトプラスト化率と再生率の検定

2 種類の菌株が有する異なる有用形質を迅速にかつ能動的に組み合わせ新規有用微生物を創出することを目的に、プロトプラスト-PEG 法に則った細胞融合法の開発を試みた。まず、本実験では、菌膜形成能はないが耐熱性を有する *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-01/42C (Ap01/42C 株) と菌膜形成能は有するが非耐熱性である *A. pasteurianus* IFO 3283-32 (Ap32 株) の 2 株を有用形質のドナーとして選択し、細胞融合により菌膜形成能を有する耐熱性 *A. pasteurianus* の創出を行った。

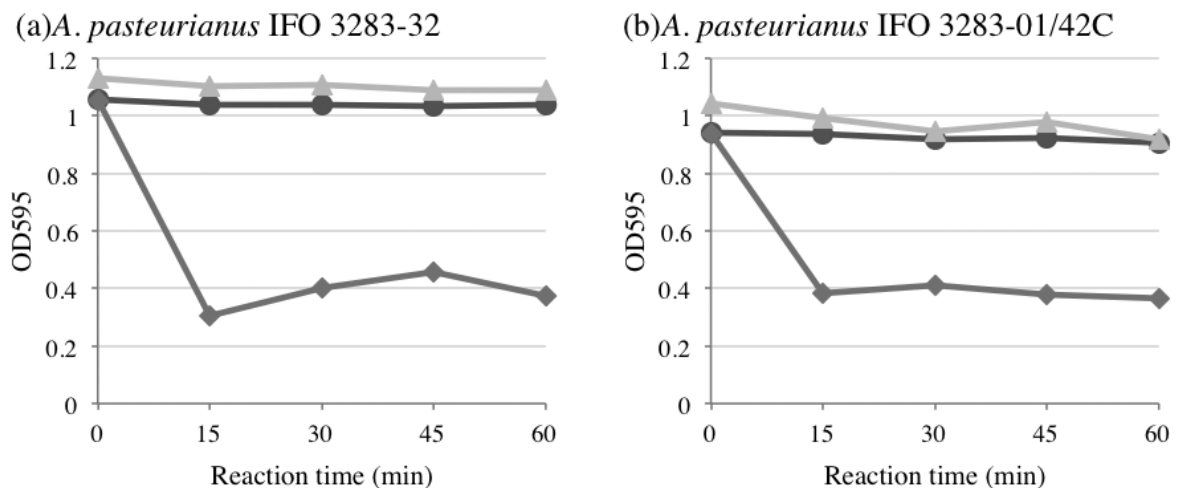


図1 OD₅₉₅の測定によるプロトプラスト化の確認

(a) *A. pasteurianus* IFO 3283-32、(b) *A. pasteurianus* IFO 3283-01/42C の OD₅₉₅ を 15 分毎に測定した。(a, b) 横軸はリゾチームによる処理時間、縦軸は波長 595 nm による吸光度 (OD₅₉₅) の測定値。●はリゾチーム未処理の細胞を超純水で希釈したもの、▲はリゾチーム処理をした細胞を 2×PBS に希釈したもの、◆はリゾチーム処理をした細胞を超純水で希釈したものを示す。

まず両株のリゾチーム処理によるプロトプラスト化の最適条件を知ることを目的に、バッファーの種類、反応温度、反応時間、リゾチーム濃度について検討をした (反応時間に関しては図 1、他はデータ省略)。プロトプラスト化した細胞は低浸透圧状態で破裂することが知られており⁶⁾、酢酸菌のプロトプラスト化は超純水で 10 倍に希釈した際の OD₅₉₅ の低下と顕微鏡観察による形態変化を指標として評価した。リゾチームによるプロトプラスト化に必要な時間を検討するために、リゾチームに処理開始後 15 分ごとにサンプリングを行い、OD₅₉₅ の変化を観察した。リゾチーム未処理のネガティブコントロールを超純水で希釈したものは、細胞壁をもつ細胞は低浸透圧耐性であり、OD₅₉₅ の低下は観察されなかった。リゾチーム処理をした試料を 2×PBS に希釈したものも、等浸透圧状態であり細胞の破裂はなく、OD₅₉₅ の低下は観察されなかった。一方で、リゾチーム処理をした試料を超純水で希釈したものでは 15 分で急激な OD₅₉₅ の低下が観察された。これは本実験条件、1 mL の 2×PBS 中で対数増殖期の酢酸菌を OD₅₉₅ = 10 (10⁹ 細胞) 程度懸濁し、0.2 mg (約 8,000 units) のリゾチーム (SIGMA) を用いて 37°C で処理した場合、15 分以内に低浸透圧環境で破裂するプロトプラスト化していることを意味する (図 1)。

次に、プロトプラスト化した細胞の細胞壁を再生し、再び低浸透圧耐性を有する細胞に回復するための条件を検討した。上記のプロトプラスト化条件で 60 分間処理したプロトプラスト試料を用いて、30°C で 4 時間回復処理を行った。この試料を超純水で 10⁰~10⁵ 倍に希釈した後に YPGD 寒天培地に植菌し 30°C で 2 日間培養を行った (図 2)。

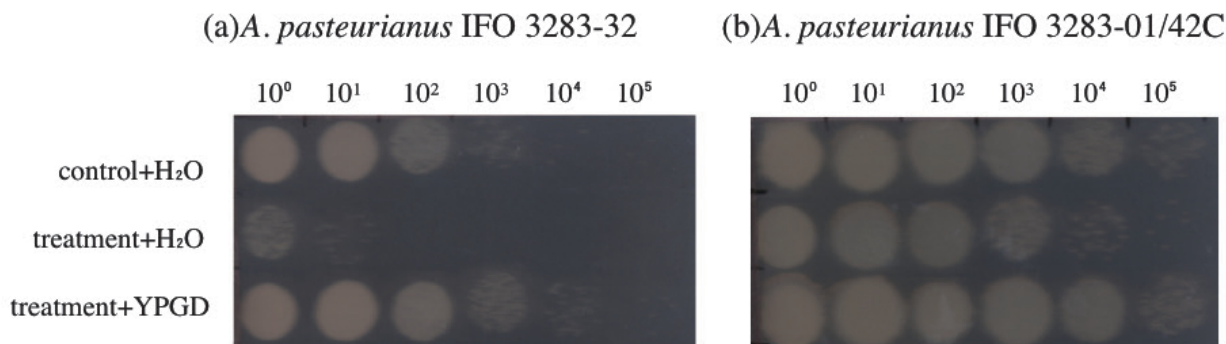


図2 プロトプラストの作製率と再生率の検定のためのCFUの計測

リゾチーム未処理の細胞を超純水で希釈した試料を(control + H₂O)、リゾチーム処理の細胞を超純水で希釈した試料を(treatment + H₂O)、リゾチーム処理の細胞を YPGD で希釈した試料を(treatment + YPGD)と表記する。各写真のトップには、各処理4時間の後に行った超純水での希釈度を示す。

酢酸菌の増殖が見られたスポットとその希釈率の関係から、元々の試料中に存在したCFUを計算し、以下の(式1)でプロトプラスト化率を計算した。結果、Ap32株とAp01/42C株のそれぞれのプロトプラスト化率は99%、91%を超える値となった(表1)。

$$\text{プロトプラスト化率(\%)} = \frac{(\text{control} + \text{H}_2\text{O}) - (\text{treatment} + \text{H}_2\text{O})}{(\text{control} + \text{H}_2\text{O})} \times 100 \quad (\text{式1})$$

また、細胞壁の再生率は、細胞壁が再生するのに要する時間を t とした場合、以下の(式2)で計算される。今回の実験では細胞壁の再生時間 t を導くのに十分なデータが得られていない。しかし、 t が限りなく0時間に近い場合に再生率は最低となるが、この場合でもAp32株で30%、Ap01/42C株で24%を超える値であった(表1)。逆に、 t が4時間に限りなく近い場合には、再生率は最大になり、両菌とも再生率はほぼ100%と計算される。

$$\text{細胞壁の再生率(\%)} = \frac{(\text{treatment} + \text{YPGD}) - 2^2(\text{treatment} + \text{H}_2\text{O})}{2^{(4-t)/2} \{(\text{control} + \text{H}_2\text{O}) - (\text{treatment} + \text{H}_2\text{O})\}} \times 100 \quad (\text{式2})$$

表1 プロトプラスト化率と細胞壁の再生率

Strain	sample/CFU	希釈率						プロトプラスト化率 (%)	細胞壁の再生率 (%)		
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵		t = 0 (hours)	~	t = 4 (hours)
Ap32	control + H ₂ O	/	/	/	48	4	3	99%	25%	~	98%
	treatment + H ₂ O	/	26	0	0	0	0				
	treatment + YPGD	/	/	/	/	34	5				
Ap01/42C	control + H ₂ O	/	/	/	/	/	40	91%	31%	~	100%
	treatment + H ₂ O	/	/	/	/	38	6				
	treatment + YPGD	/	/	/	/	/	60				

3. 1-2 細胞融合とジェノタイプ解析

Ap32 株と Ap01/42C 株の細胞融合をプロトプラスト-PEG 法で実施した後、YPGD 液体培地で 4 時間回復処理を行った。その細胞融合試料を 1%酢酸と 1%エタノールを添加した YPGD (E1%, A1%) 液体培地 5 mL に植菌し、42°C で 30 日間静置培養したところ、菌膜の形成が確認された (図 3a)。この菌膜を回収し、200 mL の YPGD (E1%, A1%) 液体培地を用いて 41°C で静置培養し、形成された菌膜を *mika_f7-1* 株として保存するとともに、その菌膜からゲノム抽出した (図 3b)。Ap32 株及び Ap01/42C 株の 2 株のゲノム間に存在する 5 ヶ所の変異点を鑑別するためのプライマー (表 2、図 3c) を用いて PCR を行い、Ap32 株及び Ap01/42C 株と比較することにより *mika_f7-1* 株のジェノタイプを解析した (図 3d)。結果として、5 ヶ所のいずれの変異点においても *mika_f7-1* 株のゲノム DNA は Ap01/42C 株に由来であることが示された (図 3、表 2)。つまり、*mika_f7-1* 株は Ap32 株と同様に強い菌膜形成能を有しているが、ジェノタイプとしては Ap32 株に由来する変異マーカーをもっていなかった。特に、SNP02 が Ap01 株に生じることにより Ap32 株が有する菌膜形成能を失ったと考えられており⁽¹⁰⁾、SNP02 を有する *mika_f7-1* 株が菌膜形成能をもつことは興味深い。

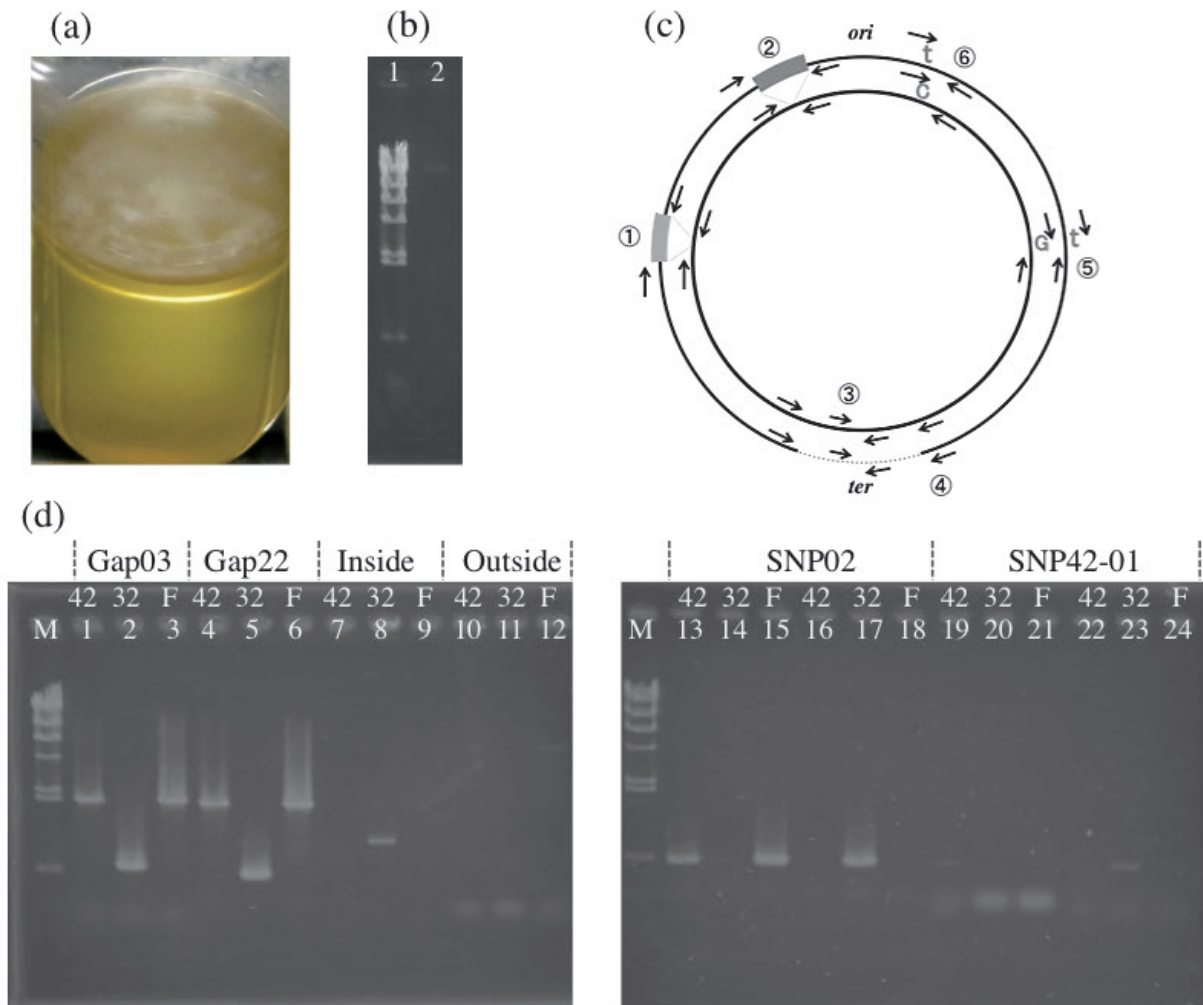


図3 細胞融合株 *mika_f7-1* の樹立とジェノタイプ解析

(a)細胞融合処理 30 日後に 42°C 環境下での菌膜形成。(b)細胞融合株 *mika_f7-1* から抽出されたゲノム DNA を 100 V で 30 分間、1% agarose / TAE で電気泳動した (lane 2)。lane 1 は λ -HindIII marker。(c)Ap32 株と Ap01/42C 株間に存在するゲノム変異点及びプライマー作製位置の模式図。(d)PCR による *mika_f7-1* 株のジェノタイプ解析。写真トップの記載は上段より、ゲノム変異点、鋳型となるゲノム DNA の由来 (42 は Ap01/42C 株、32 は Ap32 株、F は *mika_f7-1* 株)、PCR のサンプル番号 (表 2) を示す。M は λ -HindIII marker。

表2 プライマーの設計と期待される PCR 産物、実際の PCR 結果

Genotypes	AGE_lane	template DNA	product size (bp)	Primer design					
				Forward primer name	primer seq	GC%	Reverse primer name	primer seq	GC%
①Gap03	1	Ap01/42C	1812	YM_05	TTGCCAGAGCCACAATAGAA	45	YM_04	CTGCATGATAACTGGCAGGA	50
	2	Ap32	561						
	3	Fusant Cell	1800						
②Gap22	4	Ap01/42C	1909	YM_07	GCCTGTCTGTGGCTCTTTC	55	YM_06	GGCATGAGGTTCCAGAAGAT	50
	5	Ap32	658						
	6	Fusant Cell	1900						
92 kb deletion ③Inside	7	Ap01/42C	-	YM_13	GTATTGGTGGAGGGGCATTA	50	YM_10	TCTTCCAGACCGTAGGTGGA	55
	8	Ap32	1000						
	9	Fusant Cell	-						
92 kb deletion ④Outside	10	Ap01/42C	5854	YM_15	GTAGTTTGTCTCCAGAATGGG	50	YM_12	CAACCAGATGCTGCACGG	55
	11	Ap32	-						
	12	Fusant Cell	5800						
⑤SNP02	13	Ap01/42C	554	YM_01	TCCAGATATCTCCGGGCAT	50	YM_02	TATCCTGACCGCCATTTTGG	50
	14	Ap32	-						
	15	Fusant Cell	550						
	16	Ap01/42C	-	YM_03	TCCAGATATCTCCGGGCAG	55			
	17	Ap32	554						
	18	Fusant Cell	-						
⑥SNP42-01	19	Ap01/42C	543	YM_08	AAAAGCCAGAACCATGGCCA	50	YM_11	GAATATCTTCTGCCGCCAT	45
	20	Ap32	-						
	21	Fusant Cell	540						
	22	Ap01/42C	-				YM_09	GAATATCTTCTGCCGCCAC	50
	23	Ap32	543						
	24	Fusant Cell	-						

3. 2 菌膜形成株 Ap32 の高温適応育種による MU 株の樹立と菌膜形成及びエタノール耐性育種

生育限界温度が 39°C である Ap32 株の高温適応育種を行い、生育限界温度が 42°C に上昇した MU シリーズ 5 株 (MU01-1, MU01-2, MU03-2, MU03'-1, MU03'-2) の分離に成功した。YPGD 寒天培地を用いて 30°C、42°C、43°C の環境下で培養を行った (図 4)。42°C 環境下での増殖のネガティブコントロールとして Ap01 株及び Ap32 株を、ポジティブコントロールとして Ap01/42C 株を用いた (図 4 a)。これらの酢酸菌の適正増殖温度である 30°C での培養では、この 8 株の増殖に差は見られなかった (図 4 b)。42°C での培養では Ap01 株及び Ap32 株は増殖せず、Ap01/42C 株および MU 株 5 株は増殖していた (図 4 c)。この 42°C では、これまで唯一 42°C で増殖が可能だった Ap01/42C 株よりも、MU 株の方が高い増殖を示した。43°C では Ap01/42C 株と同様に MU 株においても生育が確認されなかった (図 4 d)。

MU 株のうち特に 42°C で増殖が良好で、菌膜形成能の高い MU03'-1 株を用いて、まず基質適応育種を行った。1% エタノールを添加した YPGD 液体培地を用いて 42°C 環境下で培養を行い、形成された菌膜を継代することにより、最終的に 3% エタノールを添加した YPGD 液体培地でも良好な増殖が見られる株を得た。さらに産物適応育種として 3% エタノールに加え 1% 酢酸を添加した YPGD 液体培地を用いて 41°C 環境下で菌膜を形成させ、その菌膜を 2 回継代することのできた育種株 JK_02 を獲得した。これを 250 L 大型発酵試験に育種株として用いた。育種株をさらに 2 回同条件下で継代培養を行ったものを JK_03 株として、320 L 食酢醸造試験に用いた。

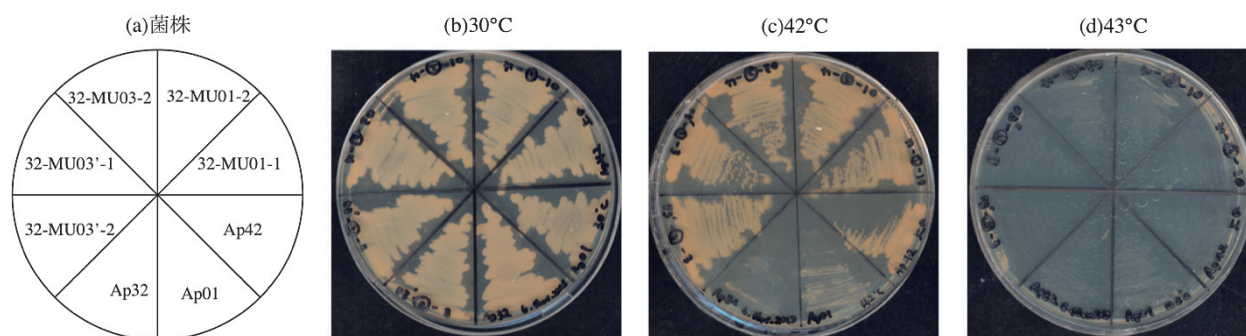


図 4 高温耐性 MU 株の樹立と生育限界温度の確認

3. 3 250 L 大型発酵試験

耐熱性食酢醸造菌を用いた社会実装に向けた研究室外試験として、細胞融合株 *mika_f7-2* と育種株 *JK_02* を用いて、250 L 大型発酵試験を行った。本実験は田村造酢（株）の監修を受け、田村造酢（株）の食酢醸造用の蔵内で実施した。また、田村造酢（株）では夏期の醸造では発酵熱により醸造菌の増殖停止や死滅が発生することもあり、猛暑期（7月から9月）を避けて食酢醸造を行っている。本研究で樹立した耐熱性食酢醸造菌が猛暑期でも食酢醸造に使用可能か検証することも目的として、8月中旬から9月中旬にかけて実施した。実際の大型発酵試験の行程を図5に示す。

まず、*mika_f7-2* 株と *JK_02* 株とともに培養開始2日目に槽全体に菌膜の形成が確認された（図6）。終了時の酢酸度は2株ともに2.95%まで上昇していた（図7）。*mika_f7-2* 株においては原料のエタノール濃度が2%で酢酸濃度が1%であることから、計算上2%エタノールから1.95%の酢酸を生産した。*JK_02* 株では同様の計算で、3%エタノールから1.95%の酢酸を生産した。猛暑期の食酢醸造で想定していた酢酸菌が死滅する程度の発酵槽の温度上昇（39°C）が観察されなかった。今年の夏は異常な冷夏であったこと、田村造酢（株）では4000 Lの発酵槽を用いて食酢醸造しているが今回はその1/16のスケールであり、発酵熱の放散も大きく影響したと考えられる。また、耐熱性酢酸菌の発酵能が低い可能性も考えられる。

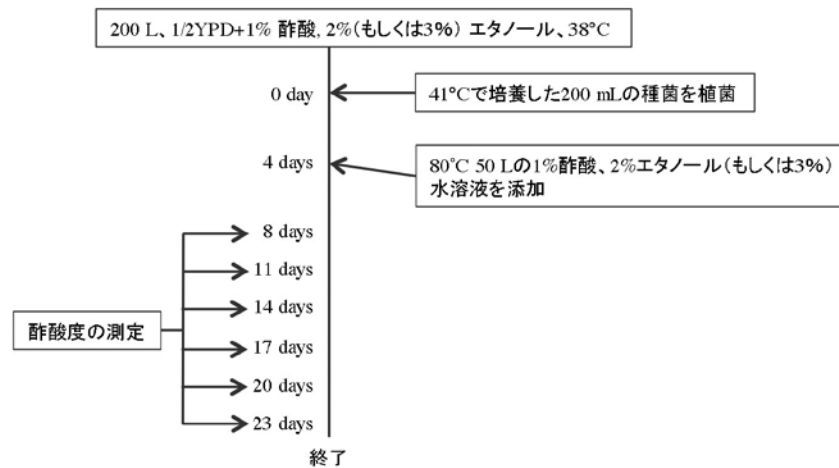


図5 大型発酵試験の作業スキーム

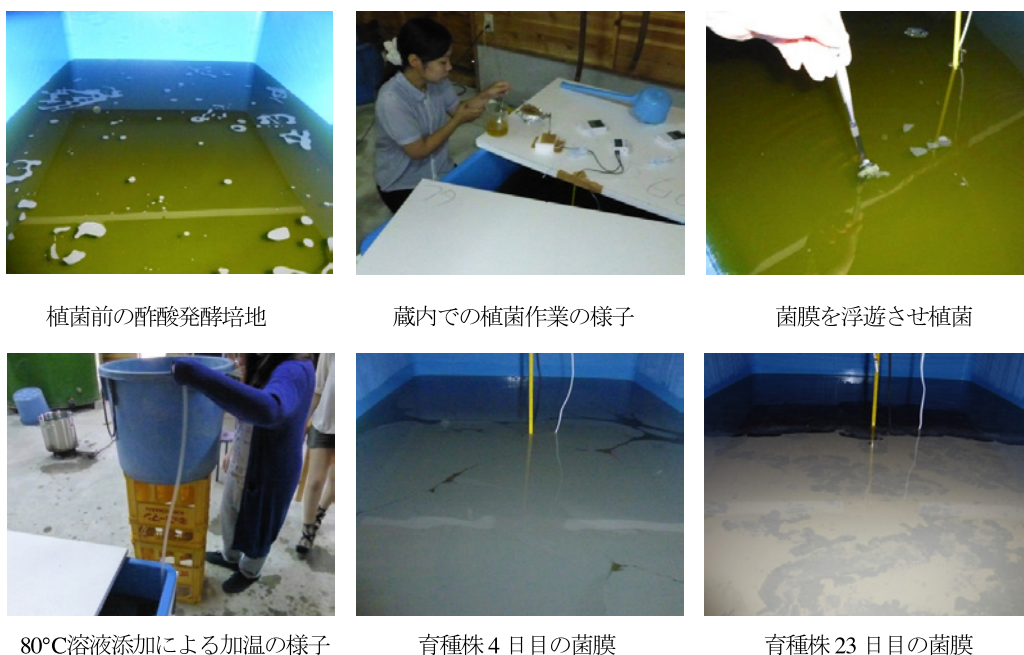
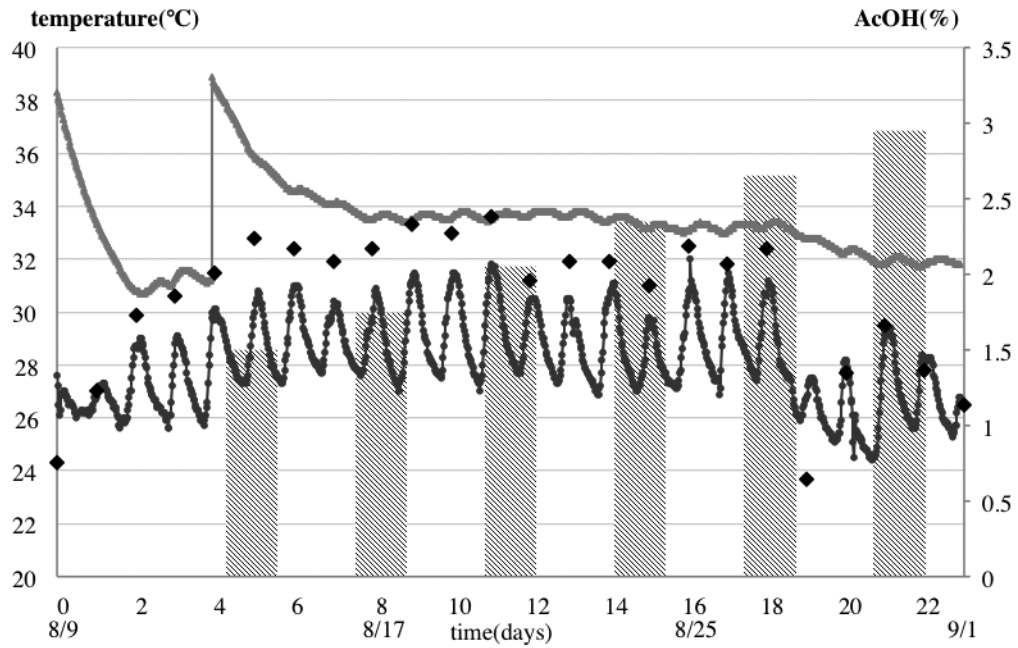


図6 250 L 大型発酵試験

(a)育種株を用いた大型発酵試験



(b)細胞融合株を用いた大型発酵試験

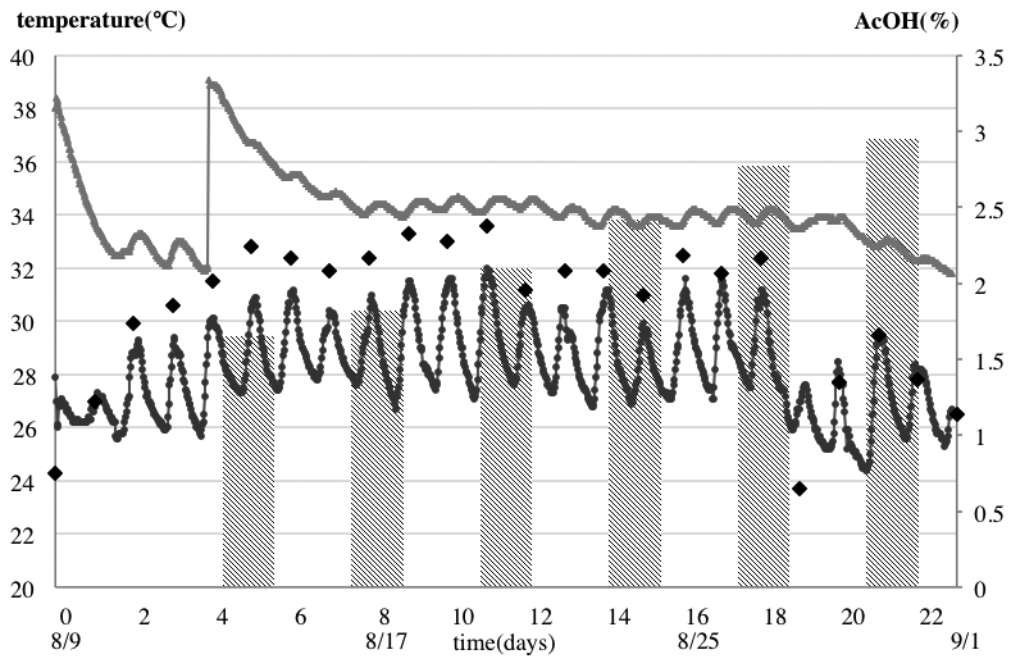


図7 細胞融合株及び育種株を用いた250 L大型発酵試験のモニタリング

(a)育種株を用いた結果。(b)細胞融合株を用いた結果。それぞれ、灰色線が発酵液表面温度、黒色線が蔵内気温、菱形の点が気象庁による和歌山県かつらぎ町の最高気温、棒グラフが酢酸度を示す。

3. 4 320 L 食酢醸造試験

育種株 JK_03 と田村造酢(株) で使用されている菌株(田村造酢株) を用いて 320 L 食酢醸造試験を行った。醸造原料として、醸造した日本酒を井水により 4 倍に希釈し、酢酸と酵母抽出液、硫酸マグネシウムを添加した。食酢醸造の行程を図 8 に示す。JK_03 株では培養開始 2 日目に、田村造酢株では培養開始 3 日目に、槽全体に菌膜の形成が確認された(図 9)。終了時の酢酸度は JK_03 株では 2.64%、田村造酢株では 3.06%まで上昇していた(図 10)。計算上、JK_03 株では 2.5%のエタノールから 1.64%の酢酸が生産された。田村造酢株では同様に 2.5%のエタノールから 2.06%の酢酸が生産された。大型発酵試験と同様に高温下での醸造試験は叶わなかった。

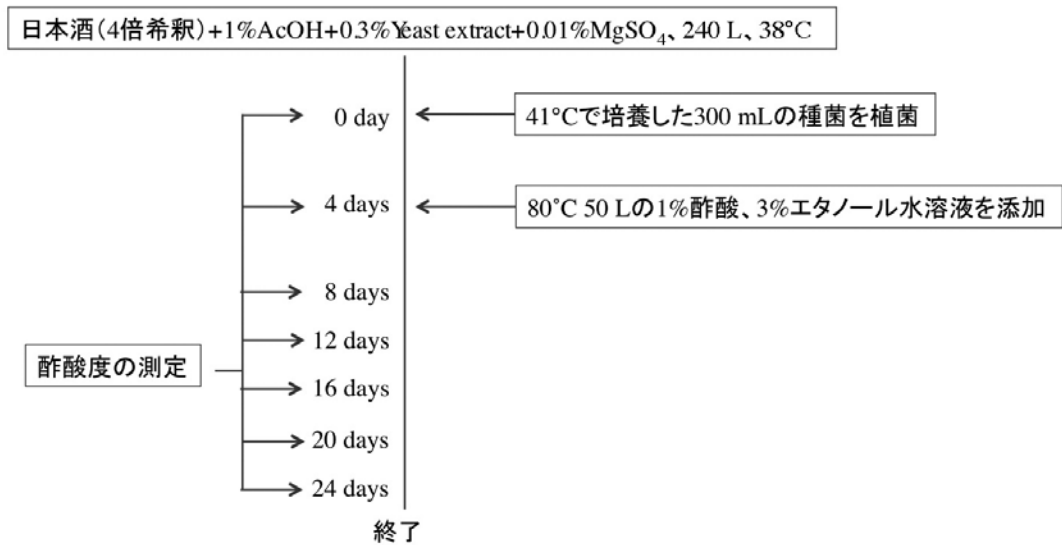


図 8 食酢醸造試験の作業スキーム



酒母仕込みの様子



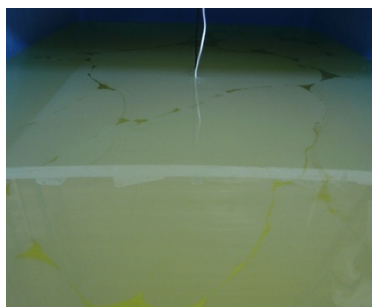
酵母による発酵の様子



自然落下による醪の分離



植菌前の日本酒培地



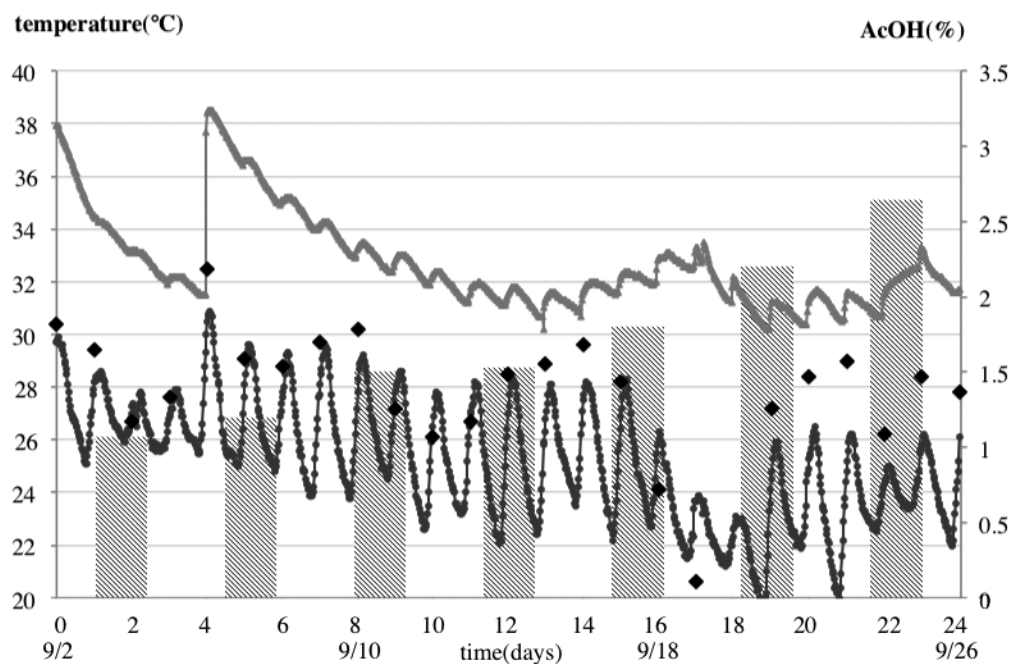
育種株 4 日目の菌膜



育種株 24 日目の菌膜

図 9 320 L 食酢醸造試験

(a)育種株を用いた食酢醸造試験



(b)田村造酢で用いられている菌株による食酢醸造試験

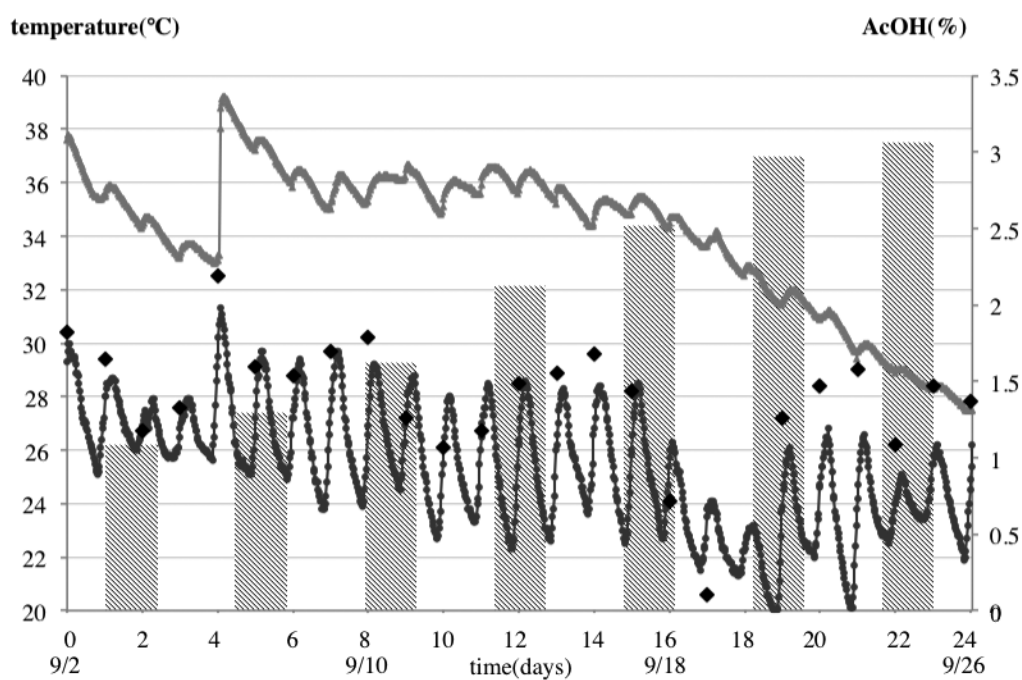


図 10 320 L 食酢醸造試験のモニタリング

(a)育種株を用いた結果。(b)田村造酢株を用いた結果。それぞれ、灰色線が発酵液表面温度、黒色線が蔵内気温、菱形の点が気象庁による和歌山県かつらぎ町の最高気温、棒グラフが酢酸度を示す。

4. 考察

発酵産業は食品生産だけではなく、医薬品や工業製品の原材料生産も含む巨大な産業である。その近代的な生産現場においては発酵熱による菌の死滅や発酵能の低下を回避するために、大規模な冷却装置が導入され徹底した温度管理が行われている。本研究では、その冷却コストの削減と高温発酵による生産効率の向上を目的として、発酵生産に使用される有用発酵微生物の耐熱化を育種法と細胞融合法により試みた。さらに、創出された耐熱性菌を用いた社会実装を目指し、実験室外における無冷却高温発酵実験を実施した。

細胞融合法に用いる発酵生産のモデルとして食酢醸造における優占種である *Acetobacter pasteurianus* を選択した。この酢酸菌には、生育限界温度が39°Cで非耐熱性だが菌膜形成能をもつ Ap32株と、菌膜形成能はもたないが生育限界温度が42°Cで耐熱性である Ap01/42C株が利用可能である。また、もともと食経験のある酢酸菌であり全ゲノムDNA配列が完全に決定されている極めて安全な菌であり、細胞融合によって生み出される菌株も安全であると考えられた。

Ap32株と Ap01/42C株のリゾチームを用いたプロトプラスト化率は、ともに90%を超えており、先行研究^(11,12)と比較しても高効率であり、この菌株に対して適切なプロトプラスト化条件を得たと考えている。プロトプラストの細胞壁の再生率に関しては、細胞壁再生に要する時間を決定するのに十分な結果を得ていないため細胞壁の再生率を正確に求めることはできない。しかし、最低でも20%以上のプロトプラストが低張液耐性を回復し YPGD寒天培地で増殖することができたことから、プロトプラストの再生に関しては実験を進めるのに十分な条件を得たと考えた。細胞融合における最後のパラメーターとして重要である、細胞融合の効率に関しては本実験では定量化できていない。当研究室で開発した酢酸菌ベクターを導入した形質転換体を利用した細胞質融合の実験を行い、細胞融合の効率を求める検討している。

本研究では、細胞融合法にはプロトプラスト-PEG法を採用し、Ap32株と Ap01/42C株の細胞を融合した上で、耐熱性食酢醸造に必要な形質（菌膜形成能あり、生育限界温度42°C）を有する細胞融合株（mika株）の分離に成功した。ジェノタイピング解析から、mika株は Ap01/42C株由来の遺伝子マーカーのみを持っていることが明らかとなり、ゲノムDNAの融合の証明はできなかった。また、菌膜形成に関与するとされる glycerol kinase に存在する SNP02 が Ap01/42C株由来であり、mika株の菌膜形成能を支持する遺伝的背景は全く不明であり、細胞融合処理の過程で異なる遺伝子領域に変異が生じたことにより再び菌膜形成能を獲得したものと考えられる。近い将来、全ゲノム解析によってその変異部位を明らかにしたい。

育種法では菌膜形成能を有するが非耐熱性である Ap32株に対して高温適応育種を行うことで菌膜形成能を保持したまま耐熱性株 MU の獲得に成功した。MU株においては現在次世代シーケンサーによってゲノムDNAのドラフト解析が終了しており、3個のプラスミドDNAの欠失と Ap01/42C株でも確認された大規模なゲノムDNAの欠損が生じていることが判明している。さらにMU株を用いて高温かつ高濃度エタノール存在下で静置培養を繰り返すことにより、高温での食酢醸造に必要な形質である耐熱性とエタノール耐性、菌膜形成能を有する耐熱性食酢醸造株 JK株の育種にも成功した。本研究における育種法では食酢醸造菌の多因子性形質の柔軟性を示すことができた。今後はゲノム解析による耐熱性やアルコール耐性、酢酸耐性などの形質に影響を与える遺伝子群の同定を進める予定にしている。

伝統的な食酢醸造を行う田村造酢（株）では、発酵槽の冷却装置を用いておらず、ゆえに猛暑期には発酵槽が発酵熱により過高温となり酢酸菌の増殖が抑制されるため、食酢醸造を行っていない。今回この田村造酢（株）の監修を受け、耐熱性食酢醸造株を用いた社会実装にむけた実験室外での無冷却高温発酵実験として、JK株とmika株を用いた250L大型発酵試験と、JK株を用いた日本酒を原料とする320L食酢醸造試験を行った。いずれの発酵実験槽においても液体表面全体に菌膜の形成が確認され、酢酸度も目標となる数値まで上昇した。実験を実施した2014年の夏は異常に気温が低く、田村造酢（株）の種株を用い

た場合でさえも想定していた発酵槽の過高温は発生しなかった。つまり、今回作成した耐熱性菌の耐熱性形質が発揮される条件は得られなかった。

今後も社会実装にむけた耐熱性食酢醸造株を用いた耐熱性形質の有効性を確認する実験は引き続き実施する予定である。その際には、発酵槽の形状やスケールの再検討、発酵実験を行う場所の検討が必要である。一方で発酵における温度管理の重要性が再認識された。発酵に用いる菌株も、より優れた発酵能を保持する酢酸菌の選択が必要である。今回大型発酵試験に用いた2つの耐熱性株は、田村造酢（株）より提供された菌株よりも食酢醸造能が低い可能性が示唆された。田村造酢（株）で利用されている酢酸菌はヘテロ菌群である一方、耐熱性株はクローンされた純粋培養株であるためクオラムセンシングによる制御の可能性もある。今後考慮すべき検討課題である。

5. 参考文献

1. 酢酸菌研究会 (2012) 酢の機能と科学、初版、pp.115-125、朝倉書店。
2. 酢酸菌研究会 (2012) 酢の機能と科学、初版、pp.136-142、朝倉書店。
3. Matsushita, K., Ebisuya, H., Ameyama, M., Adachi, O. (1992) Change of the terminal oxidase from cytochrome a1 in shaking cultures to cytochrome o in static cultures of *Acetobacter aceti*. *Journal of Bacteriology*, 174, 122-129.
4. Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., Shirai, M. (2009) Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 37, 5768-5783.
5. 張 恩実、今田 千秋 (2008) 海洋性発光細菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合法のモデル系の構築と応用、東京海洋大学博士学位論文平成 20 年度 (2008) 応用生命科学課程博士甲第 90 号。
6. Fukaya, M., Tagami, H., Tayama, K., Okumura, H., Kawamura, Y. (1989) Spheroplast fusion of *acetobacter aceti* and its application to the breeding of strains for vinegar production. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2435-2440.
7. Kanchanarach, W., Theeragool, G., Inoue, T., Yakushi, T., Adachi, O., Matsushita, K. (2010) Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: Relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1591-1597.
8. Schaeffer, P., Cami, B., Hotchkiss, R D. (1976) Fusion of bacterial protoplasts., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2151-2155
9. 農林水産省告示 1506 号 (2008) 醸造酢の日本農林規格。
10. 東 慶直(2010)、ゲノム情報解析に基づく酢酸菌の代謝系多様性とその多様性誘因因子の解析、近畿大学生物理工学部紀要、26 号。
11. Singhvi, M., Gaikawai, S., Gokhale, D. (2013) Protoplast formation and regeneration *Acetobacter pasteurianus*. *American J. Bioeng. Biotech.* 1, pp. 37-43.
12. Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M. (1981) Spheroplast of acetic acid bacteria. *Agri. Biol. Chem.*, 45, 1515-1518
13. 気象庁 異常気象分析検討会 (2014) 平成 26 年 (2014 年) 8 月の不順な天候について、報道発表資料。

Creation of thermo-tolerant strains by adaptation and cell-cell fusion from *Acetobacter pasteurianus* for high temperature vinegar fermentation

Naruhei Okamoto¹, Mika Yamamoto², Sana Shiomura², Ayaka Kumada², Kana Jouya², Minako Ueno², Akihiro Tamura³, So Takebe^{1,2}, and Yoshinao Azuma^{1,2}

In order to realize the continual and steady reduction of greenhouse gas emissions in the mid and long term, we are working to obtain fruitful research leading to green innovation as a team for “Genome-based research and development of thermo-tolerant microbes aiming at low-cost fermentation” (a JST-ALCA project). Microbial fermentation is important in bio-industry such as not only brewing or food production but also a variety and abundant of productions of medicinal and industrial materials. Facing with a global warming and also an electric power crisis, it becomes more requested to keep the process at low temperature to make sure the stable fermentation or high productivities. We aim at developing methods to provide useful thermo-tolerant microbes able to ferment stably above 40°C through genome engineering on the basis of breeding with adaptive evolution, cell-cell fusion (or bacterial crossbreeding) and genetic manipulation using genes related to this thermo-tolerance.

Traditional breeding is suitable to modify microbes regarding to multi-gene phenotypes and most acceptable for the society based on its verified safety and reliability. Compared to the method, artificial genetic manipulation is more efficient to provide aimed functions to microbes and appropriate for maintenance of microbial diversity in many companies, but it is not welcome to the people in many countries. Thus a new method for systematic genome engineering with advantages of traditional breeding and artificial genetic manipulation is requested. However no systems have been established yet, cell-cell fusion is seemed as a prospected candidate to develop such systems.

Here we chose *Acetobacter pasteurianus*, which is widely used for vinegar production in the world, as a model organism for development of methods to generate thermo-tolerant fermentation microbes. As results, we successfully established two strains with two phenotypes, thermo-tolerant (growing at up to 42°C) and pellicle formation. One of the two strains was established from a strain with pellicle formation and thermo-labile (growing at 39°C or low) phenotypes based on breeding with adaptive evolution. The other one was generated by cell-cell fusion with a pellicle formation but thermo-labile strain and a non-pellicle formation but thermo-tolerant strain. Using these strains, we attempted to brew vinegar in 250 and 320 liter scales without any cooling system in the middle of this summer as implementation experiments prior to utilization in fermentation companies. Both strains could form stable pellicles and produce acetic acid up to the expected concentrations under a procedure employed during cool seasons in Tamura Zousu Company. Using this procedure, the temperature of fermentation tanks generally rise above one which a thermo-labile strain can survive and ferment vinegar. Unfortunately it was abnormally cold in this summer and the temperatures of tanks did not reach even at 35°C, and thus the test point of thermo-tolerant phenotype was not validated.

Key words: Acetic acid bacteria, thermo-tolerant, cell-cell fusion, adaptation breeding, vinegar production.

1. Graduate School of Biology-Orient Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. BOST, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Tamura Zousu, Wakayama 649-7113, Japan