

研究ノート

ナタデココ生産における酢酸菌のコロニー形態と生産能の相関性

稲岡 隆史*, 木村 啓太郎, 中村 敏英, 富田 理

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

The correlation between nata de coco production and the colony morphology in *Gluconacetobacter xylinus*

Takashi Inaoka*, Keitarou Kimura, Toshihide Nakamura, Satoru Tomita

Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan**Abstract**

Nata de coco is a chewy jelly-like food originating in the Philippines. It is the bacterial cellulose formed on the surface of coconut milk through the fermentation with acetic bacteria, *Gluconacetobacter xylinus*. However, the industrial production of nata de coco is unstable, possibly because of the genetic instability of acetic bacteria. In this study, we observed the effect of serial passage of *G. xylinus* on the productivity of nata de coco and the colony morphology on agar plate. We found that *G. xylinus* forms three types of colony morphology: rough, smooth and the intermediate between rough and smooth. These colony morphologies were changeable and reversible during serial subculture. Nata de coco production of rough colony was higher than that of smooth colony, indicating the correlation between nata de coco production and the colony morphology. This finding is useful for selection of nata de coco producer strain.

Key words: Nata de coco, colony morphology, *Gluconacetobacter xylinus***要旨**

ナタデココはフィリピン発祥の弾力のあるゼリー状食品であり、酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* による発酵によりココナッツミルク表面上に形成される微生物セルロースである。しかしながら、酢酸菌の遺伝的

不安定性のため、ナタデココの工業生産は不安定なものとなっている。本研究では、*G. xylinus* を継代培養することにより、ナタデココ生産性と寒天培地上でのコロニー形態における変化を観察した。その結果、*G. xylinus* は3つのコロニー形態（Rough型、Smooth型、およびRoughとSmoothの中間型）を示すことがわかった。Rough型コロニーのナタデココ生産性は、

* 連絡先 (Corresponding author), tina2672@affrc.go.jp

Smooth 型コロニーの生産性よりも高かったことから、ナタデココ生産性とコロニー形態の間には相関性があることが示された。この知見はナタデココ生産株の選抜に有用となるであろう。

緒言

酢酸菌は食酢の製造に古くから利用されてきた。また、ある種の酢酸菌は菌体外にゲル状物質である微生物セルロースを生産することが知られている。フィリピン発祥の伝統発酵食品である「ナタデココ」は、セルロース生産能を有する酢酸菌（主に *Gluconacetobacter xylinus*）がココナッツミルクの表面上に形成する微生物セルロースであり、低カロリーの食物繊維としてダイエット食や特定保健用食品に利用されている。¹⁾ 微生物セルロースは、植物由来セルロースと比較して微細な網目構造を有し、リグニンやヘミセルロースを含まないなどの特徴から工業用素材としても注目されている。

酢酸菌の形質は変わりやすく、セルロース生産能や酢酸耐性などの形質がしばしば消失することが知られている。酢酸菌ゲノムには多くのトランスポゾンが存在しているほか、複数のプラスミドを保持していることもわかっており、これらが酢酸菌の遺伝的不安定性に関与していると考えられている。²⁾ ナタデココ生産においても、その不安定性に起因すると思われる生産歩留まりの低下が度々発生するため、ナタデココの安定的生産が重要な課題となっている。さらに、ナタデココ生産に用いられる培地には油分の多いココナッツミルクや高濃度の酢酸が含まれており、極めて特殊な環境となっていることから、これら環境因子が生産不安定性の一因となっている可能性も考えられる。

酢酸菌の研究者人口は、海外を含めても多くはなく、ナタデココ生産に着目した研究は極めて少ない。本研究では、産業的ナタデココ生産に則した実験系を用いて、ナタデココ生産菌の特徴とセルロース生産能の関係を調査した。

実験材料および方法

1. 使用菌株

ナタデココ生産用の種菌はフジッコ株式会社より分譲された実用菌株を使用した。菌種同定のため、16S rDNA をプライマー 12F および 1540R を使用して増幅後、約 1.45 kb の塩基配列を決定し、日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) の登録

表 1 16S rDNA の PCR 増幅及び塩基配列決定に用いたプライマー

| プライマー名 | 塩基配列 (5' → 3') |
|--------|------------------------|
| 12F | TTGATCCTGGCTCAGG |
| 270R | TTACCCACCAACTAGCTAATGC |
| 350F | TACGGGAGGCAGCAG |
| 520R | ACCGCGGCTGCTGGC |
| 800F | ATTAGATACCCTGGTA |
| 920R | GTCAATTCCTTTGAGTTT |
| 1100F | GCAACGAGCGCAACCC |
| 1240R | CCATTGTAGCACGTGT |
| 1400F | TGTACACACCGCCCGT |
| 1540R | AAGGAGGTGATCCAGCC |

配列と照合した。16S rDNA の増幅及び塩基配列決定に用いたプライマーは表 1 に示した。

2. 培地

培地に使用したココナッツミルクはフジッコ株式会社より提供された。ココナッツミルクは熱湯により 4 倍希釈し、一晩冷蔵後、ろ過により油分を取り除いた。さらに遠心分離により油分を取り除き、ココナッツエキスをとした。ナタデココ生産株の培養は主にココナッツエキス (CE) 培地 (グルコース 6%, ココナッツエキス 50%, 酢酸で pH4.0 に調整) を用いた。酢酸菌培養に一般的に用いられる Hestrin-Schramm (HS) 培地 (グルコース 2%, 酵母エキス 0.5%, ペプトン 0.5%, Na_2HPO_4 0.375%, クエン酸 0.115%) も使用した。

3. ナタデココ生産性試験

ナタデココ生産用種菌を CE 寒天培地 (2.4% 寒天を含む CE 培地) に植菌し、30℃ で 1 週間培養した。出現したコロニーの中から 1 コロニーをかきとり、CE 液体培地に植菌して 30℃ で 1 週間静置培養した。1 週間培養後、培地表面に形成されたゲル部分の厚みを計測して、セルロース生産性を比較した。

4. 易変異性試験

ナタデココ生産用種菌を CE 寒天培地上で生育させ、出現したコロニーの中から 20 個のコロニーを無作為に選抜し、No.1 ~ 20 とした。各コロニーをさらに CE 寒天培地上に塗布し、30℃ で培養した。1 週間培養後に出現したコロニーを CE 液体培地に植菌し、30℃ で静置培養してナタデココ生産を確認した。寒天培地上

のコロニーを再び CE 寒天培地に継代培養し、ナタデココ生産を確認しながら 20 回継代観察を繰り返した。

結果及び考察

1. ナタデココ生産不安定性の検証

フジッコ株式会社より分譲されたナタデココ生産用種菌を HS 培地で培養したところ、この培地では増殖しないことがわかった。HS 培地は多くの酢酸菌の培養に一般的に用いられる培地であり、*G. xylinus* も増殖可能

であることから、ナタデココ生産用種菌は一般的な酢酸菌株とは異なる可能性が考えられた。そこで、ナタデココ生産用種菌の 16S rDNA 塩基配列（約 1.5 kb）を決定し、DNA データバンクに登録されている配列情報と比較したところ、*Gluconacetobacter xylinus* の基準株である NBRC 15237 株の 16S rDNA と 99.9%（約 1500 塩基中の 1 塩基が不一致）相同であり、ナタデココ生産用種菌は *G. xylinus* であることが確認できた。

次に、ナタデココ生産用種菌を CE 寒天培地上にて培養し、出現したコロニーの中から無作為に選抜した

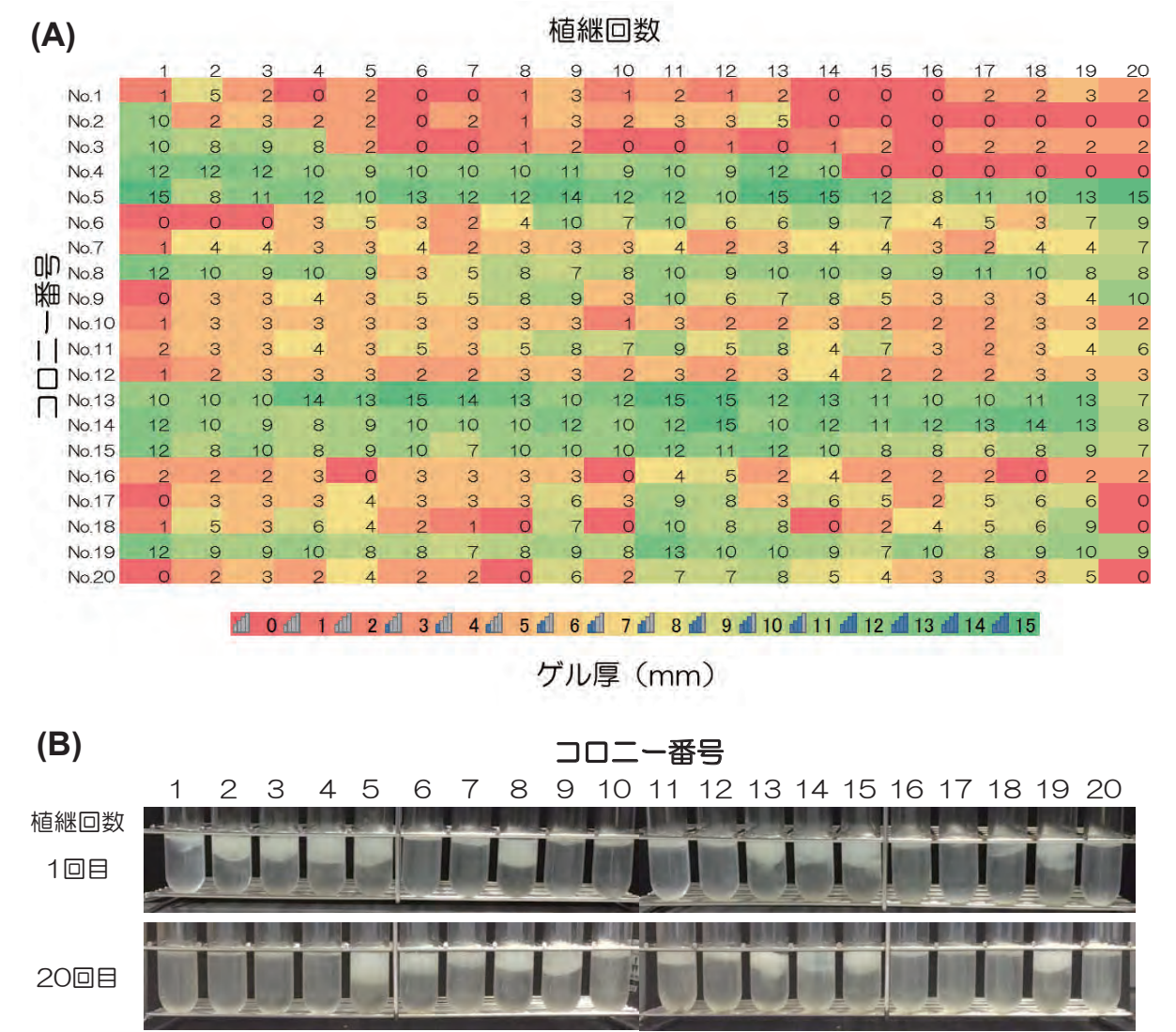


図 1 ナタデココ生産株の継代培養によるセルロース生産性の変動

ナタデココ生産株を CE 寒天培地上で培養し、出現したコロニーの中から無作為に選抜した 20 コロニーを CE 寒天培地で 20 回継代培養を行い、継代培養毎にナタデココ生産能を比較した。(A) 植継毎の各コロニーのナタデココ生産能の比較。ナタデココ生産能は試験管内に形成されたゲルの厚み (mm) により判定した。(B) 20 回植継後のゲル写真。植継 1 回目 (上段) および 20 回目 (下段) の写真を比較している。

20 個のコロニー (No.1 ~ 20) を 1 週間毎に CE 寒天培地で継代培養し、その都度、ナタデココ生産性を確認した (図 1)。20 個のコロニーのうち、No.5, 13, 14, 15, 19 は安定したナタデココ生産を示したが、No.1, 10, 12, 16 は一貫してナタデココ生産性が低かった。No.2, 3, 4 は当初は良好なナタデココ生産性を示したものの、継代培養中に生産能の低下がみられた。その他のコロニーは、ナタデココ生産能が一定せず、期間中不安定であったが、No.6 は継代培養を繰り返すことにより生産性の改善が見られた。このように、同じ種菌から出現した単一コロニーであっても、ナタデココ生産性は大きく異なっており、継代培養を繰り返すことにより、その生産性が頻繁に変化することが明らかとなった。

2. ナタデココ生産菌のコロニー形態とナタデココ生産能との相関性

前述のように、継代培養中にナタデココ生産性が著しく変化することから、ナタデココの安定生産のためには、高生産株を効率よく選抜し、植え継ぐことが肝

要である。我々は、CE 寒天培地上のナタデココ生産株のコロニー形態には、光沢のあるコロニー (Smooth) と光沢のないコロニー (Rough), その中間的なコロニー (R/S) の 3 種類が存在することを確認した (図 2A)。20 回継代培養後のコロニー形態とナタデココ生産能を比較したところ、R 型コロニーは良好なナタデココ生産性を示したのに対して、S 型コロニーは試験管の底部に菌体が沈降する傾向があり、ナタデココの生産性は低下していた (図 2B)。R/S 型コロニーは、R 型と S 型が混在している状態であると考えられ、それらの比率によりナタデココの生産性は大きく異なるものと考えられた。継代培養中に生産性が低下した No.3 および No.4 は当初 R 型コロニーを形成していたが、継代培養を繰り返すことにより S 型 (No.3) または R/S 型 (No.4) に変化していた。また、継代培養により生産性の改善が見られた No.6 は、継代培養当初は S 型コロニーを形成していたが、20 回継代培養後には R/S 型コロニーとなっていた。このようなコロニー形態の変化に関しては、松下らも *Acetobacter aceti* において同様な報告をしている。³⁾ また、彼らは熱耐性酢酸菌 *Acetobacter*

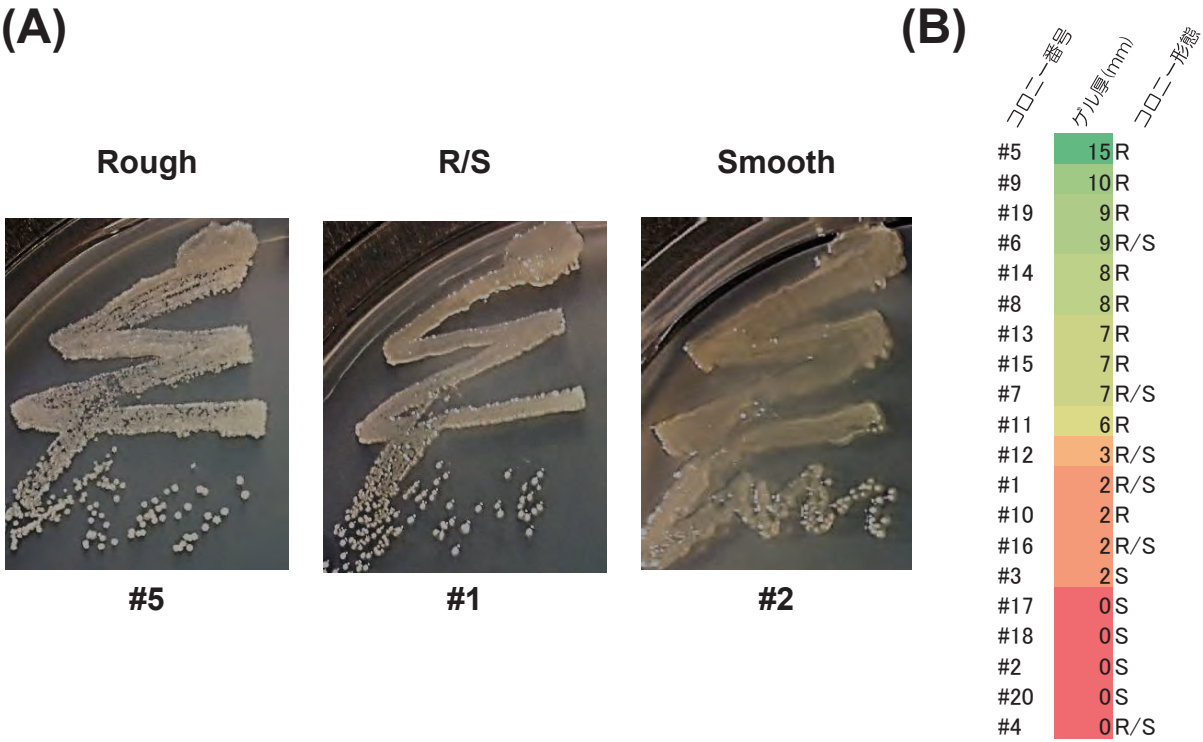


図 2 ナタデココ生産株のコロニー形態とセルロース生産能の相関性

(A) CE 寒天培地上でのナタデココ生産株のコロニー形態。Rough (No.5) および R/S (No.1), Smooth (No.2) 型のコロニー例を示している。(B) CE 寒天培地で 20 回継代培養した後の各コロニーのナタデココ生産能とコロニー形態の比較。

tropicalis を用いたトランスポゾン解析により, *polE* 遺伝子内におこる変異により菌体外多糖の合成能が失われると S 型コロニーを形成することも明らかにしている.⁴⁾ これらのことから, R 型コロニーを形成する酢酸菌は, 多糖からなる菌膜を形成することにより培地表面に浮かび, 酸素を利用しながら増殖し, セルロースを生産することができるが, S 型コロニーは菌膜を形成できないため, 培地の底部に沈降し, 酸素を十分に利用することができず, セルロースも生産することができないものと考えられる.

本研究では, ナタデココ生産能とコロニー形態の相関性を明らかにすることができた. ナタデココ生産株のコロニー形態は極めて変化しやすいが, 生産性の高い R 型コロニーを注意深く選抜することにより, ナタデココの安定生産に繋げることができるかもしれない. 今回使用したナタデココ生産用種菌は, 16S rDNA 配列比較により *G. xylinus* であることが確認できたが, S 型コロニーを形成する原因変異や HS 培地で増殖できない原因については未だ不明であり, 今後のゲノムシーケンス解析などにより明らかにする予定である.

謝辞

本研究で使用したナタデココ生産用種菌やココナツミルクを提供して下さったフジッコ株式会社に, 深く感謝いたします.

参考文献

- 1) 田島健次. ナタデココ. 食と微生物の辞典. 編 北本勝ひこ, 春田伸, 丸山潤一, 後藤慶一, 尾花望, 齋藤勝晴. 第 1 章 48 項. 96-97 (2017)
- 2) Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., and Shirai, M. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res* 37, 5768-5783 (2009)
- 3) Matsushita, K., Ebisuya, H., Ameyama, M. and Adachi, O. Change of the terminal oxidase from cytochrome a1 in shaking culture to cytochrome o in static culture of *Acetobacter aceti*. *J Bacteriol* 174, 122-129 (1992)
- 4) Deeksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O. and Matsushita, K. Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, *polE*, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Microbiology* 151, 4111-4120 (2005)