(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-136850
(P2016-136850A)
(43)公開日　平成28年8月4日(2016.8.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAZ	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063
C12N 7/00	(2006.01)	C12N	7/00		4B065

審査請求 未請求　請求項の数 6　OL　（全 17 頁）

(21)出願番号　特願2015-12281(P2015-12281)
(22)出願日　平成27年1月26日(2015.1.26)

特許法第３０条第２項適用申請有り　（１）平成２６年７月２６日に第１３回微生物研究会のポスター発表にて発表　（２）平成２６年１０月２４日に平成２６年度細菌細胞の増殖と代謝研究会の口頭発表にて発表

(71)出願人　514057743
株式会社Ｍｉｚｋａｎ　Ｈｏｌｄｉｎｇｓ
愛知県半田市中村町二丁目６番地
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74)代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次
(74)代理人　100096482
弁理士　東海　裕作
(74)代理人　100188352
弁理士　松田　一弘
(74)代理人　100131093
弁理士　堀内　真
(74)代理人　100150902
弁理士　山内　正子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酢酸菌ファージ

(57)【要約】　（修正有）
【課題】酢酸発酵液中における酢酸菌ファージの有無や、酢酸菌ファージの感染サイクル（溶原サイクル又は溶菌サイクル）の状態を高感度に検出するための簡便性に優れる酢酸菌ファージ検出方法と検出用キットの提供。
【解決手段】酢酸発酵液やかかる発酵液の菌体画分及び培養上清画分等の被検試料より、特定のゲノム配列を有する３種類の酢酸菌に感染するファージを特定し、そのゲノム配列を決定した。そのゲノム配列情報より、これら酢酸菌ファージを特異的に検出できる特定の塩基配列を持つプライマーセットを設計して、ＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法等の方法により該酢酸菌ファージを検出することができる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出するか、
配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出するか、あるいは
配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出する
ことを特徴とする酢酸菌ファージの検出方法。
【請求項２】
配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法により、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出し、
配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ法により、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出し、
配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ法により、アセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする請求項１に記載の検出方法。
【請求項３】
配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列にアニールし、
配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列にアニールし、
配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする請求項２に記載の検出方法。
【請求項４】
配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号１に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物、
配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号２に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物、あるいは

配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号３に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物
を備えることを特徴とする酢酸菌ファージの検出用キット。
【請求項５】
配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列にアニールし、
配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列にアニールし、
配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする請求項４に記載の検出用キット。
【請求項６】
以下の［酢酸菌ファージ群］に含まれる少なくとも１種の酢酸菌ファージ。
［酢酸菌ファージ群］
配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する、グルコンアセトバクター・ザイリナス由来の酢酸菌ファージ又はその変異株
配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する、アセトバクター・オルレアネンシス由来の酢酸菌ファージ又はその変異株
配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する、アセトバクター・パスツリアヌス由来の酢酸菌ファージ又はその変異株
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、グルコンアセトバクター・ザイリナス（Gluconacetobacter xylinus）に由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出するか、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・オルレアネンシス（Acetobacter orleanensis）に由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出するか、あるいは配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・パスツリアヌス（Acetobacter pasteurianus）に由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出する酢酸菌ファージの検出方法や、かかる検出方法に用いるための検出用キット等に関する。
【背景技術】
【０００２】
乳酸菌による乳酸発酵を利用し、ヨーグルト、チーズ等の発酵乳製品を製造する現場において、バクテリオファージ（ファージ）の乳酸菌への感染と、それに伴う溶菌が、酸生成の低下、発酵の遅延、発酵乳製品の製造の失敗等を引き起こすことが知られている。このため、発酵乳製品の製造においては、乳酸菌へのファージ感染を防止することが重要となる。乳酸菌へのファージ感染を防止する方法としては、カルチャー及びスターターの無菌的取扱い、施設（工場、試験室等）内や使用原料の厳密な殺菌操作、多菌株カルチャーの使用、カルチャーの交代、ファージ耐性菌株の導入等が知られている（非特許文献１）。

【０００３】
乳酸菌へのファージ感染を防止するうえで、ファージ感染を早期発見することも重要である。ファージ感染を検出する方法としては、検出対象のファージに対応する宿主乳酸菌を寒天重層法により培養し、プラークを形成させて観察する方法が知られている（特許文献１、非特許文献２）。また、定量ＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法により、牛乳や乳清からラクトコッカス属（Lactococcal）由来のファージを検出する方法も報告されている（非特許文献３）。
【０００４】
一方、酢酸菌による酢酸発酵を利用し、食酢製品を製造する現場においても、ファージによる感染が原因と思われる発酵不良が発生することがある。実際に、酢酸発酵液からファージが単離・解析されたことは報告されているものの（非特許文献４）、酢酸発酵液中における酢酸菌ファージの有無や、酢酸菌ファージの感染サイクル（溶原サイクル又は溶菌サイクル）の状態を検出する方法は知られていなかった。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】特開２０１０－２２０５２７号公報
【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】曽根敏麿監訳、「ヨーグルト」、第３０～３２頁、第１７０頁、実業図書株式会社、１９８６年４月１０日発行
【非特許文献２】社団法人日本化学会編、「第５版 実験化学講座２９ バイオテクノロジーの基本技術」、第１０４～１０５頁、丸善株式会社、平成１８年７月２５日発行
【非特許文献３】Ly-Chatain, M.H. et al., Int. J. Microbiol. 2011: doi:10.1155/2011/594369 (2011)
【非特許文献４】Sellmer, S. et al., System. Appl. Microbiol. 15: 610-616 (1992)
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明の課題は、簡便性に優れ、且つ、酢酸発酵液中における酢酸菌ファージの有無や、酢酸菌ファージの感染サイクル（溶原サイクル又は溶菌サイクル）の状態を高感度に検出することができる、酢酸菌ファージの検出方法や検出用キットを提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明者らは、まず、「発酵不良を起こす溶菌性ファージは環境中に存在し、それが発酵槽に入り込み、発酵不良を引き起こす」との仮説を基に、環境中からファージを取得する試みを６年ほど行ったが、酢酸菌に感染するファージを取得することはできなかった。そこで、「環境中には溶原性ファージを有する酢酸菌が存在し、溶原性ファージのゲノムＤＮＡ領域に変異が入り、溶菌性となり、さらに何らかの要因で溶菌サイクルが誘導され、そのことにより発酵不良を引き起こす」という仮説を立てて、ターゲットを溶原化ファージに切り替え、マイトマイシンＣ（ＭＭＣ）によるスクリーニングを実施することを試みた。具体的には、株式会社Ｍｉｚｋａｎ Ｈｏｌｄｉｎｇｓで入手した酢酸菌株１６００種に、ファージが溶原化している酢酸菌株（酢酸菌溶原株）が含まれている可能性を考え、かかる１６００種の酢酸菌株を用いて、マイトマイシンＣ（ＭＭＣ）による溶原株の１・２次スクリーニング、及び透過型電子顕微鏡によるファージ粒子の観察を行った。ＭＭＣは酸に弱く、分解されるため、菌株の違いや培養の進み具合の違いにより酸の生成量が異なり、その結果、同じ条件でもファージ粒子が誘導される場合と誘導されない場合があり、安定した結果が得られず苦労し、また、最終的には、ファージ粒子の存在の有無を顕微鏡で１サンプルずつ観察する必要があるため、観察に多くの時間を要したため、酢酸菌溶原株の単離を諦めかけたが、たまたま実施例１に記載の方法で１・２次スクリーニン

グを行ったところ、３種類の酢酸菌株（グルコンアセトバクター・ザイリナス、アセトバクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌス）由来のファージ粒子を確認することができた。また、かかる３種類の酢酸菌株由来のファージのゲノムＤＮＡを解析し、ファージゲノムＤＮＡを検出するためのプライマーセットを用いたＰＣＲ法を行うことにより、酢酸発酵液において上記３種類の酢酸菌株由来のファージが溶原化している酢酸菌を検出できることを確認した。本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【０００９】

すなわち、本発明は（１）配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出するか、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出するか、あるいは配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする酢酸菌ファージの検出方法や、（２）配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法により、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出し、配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ法により、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出し、配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ法により、アセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする上記（１）に記載の検出方法や、（３）配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記（２）に記載の検出方法に関する。

【００１０】

また、本発明は（４）配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号１に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物、配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号２に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物、あるいは配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にア

ニールするフォワードプライマーと、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号３に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物を備えることを特徴とする酢酸菌ファージの検出用キットや、（５）配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記（４）に記載の検出用キットに関する。

【００１１】

また、本発明は（６）以下の［酢酸菌ファージ群］に含まれる少なくとも１種の酢酸菌ファージに関する。

［酢酸菌ファージ群］

配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する、グルコンアセトバクター・ザイリナス由来の酢酸菌ファージ又はその変異株

配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する、アセトバクター・オルレアネンシス由来の酢酸菌ファージ又はその変異株

配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する、アセトバクター・パスツリアヌス由来の酢酸菌ファージ又はその変異株

【００１２】

また本発明の実施の他の形態として、〔１〕配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする酢酸菌ファージの検出方法や、〔２〕配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法により、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする上記〔１〕に記載の検出方法や、〔３〕配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記〔２〕に記載の検出方法や、〔４〕さらに、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の検出方法や、〔５〕配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ法により、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする上記〔４〕に記載の検出方法や、〔６〕配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配

列番号５に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記〔５〕に記載の検出方法や、〔７〕さらに、配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、アセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の検出方法や、〔８〕配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセットを用いたＰＣＲ法により、アセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株を検出することを特徴とする上記〔７〕に記載の検出方法や、〔９〕配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記〔８〕に記載の検出方法を挙げることができる。

【００１３】

また本発明の実施の他の形態として、〔１０〕配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号１に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物を備えることを特徴とする酢酸菌ファージの検出用キットや、〔１１〕配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号４に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記〔１０〕に記載の検出用キットや、〔１２〕さらに、配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号２に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物を備えることを特徴とする上記〔１０〕又は〔１１〕に記載の検出用キットや、〔１３〕配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号５に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記〔１２〕に記載の検出用キットや、〔１４〕さらに、配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーと、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーとのプライマーセット、又は配列番号３に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ、或いはそれらの標識物を備えることを特徴とする上記〔１０〕～〔１３〕のいずれかに記載の検出用キットや、〔１５〕配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールし、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマーが、配列番号６に示されるヌクレオチド配列にアニールすることを特徴とする上記〔１４〕に記載の検出用キットを挙げることができる。

【発明の効果】

【００１４】

本発明の酢酸菌ファージの検出方法や検出用キットを用いると、比較的簡単に、酢酸発酵液中における酢酸菌ファージの有無や、酢酸菌ファージの感染サイクルの状態を高感度に検出することができるため、酢酸発酵液におけるファージ汚染の早期発見及びファージ駆除に有用であるとともに、酢酸菌発酵液中のファージの感染サイクルを定期的にモニタリングすることにより、溶原サイクルから溶菌サイクルへの移行時期を見極め、酢酸菌ファージ汚染を防除することが可能となり、生産機会の損失を最小化できることが期待され

る。
また、本発明の酢酸菌ファージは、ファージ耐性酢酸菌のスクリーニングや変異株の作製に有用である。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】図１Ａ～Ｃは、それぞれ酢酸菌株３種（グルコンアセトバクター・ザイリナス、アセトバクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌス）由来のファージ粒子を観察した、透過型電子顕微鏡による画像である。
【図２】図２Ａ～Ｃは、それぞれ酢酸菌株３種（グルコンアセトバクター・ザイリナス、アセトバクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌス）由来のファージゲノムＤＮＡを、ＰＣＲを用いて検出した結果を示す図である。図中レーン「菌体」は菌体画分を示し、レーン「Ｍ」はＤＮＡ分子量マーカー（TakaRa社製）を示す。
【図３】図３Ａ～Ｃは、それぞれ麦芽酢（モルトビネガー）発酵不良液における酢酸菌株３種（グルコンアセトバクター・ザイリナス、アセトバクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌス）由来のファージゲノムＤＮＡを、ＰＣＲを用いて検出した結果を示す図である。図中レーン「菌体」は菌体画分を示し、レーン「上清」は上清画分を示し、レーン「Ｍ」はＤＮＡ分子量マーカー（TakaRa社製）を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１６】
本発明の酢酸菌ファージの検出方法（以下、「本件検出方法」ということがある）としては、被検試料中の、グルコンアセトバクター・ザイリナスに由来する配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株（以下、これらを総称して「本件酢酸菌ファージ１」ということがある）を、配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出するか、アセトバクター・オルレアネンシスに由来する配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株（以下、これらを総称して「本件酢酸菌ファージ２」ということがある）を、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出するか、あるいはアセトバクター・パスツリアヌスに由来する配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージ、又はその変異株（以下、これらを総称して「本件酢酸菌ファージ３」ということがある）を、配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出する方法であれば特に制限されず、例えば、本件酢酸菌ファージ１を、配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出することに加えて、さらに本件酢酸菌ファージ２を、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、同時、逐次、又は個別に検出する方法や、本件酢酸菌ファージ１を、配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出することに加えて、さらに本件酢酸菌ファージ３を、配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、同時、逐次、又は個別に検出する方法や、本件酢酸菌ファージ１を、配列番号１に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出することに加えて、さらに本件酢酸菌ファージ２を、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、同時、逐次、又は個別に検出し、かつ、本件酢酸菌ファージ３を、配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、同時、逐次、又は個別に検出する方法や、本件酢酸菌ファージ２を、配列番号２に示されるヌクレオチド配列情報に基づき検出することに加えて、さらに本件酢酸菌ファージ３を、配列番号３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、同時、逐次、又は個別に検出する方法であってもよい。
【００１７】
また、本発明の酢酸菌ファージの検出用キット（以下、「本件検出用キット」ということがある）としては、配列番号１に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマー（以下、「本件フォワードプライマー１」ということがある）と、配列番号１に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマー（以下、「本件リバースプライマー１」ということがある）とのプライマーセット（以下、「本件プライマーセット１」ということがある）、又は配列番号１に示されるヌクレオチド配列若し

くはその相補配列にアニールするプローブ（以下、「本件プローブ１」ということがある）、或いはそれらの標識物や、配列番号２に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマー（以下、「本件フォワードプライマー２」ということがある）と、配列番号２に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマー（以下、「本件リバースプライマー２」ということがある）とのプライマーセット（以下、「本件プライマーセット２」ということがある）、又は配列番号２に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ（以下、「本件プローブ２」ということがある）、或いはそれらの標識物や、配列番号３に示されるヌクレオチド配列の相補配列にアニールするフォワードプライマー（以下、「本件フォワードプライマー３」ということがある）と、配列番号３に示されるヌクレオチド配列にアニールするリバースプライマー（以下、「本件リバースプライマー３」ということがある）とのプライマーセット（以下、「本件プライマーセット３」ということがある）、又は配列番号３に示されるヌクレオチド配列若しくはその相補配列にアニールするプローブ（以下、「本件プローブ３」ということがある）、或いはそれらの標識物を備えるキットであれば特に制限されず、例えば、本件プライマーセット１若しくは本件プローブ１又はそれらの標識物に加えて、さらに本件プライマーセット２若しくは本件プローブ２又はそれらの標識物を備えるキットや、本件プライマーセット１若しくは本件プローブ１又はそれらの標識物に加えて、さらに本件プライマーセット３若しくは本件プローブ３又はそれらの標識物を備えるキットや、本件プライマーセット１若しくは本件プローブ１又はそれらの標識物に加えて、さらに本件プライマーセット２若しくは本件プローブ２又はそれらの標識物と、本件プライマーセット３若しくは本件プローブ３又はそれらの標識物とを備えるキットや、本件プライマーセット２若しくは本件プローブ２又はそれらの標識物に加えて、さらに本件プライマーセット３若しくは本件プローブ３又はそれらの標識物を備えるキットであってもよい。本件検出用キットは、酢酸菌ファージの検出用キットとしての用途に限定されるものである。そして、このキットには、一般にこの種の検出キットに用いられる成分、例えば担体、ｐＨ緩衝剤、安定剤の他、酢酸菌ファージを検出するための説明書等の添付文書が通常含まれる。

【００１８】

本発明において、「アニールする」とは、フォワードプライマー及びリバースプライマーやプローブが、鋳型ＤＮＡである本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡと相補的に結合することを意味し、ここで相補的な結合とは、具体的には、アデニンヌクレオチド（Ａ）とチミンヌクレオチド（Ｔ）との結合、及びグアニンヌクレオチド（Ｇ）とシトシンヌクレオチド（Ｃ）との結合を意味する。

【００１９】

本件酢酸菌ファージ１における変異株は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列において、１若しくは数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、付加又は逆位されたヌクレオチド配列からなり、かつ配列番号１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％の同一性を有するゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージである。

【００２０】

また、本件酢酸菌ファージ２における変異株は、配列番号２に示されるヌクレオチド配列において、１若しくは数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、付加又は逆位されたヌクレオチド配列からなり、かつ配列番号２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％の同一性を有するゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージである。

【００２１】

また、本件酢酸菌ファージ３における変異株は、配列番号３に示されるヌクレオチド配列において、１若しくは数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、付加又は逆位されたヌクレオチド配列からなり、かつ配列番号３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％の同一性を有するゲノムＤＮＡを有する酢酸菌ファージである。

【００２２】

本発明において、「１若しくは数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、付加又は逆位

されたヌクレオチド配列」とは、例えば１～３０個の範囲内、好ましくは１～２０個の範囲内、より好ましくは１～１５個の範囲内、さらに好ましくは１～１０個の範囲内、より好ましくは１～５個の範囲内、さらに好ましくは１～３個の範囲内、より好ましくは１～２個の範囲内の数のヌクレオチドが置換、欠失、挿入、付加又は逆位されたヌクレオチド配列を意味する。

【００２３】

本発明において、「少なくとも８０％の同一性」とは、同一性が８０％以上であることを意味し、好ましくは８５％以上、より好ましくは８８％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９３％以上、特に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の同一性を意味する。

【００２４】

本件検出方法において、被検試料中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出された場合、かかる被検試料は、本件酢酸菌ファージ１～３により汚染されている可能性が高いと判定（評価）することができ、上記被検試料中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出されなかった場合、上記被検試料は、本件酢酸菌ファージ１～３により汚染されている可能性が低いと判定（評価）することができる。酢酸菌ファージの感染サイクル（溶原サイクル又は溶菌サイクル）の状態を検出する場合、上記被検試料としては、酢酸発酵液の菌体画分及び培養上清画分が好ましい。すなわち、酢酸発酵液の菌体画分及び培養上清画分を用いて本件検出方法を実施した場合、酢酸発酵液の菌体画分中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出され、かつ、酢酸発酵液の培養上清画分中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出されなかったとき、本件酢酸菌ファージ１～３は溶原サイクルの状態にある可能性が高いと判定（評価）することができ、酢酸発酵液の菌体画分中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出され、かつ、酢酸発酵液の培養上清画分中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出されたとき、本件酢酸菌ファージ１～３は溶菌サイクルに移行する予兆がある、又は溶菌サイクルの状態にある可能性が高いと判定（評価）することができる。また、酢酸発酵液の菌体画分中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出されず、かつ、酢酸発酵液の培養上清画分中に本件酢酸菌ファージ１～３が検出されたとき、本件酢酸菌ファージ１～３は、溶菌ファージとして外部から酢酸発酵液に混入した可能性が高いと判定（評価）することもできる。

【００２５】

配列番号１～３に示されるヌクレオチド配列情報に基づき、本件酢酸菌ファージ１～３を検出する方法としては、配列番号１～３に示されるヌクレオチド配列の少なくとも一部にアニール（ハイブリダイズ）するプライマーやプローブを選択し、かかるプライマーやプローブを用いて本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡを特異的に検出できる方法であればどのような方法であってもよく、具体的には、被検試料中のＤＮＡを抽出・精製し、本件プライマーセット１～３を用いたＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法により検出する方法や、本件プローブ１～３を用いたサザンハイブリダイゼーション法により検出する方法や、被検試料と本件プローブ１～３を用いたＦＩＳＨ（Fluorescent in situ hybridization）法により検出する方法を挙げることができ、これらの中でも簡便性に優れているため、本件プライマーセット１～３を用いたＰＣＲ法により検出する方法が好ましい。ＰＣＲ法、サザンハイブリダイゼーション法、ＦＩＳＨ法等の方法は、モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリーマニュアル（Molecular cloning,A laboratorymanual）に記載の方法にしたがって行うこともできるし、市販のキット製品、例えば、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ［東洋紡績社製］、TaKaRa PCR Amplification Kit［TaKaRa社製］等のＰＣＲ用キットや、Super Hybr Kit［Molecular Research Center社製］、Detector AP Chemiluminescent Blotting Kit［SeraCare Life Science社製］等のサザンハイブリダイゼーション用キットや、Label IT FISH Kit［TaKaRa社製］、Zyto Light［Zyto Vision社製］等のＦＩＳＨ用キットを用いて、製品添付の説明書にしたがって行うこともできる。

【００２６】

本発明において、フォワードプライマー及びリバースプライマーは、通常、鋳型ＤＮＡ

である本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡ由来の増幅産物が特異的に生成されるように選択される。すなわち、配列番号１に示されるヌクレオチド配列において１番目のヌクレオチドを上流とし、５４１９８番目のヌクレオチドを下流とした場合、本件フォワードプライマー１の３’末端におけるヌクレオチドは、フォワードプライマーとリバースプライマーによる二本鎖ＤＮＡ形成（プライマーダイマー形成）による擬陽性を回避することも考慮すると、通常、本件リバースプライマー１の３’末端におけるヌクレオチドよりも少なくとも上流にアニールするように選択される。

【００２７】

また、配列番号２に示されるヌクレオチド配列において１番目のヌクレオチドを上流とし、３４１００番目のヌクレオチドを下流とした場合、本件フォワードプライマー２の３’末端におけるヌクレオチドは、プライマーダイマー形成による擬陽性を回避することも考慮すると、通常、本件リバースプライマー２の３’末端におけるヌクレオチドよりも少なくとも上流にアニールするように選択される。

【００２８】

また、配列番号３に示されるヌクレオチド配列において１番目のヌクレオチドを上流とし、５３０００番目のヌクレオチドを下流とした場合、プライマーダイマー形成による擬陽性を回避することも考慮すると、通常、本件リバースプライマー３の３’末端におけるヌクレオチドよりも少なくとも上流にアニールするように選択される。

【００２９】

本発明において、フォワードプライマー及びリバースプライマーにより増幅（生成）されるＤＮＡ産物の長さや、フォワードプライマー及びリバースプライマーの長さや、フォワードプライマー及びリバースプライマーがアニールする部位等は、ＰＣＲによるＤＮＡの増幅効率や検出効率を考慮して適宜選択することができる。

【００３０】

例えば、フォワードプライマーの３’末端におけるヌクレオチドと、リバースプライマーの３’末端におけるヌクレオチドとの間で増幅されるＤＮＡ産物の長さは、通常５～２０００塩基長（ヌクレオチド長）であり、好ましくは１０～１０００塩基長であり、より好ましくは２０～８００塩基長であり、さらに好ましくは３０～６００塩基長であり、さらにより好ましくは４０～５００塩基長である。

【００３１】

例えば、フォワードプライマー及びリバースプライマーの長さは、通常１０～１００塩基長であり、好ましくは１０～４０塩基長であり、より好ましくは１０～３０塩基長であり、さらに好ましくは１５～３０塩基長である。

【００３２】

フォワードプライマー及びリバースプライマーがアニールする部位は、具体的には、フォワードプライマーが本件フォワードプライマー１の場合、配列番号４に示されるヌクレオチド配列の相補配列を挙げることができ、また、フォワードプライマーが本件フォワードプライマー２の場合、配列番号５に示されるヌクレオチド配列の相補配列を挙げることができ、また、フォワードプライマーが本件フォワードプライマー３の場合、配列番号６に示されるヌクレオチド配列の相補配列を挙げることができ、また、リバースプライマーが本件リバースプライマー１の場合、配列番号４に示されるヌクレオチド配列を挙げることができ、また、リバースプライマーが本件リバースプライマー２の場合、配列番号５に示されるヌクレオチド配列を挙げることができ、また、リバースプライマーが本件リバースプライマー３の場合、配列番号６に示されるヌクレオチド配列を挙げることができる。

【００３３】

本発明において、フォワードプライマー及びリバースプライマーは、その少なくとも一部が鋳型ＤＮＡ（本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡ）とアニール（ハイブリダイズ）し、かつ、ＰＣＲにより増幅産物を生成できるものであればよく、また、プローブは、その少なくとも一部が鋳型ＤＮＡ（本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡ）とアニール（ハイブリダイズ）できるものであればよく、ここで「少なくとも一部」とは、通常

、全ヌクレオチド配列に対して６０％以上を意味し、好ましくは６５％以上であり、より好ましくは７０％以上であり、さらに好ましくは７５％以上であり、さらにより好ましくは８０％以上であり、特に好ましくは８５％以上であり、最も好ましくは９０％以上を意味する。

【００３４】

本発明において、フォワードプライマー及びリバースプライマーは、ＰＣＲで用いるポリメラーゼがプライマーの３’末端で複合体を形成し、ＤＮＡ鎖を伸長することを考慮すると、かかるプライマーの３’末端のヌクレオチドは、鋳型ＤＮＡ（本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡ）とアニールするように設計することが好ましく、さらに、プライマーの３’末端でのポリメラーゼ／プライマー複合体の安定性を高めるために、Ｇ又はＣとなるように設計することがより好ましい。

【００３５】

本発明において、プローブの長さや、プローブがアニールする部位等は、ハイブリダイゼーションの効率や特異性を考慮して適宜選択することができる。

【００３６】

例えば、プローブの長さは、通常５０～２０００塩基長であり、好ましくは１００～１５００塩基長であり、より好ましくは２００～１０００塩基長であり、さらに好ましくは３００～８００塩基長である。

【００３７】

本件検出用キットの標識物における標識物質としては、ペルオキシダーゼ（例えば、horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescence Protein；ＧＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（Cyan Fluorescence Protein；ＣＦＰ）、青色蛍光タンパク質（Blue Fluorescence Protein；ＢＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（Yellow Fluorescence Protein；ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（Red Fluorescence Protein；ＲＦＰ）、ルシフェラーゼ（luciferase）等の蛍光タンパク質、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ若しくは^{131}Ｉ等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質を挙げることができる。

【００３８】

本件検出方法においては、本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡにおけるヌクレオチド配列情報に基づき、被検試料中の酢酸菌ファージを直接検出する点に特徴がある。したがって、マイトマイシンＣ（ＭＭＣ）を用いて酢酸菌溶原株をスクリーニングする工程や、透過型電子顕微鏡等の顕微鏡によりファージ粒子を観察する工程は通常必要としない。

【００３９】

本件酢酸菌ファージ１～３は、例えば、以下の実施例に記載の方法にしたがって、酢酸発酵液から１・２次スクリーニング及び透過型電子顕微鏡によるファージ粒子の観察や、本件酢酸菌ファージ１～３を特異的に検出するプライマーセットを用いたＰＣＲ法を行うことにより得ることができる。

【００４０】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例１】

【００４１】

１．酢酸菌溶原株の単離

酢酸菌溶原株を単離するために、ＭＭＣを用いた溶原株の１・２次スクリーニング、及

び透過型電子顕微鏡によるファージ粒子の観察を行った。

【００４２】

１－１　１・２次スクリーニング

株式会社Ｍｉｚｋａｎ　Ｈｏｌｄｉｎｇｓで入手した酢酸菌株１６００種を、０．５μｇ／ｍＬ ＭＭＣ含有ＹＰＧ（３％ グルコース、０．５％ 酵母エキス、０．２％ ポリペプトン）寒天培地に植菌し、２８℃で３日間培養した後、増殖速度の遅い酢酸菌株（ＭＭＣ感受性酢酸菌株）を１次スクリーニングし、得られたＭＭＣ感受性酢酸菌株を、０．２～４．０μｇ／ｍＬ ＭＭＣ含有ＹＰＧ液体培地に植菌し、２８℃で３日間培養し、ＭＭＣ感受性が特に高い１０６種類の酢酸菌株を２次スクリーニングした。なお、コントロールとして、ＭＭＣ不含のＹＰＧ寒天培地に上記酢酸菌を植菌した。

【００４３】

１－２　透過型電子顕微鏡によるファージ粒子の観察

１・２次スクリーニングにより得られたＭＭＣ感受性酢酸菌株１０６種を、０．２～４．０μｇ／ｍＬ ＭＭＣ含有ＹＰＧ液体培地に植菌し、OD_{660}値が０．１～０．３になるまで２８℃で培養した後、培養上清を遠心処理（７，５００×ｇ、１０分、室温）により回収し、ポリエチレングリコール８０００を添加し、４℃で一晩インキュベートした。遠心分離機（HITACHI社製、CP100MX）にて３００００ｒｐｍ、２時間、１６℃の条件下で遠心処理し、沈殿物を回収した後、透過型電子顕微鏡（日本電子社製、JEM1010）を用いてファージ粒子の有無を観察したところ、３種類の酢酸菌株（グルコンアセトバクター・ザイリナス［ＮＢＲＣ１３７７２　Komagataeibacter xylinus］、アセトバクター・オルレアネンシス［ＮＢＲＣ３１７０　Acetobacter orleanensis］、及びアセトバクター・パスツリアヌス［ＮＢＲＣ１０９４４６　Acetobacter sp.］）由来のファージ粒子が観察された（図１参照）。

【実施例２】

【００４４】

２．酢酸菌ファージのゲノムＤＮＡ解析

上記３種類の酢酸菌株（グルコンアセトバクター・ザイリナス、アセトバクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌス）由来のファージのゲノムＤＮＡを解析するために、ファージのゲノムＤＮＡや酢酸菌ゲノムＤＮＡを調製した。

【００４５】

２－１　酢酸菌ファージのゲノムＤＮＡの調製

酢酸菌株を、０．２～４．０μｇ／ｍＬ ＭＭＣ含有ＹＰＧ液体培地に植菌し、OD_{660}値が０．１～０．３になるまで２８℃で培養した後、培養上清を遠心処理により回収し、ポリエチレングリコール８０００を添加し、４℃で一晩インキュベートした。８，０００×ｇ、４℃で２０分間遠心後、沈殿物を滅菌水に懸濁し、２０μｇ／ｍｌ ＤＮａｓｅＩ（Sigma社製）及び１０μｇ／ｍＬ ＲＮａｓｅＡ（Sigma社製）で、３７℃、３０分間処理した。得られたファージ液からファージDNA抽出キット（NORGEN社製）を用いてファージゲノムＤＮＡを調製した。

【００４６】

２－２　酢酸菌ゲノムＤＮＡの調製

酢酸菌株を、０．２～４．０μｇ／ｍＬ ＭＭＣ含有ＹＰＧ液体培地に植菌し、OD_{660}値が０．１～０．３になるまで２８℃で培養した後、培養上清を遠心処理により回収し、ポリエチレングリコール８０００を添加し、４℃で一晩インキュベートした。８，０００×ｇ、４℃で２０分間遠心後、沈殿物（菌体画分）を用いてillustra bacteria genomicPrep Mini Spin kit（GEヘルスケア・ジャパン社製）により酢酸菌ゲノムＤＮＡを精製した。

【００４７】

２－３　酢酸菌ファージのゲノムＤＮＡ解析

グルコンアセトバクター・ザイリナス由来のファージゲノムＤＮＡを、上記「２－１　酢酸菌ファージのゲノムＤＮＡの調製」に記載の方法にしたがって調製し、また、アセト

バクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌスのゲノムＤＮＡを、上記「２－２　酢酸菌ゲノムＤＮＡの調製」に記載の方法にしたがって調製し、外部委託（北海道システムサイエンス社）し、次世代シークエンサーによる解析を行った。その結果、上記３種類の酢酸菌株（グルコンアセトバクター・ザイリナス、アセトバクター・オルレアネンシス、及びアセトバクター・パスツリアヌス）由来のファージのうち、グルコンアセトバクター・ザイリナス由来のファージ（本件酢酸菌ファージ１）は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有し、アセトバクター・オルレアネンシス由来のファージ（本件酢酸菌ファージ２）は、配列番号２に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有し、アセトバクター・パスツリアヌス由来のファージ（本件酢酸菌ファージ３）は、配列番号３に示されるヌクレオチド配列からなるゲノムＤＮＡを有することが明らかとなった。

【実施例３】

【００４８】

３．モルトビネガー発酵不良液における本件酢酸菌ファージ１～３の検出

酢酸発酵が不良となった場合に、本件酢酸菌ファージ１～３が含まれているかどうかや、効率よく検出できるかどうかについて、モルトビネガー発酵不良液の菌体画分と上清画分とを用いてＰＣＲ法による解析を行った。

【００４９】

３－１　モルトビネガー発酵不良液の菌体画分と上清画分の調製

ミツカングループ工場で得られたモルトビネガー発酵不良液を遠心処理（７，５００×ｇ、１０分、室温）により上清と沈殿物を分離し、かかる沈殿物を菌体画分とした。上清は、さらに０．４５μｍフィルターで濾過し酢酸菌を取り除く処理を行った後、２０μｇ／ｍｌ　ＤＮａｓｅｌ（Sigma社製）及び１０μｇ／ｍＬ　ＲＮａｓｅＡ（Sigma社製）で、３７℃、３０分間処理したものを上清画分とした。

【００５０】

３－２　ＰＣＲ法

モルトビネガー発酵不良液の菌体画分と上清画分を適宜希釈した後、本件酢酸菌ファージ１～３を検出するためのプライマーセット（表１参照）とＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ（東洋紡績社製）を用いて製品添付のプロトコールにしたがってＰＣＲを行った。なお、本件プライマーセット１は、本件酢酸菌ファージ１の「tail protein」遺伝子領域において、配列番号４に示されるヌクレオチド配列からなるＤＮＡ領域を増幅するものであり、本件プライマーセット２は、本件酢酸菌ファージ２の「terminase」遺伝子領域において、配列番号５に示されるヌクレオチド配列からなるＤＮＡ領域を増幅するものであり、本件プライマーセット３は、本件酢酸菌ファージ３の「hypothetical protein」遺伝子領域において、配列番号６に示されるヌクレオチド配列を増幅するものである。

【００５１】

【表１】

プライマーセット	ヌクレオチド配列
本件酢酸菌ファージ１検出用	
フォワードプライマー	5’-GAYGTNATHTGYAAYCCNGC-3’（配列番号７）
リバースプライマー	5’-TGRTAYTGNACYTGNACRTC-3’（配列番号８）
本件酢酸菌ファージ２検出用	
フォワードプライマー	5’-GCGTTTTCCGGCATGGTATCTG-3’（配列番号９）
リバースプライマー	5’-TCATCCAGCAGGCGGCCTGC-3’（配列番号１０）
本件酢酸菌ファージ３検出用	
フォワードプライマー	5’-GGTCTGGCCGAGAAATACGG-3’（配列番号１１）
リバースプライマー	5’-CACTTGGCAAAGATGGCTTC-3’（配列番号１２）

表中、「Y」はC又はTを示し、「N」は、A、C、G、又はTを示し、「H」は、A、C、又はTを示し、「R」は、A又はGを示す。

【００５２】

まず、予備実験として、実施例１で単離した３種類の酢酸菌溶原株から菌体画分を取得し、酢酸菌ゲノムＤＮＡを調製し、ＰＣＲによる解析を行ったところ、本件酢酸菌ファージ１～３のゲノムＤＮＡ由来のバンドが検出されることが確認された（図２参照）。

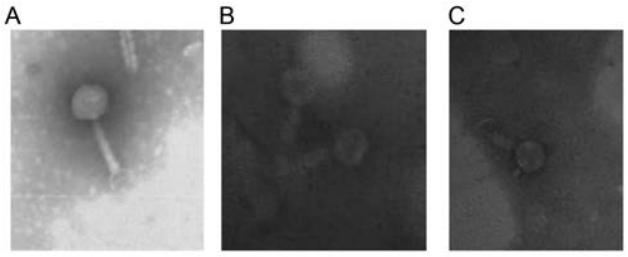
次に、モルトビネガー発酵不良液の菌体画分と上清画分を用いたＰＣＲによる解析を行ったところ、本件酢酸菌ファージ１のゲノムＤＮＡ由来のバンドは、上清画分のみに検出され（図３Ａ参照）、本件酢酸菌ファージ２のゲノムＤＮＡ由来のバンドは、菌体画分及び上清画分のいずれにおいても検出されず（図３Ｂ参照）、また、本件酢酸菌ファージ３のゲノムＤＮＡ由来のバンドは、菌体画分のみに検出される（図３Ｃ参照）ことが明らかとなった。これらの結果は、本件酢酸菌ファージ１は、外部からモルトビネガー発酵液に混入した可能性が高く、また、本件酢酸菌ファージ２は、モルトビネガー発酵不良液中含まれている可能性は低く、また、本件酢酸菌ファージ３は、モルトビネガー発酵不良液中で溶原化している可能性は高いが、溶菌化している可能性は低いことを示している。またこれらの結果から、本件酢酸菌ファージ１が、モルトビネガー発酵不良を引き起こす原因の１つであることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

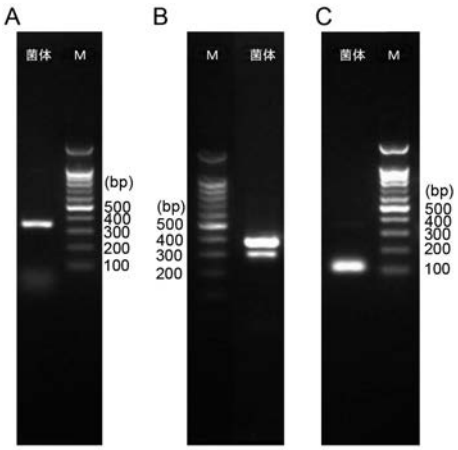
【００５３】

本発明は、食酢及び食酢含有食品・飲料の製造分野において利用できる。

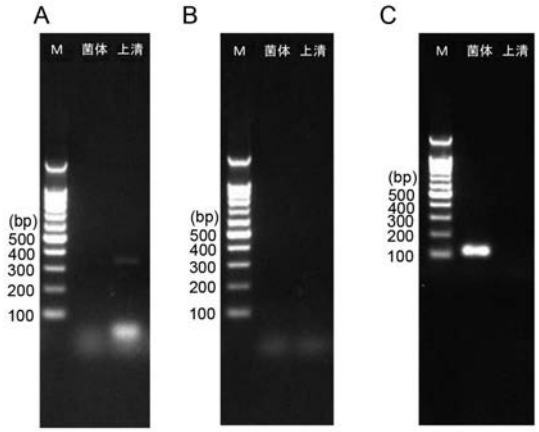
【図１】



【図２】



【図３】



【配列表】

20161368500000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100177714
弁理士 藤本 昌平
(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
(72)発明者 日比 徳浩
愛知県半田市中村町二丁目６番地 株式会社Ｍｉｚｋａｎ Ｈｏｌｄｉｎｇｓ内
(72)発明者 中野 繁
愛知県半田市中村町二丁目６番地 株式会社Ｍｉｚｋａｎ Ｈｏｌｄｉｎｇｓ内
(72)発明者 高本 秀司
愛知県半田市中村町二丁目６番地 株式会社Ｍｉｚｋａｎ Ｈｏｌｄｉｎｇｓ内

Ｆターム(参考) 4B024 AA05 AA11 CA01 CA20 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ10 QQ15 QR08 QR62 QS16 QS25 QS36 QX01
4B065 AA98X AA98Y BA22 CA46