

明 細 書

発明の名称：シトルリンの調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、シトルリンの調製方法に関し、さらに詳しくは、乳酸菌などの微生物を用いたシトルリンの調製方法に関する。また、本発明は、シトルリンを高濃度で含む組成物（例えば、乳製品）の製造方法に関する。さらに、本発明は、アルギニンからシトルリンへの変換効率が高められた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法、および、菌体濃度が高められた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法に関する。

背景技術

[0002] シトルリンは機能性のアミノ酸であり、日本では、医薬品として使用が認められた後に、2007年に食品として使用が認められている。また、シトルリンは海外では、2007年以前から食品として摂取され、例えば、血流改善、動脈硬化予防、精力増強の機能から、サプリメントとして販売されてきた実績がある。さらに、シトルリンは他にも、冷性改善、皮膚機能改善、疲労軽減・回復、筋肉成長、運動機能向上などの機能を有することが報告されている。

[0003] 一方、シトルリンは食品素材として極めて高価であり、さらに、その機能を発揮させるために必要な摂取量は比較的に多量（例えば、数百mg）である。従って、シトルリンを食品等に有効量で配合しようとする、その高価であることが問題となる。

[0004] シトルリンは現状では、主に発酵法で生産される。例えば、特開昭63-068091号公報（特許文献1）には、コリネバクテリウム属やブレヴィバクテリウム属に属する微生物を培養し、培養液中にL-シトルリンを生成蓄積させるL-シトルリンの製造法が開示されている。また、特開平05-168486号公報（特許文献2）には、ペディオコッカス属に属する乳酸菌

にバクテリオファージを感染させて溶菌したものを、L-アルギニンに作用させて、L-シトルリンを生成させるL-シトルリンの製造方法が開示されている。また、特開平08-089269号公報（特許文献3）には、水溶性有機溶剤で乾燥したL-オルニチン生産能欠如菌体を、L-アルギニンに接触作用させて、L-シトルリンを生成させるL-シトルリンの製造方法が開示されている。この公報には、バチルス属、シュードモナス属、ストレプトコッカス属に属する細菌が例示されている。また、特開2010-088301号公報（特許文献4）には、ビブリオ属細菌の発酵法によるL-シトルリンの製造方法が開示されている。

[0005] しかしながら、これら従来技術には、シトルリンの生産効率および生産費の観点から、まだ改善の余地があり、依然として、生産効率や費用対効果の高いシトルリンの調製方法への希求が存在しているといえる。

[0006] ここで、本発明者らの知る限りでは、乳酸菌の一種であるラクトコッカス・ラクティス（*L. lactis*）を用いて、アルギニンからシトルリンやオルニチンを生産することは報告されていないが、*L. lactis*により、アルギニンが代謝されることは幾つか報告されている（非特許文献1、2、および3）。例えば、非特許文献1および2には、*L. lactis*によって、アルギニンの全部がオルニチンに変換されたことが記載されている。また、非特許文献3には、*L. lactis*によって、アルギニンを代謝した場合に、アルギニンの全部がオルニチンに変換されることが既知の事実として記載されている。そして、特開2009-112205号公報（特許文献5）には、チーズ等の製造の発酵過程において、L-オルニチンを産生させ、オルニチン含有組成物を製造することが記載されている。

[0007] さらに、アルギニンの代謝に関する遺伝子の発現の研究では、*L. lactis*において、アルギニンからシトルリンに変換する酵素のアルギニンデイミナーゼ（ADI）と、シトルリンからオルニチンに変換する酵素のオルニチンカーボミルトランスフェラーゼ（OTC）の遺伝子が隣接してコードされていることや、これら2つの遺伝子が同一のプロモーターによって、その発現を

制御されていることが報告されている（非特許文献4）。

[0008] また、アルギニンの代謝に関する遺伝子の発現の研究では、L. lactis以外の乳酸菌として、エンテロコッカス・フェカーリス（Enterococcus faecalis）およびラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus planturum）においても、AD IとOTCの遺伝子が隣接してコードされていることや、これら2つの遺伝子が同一のプロモーターによって、その発現を制御されていることが報告されている（非特許文献5および6）。

[0009] これらの研究では、リアルタイムPCRを用いて、AD IとOTCの遺伝子の発現が同時に制御されていることを確認している。そして、L. lactisでは、様々な培養条件において、AD IとOTCの活性が測定されており（非特許文献1）、その何れの培養条件においても、AD IよりもOTCの活性が高くなることが報告されている。

[0010] つまり、これらの研究から、アルギニン代謝能を有する微生物にあっては、AD Iにより、アルギニンはシトルリンへ変換されるが、OTCにより、シトルリンは直ちにオルニチンへ変換されるため、シトルリンは培養液中に蓄積しないことが示唆されている。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：特開昭63-068091号公報
特許文献2：特開平05-168486号公報
特許文献3：特開平08-089269号公報
特許文献4：特開2010-088301号公報
特許文献5：特開2009-112205号公報

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Crow V. L., T. D. Thomas. 1982. Arginine metabolism in lactic streptococci. J. Bacteriol. 150:1024-1032.
非特許文献2：Poolman B., A. J. M. Driessen, W. N. Konings. 1987. Regulation of arginine-ornithine exchange and arginine deiminase pathway

in *Streptococcus lactis*. *Bacteriol.*, 169: 5597-5604

非特許文献3: Larsen R., G. Burist, O. P. Kuipers, J. Kok. 2004. ArgR and AhrC are required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 186: 1147-1157

非特許文献4: Budin-Verneuil A., E. Maguin, Y. Auffray, D. S. Ehrlich, V. Pichereau. 2006. Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Can. J. Microbiol.* 52: 617-622

非特許文献5: Barcelona B., A. Marina, V. Rubio. 2002. Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 184: 6289-6300

非特許文献6: Spano G., G. Chieppa, L. Beneduce, S. Massa, 2004. Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 96 185-193

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 乳酸菌などの微生物を用いて、アルギニンの大部分をシトルリンへ効率的に変換するためには、シトルリンがオルニチンへ変換されることを抑制することが有効であると考えられた。ところが、本発明者らの知る限りでは、これまでに、アルギニンの大部分をシトルリンへ効率的に変換する方法に関しては報告されていない。

[0014] 本発明者らは、今般、シトルリン産生能を有する微生物を用いて、通常（微生物の培養の至適温度）よりも高い温度で、培地を培養することにより、シトルリンを効率的に微生物に生産させることができるとの知見を得た。また、本発明者らは、シトルリン産生能を有する微生物を用いて、通常（微生物の発酵の至適温度）よりも高い温度で、原料（例えば、原料乳など）を発

酵させることにより、シトルリンを高濃度で含む組成物（例えば、発酵乳製品などの飲食品）を製造することができるとの知見を得た。

[0015] さらに、本発明者らは、アルギニン培地や原料へ添加して培養や発酵することにより、微生物のシトルリン産生能を高めることができるとの知見を得た。そして、本発明者らは、培地（培養液）のpHを制御して培養することにより、微生物の濃度（個数）を高めることができるとの知見を得た。本発明は、これらの知見に基づくものである。

[0016] 従って、本発明は、シトルリンを効率的に生産できるシトルリンの調製方法の提供をその目的としている。また、本発明は、シトルリンを高濃度で含むシトルリン含有組成物の製造方法の提供をその目的としている。

[0017] さらに、本発明は、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた微生物の培養方法や発酵方法の提供をその目的としている。そして、本発明は、シトルリン産生能を有する微生物の濃度を高めた培養方法の提供をその目的としている。

課題を解決するための手段

[0018] すなわち、本発明は以下の態様（１）～（１８）に関する。

（１）シトルリン産生能を有する微生物を培地に接種し、４０℃以上７０℃以下の温度で培養することを特徴とする、シトルリンの調製方法。

（２）シトルリン産生能を有する微生物が乳酸菌、ビフィズス菌またはプロピオン酸菌である、（１）に記載のシトルリンの調製方法。

（３）乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・ファーマンタム、およびラクトバチルス・ブフネリからなる群から選択される１種または２種以上である、（２）に記載のシトルリンの調製方法。

（４）乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス（*Lactococcus lactis* spp. *lactis*）0LS3789株、0LS3797株、および0LS3818株からなる群から選択される１種または２種以上である、（２）に記載のシトルリンの調製方法。

[0019] （５）シトルリン産生能を有する微生物を原料に添加（配合）し、４０℃以

上 7 0℃以下の温度で発酵することを特徴とする、シトルリン含有組成物の製造方法。

(6) シトルリン産生能を有する微生物が乳酸菌、ビフィズス菌またはプロピオン酸菌である、(5) に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

(7) 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・ファーマンタム、およびラクトバチルス・ブフネリからなる群から選択される 1 種または 2 種以上である、(6) に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

(8) 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* spp. *lactis*) 0LS3789株、0LS3797株、および0LS3818株からなる群から選択される 1 種または 2 種以上である、(6) に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

(9) 原料が原料乳である、(5) ~ (8) のいずれかに記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

(10) シトルリン含有組成物が飲食品である、(5) ~ (9) のいずれかに記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

[0020] (11) シトルリン産生能を有し、かつ 4 0℃以上 7 0℃以下の培養温度におけるアルギニンからシトルリンへの変換効率が高められた微生物を含む培養液の調製方法であって、シトルリン産生能を有する微生物を、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする、調製方法。

(12) 培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、

培養の途中で断続的にアルギニンを添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを添加する、(11) に記載の培養液の調製方法。

(13) シトルリン産生能を有する微生物を含み、かつ当該微生物の濃度が高められた培養液の調製方法であって、シトルリン産生能を有する微生物を、pH が 5 以上 7 以下の範囲にある培地で培養し、前記微生物の濃度を高めることを特徴とする、調製方法。

(14) アルカリの添加によって培地の pH を調整する、(13) に記載の培養液の調製方法。

[0021] (15) シトルリン産生能を有し、35℃以上70℃以下の培養温度におけるアルギニンからシトルリンへの変換効率が高められた微生物を含み、かつ当該微生物の濃度（菌体濃度）が高められた培養液の調製方法であって、シトルリン産生能を有する微生物を、アルギニンを添加し、かつpHが5以上7以下の範囲にある培地で培養して前記微生物の濃度を高めることを特徴とする、調製方法。

(16) 培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、
培養の途中で断続的にアルギニンを添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを添加する、(15)に記載の培養液の調製方法。

(17) (11)～(16)のいずれかに記載の方法によって得られた培養液を遠心分離および／または膜分離して得られる、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めたシトルリン産生能を有する微生物の調製方法。

(18) (11)～(16)のいずれかに記載の培養液の調製方法によって得られた培養液または(17)に記載の微生物の調製方法によって得られた微生物を、培地に接種して培養する、(1)～(4)のいずれかに記載のシトルリンの調製方法、もしくは原料に添加して発酵させる、(5)～(10)のいずれかに記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

発明の効果

[0022] 本発明のシトルリンの調製方法によれば、シトルリンを効率的に生産できる。また、本発明のシトルリン含有組成物の製造方法によれば、シトルリンを高濃度で含む乳製品などの栄養組成物を得られる。また、本発明の微生物の培養方法や発酵方法によれば、アルギニンからシトルリンへの変換効率が高められる。そして、本発明の微生物の培養方法によれば、微生物の濃度が高められる。さらに、本発明のシトルリンの調製方法やシトルリン含有組成物の製造方法によれば、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、および／または微生物の濃度を高めた、シトルリン産生能を有する微生物ならびに／もしくは当該培養液を用いて、シトルリンを効率的に生産できるし、シトルリンを高濃度で含む乳製品などの栄養組成物を得られる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]水酸化ナトリウムを用いて、培地（培養液）のpHを5.5に制御して、L. lactis 0LS3797株を培養したときのL. lactis 0LS3797株の菌体濃度の経時変化を示すグラフである。

[図2]培地（培養液）のpHを制御して、L. lactis 0LS3797株を培養（pH制御培養）したときの培養開始から10、11、12時間後の培養液と、L. lactis 0LS3797株を静置培養したときの培養液における、アルギニンからシトルリンへの変換効率の比較を示すグラフである。

[図3]培養の前にアルギニンをMRS培地に添加して、L. lactis 0LS3797株を培養したときのpHの経時変化、菌体濃度の経時変化、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度の経時変化を示すグラフである。

[図4]培養開始から10時間後にアルギニンを断続的にMRS培地に添加して、L. lactis 0LS3797株を培養したときのpHの経時変化、菌体濃度の経時変化、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度の経時変化を示すグラフである。

[図5]培養開始から4時間後にアルギニンを継続的にMRS培地に添加して、L. lactis 0LS3797株を培養したときのpHの経時変化、菌体濃度の経時変化、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度の経時変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0024] シトルリンの調製方法

本発明のシトルリンの調製方法は、シトルリン産生能を有する微生物を培地に接種し、通常（微生物の培養の至適温度）よりも高い温度で培養することを特徴とする。培養温度は、具体的には40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下である。また本発明の別の態様によれば、前記培養温度は40℃以上70℃以下であり、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である。

[0025] 前記したとおり、本発明における培養温度は、シトルリン産生能を有する微生物の通常の培養温度（例えば、至適温度）よりも高い温度である。このような温度域で、微生物を培養することによって、シトルリンを効率的に産生させることができる。この理由について、次のように考えられるが、以下の説明（理論）は、あくまでも仮定であって、本発明は、この理論によって、何ら限定されるものではない。すなわち、従来技術において記載したとおり、例えば、アルギニン代謝能を有する *L. lactis* は、アルギニンをシトルリンに変換する酵素のアルギニンデヒミナーゼ（ADH）と、シトルリンからオルニチンに変換する酵素のオルニチンカーボミルトランスフェラーゼ（OTC）の遺伝子を有しており、これら両者は同一のプロモーターにより発現が制御されていると考えられている。このとき、本発明のように、培養温度が高い温度の場合には、ADHにより、アルギニンからシトルリンへの変換が亢進されるか、OTCにより、シトルリンからオルニチンへの変換が抑制されるか、または、これら両方の作用や現象に伴って、シトルリンが培地（培養液）に蓄積されると考えられる。つまり、本発明のように、培養温度が高い場合には、アルギニンがシトルリンへ効率的に変換され、このため、シトルリンの効率的な調製方法を実現できると考えられる。

[0026] 本発明の培養時間は、シトルリン産生能を有する微生物を培養できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されないが、好ましくは2～48時間、より好ましくは3～36時間、さらに好ましくは4～24時間である。

[0027] 本発明のシトルリン産生能を有する微生物は、シトルリンを産生するものであれば、特に限定されないが、好ましくは40℃以上48℃以下、より好ましくは42℃以上47℃以下、さらに好ましくは44℃以上46℃以下の温度で培養して、シトルリンを効率的に産生するものであることが好ましい。また本発明の別の態様によれば、前記温度は40℃以上70℃以下であり、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である。そして、本発明におけるシトルリン産生能を有する微生物は、好ましくは、シトルリン産生能を有する乳

酸菌、ビフィズス菌またはプロピオン酸菌であり、より好ましくは、シトルリン産生能を有する乳酸菌またはビフィズス菌であり、さらに好ましくは、シトルリン産生能を有する乳酸菌である。

[0028] 本発明のシトルリン産生能を有する乳酸菌は、好ましくは、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・ファーマンタム、ラクトバチルス・ブフネリ、エンテロコッカス・フェーカリス、オエノコッカス・オエニ、ペディオコッカス・ペントサセウス、ラクトバチルス・アミロボラス、ラクトバチルス・ブレビス、およびラクトバチルス・ロイテリからなる群から選択される1種または2種以上であり、より好ましくは、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・ファーマンタム、およびラクトバチルス・ブフネリからなる群から選択される1種または2種以上であり、さらに好ましくは、ラクトコッカス・ラクティスである。

[0029] 本発明のシトルリン産生能を有するラクトコッカス・ラクティスは、好ましくは、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティスおよびラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリスからなる群から選択される1種または2種以上であり、より好ましくは、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティスであり、さらに好ましくは、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (Lactococcus lactis spp. lactis) 0LS3789株、0LS3797株、および0LS3818株からなる群から選択される1種または2種以上である。なお、これらの菌株は、後記したとおり、寄託機関に寄託されている。

[0030] 本発明のシトルリン産生能を有するラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティスは、前記したとおり、Lactococcus lactis spp. lactis 0LS3789であって、独立行政法人 製品評価技術機構 特許微生物寄託センターに受領番号：NITE BP-1387（識別の表示：Lactococcus lactis spp. lactis 0LS3789、寄託日：2012年7月18日）で寄託されているもの、Lactococcus lactis spp. lactis 0LS3797であって、独立行政法人 製品評価技術機構 特許微生物寄託センターに受領番号：NITE BP-1388（識別の表示：Lactococcus lactis spp. lactis 0LS3797、寄託日：2012年7月18日）で寄託されているもの、Lactoco

ccus lactis spp. lactis OLS3818であって、独立行政法人 製品評価技術機構 特許微生物寄託センターに受領番号：NITE BP-1389（識別の表示：Lactococcus lactis spp. lactis OLS3818、寄託日：2012年7月18日）で寄託されているものである。

[0031] ここで、Lactococcus lactis spp. lactis OLS3789は、次のような科学的な性質（形態的、培地上の特徴、生理学的な性質など）を有する。

（a）形態的な性質

培地(Lactobacilli MRS Agar、DIFCO)上のコロニー性状：円形、白色、Smooth型、扁平状

（b）生理学的な性質

菌形態：球菌、グラム染色：陽性、乳酸発酵形式：ホモ乳酸発酵、好氣的発育：+

[0032] （c）その他、当該微生物を特徴付ける性質

16srDNA配列は、以下のとおりである。（OLS3789）

GCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGGAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGT（配列番号：1）

[0033] また、Lactococcus lactis spp. lactis OLS3797は、次のような科学的な性質（形態的、培地上の特徴、生理学的な性質など）を有する。

（a）形態的な性質

培地(Lactobacilli MRS Agar、DIFCO)上のコロニー性状：円形、白色、Smooth型、扁平状

（b）生理学的な性質

菌形態：球菌、グラム染色：陽性、乳酸発酵形式：ホモ乳酸発酵、好氣的
発育：＋

[0034] (c) その他、当該微生物を特徴付ける性質

16srDNA配列は、以下のとおりである。(OLS3797)

GAAGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAG
CAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGGAACGAATGCT
AATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGAT
CCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCG
GCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGT
TGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGC
TAACTACGT (配列番号：2)

[0035] さらに、Lactococcus lactis spp. lactis OLS3818は、次のような科学的
な性質（形態的、培地上の特徴、生理学的な性質など）を有する。

(a) 形態的な性質

培地(Lactobacilli MRS Agar、DIFCO)上のコロニー性状：円形、白色、Smo
oth型、扁平状

(b) 生理学的な性質

菌形態：球菌、グラム染色：陽性、乳酸発酵形式：ホモ乳酸発酵、好氣的
発育：＋

[0036] (c) その他、当該微生物を特徴付ける性質

16srDNA配列は、以下のとおりである。(OLS3818)

GCGAAGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATG
AGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGGAACGAATG
CTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATG
ATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT

GTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAGGGACG
GCTAACTACGT（配列番号：3）

[0037] 本発明の培地は、シトルリン産生能を有する微生物を培養できるものから適宜選択されればよく、特に限定されないが、例えば、脱脂乳、脱脂濃縮乳、還元脱脂乳、及びこれらのタンパク質分解物、ホエイ、ホエイ濃縮物、還元ホエイ、及びこれらのタンパク質分解物、生乳、全脂乳（殺菌乳）、全脂濃縮乳、還元全脂乳等を含むものであり、好ましくは、脱脂乳、還元脱脂乳、及びこれらのタンパク質分解物、ホエイ、還元ホエイ、及びこれらのタンパク質分解物を含むものである。

[0038] 本発明のシトルリンの調製方法において、シトルリンは培地中に産生される。このとき、シトルリンを含有する培地を、飲食品の原料や素材等として、好ましくは、乳製品の原料や素材等として、そのまま利用してもよいし、この培地からシトルリンを分離（単離等）や濃縮等の処理により加工してから、所望の純度のシトルリンを調製して利用してもよい。このとき、飲食品には、機能性食品、栄養食品等が挙げられ、乳製品には、例えば、乳飲料、発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）、乳酸菌飲料、チーズ、アイスクリーム等が挙げられる。

[0039] シトルリン含有組成物の製造方法

本発明のシトルリン含有組成物の製造方法は、シトルリン産生能を有する微生物を原料に添加（配合）し、通常（微生物の発酵の至適温度）よりも高い温度で発酵することを特徴とする。発酵温度は、具体的には、40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下である。また本発明の別の態様によれば、前記発酵温度は40℃以上70℃以下であり、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である。

[0040] 前記したとおり、本発明における発酵温度は、シトルリン産生能を有する微生物の通常発酵温度（例えば、至適温度）よりも高い温度である。このような温度域で、微生物を培養することによって、シトルリンを効率的に産

生させることができる。この理由については、本発明のシトルリンの調製方法において既に説明した理由と同様に考えられる。

[0041] また、本発明のシトルリンの調製方法において、シトルリンを含有する培地からシトルリンを単離せずに、そのまま培地をシトルリン含有組成物として利用してもよいし、または、所望の操作（例えば、遠心分離、膜分離など）で処理した培地をシトルリン含有組成物として利用してもよい。

[0042] 本発明の発酵時間は、シトルリン産生能を有する微生物が発酵できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されないが、好ましくは2～24時間、より好ましくは3～16時間、さらに好ましくは4～12時間である。

[0043] 本発明の原料は、シトルリン産生能を有する微生物が発酵できるものから適宜選択されればよく、特に限定されないが、例えば、脱脂乳、脱脂濃縮乳、還元脱脂乳、及びこれらのタンパク質分解物、ホエイ、ホエイ濃縮物、還元ホエイ、及びこれらのタンパク質分解物、生乳、全脂乳（殺菌乳）、全脂濃縮乳、還元全脂乳等を含むものであり、好ましくは、脱脂乳、還元脱脂乳、及びこれらのタンパク質分解物、ホエイ、還元ホエイ、及びこれらのタンパク質分解物を含むものである。

[0044] 本発明の好ましい一態様によれば、原料として、原料乳を用いれば、シトルリン含有組成物として、乳原料または乳製品等が得られる。この得られた乳原料または乳製品等（シトルリン含有組成物）には、シトルリンに由来する機能が付加されており、その栄養的な価値が高められている。さらに、本発明の乳原料または乳製品等では、シトルリンを外部から添加（配合）するのではなく、その製造工程において、シトルリン含有量を高めることができるため、その乳原料または乳製品等に基づく最終製品の製造費等を低く抑えることができる。

[0045] 本発明の別の好ましい一態様によれば、原料として、発酵乳ミックス（より好ましくは、ヨーグルトミックス）を用いれば、シトルリン含有組成物として、発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）が得られる。この得られた発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）には、シトルリンに由来する機能が付

加されており、その栄養的な価値が高められている。さらに、本発明の発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）では、シトルリンを外部から添加（配合）するのではなく、その製造工程において、シトルリン含有量を高めることができるため、その発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）に基づく最終製品の製造費等を低く抑えることができる。

[0046] 本発明のシトルリン含有組成物の製造方法において、シトルリンは原料中に産生される。このとき、シトルリンを含有する原料を、飲食品の原料や素材等として、好ましくは、乳製品の原料や素材等として、そのまま利用してもよいし、この原料からシトルリンを分離（単離等）や濃縮等の処理により加工してから、所望の純度のシトルリンを調製して利用してもよい。このとき、飲食品には、機能性食品、栄養食品等が挙げられ、乳製品には、例えば、乳飲料、発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）、乳酸菌飲料、チーズ、アイスクリーム等が挙げられる。

[0047] シトルリン含有飲食品

前記したとおり、本発明のシトルリンの調製方法により得られるシトルリンを含む培地、または本発明によるシトルリン含有組成物の製造方法により得られるシトルリンを含む原料、あるいはこれらの加工品は、前記培地や原料として飲食品に適切な任意のものを選択して用いることにより、各々を飲食品そのものあるいは飲食品の原料または素材とすることができる。従って、本発明によれば、本発明のシトルリンを含む培地、またはシトルリンを含む原料、あるいはこれらの加工品を、飲食品そのものあるいは飲食品の原料または素材として利用した、シトルリン含有飲食品を提供することができる。

[0048] また、前記した本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法により得られる、シトルリンまたはシトルリン含有組成物、あるいはこれらの加工品を、飲食品（好ましくは、乳製品、より好ましくは、発酵乳）に添加（配合）して、その飲食品にシトルリンに由来する機能を付加することができる。従って、本発明によれば、本発明のシトルリンまたは

シトルリン含有組成物、あるいは、これらの加工品を、飲食品に添加して、シトルリン含有飲食品を提供することができる。

[0049] 本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法によれば、シトルリンまたはシトルリン含有組成物、あるいはこれらの加工品について、その調製費（加工費）や製造費等を低く抑えて効率的に提供することができる。従って、本発明のシトルリンまたはシトルリン含有組成物を用いることで、シトルリンに由来する機能を付加する等して商品価値を高めながら、シトルリン含有飲食品について、その製造工程においてシトルリン含有量を高めることができる等の理由により、その製造費等を低く抑えて効率的に提供することができる。

[0050] 本発明のシトルリン含有飲食品は、シトルリンの含有を許容するものであればよく、特に限定されないが、例えば、乳飲料、発酵乳（より好ましくは、ヨーグルト）、乳酸菌飲料、チーズ、アイスクリーム等の乳製品が挙げられる。

[0051] アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法

本発明のアルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法は、前記微生物を通常（微生物の発酵の至適温度）よりも高い培養温度において、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする。前記培養温度は、具体的には40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下である。また本発明の別の態様によれば、前記培養温度は40℃以上70℃以下であり、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である。

[0052] 本発明の好ましい一態様によれば、本発明のシトルリン産生能を有する微生物を、40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下の温度で培養する、前記微生物のシトルリン産生能の向上方法が提供される。また本発明の別の態様によれば、前記培養

を40℃以上70℃以下で行い、好ましい培養の上限温度は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限温度は42℃、より好ましい下限は43℃である。このとき、本発明のシトルリン産生能を有する微生物には、本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法で得られた培養物または組成物を適切に処理することにより得られた、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた微生物を用いることができる。

[0053] 前記したとおり、本発明の好ましい一態様の培地は、アルギニンを添加した培地である。このような培地の組成（配合）で、微生物を培養することによって、シトルリンを効率的に産生させることができる。この理由について、次のように考えられるが、以下の説明（理論）は、あくまでも仮定であって、本発明は、この理論によって、何ら限定されるものではない。すなわち、従来技術において記載したとおり、例えば、上記の非特許文献1および2には、*L. lactis*のアルギニンの代謝活性について、アルギニンを培地に添加すると、AD IおよびOCTをコードする遺伝子の転写量が増大することが報告されている。この知見によれば、アルギニンを培地へ添加することにより、AD Iをコードする遺伝子の転写量の増大が予想され、40℃以上70℃、ある場合には48℃以下という培養温度が高い温度の場合にも、この現象が維持されていることが考えられる。なお、アルギニンを培地に添加することにより、AD Iをコードする遺伝子の転写量が増大することや、40℃以上70℃以下、ある場合には48℃以下という培養温度が高い温度の場合にも、この現象が維持され、あるいはOCTをコードする遺伝子の転写量が抑制されることは、直ちには予想しにくい。従って、本発明が非特許文献1および2から自明であると判断することは妥当でない。

[0054] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、培養の途中で断続的にアルギニンを培地に添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを培地に添加する。これにより、シトルリン産生能を有する微生物のシトルリン産生能を高めることができる。このとき、シトルリ

ン産生能を有する微生物が、十分な濃度のアルギニンと接触する時間が長いことが好ましい。従って、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、培養の前にアルギニンを培地に添加（配合）することが好ましく、培養の前にアルギニンを培地に添加すると共に、培養の途中で断続的又は継続的にアルギニンを培地に添加（追加）することがより好ましく、とりわけ、培養の途中で継続的にアルギニンを培地に添加することがさらに好ましい。

[0055] 本発明のアルギニンの添加量は、シトルリンまたはシトルリン含有組成物、あるいは、これらの加工品を調製や製造できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されないが、培地に対し、好ましくは0.5～5質量%、より好ましくは0.7～4質量%、さらに好ましくは1～3質量%である。

[0056] 本発明のアルギニンの添加方法は、培地に対し、アルギニンを無菌的に添加（配合）できればよく、特に限定されないが、培地に対し、アルギニンを添加した後に、当該培地を加熱殺菌や濾過滅菌してもよく、あるいは、アルギニン水溶液を別途調製し、当該アルギニン水溶液を加熱殺菌や濾過滅菌した後に、培地に対し、これを添加してもよい。

[0057] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、pHが5以上7以下の範囲にある培地を使用し、好ましくはpHが5以上6.5以下の範囲にある培地を使用し、より好ましくはpHが5以上6以下の範囲にある培地を使用し、さらに好ましくはpHが5.5以上6以下の範囲にある培地を使用する。これにより、シトルリン産生能を有する微生物の濃度（菌体濃度）を高めることができ、シトルリン産生能を高めることができる。このとき、アルカリの添加によって培地のpHを調整することが好ましく、アルカリとしてアルギニンまたはアルカリ金属水酸化物を用いることがより好ましい。

[0058] 本発明の一態様において、「pHが5以上7以下の範囲の培地で培養する」とは、好ましくは、培養の初期から終了まで、培地のpHが5以上7以下の範囲にあることを意味するが、必ずしも、培養の初期から終了まで常に、培地のpHが5以上7以下の範囲にあることを意味するものではない。すな

わち、培地のpHが5以上7以下の範囲にある状態において、アルギニンからシトルリンへの変換効率が高まるために十分な時間で培養すればよく、具体的には1～60時間、好ましくは2～48時間、より好ましくは3～36時間、さらに好ましくは4～24時間で培養すればよい。

[0059] 本発明のアルカリの添加方法は、培地のpHを所定の範囲に制御又は管理できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されない。例えば、pH計とコンピューター等を用いて、培地のpHを断続的又は継続的に観察しながら、培地のpHを所定の範囲で断続的又は継続的に制御又は管理することが好ましく、培地のpHを継続的に観察しながら、培地のpHを所定の範囲で継続的に制御や管理することがより好ましい。

[0060] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する前に、その微生物を賦活培養してもよい。賦活培養の培養条件は、シトルリン産生能を有する微生物の種類に応じて適宜選択されればよく、特に限定されない。

[0061] 本発明の一つの態様によれば、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液から、その微生物の菌体を遠心分離や膜分離などの処理に付してから、本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法に、その菌体を用いてもよい。

[0062] アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む組成物の製造方法

本発明のアルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む組成物の製造方法は、前記微生物を通常（微生物の発酵の至適温度）よりも高い培養温度において、アルギニンを添加した原料で発酵することを特徴とする。前記培養温度は、具体的には40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下である。また本発明の別の態様によれば、前記培養温度は40℃以上70℃以下であり、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃で

あり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である。

[0063] 本発明の好ましい一態様によれば、本発明のシトルリン産生能を有する微生物を、40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下の温度で発酵する、前記微生物のシトルリン産生能の向上方法が提供される。また本発明の別の態様によれば、前記発酵温度は40℃以上70℃以下であり、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である。このとき、本発明のシトルリン産生能を有する微生物には、本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法で得られた培養物または組成物を適切に処理することにより得られる、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた微生物を用いることができる。

[0064] 前記したとおり、本発明の好ましい一態様の原料は、アルギニンを添加した原料である。このような原料の組成（配合）で、微生物を発酵することによって、シトルリンを効率的に産生させることができる。この理由について、本発明のアルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法において説明した理由と同様に考えられる。

[0065] 本発明のアルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法において、シトルリンを含有する培地からシトルリンを単離せずに、そのまま培地をシトルリン含有組成物として利用してもよいし、または、所望の操作（例えば、遠心分離、膜分離など）で処理した培地をシトルリン含有組成物として利用してもよい。

[0066] 本発明のアルギニンの添加量は、シトルリンまたはシトルリン含有組成物、あるいは、これらの加工品を調製や製造できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されないが、原料に対し、好ましくは0.5～5質量%、より好ましくは0.7～4質量%、さらに好ましくは1～3質量%である。

[0067] 本発明のアルギニンの添加方法は、培地に対し、アルギニンを無菌的に添加（配合）できればよく、特に限定されないが、原料に対し、アルギニンを

添加した後に、当該原料を加熱殺菌や濾過滅菌してもよく、あるいは、アルギニン水溶液を別途調製し、当該アルギニン水溶液を加熱殺菌や濾過滅菌した後に、原料に対し、これを添加してもよい。

[0068] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、培養の途中で断続的にアルギニンを培地に添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを培地に添加する。これにより、シトルリン産生能を有する微生物のシトルリン産生能を高めることができる。このとき、シトルリン産生能を有する微生物にとって、十分な濃度のアルギニンと接触する時間が長いことが好ましい。従って、培養の前にアルギニンを培地又は原料に添加（配合）することが好ましく、培養の前にアルギニンを培地に添加すると共に、培養の途中で断続的（例えば、所定量を一括して）又は継続的（例えば、少量ずつで徐々に）にアルギニンを培地に添加（追加）することがより好ましく、とりわけ、培養の途中で継続的にアルギニンを培地に添加することがさらに好ましい。これにより、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めることができる。

[0069] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を用いて発酵する前に、その微生物を賦活培養してもよい。賦活培養の培養条件は、シトルリン産生能を有する微生物の種類に応じて適宜選択されればよく、特に限定されない。

[0070] 本発明の一つの態様によれば、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む組成物から、その微生物の菌体を遠心分離や膜分離などしてから、本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法に、その菌体を用いてもよい。

[0071] 微生物の濃度（菌体濃度）を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法

本発明の微生物の濃度（菌体濃度）を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法は、前記微生物を通常（微生物の発酵の至適

温度)の培養温度において、pHが5以上7以下の範囲にある培地で培養することを特徴としており、前記微生物を、35℃以上48℃以下、好ましくは38℃以上48℃以下、より好ましくは40℃以上48℃以下、さらに好ましくは42℃以上47℃以下、特に好ましくは44℃以上46℃以下の培養温度において、pHが5以上7以下の範囲、好ましくはpHが5以上6.5以下の範囲、より好ましくはpHが5以上6以下の範囲、さらに好ましくはpHが5.5以上6以下の範囲にある、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする。つまり、ここでは、シトルリン産生能を有する微生物の培養に適した温度(例えば、至適温度)において、前記微生物を培養してもよい。本発明の別の態様によれば、前記微生物を、35℃以上70℃以下の培養温度(ここで、下限は好ましくは38℃、より好ましくは40℃、さらに好ましくは42℃、特に好ましくは44℃であり、上限は好ましくは68℃、さらに好ましくは65℃である)において、pHが5以上7以下の範囲、好ましくはpHが5以上6.5以下の範囲、より好ましくはpHが5以上6以下の範囲、さらに好ましくはpHが5.5以上6以下の範囲にある、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする。

[0072] 本発明の好ましい一態様によれば、本発明のシトルリン産生能を有する微生物を、35℃以上48℃以下、好ましくは38℃以上48℃以下、より好ましくは40℃以上48℃以下、さらに好ましくは42℃以上47℃以下、特に好ましくは44℃以上46℃以下の温度で培養する、前記微生物の濃度(菌体濃度)の向上方法が提供される。本発明の別の態様によれば、前記微生物を、35℃以上70℃以下の培養温度(ここで、下限は好ましくは38℃、より好ましくは40℃、さらに好ましくは42℃、特に好ましくは44℃であり、上限は好ましくは68℃、さらに好ましくは65℃である)で培養する、前記微生物の濃度(菌体濃度)の向上方法が提供される。このとき、本発明のシトルリン産生能を有する微生物には、本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法で得られた培養物または組成物を適切に処理することにより得られる、アルギニンからシトルリンへの変

換効率を高めた微生物を用いることができる。

[0073] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、pHが5以上7以下の範囲にある培地を使用し、好ましくはpHが5以上6.5以下の範囲にある培地を使用し、より好ましくはpHが5以上6以下の範囲にある培地を使用し、さらに好ましくはpHが5.5以上6以下の範囲にある培地を使用する、前記微生物の濃度（菌体濃度）の向上方法が提供される。これにより、シトルリン産生能を有する微生物の濃度（菌体濃度）を高めることができ、シトルリン産生能を高めることができる。このとき、アルカリの添加によって培地のpHを調整することが好ましく、アルカリとしてアルギニンまたはアルカリ金属水酸化物を用いることがより好ましい。

[0074] 本発明のアルギニンの添加量は、シトルリンまたはシトルリン含有組成物、あるいは、これらの加工品を調製や製造できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されないが、培地に対し、好ましくは0.5～5質量%、より好ましくは0.7～4質量%、さらに好ましくは1～3質量%である。

[0075] 本発明の一態様において、「pHが5以上7以下の範囲の培地で培養する」とは、好ましくは、培養の初期から終了まで、培地のpHが5以上7以下の範囲にあることを意味するが、必ずしも、培養の初期から終了まで常に、培地のpHが5以上7以下の範囲にあることを意味するものではない。すなわち、培地のpHが5以上7以下の範囲にある状態において、菌体濃度が高まるために十分な時間で培養すればよく、具体的には1～60時間、好ましくは2～48時間、より好ましくは3～36時間、さらに好ましくは4～24時間で培養すればよい。

[0076] アルカリの添加方法は、培地のpHを所定の範囲に制御又は管理できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されない。例えば、pH計とコンピューター等を用いて、培地のpHを断続的又は継続的に観察しながら、培地のpHを所定の範囲に制御又は管理することが好ましく、培地のpHを継続的に観察しながら、培地のpHを所定の範囲に制御又は管理することがより

好ましい。

[0077] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する前に、その微生物を賦活培養してもよい。賦活培養の培養条件は、シトルリン産生能を有する微生物の種類に応じて適宜選択されればよく、特に限定されない。

[0078] 本発明の一つの態様によれば、菌体濃度を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液から、その微生物の菌体を遠心分離や膜分離などの処理に付してから、本発明のシトルリンの調製方法またはシトルリン含有組成物の製造方法に、その菌体を用いてもよい。

[0079] 本発明の一態様において、アルギニンをアルカリとして用いる際に、当該アルギニンは、本発明のシトルリンの調製方法、本発明のシトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法などで培地に添加するアルギニンと共通する。従って、前記の調製方法などでアルギニンを培地に過剰に添加した場合には、当該培地のpHがアルカリ側に変化し、当該培地のpHが5以上7以下の範囲から大きく外れてしまうことがある。このようにアルギニンを培地に過剰に添加した場合には、シトルリン産生能を幾らか高められるため、シトルリン産生能を高めることのみを目的とすれば許容されるが、菌体濃度を十分には高められないこともある。そのため、このような場合には、シトルリン産生能を有する微生物（菌体）当たりのシトルリンの産生量（シトルリンの相対量）を高められるものの、当該微生物を含む培養液（培地）当たりのシトルリンの産生量（シトルリンの絶対量）を十分に高められない可能性があるため、留意が必要である。

[0080] アルギニンからシトルリンへの変換効率を高め、かつ微生物の濃度（菌体濃度）を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法

本発明のアルギニンからシトルリンへの変換効率を高め、かつ微生物の濃度（菌体濃度）を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製方法は、前記微生物を通常（微生物の発酵の至適温度）よりも高い培養温度において、pHが5以上7以下の範囲にある培地で培養することを特徴

としており、前記微生物を、40℃以上48℃以下、好ましくは42℃以上47℃以下、より好ましくは44℃以上46℃以下の培養温度において、pHが5以上7以下の範囲、好ましくはpHが5以上6.5以下の範囲、より好ましくはpHが5以上6以下の範囲、さらに好ましくはpHが5.5以上6以下の範囲にある、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする。また本発明の別の態様によれば、本発明による調製方法は、前記微生物を、40℃以上70℃以下の温度範囲（ここで、好ましい上限は68℃、より好ましい上限は65℃であり、好ましい下限は42℃、より好ましい下限は43℃である）において、pHが5以上7以下の範囲、好ましくはpHが5以上6.5以下の範囲、より好ましくはpHが5以上6以下の範囲、さらに好ましくはpHが5.5以上6以下の範囲にある、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする。

[0081] つまり、本発明のアルギニンからシトルリンへの変換効率を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製条件、および本発明の微生物の濃度（菌体濃度）を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液の調製条件を併用することで、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高め、かつ微生物の濃度（菌体濃度）を高めた、シトルリン産生能を有する微生物を含む培養液を調製できることとなる。

[0082] 本発明の一態様において、アルギニンの培地（培養液）への添加方法と、培地（培養液）のpHの調整（制御）方法には、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高め、かつ微生物の濃度（菌体濃度）を高められる限りにおいて、前記の方法を適用することができる。

[0083] 本発明の好ましい一態様によれば、シトルリン産生能を有する微生物を培養する際に、培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、培養の途中で断続的にアルギニンを培地に添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを培地に添加する。これにより、シトルリン産生能を有する微生物のシトルリン産生能を高めることができる。このとき、シトルリン産生能を有する微生物にとって、培養の開始時に培地のpHが中性程度で

あることが好ましい。従って、培養の前にアルギニン培地を培地に添加（配合）しないことが好ましく、培養の前にアルギニンを培地に添加せずに、培養の途中で断続的（例えば、所定量を一括して）又は継続的（例えば、少量ずつで徐々に）にアルギニンを培地に添加（追加）することがより好ましく、とりわけ、培養の途中で継続的にアルギニンを培地に添加することがさらに好ましい。これにより、シトルリン産生能を有する微生物を培養又は発酵する際に、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高め、かつ微生物の濃度（菌体濃度）を高めることができる。

- [0084] 本発明のアルギニンの添加量は、シトルリンまたはシトルリン含有組成物、あるいは、これらの加工品を調製や製造できる条件から適宜選択されればよく、特に限定されないが、培地に対し、好ましくは0.5～5質量%、より好ましくは0.7～4質量%、さらに好ましくは1～3質量%である。

実施例

- [0085] 以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明する。ただし、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

- [0086] 本発明の実施例において、菌体濃度は「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）（日本国）」に記載の乳酸菌数の測定法により測定した。ただし、BCP培地の培養温度は30℃とした。また、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度はHPLC法により測定した。

- [0087] 実施例1：乳酸菌とビフィズス菌のアルギニンの代謝能力

下記の第1表に記載した、乳酸菌とビフィズス菌について、アルギニンの代謝能力を調べた。まず、MRS培地またはGAM培地を121℃、15分間で滅菌した。その後、アルギニン水溶液を濾過滅菌してから、これら培地に添加し、アルギニン濃度が27mMとなるように調整した。これら調整した培地に、下記の第1表に示される乳酸菌とビフィズス菌のMRS培地の賦活培養液を1重量%で接種した。ラクトコッカスでは、培養温度を30℃、培養時間を16時間として、静置状態において好気培養し、その他の菌体では、培養温度を37℃、培養時間を16時間として、静置状態において好気培

養した。

[0088] この結果は、下記の第1表に示されるとおりであった。Lactobacillus fermentum JCM1173T、Lactobacillus buchneri NCIMB8007T、Lactococcus lactis ssp. lactis JCM5805T、およびIF012007において、アルギニンの代謝能力が確認された。

[0089]

第1表 乳酸菌とビフィズス菌のアルギニンの代謝能力の比較

Strain	Type Strain NO.	Media	Temp. (°C)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	OD (600nm)
<i>Bif. breve</i>	JCM 1192T	MRS	37	25.0	0.1	1.8	2.20
		GAM		25.7	0	6.9	2.69
<i>Bif. Longum</i>	JCM 1217T	MRS		26.5	0.1	1.8	3.12
		GAM		25.2	0	6.6	1.46
<i>Bif. Bifidum</i>	JCM 1255T	MRS		25.2	0	1.9	1.24
		GAM		24.3	0	6.4	0.73
<i>S. thermophilus</i>	JCM 17834T	MRS		27.2	0	2.7	4.42
<i>Pediococcus pentosus</i>	JCM 5890T	MRS		25.9	0	1.3	1.99
<i>L. gasseri</i>	JCM 1131T	MRS		27.7	0	1.6	5.80
<i>L. rhamnosus</i>	JCM 1136T	MRS		27.7	0	1.1	5.82
<i>L. fermentum</i>	JCM 1173T	MRS		0	1.3	24.9	5.26
<i>L. buchneri</i>	NCIMB 8007T	MRS		1.8	3.1	22.3	3.39
<i>L. plamtarum</i>	NCIMB 11974T	MRS		25.9	0	1.2	9.01
<i>L. bulgaricus</i>	JCM 1002T	MRS		25.9	0	1.5	3.02
<i>L. casei</i>	JCM 1134T	MRS		25.5	0	1.4	4.91
<i>Lac. Lactis ssp. Lactis</i>	JCM 5805T	MRS	30	0.8	2.2	24.6	2.48
<i>Lac. Lactis ssp. Lactis</i>	IFO 12007	MRS		0	0.9	25.4	3.62
<i>Lac. Lactis ssp. cremoris</i>	JCM 16167T	MRS		25.2	0	1.5	1.70

表中、Arg : アルギニン、Cit : シトルリン、Orn : オルニチン

[0090] 実施例2 : Lactococcus lactis ssp. lactisとLactococcus lactis ssp. diacetylactisのアルギニンの代謝能力

実施例 1 の結果から、Lactococcus lactis ssp. lactisでは、2 菌株のうち 2 菌株ともに、アルギニンの代謝能力が確認された。しかし、これら 2 菌株では、アルギニンの全部をシトルリンに変換した後に、そのシトルリンの大部分をオルニチンに変換していた。

[0091] そこで、次に、下記の第 2 表に記載した、Lactococcus lactis ssp. lactis の 29 株と、Lactococcus lactis ssp. lactisの近縁種であるLactococcus lactis ssp. diacetylactisの 1 株について、シトルリンをオルニチンに変換しない菌株を探索した。第 2 表中の N0.1~N0.29 は、Lactococcus lactis ssp. lactisであり、N0.30 は、Lactococcus lactis ssp. diacetylactisである。

[0092] まず、MRS 培地を 121℃、15 分間で滅菌した。その後、アルギニン水溶液を濾過滅菌してから、これら培地に添加し、アルギニン濃度が 27mM となるように調整した。これら調整した培地に、下記の第 2 表の菌株の MRS 培地の賦活培養液を 1 重量%で接種した。これら菌株では、培養温度を 30℃、培養時間を 16 時間として、静置状態において好気培養した。

[0093] この結果は、下記の第 2 表に示されるとおりであった。Lactococcus lactis ssp. lactisの 29 菌株の全部において、アルギニンの代謝能力が確認された。ただし、アルギニンの大部分がオルニチンへと変換されており、オルニチンに対するシトルリンの生産比率（「Cit/Orn」）は 0.02~0.13 と低値であった。また、Lactococcus lactis ssp. diacetylactisの 1 菌株において、アルギニンの代謝能力は確認されなかった。

[0094]

第2表 ラクティス菌のアルギニンの代謝能力の比較

NO.	Strain	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/Orn	OD (600nm)
1	MEP12 03401	0.4	0.6	20.6	0.03	4.64
2	MEP12 03402	0	0.5	21.5	0.02	4.33
3	MEP12 03403	0	2.0	20.7	0.09	3.91
4	OLS 3789	0	1.1	21.4	0.05	4.56
5	MEP12 03404	0	0.6	21.2	0.03	4.51
6	MEP12 03405	0	1.0	20.8	0.05	4.08
7	MEP12 03406	0	0.6	21.0	0.03	3.97
8	MEP12 03407	0	0.7	21.1	0.03	4.05
9	MEP12 03408	0	0.9	23.7	0.04	5.05
10	MEP12 03409	0	0.7	21.4	0.03	4.11
11	MEP12 03410	0	0.7	20.9	0.03	4.37
12	OLS 3797	0	1.8	20.2	0.09	5.00
13	MEP12 03411	0	2.5	19.8	0.13	3.76
14	MEP12 03412	0	2.5	20.9	0.12	3.73
15	MEP12 03413	0	1.0	20.7	0.05	3.80
16	MEP12 03414	0	0.9	21.0	0.04	3.91
17	MEP12 03415	0	0.9	21.7	0.04	4.29
18	MEP12 03416	0	0.6	21.9	0.03	4.38
19	MEP12 03417	0	0.6	21.4	0.03	4.04
20	MEP12 03418	0	0.8	22.5	0.03	4.09
21	MEP12 03419	0	0.6	21.6	0.03	4.33
22	MEP12 03420	0	0.6	21.8	0.03	4.07
23	MEP12 03421	0	0.7	21.4	0.03	3.98
24	MEP12 03422	0	0.5	21.4	0.02	4.46

第2表のつづき

25	MEP12 03423	0	0.6	21.2	0.03	4.01
26	MEP12 03424	0	0.9	21.1	0.04	3.95
27	OLS 3818	0	0.7	20.1	0.04	4.34
28	MEP12 03425	0	0.4	21.1	0.02	4.48
29	MEP12 03426	0	0.4	21.2	0.02	3.84
30	MEP12 03427	24.0	0.2	2.4	0.07	2.81

[0095] 実施例3 : Lactococcus lactis ssp. lactisのアルギニンの代謝における培養温度（37℃、40℃）の影響

培養温度を37℃または40℃とした以外は、実施例2と同様にして、菌体を培養し、アルギニンの代謝能力を調べた。この結果は、下記の第3表に示されるとおりであった。ここでは、Cit/Ornが比較的高い菌株を探索し、6菌株を選抜した。

[0096]

第3表 ラクティス菌のアルギニンの代謝能力と培養温度の関係 (MR S 培地)

NO.	Strain	37 °C					40 °C				
		Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/ Orn	OD (600nm)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/ Orn	OD (600nm)
1	MEP12 03401	2.3	0.8	21.9	0.03	4.49	0	3.2	18.8	0.17	2.89
2	MEP12 03402	0	0.8	22.2	0.03	4.51	0	0.8	21.4	0.04	4.00
3	MEP12 03403	0.7	4.8	18.0	0.27	2.19	16.6	1.2	2.5	0.47	0.48
4	OLS 3789	0	4.3	19.3	0.22	4.05	1.2	11.1	9.2	1.21	2.95
5	MEP12 03404	0	1.4	21.9	0.06	4.22	0	4.0	16.8	0.24	2.97
6	MEP12 03405	0	2.1	21.4	0.10	3.88	7.5	3.7	10.6	0.35	3.25
7	MEP12 03406	0	2.3	21.2	0.11	3.17	7.6	2.5	11.2	0.22	2.02
8	MEP12 03407	0.2	2.0	22.4	0.09	3.29	6.0	2.1	13.6	0.15	2.21
9	MEP12 03408	0.1	1.7	21.8	0.08	4.28	0	3.0	19.2	0.16	3.47
10	MEP12 03409	0.1	2.2	21.8	0.10	3.15	8.0	2.0	11.6	0.18	2.13
11	MEP12 03410	0	1.8	21.5	0.08	3.89	3.1	3.5	14.9	0.23	2.47
12	OLS 3797	0	3.3	20.3	0.16	4.43	0	11.6	9.6	1.20	2.90
13	MEP12 03411	0.3	4.8	18.9	0.25	2.94	3.5	5.0	12.2	0.41	1.95
14	MEP12 03412	0.2	4.7	19.6	0.24	2.98	3.1	4.9	12.7	0.39	2.02
15	MEP12 03413	1.0	3.3	19.1	0.17	3.32	5.0	3.5	13.2	0.26	2.55
16	MEP12 03414	0	2.2	21.3	0.10	3.25	2.8	3.3	15.7	0.21	2.42
17	MEP12 03415	0	1.8	20.9	0.09	3.53	1.8	6.8	12.8	0.53	2.20
18	MEP12 03416	0	4.1	19.9	0.21	3.19	1.0	13.2	7.4	1.79	1.40

第3表のつづき

19	MEP12 03417	0	1.6	21.1	0.08	3.84	3.2	3.2	15.0	0.21	2.82
20	MEP12 03418	0	2.1	21.0	0.10	3.25	4.5	1.9	14.5	0.13	2.27
21	MEP12 03419	0	2.0	21.1	0.10	3.33	2.7	3.2	15.1	0.21	2.04
22	MEP12 03420	0.6	2.4	20.1	0.12	3.21	6.9	8.0	6.0	1.33	1.59
23	MEP12 03421	0	1.9	21.1	0.09	3.32	4.4	2.0	14.0	0.14	2.71
24	MEP12 03422	0	4.5	18.1	0.25	3.06	0	13.5	5.7	2.36	1.42
25	MEP12 03423	0	1.8	21.2	0.09	3.29	3.6	3.6	14.2	0.25	2.49
26	MEP12 03424	0	1.2	20.8	0.06	3.87	6.7	2.0	13.5	0.15	2.22
27	OLS 3818	0	10.5	11.5	0.91	3.94	0	15.4	4.2	3.68	3.04
28	MEP12 03425	0	2.2	20.2	0.11	3.90	5.5	2.5	13.5	0.18	2.79
29	MEP12 03426	0	2.8	18.8	0.15	3.56	3.6	3.6	13.8	0.26	2.45

[0097] 実施例4：還元脱脂乳中のLactococcus lactis ssp. lactisのアルギニンの代謝能力の検証（1）

実施例3の結果から、Cit/Ornが比較的高い菌株を探索し、5菌株を選抜して使用した。すなわち、下記の第4表に記載した5菌株について、アルギニンの代謝能力を調べた。このとき、培地として、アルギニンを1重量％で添加した還元脱脂乳（脱脂粉乳の濃度：10重量％）（以降「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」と記す）を使用した。

[0098] 下記の第4表に記載した5菌株のMRS培地の賦活培養液の20 mLを遠心分離（8000 rpm、10分間）し、これら5菌株の菌体を回収した。その後、「1% Arg + 10%還元脱脂乳」の40 mLを95℃、3分間で殺菌したところに、前記のように回収した5菌株の菌体を接種した。なお、還元脱脂乳にアルギニンを添加する際には、まずアルギニンの水溶液を調製し、塩酸でpHを調整してから、還元脱脂乳と混合した。これら5菌株では、培養温度を40℃および43℃、培養時間を4時間および8時間として、静置状

態において好気培養した。

[0099] この結果は、下記の第4表に示されるとおりであった。ここでは、Cit/Ornが比較的高い菌株を探索するとともに、Cit/Ornが比較的高い培養温度と培養時間を探索した。これら菌株では、全体として、培養温度が高いほど、そして、培養時間が長いほど、Cit/Ornが高くなる傾向が確認された。

[0100] 第4表 ラクティス菌のアルギニンの代謝能力と培養温度・時間の関係（脱脂粉乳培地）

(1)

Strain	Temp. (°C)	Time (H)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/Orn
OLS3789	40	4	28.5	2.2	13.1	0.17
		8	17.1	4.8	20.8	0.23
	43	4	30.3	3.9	9.9	0.40
		8	17.8	14.2	12.3	1.16
OLS3797	40	4	31.8	6.8	4.4	1.54
		8	22.2	16.6	10.8	1.54
	43	4	29.7	11.7	4.6	2.52
		8	7.8	31.1	5.3	5.91
MEP1203416	40	4	33.6	1.6	7.0	0.23
		8	27.8	4.2	14.9	0.28
	43	4	32.2	2.3	9.7	0.23
		8	23.3	5.4	18.7	0.29
MEP1203422	40	4	31.7	1.6	8.2	0.20
		8	23.3	4.0	17.4	0.23
	43	4	30.6	2.1	10.4	0.20
		8	19.2	4.4	19.9	0.22
OLS3818	40	4	33.8	4.6	5.4	0.86
		8	24.2	9.1	12.9	0.70
	43	4	27.6	10.9	5.9	1.84
		8	5.3	30.4	6.9	4.41

[0101] 実施例5：還元脱脂乳中のLactococcus lactis ssp. lactisのアルギニンの代謝能力の検証（2）

培養温度を44.5℃、46℃、さらに50℃から5度刻みで70℃までとした以外は、実施例4と同様にして、菌体を培養し、アルギニンの代謝能力を調べた。この結果は、下記の第5表に示されるとおりであった。なお、実施例4の結果から、Cit/Ornが比較的高い菌株を探索し、3菌株を選抜して使用した。

[0102]

第5表 ラクティス菌のアルギニンの代謝能力と培養温度・時間の関係（脱脂粉乳培地）

(2)

Strain	Temp. (°C)	Time (H)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/Orn
OLS 3789	44.5	4	28.1	4.3	8.3	0.51
		8	18.6	13.3	10.9	1.22
	46	4	27.4	7.4	7.1	1.04
		8	17.3	18.0	8.4	2.14
	50	4	28.51	22.53	2.56	8.79
		8	8.90	44.05	2.72	16.17
	55	4	43.19	7.28	2.97	2.45
		8	38.70	15.24	3.89	3.92
	60	4	34.43	21.77	0.67	32.39
		8	23.28	34.58	0.84	41.16
	65	4	42.13	13.65	0.54	25.47
		8	36.82	12.95	0.67	19.35
	70	4	52.05	2.48	0.40	6.25
		8	53.60	2.26	0.50	4.57

第5表のつづき

Strain	Temp. (°C)	Time (H)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/Orn
OLS 3797	44.5	4	27.0	8.4	5.6	1.51
		8	8.5	27.7	6.3	4.43
	46	4	25.3	13.8	3.1	4.42
		8	9.3	28.9	3.1	9.41
	50	4	28.52	23.55	1.88	12.56
		8	9.17	40.65	1.93	21.09
	55	4	24.59	27.86	1.22	22.76
		8	4.05	50.45	1.52	33.25
	60	4	20.32	36.10	1.00	36.10
		8	1.93	54.84	1.65	33.24
	65	4	35.22	19.91	0.96	20.85
		8	31.83	22.94	1.46	15.71
	70	4	50.83	2.49	0.48	5.19
		8	52.73	2.17	0.58	3.77

第5表のつづき

Strain	Temp. (°C)	Time (H)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)	Cit/Orn
OLS 3818	44.5	4	27.3	10.2	5.4	1.89
		8	9.3	26.2	6.3	4.14
	46	4	25.1	14.5	2.5	5.83
		8	11.4	28.8	2.6	11.25
	50	4	35.23	19.12	2.22	8.62
		8	34.55	19.13	2.20	8.71
	55	4	35.60	16.52	2.29	7.23
		8	29.38	26.70	1.96	13.63
	60	4	37.19	18.64	0.62	30.07
		8	28.48	28.24	0.82	34.64
	65	4	43.40	8.71	0.48	18.22
		8	31.04	7.73	0.52	14.90
	70	4	54.33	1.59	0.47	3.42
		8	54.49	1.30	0.54	2.40

[0103] 実施例6 : Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株またはOLS3818株を使用したシトルリンを含むヨーグルトの製造

Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株またはOLS3818株を使用し、シトルリンを含む発酵乳（ヨーグルト）を製造した。すなわち、下記の第6表に記載した原料乳（ヨーグルトベース）を調合し、95℃、3分間で殺菌した。そして、この原料乳に、ヨーグルトスターターとして、Lactobacillus bulgaricusおよびStreptococcus thermophilusの混合スターターを2重量%で添加するとともに、Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株またはOLS3818株を添加し、45℃で発酵させて、ヨーグルトを製造した。なお、ここで、Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株およびOLS3818株として、MRS培地の培養液を遠心分離（8000rpm、10分間）し、菌体のみを回収して使用した。このとき、MRS培地の使用量は、下記の第6表に記載した原料乳の使用量と同じ重量とした。

[0104]

第6表 原料乳（ヨーグルトベース）の組成（質量％）

牛乳	78.2
脱脂粉乳	2.5
ホエイタンパク質単離物（WPI）	0.2
アルギニン溶液（10 重量％）＊	10.0
水	9.1

＊アルギニンを塩酸溶液に溶解し、溶解後のpHを5前後に調整した。

[0105] Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株を使用した場合には、5時間30分で酸度が0.80％に達した。また、Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3818株を使用した場合には、4時間30分で酸度が0.83％に達した。これら2菌株を使用した場合には、発酵が順調に進行したことが確認された。また、これら発酵乳（ヨーグルト）の風味と物性は、通常品や従来品と比較して大差はなかった。

[0106] これら発酵乳（ヨーグルト）のアルギニン、シトルリン、オルニチンの濃度を測定した。この結果は、下記の第7表に示されるとおりであった。アルギニンの大部分が代謝され、その大半がシトルリンへ変換されることが確認された。つまり、Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株またはOLS3818株を使用し、シトルリンを高濃度で含む発酵乳（ヨーグルト）を製造できることが明らかとなった。

[0107] 第7表 ヨーグルト中のラクティス菌のアルギニンの代謝能力

菌株	発酵時間 (H)	Arg (mM)	Cit (mM)	Orn (mM)
OLS 3797	5.5	0	46	10.6
OLS 3818	4.5	11.6	34.8	13.1

[0108] 実施例7：アルギニンからシトルリンへの変換効率の高い菌株（Lactococcus lactis ssp. lactis OLS3797株）の培養液の調製方法の検討（1）

アルギニンからシトルリンへの変換効率（活性）の高い培養液の調製方法について検討した。上記の実施例では、L. lactisをMRS培地で静置培養して培養液を調製した。その結果として、L. lactisを静置培養すると、培養液のpHの低下に伴い、L. lactisの増殖が停止し、菌体濃度が高まらないこと

が観察された。そこで、アルカリを培養液に添加し、培養液のpHの低下を抑制して、そのpHを制御しながら、*L. lactis*をMRS培地で攪拌培養（pH制御培養）することで、菌体濃度への影響を検討した。つまり、*L. lactis*をMRS培地でpH制御培養することで、*L. lactis*の培養液における単位容量当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が高まる可能性について検討した。なお、MRS培地を121℃、15分間で滅菌した。

[0109] 水酸化ナトリウム水溶液（NaOH：10重量%）を培養液に添加し、培養液のpHを5.5に制御しながら、*L. lactis* 0LS3797株を攪拌培養（pH制御培養）し、菌体濃度を経時的に測定した。具体的には、*L. lactis* 0LS3797株のMRS培地の賦活培養液（培養温度：30℃、培養時間：16時間）を、MRS培地に1重量%で接種して攪拌培養（培養温度：30℃、攪拌速度：200rpm）した。この菌体濃度の経時的な変化は、図1に示されたとおりであった。

[0110] 培養開始から10、11、12時間後におけるpH制御培養の培養液を採取し、これら培養液を氷水中で冷却保存した。そして、この培養液を「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種して静置培養（培養温度：44.5℃、培養時間：8時間）し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。このとき、比較対照として、前記の培養液をMRS培地に5重量%で接種して静置培養（培養温度：30℃、培養時間：16時間）し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。この結果は、図2および下記の第8表に示されたとおりであった。

[0111]

第8表 ラクティス菌におけるシトルリンの変換効率と培養条件の関係

培地	Cit Production (mM)		Initial Cell (cfu/mL)	Cit Production ($\times 10^9$ mM) Initial Cell $\cdot$ H (cfu $\cdot$ H /mL)	
	4H	8H		4H	8H
静置	1.3	2.0	1.0×10^8	3.3	2.7
pH制御 10H	3.1	5.4	2.3×10^8	3.4	3.0
pH制御 11H	3.3	5.5	2.3×10^8	3.6	3.0
pH制御 12H	3.4	5.9	2.5×10^8	3.5	3.0

[0112] 以上のとおり、MRS培地で静置培養した場合に比較して、MRS培地で

pH制御培養した場合では、L. lactisの培養液における単位容量当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が高まることが確認された。一方、MRS培地で静置培養した場合に比較して、MRS培地でpH制御培養した場合では、L. lactisの培養液における単位時間・単位菌体当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率に差はなかった。つまり、静置培養に比較して、pH制御培養では、菌体濃度は高まるが、単位菌体当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率は変化しないと判断できた。なお、単位時間・単位菌体当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率は、培養開始から4時間後と8時間後のシトルリンの濃度を、初発の生菌数と培養時間（4時間と8時間）で除した数値として算出した。

[0113] さらに、pH制御培養の培養開始から12時間後の培養液を使用した場合について、「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」における培養開始から4時間後と8時間後の菌数を調べた。その結果として、これら菌数は、それぞれ 1×10^6 cfu/mLと 1×10^4 cfu/mL（cfu : colony forming unit）であり、培養開始から時間の経過に伴い、菌数が低下していた。よって、アルギニンからシトルリンへの変換効率の測定中に、ADIが産生される可能性は低く、菌体自身が保有していたADIにより、アルギニンからシトルリンへ変換されていると推測できた。このとき、培養開始から時間の経過に伴い、ADIの活性が幾らか低下している可能性はあるが、培養開始から4時間と8時間後の変換効率に大差はなかった。

[0114] 実施例8：アルギニンからシトルリンへの変換効率の高い菌株（Lactococcus lactis ssp. lactis 3797株）の培養液の調製方法の検討（2）

実施例7において、L. lactisをpH制御培養すると、菌体濃度（菌数）は高まったが、単位時間・単位菌体当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率は変化しなかった。そこで、L. lactisの培養を開始する前に、アルギニンをMRS培地に添加して静置培養することで、L. lactisの培養液における単位容量当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が高まる可能性について検討した。すなわち、L. lactis 0LS3797株を通常のMRS培地と、

アルギニンを含む0.5重量%のMRS培地で静置培養し、その培養液を使用して、「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」におけるアルギニンからシトルリンへの変換効率を測定した。ここで、MRS培地を121℃、15分間で滅菌した。

[0115] 具体的には、*L. lactis* 3797株の賦活培養液（培養温度30℃、培養時間16時間）を、MRS培地に1重量%で接種して静置培養（培養温度：30℃、培養時間：16時間）した。そして、この培養液の20mLを遠心分離（8000rpm、10分間）し、菌体のみを回収してから、「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」の40mLに接種して、攪拌培養（培養温度：44.5℃、培養時間：4時間）し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。この結果は、下記の第9表に示されるとおりであった。

[0116] 一方、前記の賦活培養液を、アルギニンを含む0.5重量%のMRS培地に1重量%で接種して静置培養（培養温度：30℃、培養時間：16時間）した。そして、この培養液の20mLを遠心分離（8000rpm、10分間）し、菌体のみを回収してから、「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」の40mLに接種して、攪拌培養（培養温度：44.5℃、培養時間：4時間）し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。この結果は、下記の第9表に示されるとおりであった。

[0117] 第9表 *ラクティス*菌におけるシトルリンの変換効率と培地組成の関係

Media	Cit Production (mM)	Initial Cell (cfu/mL)	Cit Production ($\times 10^9$ mM) / Initial Cell $\cdot$ H (cfu $\cdot$ H / mL)
MRS	8.4	6.7×10^8	3.14
MRS + 0.5% Arg	27.9	1.1×10^9	6.41

[0118] 以上のとおり、通常の（従来の）MRS培地で静置培養した場合に比較して、アルギニンを含むMRS培地で静置培養した場合では、*L. lactis*の培養液における単位時間、単位菌体当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が2倍以上に高まることが確認された。

[0119] **実施例9**：アルギニンからシトルリンへの変換効率の高い菌株 (*Lactococcus*

Lactis ssp. lactis 0LS3797株) の培養液の調製方法の検討 (3)

実施例 8 において、アルギニン培地を添加すると、L. lactis のアルギニンからシトルリンへの変換効率が高まった。そこで、L. lactis の培養を開始する前に、アルギニンを MRS 培地に添加してから pH 制御培養することで、L. lactis の培養液における単位容量当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が高まる可能性について検討した。すなわち、L. lactis 0LS3797 株を、アルギニンを 0.5 重量%で含む MRS 培地で pH 制御培養し、その培養液を使用して、「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」におけるアルギニンからシトルリンへの変換効率を測定した。ここで、MRS 培地を 121℃、15 分間で滅菌した。その後、アルギニン水溶液を濾過滅菌してから、この培地に添加し、アルギニン濃度が 0.5 重量%となるように調整した。

[0120] 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH: 10 重量%) を培養液に添加し、培養液の pH を 5.5 に制御しながら、L. lactis 0LS3797 株を攪拌培養 (pH 制御培養) し、菌体濃度などを経時的に測定した。具体的には、L. lactis 0LS3797 株の MRS 培地の賦活培養液 (培養温度: 30℃、培養時間: 16 時間) を、アルギニンを 0.5 重量%で含む MRS 培地に 1 重量%で接種してから、NaOH を添加し、培養液の pH を 5.5 に制御しながら攪拌培養 (培養温度: 30℃、攪拌速度: 200 rpm) した。この菌体濃度、pH、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度の経時的な変化は、図 3 に示されるとおりであった。

[0121] 以上のとおり、L. lactis の培養を開始する前に、アルギニンを培地へ添加したところ、培養開始時の培地の pH が 8.3 に上昇した。そして、この培養開始時 (培養の初期) の培地の pH の上昇により、菌株の増殖が遅延したと思われる。ただし、培養の後期 (後半) では、乳酸菌 (菌体) が順調に増殖し、培養開始から 10 時間以降にアルギニンの消費が開始され、13 時間後にアルギニン濃度は 0 となった。なお、この培養では、最高到達の菌体濃度が 2.7×10^9 cfu/mL となり、実施例 7 と比較して、菌体濃度が半分 (2 分の 1) 以下に低下した。

[0122] 培養開始から8、9、10、11、12、13時間後における培養液を採取し、これら培養液を氷水中で冷却保存した。そして、この培養液を「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種して静置培養（培養温度：44.5℃、培養時間：8時間）し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。この結果は、下記の第10表に示されるとおりであった。

[0123] 第10表 ラクティス菌におけるシトルリンの変換効率とpH制御培養の関係

Cultivation Time (H)	Cit Production (mM)	Initial Cell (cfu/mL)	Cit Production ($\times 10^9$ mM) / Initial Cell $\cdot$ H (cfu $\cdot$ H / mL)
8	0.0	6.3×10^6	0.0
9	0.7	3.4×10^7	4.2
10	1.1	3.4×10^7	4.0
11	2.9	8.6×10^7	4.3
12	13.5	1.3×10^8	13.0
13	21.5	1.3×10^8	20.3

以上のとおり、培養開始から11時間以降にアルギニンの消費が急激に増加した。これらのアルギニンの消費が速い培養液を使用すると、アルギニンからシトルリンへの変換効率が高まることが確認された。

[0124] 実施例10：アルギニンからシトルリンへの変換効率の高い菌株 (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 0LS3797株) の培養液の調製方法の検討 (4)

実施例9において、乳酸菌 (菌体) の培養を開始する前に、アルギニンを培地へ添加すると、アルギニンからシトルリンへの変換効率が大幅に高まるが、アルギニンを添加しない場合に比較して、最高到達の菌体濃度が低下した。ここで、培養開始時の培地のpHが高いと、最高到達の菌体濃度が低下しやすいと考えられた。そこで、*L. lactis*を培養している途中で、アルギニンを培地 (培養液) へ一括して (断続的に) 添加して、pH制御培養することで、*L. lactis*の培養液における単位容量当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が高まる可能性について検討した。ここで、MRS培地を121℃、15分間で滅菌した。

[0125] 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH: 10重量%) を培養液に添加し、培養液のpHを5.5に制御しながら、*L. lactis* 0LS3797株を攪拌培養 (pH

制御培養)して、菌体濃度などを経時的に測定した。このとき、培養開始から10時間後に、アルギニン水溶液(アルギニン:10重量%)を濾過滅菌してから、この培地(培養液)に添加し、アルギニン濃度が0.5重量%となるように調整した。具体的には、*L. lactis* 0LS3797株のMRS培地の賦活培養液(培養温度:30℃、培養時間:16時間)を、MRS培地に1重量%で接種してから、NaOHを添加し、培養液のpHを5.5に制御しながら攪拌培養(培養温度:30℃、攪拌速度:200rpm)するとともに、培養開始から10時間後に、アルギニン水溶液を濾過滅菌してから、この培地に添加し、アルギニン濃度が0.5重量%となるように調整した。この菌体濃度、pH、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度の経時的な変化は、図4に示されるとおりであった。

[0126] 培養開始から8、10、12、13時間後における培養液を採取し、この培養液を氷水中で冷却保存した。そして、この培養液を「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種して静置培養(培養温度:44.5℃、培養時間:4.5時間)し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。この結果は、下記の第11表に示されるとおりであった。

[0127] 第11表 ラクティス菌におけるシトルリンの変換効率とアルギニンの添加時期の関係

Cultivation Time (H)	Cit Production (mM)	Initial Cell (cfu/mL)	Cit Production ($\times 10^9$ mM) Initial Cell · H (cfu · H / mL)
8	1.7	1.4×10^8	4.2
10	2.4	1.4×10^8	8.0
12	7.4	2.5×10^8	7.5
13	9.1	3.6×10^8	6.4

以上のとおり、最高到達の菌体濃度が 7.1×10^9 cfu/mLとなり、実施例7と比較して、菌体濃度が同程度となった。一方、実施例9と比較して、アルギニンからシトルリンへの変換効率は低下した。

[0128] 実施例11: アルギニンからシトルリンへの変換効率の高い菌株 (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 0LS3797株) の培養液の調製方法の検討 (5)

実施例10において、乳酸菌(菌体)を培養している途中で、アルギニン

を培地（培養液）へ一括して（断続的に）添加して、pH制御培養すると、通常（従来）のpH制御培養する場合と比較して、最高到達の菌体濃度は同程度となるが、乳酸菌（菌体）の培養を開始する前に、アルギニン培地へ添加する場合と比較して、アルギニンからシトルリンへの変換効率が低下した。そこで、L. lactisを培養している途中で、アルギニンを培地（培養液）へ少量ずつで（継続的に）添加しながら、pH制御培養することで、L. lactisの培養液における単位容量当たりのアルギニンからシトルリンへの変換効率が上がる可能性について検討した。ここで、MRS培地を121℃、15分間で滅菌した。

[0129] アルギニン水溶液（アルギニン：10重量%）を培養液に添加し、培養液のpHを5.5に制御しながら、L. lactis 0LS3797株を攪拌培養（pH制御培養）して、菌体濃度などを経時的に測定した。このとき、培養開始から4時間後に、アルギニン水溶液（アルギニン：10重量%）を濾過滅菌してから、この培地（培養液）に添加し、培地のpHが5.5となるように調整した。具体的には、L. lactis 0LS3797株のMRS培地の賦活培養液（培養温度：30℃、培養時間：16時間）を、MRS培地に1重量%で接種してから、アルギニンを添加し、培養液のpHを5.5に制御しながら攪拌培養（培養温度：30℃、攪拌速度：200rpm）するとともに、培養開始から4時間後に、アルギニン水溶液を濾過滅菌してから、この培地に添加し、培地のpHが5.5となるように調整した。この菌体濃度、pH、アルギニン濃度、シトルリン濃度、オルニチン濃度の経時的な変化は、図5に示されるとおりであった。

[0130] 培養開始から8、10、12、13時間後の培養液を採取し、この培養液を氷水中で冷却保存した。そして、この培養液を「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種して静置培養（培養温度：44.5℃、培養時間：4.5時間）し、アルギニンからシトルリンへの変換効率を調べた。この結果は、下記の第12表に示されるとおりであった。ここで、表中、「Culture」は、培養液をそのまま「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種したも

のである。また、「Supernatant」は、培養液を遠心分離して得た上清を「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種したものである。さらに、「Cell」は、培養液を遠心分離して上清を除いて回収した菌体を -80°C で凍結保存し、その後に解凍したものを「1% Arg + 10% 還元脱脂乳」に5重量%で接種したものである。

[0131] 第12表 ラクティス菌におけるシトルリンの変換効率とアルギニンの添加時期・pH制御培養の関係

Cultivation	Form of cell for test	Cit (mM)	Bacterial Count (cfu/mL)	Cit Production ($\times 10^9$ mM) Initial Cell $\cdot$ H (cfu $\cdot$ H /mL)
8	Culture	11.8	2.5×10^8	12.1
10	Culture	23.0	2.4×10^8	23.7
12	Culture	25.6	3.1×10^8	20.6
13	Culture	24.9	3.2×10^8	19.3
10	Cell	19.3	2.4×10^8	19.9
10	Supernatant	0.9		

[0132] ここでは、培養開始から4時間後に、アルギニン（中和剤、基質）の培地（培養液）への添加を開始し、培養終了まで継続した。このとき、アルギニンの培地への添加を開始してから暫くの間、アルギニンは直ちにオルニチンへ変換されていたが、培養の後半では、アルギニンの幾らかはオルニチンへ変換されず、そのまま蓄積されていた。

[0133] 以上のとおり、最高到達の菌体濃度が 6.5×10^9 cfu/mLとなり、実施例7および実施例10と比較して、菌体濃度が同程度となった。そして、実施例9と比較して、アルギニンからシトルリンへの変換効率が同程度となった。つまり、ここでは、菌体濃度が高まると共に、アルギニンからシトルリンへの変換効率が高まった。

[0134] また、菌体の培養液をそのままで使用した場合と比較して、菌体のみを回収して凍結保存した場合にも、アルギニンからシトルリンへの変換効率は同程度となった。そして、培養開始から4～8時間後には、アルギニンの全部が代謝され、アルギニンの大部分がシトルリンへ変換されていた。

[0135] そして、菌体の培養液をそのままに使用する場合に比較して、菌体のみを

回収して使用する場合には、培地（培養液）への添加濃度（接種量）は20分の1～50分の1程度へ減少する。ここでは、培地への添加濃度が5重量%であることから、菌体のみを回収して使用する場合には、培地への添加濃度は0.25～0.1重量%と試算できる。すなわち、アルギニンを（中和剤として）培養の途中で継続的に（例えば、培養終了まで）添加しながら、pH制御培養して培養液を調製した場合には、菌体のみを回収して使用すると、シトルリンを高濃度で含む乳製品を効率的に製造できることとなる。

請求の範囲

- [請求項1] シトルリン産生能を有する微生物を培地に接種し、40℃以上70℃以下の温度で培養することを特徴とする、シトルリンの調製方法。
- [請求項2] シトルリン産生能を有する微生物が乳酸菌、ビフィズス菌またはプロピオン酸菌である、請求項1に記載のシトルリンの調製方法。
- [請求項3] 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・ファーマンタム、およびラクトバチルス・ブフネリからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項2に記載のシトルリンの調製方法。
- [請求項4] 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* spp. *lactis*) 0LS3789株、0LS3797株、および0LS3818株からなる群から選択される1種または2種以上である、請求項2に記載のシトルリンの調製方法。
- [請求項5] シトルリン産生能を有する微生物を原料に添加し、40℃以上70℃以下の温度で発酵することを特徴とする、シトルリン含有組成物の製造方法。
- [請求項6] シトルリン産生能を有する微生物が乳酸菌、ビフィズス菌またはプロピオン酸菌である、請求項5に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。
- [請求項7] 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス、ラクトバチルス・ファーマンタム、およびラクトバチルス・ブフネリからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項6に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。
- [請求項8] 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* spp. *lactis*) 0LS3789株、0LS3797株、および0LS3818株からなる群から選択される1種または2種以上である、請求項6に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。
- [請求項9] 原料が原料乳である、請求項5～8のいずれか一項に記載のシトル

リン含有組成物の製造方法。

[請求項10] シトルリン含有組成物が飲食品である、請求項5～9のいずれか一項に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。

[請求項11] シトルリン産生能を有し、かつ40℃以上70℃以下の培養温度におけるアルギニンからシトルリンへの変換効率が高められた微生物を含む培養液の調製方法であって、シトルリン産生能を有する微生物を、アルギニンを添加した培地で培養することを特徴とする、調製方法。

[請求項12] 培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、
培養の途中で断続的にアルギニンを添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを添加する、請求項11に記載の培養液の調製方法。

[請求項13] シトルリン産生能を有する微生物を含み、かつ当該微生物の濃度が高められた培養液の調製方法であって、シトルリン産生能を有する微生物を、pHが5以上7以下の範囲にある培地で培養し、前記微生物の濃度を高めることを特徴とする、調製方法。

[請求項14] アルカリの添加によって培地のpHを調整する、請求項13に記載の培養液の調製方法。

[請求項15] シトルリン産生能を有し、35℃以上70℃以下の培養温度におけるアルギニンからシトルリンへの変換効率が高められた微生物を含み、かつ当該微生物の濃度が高められた培養液の調製方法であって、シトルリン産生能を有する微生物を、アルギニンを添加し、かつpHが5以上7以下の範囲にある培地で培養して前記微生物の濃度を高めることを特徴とする、調製方法。

[請求項16] 培養の前にアルギニンを培地に添加する、および／または、
培養の途中で断続的にアルギニンを添加する、もしくは、培養の途中で継続的にアルギニンを添加する、請求項15に記載の培養液の調製方法。

- [請求項17] 請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法によって得られた培養液を、遠心分離および／または膜分離して得られる、アルギニンからシトルリンへの変換効率を高めたシトルリン産生能を有する微生物の調製方法。
- [請求項18] 請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の培養液の調製方法によって得られた培養液または請求項 1 7 に記載の微生物の調製方法によって得られた微生物を、培地に接種して培養する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のシトルリンの調製方法、もしくは原料に添加して発酵する、請求項 5 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のシトルリン含有組成物の製造方法。