

明 細 書

発明の名称：ヨーグルトの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヨーグルトの製造方法に関し、より詳しくは、ニコチンアミドモノヌクレオチドを含有するヨーグルトの製造方法に関する。

背景技術

[0002] ニコチンアミドモノヌクレオチド (Nicotinamide Mono Nucleotide、NMN) は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Nicotinamide Adenine Dinucleotide、NAD) の前駆体であって、近年特に注目されている物質である。

[0003] 例えば、老化の制御には長寿遺伝子と呼ばれるサーチュインの活性維持が重要とされるが、年を重ねること（加齢）に伴ってその活性に必要なNADの組織中濃度が低下することが老化の一因とされるため、NADの前駆体であるNMNの投与又は摂取は、抗老化効果をもたらすといわれている。

[0004] より具体的に、例えば、Mills Kathryn F. et al., Cell metabolism, 24, 6, 2016, p. 795-806（非特許文献1）には、加齢マウスへのNMNの投与によって、加齢による肥満の抑制、エネルギー代謝の向上、並びに、インスリン抵抗性、脂質代謝、眼の機能、骨密度、及び免疫機能の改善が確認されたことや、骨格筋、脂肪、及び肝臓において加齢による遺伝子発現の変化が抑制されたことが報告されている。また、Ⅱ型糖尿病は加齢による耐糖能の低下を一因とする生活習慣病であるが、Jun Yoshino et al., Cell Metab., 2011 Oct 5, 14 (4), p. 528-536（非特許文献2）には、NMNの投与によって、高脂肪食投与でⅡ型糖尿病を誘導したマウスにおいて、耐糖能障害及び肝臓のインスリン感受性の改善、並びに、酸化ストレス、炎症反応、及び概日リズムに関連する遺伝子発現の回復が確認されたことが報告されている。

[0005] 他にも、例えば、L u i s R a j m a n e t a l . , C e l l M e t a b . , 2 0 1 8 M a r 6 , 2 7 (3) , p . 5 2 9 - 5 4 7 (非特許文献3) や、X i a o n a n W a n g e t a l . , B r a i n R e s e a r c h , V o l u m e 1 6 4 3 , 1 5 J u l y 2 0 1 6 , p . 1 - 9 (非特許文献4) には、NMNの投与によって、加齢により低下した肝機能、腎機能、骨格筋機能、及び心機能、並びに、アルツハイマー型認知症が改善されたことが報告されている。さらに、例えば、Z h u e t a l . , S i g n a l T r a n s d u c t i o n a n d T a r g e t e d T h e r a p y , 2 0 1 7 , e 1 7 0 1 7 (非特許文献5) には、加齢マウスへのNMNの投与によって、便秘が改善されたことが報告されている。

[0006] そのため、近年ではNMNを摂取するためのサプリメント等が市販されている。しかしながら、工業的に十分な量のNMNを容易に製造する方法は未だ確立されておらず、原料の入手が困難なため、日常的に摂取するには高価であるという問題を有していた。

[0007] NMNの製造方法としては、化学合成による製造の他、ニコチンアミドリボシド（NR）を原料として製造する方法、大腸菌により製造する方法、酵母により製造する方法等が知られている。また、国際公開第2022/138656号（特許文献1）には、フルクトバシラス属に属する特定の乳酸菌をpH4～10の反応液中で反応させる工程を含むNMNの製造方法が記載されており、国際公開第2021/070829号（特許文献2）には、これと同様の乳酸菌がNMN及びNRを産生することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2022/138656号

特許文献2：国際公開第2021/070829号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：M i l l s K a t h r y n F . e t a l . , C e l l

metabolism, 24. 6, 2016, p. 795–806

非特許文献2: Jun Yoshino et al., Cell Metab., 2011 Oct 5, 14 (4), p. 528–536

非特許文献3: Luis Rajman et al., Cell Metab., 2018 Mar 6, 27 (3), p. 529–547

非特許文献4: Xiaonan Wang et al., Brain Research, Volume 1643, 15 July 2016, p. 1–9

非特許文献5: Zhu et al., Signal Transduction and Targeted Therapy, 2017, e17017

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 乳酸菌は豊富な食経験を有する微生物であるため、乳酸菌によってNMNを製造すること、特に、古くから食経験のあるヨーグルトとしてNMN含有ヨーグルトを製造することができれば、安全性の観点から望ましい。しかしながら、従来の方法では未だ十分な量のNMNを乳酸菌によって製造することは困難であるという課題を有していた。

[0011] 本発明は、上記従来技術が有する課題に鑑みてなされたものであり、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリを用いてニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）を十分量含有するヨーグルトを製造可能なヨーグルトの製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究をおこない、先ず、多くの乳酸菌の中からNMNを産生する菌種を探索したところ、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリにおいて比較的低濃度ではあるがNMNが産生されることを見出した。次いで、これら乳酸菌によるNMN産生量の向上のための検討をおこなった結果、培地にNADを添加

して培養することで、NMNの産生量が顕著に増加することを見出し、さらには、上記乳酸菌のうち、NAD非添加ではNMNを産生しなかった菌株においてもNMNを産生するようになることを見出した。加えて、乳成分含有培地にNADを添加して培養する（発酵させる）ことで、NMNを十分に含有するヨーグルトを製造できることも見出し、本発明を完成するに至った。

[0013] かかる知見により得られた本発明の態様は以下のとおりである。

[1]

乳成分含有培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加したNAD含有培地で、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*) 及びリモシラクトバチルス・ロイテリ (*Limosilactobacillus reuteri*) からなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養し、ニコチンアミドモノヌクレオチドを含有するヨーグルトを得る培養工程を含む、ヨーグルトの製造方法。

[2]

前記ヨーグルトにおける、前記NAD含有培地及び前記乳酸菌に由来するニコチンアミドモノヌクレオチドの含有量が5 ng/mL以上である、[1]に記載のヨーグルトの製造方法。

[3]

前記乳成分含有培地における乳成分の含有量が、無脂乳固形分の含有量で、5～35 w/w%である、[1]又は[2]に記載のヨーグルトの製造方法。

[4]

前記培養における温度が25～55℃である、[1]～[3]のうちのいずれか一項に記載のヨーグルトの製造方法。

[5]

前記NAD含有培地におけるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの含有量が、前記NAD含有培地の全量に対して $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ ng/m

Ｌである、〔１〕～〔４〕のうちのいずれか一項に記載のヨーグルトの製造方法。

〔６〕

前記培地へのニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの添加が、前記培地でニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを産生するストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) の添加である、〔１〕～〔５〕のうちのいずれか一項に記載のヨーグルトの製造方法。

〔７〕

培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加したＮＡＤ含有培地で、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*) 及びリモシラクトバチルス・ロイテリ (*Limosilactobacillus reuteri*) からなる群から選択される少なくとも１種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養する培養工程を含む、ニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法。

〔８〕

前記培地が乳成分含有培地である、〔７〕に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法。

〔９〕

前記乳成分含有培地における乳成分の含有量が、無脂乳固形分の含有量で、５～３５ｗ／ｗ％である、〔８〕に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法。

〔１０〕

前記培養における温度が２５～５５℃である、〔７〕～〔９〕のうちのいずれか一項に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法。

〔１１〕

前記ＮＡＤ含有培地におけるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの含有量が、前記ＮＡＤ含有培地の全量に対して $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ ng/m}$

である、[7]～[10]のうちのいずれか一項に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法。

[12]

前記培地への前記ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの添加が、前記培地でニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを産生するストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 及びビフィドバクテリウム属に属する菌からなる群から選択される少なくとも一種の添加である、[7]～[11]のうちのいずれか一項に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法。

[13]

ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*) 及びリモシラクトバチルス・ロイテリ (*Limosilactobacillus reuteri*) からなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養する培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加してNAD含有培地とする工程を含む、ニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法。

[14]

前記培地が乳成分含有培地である、[13]に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法。

[15]

前記乳成分含有培地における乳成分の含有量が、無脂乳固形分の含有量で、5～35w/w%である、[14]に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法。

[16]

前記培養を温度25～55℃でおこなう、[13]～[15]のうちのいずれか一項に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法。

[17]

前記ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの添加量が、前記NAD含有

培地の全量に対して $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ ng/mL}$ となる量である、[13]～[16]のうちのいずれか一項に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法。

[18]

前記培地への前記ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの添加が、前記培地でニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを産生するストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 及びビフィドバクテリウム属に属する菌からなる群から選択される少なくとも一種の添加である、[13]～[17]のうちのいずれか一項に記載のニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリを用いてニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) を十分量含有するヨーグルトを製造可能なヨーグルトの製造方法を提供することが可能となる。また、本発明によれば、NMNを十分量製造可能なNMN製造方法、及び前記乳酸菌によるNMN産生量を向上させることが可能なNMN産生量向上方法を提供することも可能となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]表1に示すラクトバチルス・デルブルッキー、リモシラクトバチルス・ロイテリ、及びストレプトコッカス・サーモフィルスをSMY培地で培養後のSMY培地中におけるNMN濃度 (ng/mL) を示すグラフである。

[図2]表1に示すラクトバチルス・デルブルッキー、リモシラクトバチルス・ロイテリ、及びストレプトコッカス・サーモフィルスをSMY+NAD培地で培養後のSMY+NAD培地中におけるNMN濃度 (ng/mL) を示すグラフである。

[図3]表3に示すリモシラクトバチルス・ロイテリとストレプトコッカス・サーモフィルスとの組み合わせをSMY培地で培養後のSMY培地中におけるNMN濃度 (ng/mL) を示すグラフである。

[図4]表4に示すラクトバチルス・デルブルッキーとストレプトコッカス・サーモフィルスとの組み合わせをSMY培地で培養後のSMY培地中におけるNMN濃度（ng/mL）を示すグラフである。

[図5]L r MHD202317とSt MHD202312との組み合わせを、37℃又は43℃で、各乳成分濃度のSMY培地において培養後の、SMY培地中のNMN濃度（ng/mL）を示すグラフである。

[図6]L b MHD202324とSt MHD202312との組み合わせを、37℃又は43℃で、各乳成分濃度のSMY培地において培養後の、SMY培地中のNMN濃度（ng/mL）を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0016] 以下、本発明をその好適な実施形態に即して詳細に説明する。
- [0017] 本発明は、培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加したNAD含有培地で、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリからなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養する培養工程を含む、ニコチンアミドモノヌクレオチド製造方法（本明細書中、場合により「NMN製造方法」という）を提供する。
- [0018] また、本発明は、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリからなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養する培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加してNAD含有培地とする工程を含む、ニコチンアミドモノヌクレオチド産生量向上方法（本明細書中、場合により「NMN産生量向上方法」という）も提供する。
- [0019] さらに、本発明は、前記培地を乳成分含有培地とすることで、乳成分含有培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加したNAD含有培地で、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリからなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養し、ニコチンアミドモノヌクレオチドを含有するヨーグルトを得る培養工程を含む、ヨーグルトの製造方法（本明細書中、場合により「ヨーグルト製

造方法」という)も提供する。

[0020] (NMN)

「ニコチンアミドモノヌクレオチド」とは、 β -ニコチンアミドモノヌクレオチドのことを示し、「NMN」とも略す。 β -ニコチンアミドモノヌクレオチドは、ニコチンアミド及びニコチンアミドリボシド(NR)が生体内でニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)に変換される際の間代謝物である。本発明者らは、下記のラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリによってNMNが産生されること、及び、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの添加が、かかるNMNの産生量を高め、又は産生能を発現させ、優れたNMN産生能向上作用を有することを見出した。

[0021] (NAD)

「ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド」は、NMN及びアデノシンーリン酸(AMP)からなる物質であり、酸化還元補酵素として生体内の脱水素反応で中心的な役割を果たすことが知られている。本発明において、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドとしては、酸化型(NAD^+)であっても還元型(NADH)であってもこれらの混合物であってもよい。本明細書中、場合によりこれらを総称して「NAD」という。

[0022] (NMN産生乳酸菌)

本発明において、NMNを産生する、すなわち、NMN産生能を有する乳酸菌は、ラクトバチルス・デルブルッキー(*Lactobacillus delbrueckii*)及びリモシラクトバチルス・ロイテリ(*Limosilactobacillus reuteri*)である。これらは、いずれか1種のみであっても、両2種の組み合わせであってもよい。本明細書中、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリからなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を、場合により「NMN産生乳酸菌」と総称する。

[0023] [ラクトバチルス・デルブルッキー]

ラクトバチルス・デルブルッキーは、ラクトバシラセエ科乳酸菌に属するラクトバチルス属乳酸菌である。本発明に係るラクトバチルス・デルブルッキーには、その亜種であるラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ (*Lactobacillus delbrueckii* ssp.) も含む。

[0024] 前記ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズとしては、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・ブルガリクス、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・デルブルッキー、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・ラクティス、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・インディカス、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・スンキ、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・ヤコブセニ等が挙げられる。

[0025] 本発明に係るラクトバチルス・デルブルッキーとしては、そのうち1種のみであっても2種以上の組み合わせであってもよいが、中でも、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシズ・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*、*「ブルガリア菌」*ともいう) であることが特に好ましい。

[0026] 本発明に係るラクトバチルス・デルブルッキーとしては、NMN産生能を有するもの、本発明においてすなわち、下記のNAD含有培地でNMNを産生可能なものであれば特に限定されるものではないが、例えば、SMY+NAD培地（脱脂粉乳10w/w%、酵母エキス0.1w/w%、NAD⁺5,000ng/mL）に、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ cfu/g接種し、37℃で12時間嫌気培養したときに、培養後の前記SMY+NAD培地中にNMNを2ng/mL以上、より好ましくは10ng/mL以上、さらに好ましくは30ng/mL以上産生するもの、さらにより好ましくは50ng/mL以上産生するものを選択することができる。なお、本発明において、NMNは、例えばLC-MS/MS分析により検出、測定することができ、その条件としては、例えば下記の実施例に記載の条件を採用することができる。

[0027] 本発明に係るラクトバチルス・デルブルッキーとしては、特に制限されるものではないが、より具体的には、例えば、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーズ・ブルガリクス JCM 1002^T株 (Lb JCM 1002^T株) 等が挙げられ、同株は、その継代株、又は本発明の効果を阻害しない範囲内において、同株又はその継代株の人工変異株、自然変異株、遺伝子組み換え株、又は派生株等であってよい。なお、本明細書中、菌株番号が JCM で示される株は、理化学研究所・バイオリソース研究センター・微生物材料開発室 (<http://jcm.brc.riken.jp/ja/>) から入手可能な株である。また、本発明に係るラクトバチルス・デルブルッキーとしては、例えば、市販の発酵乳から公知のラクトバチルス属用の寒天培地 (例えば、MRS 寒天培地、BCP 加プレートカウント寒天培地) で単離される乳酸菌であってもよい。

[0028] [リモシラクトバチルス・ロイテリ]

リモシラクトバチルス・ロイテリは、ラクトバシラセエ科乳酸菌に属するリモシラクトバチルス属乳酸菌である。本発明に係るリモシラクトバチルス・ロイテリとしては、そのうち 1 種のみであっても 2 種以上の組み合わせであってもよい。

[0029] 本発明に係るリモシラクトバチルス・ロイテリとしては、NMN 産生能を有するもの、本発明においてすなわち、下記の NAD 含有培地で NMN を産生可能なものであれば特に限定されるものではないが、例えば、SMY+NAD 培地 (脱脂粉乳 10 w/w%、酵母エキス 0.1 w/w%、NAD⁺ 5,000 ng/mL) に、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ cfu/g 接種し、37℃で 12 時間嫌気培養したときに、培養後の前記 SMY+NAD 培地中に NMN を 10 ng/mL 以上、より好ましくは 100 ng/mL 以上産生するもの、さらに好ましくは 200 ng/mL 以上産生するものを選択することができる。

[0030] 本発明に係るリモシラクトバチルス・ロイテリとしては、特に制限されるものではないが、より具体的には、例えば、リモシラクトバチルス・ロイテ

リ JCM 1112^T株 (L r JCM 1112^T株) 等が挙げられ、同株は、その継代株、又は本発明の効果を阻害しない範囲内において、同株又はその継代株の人工変異株、自然変異株、遺伝子組み換え株、又は派生株等であってよい。また、本発明に係るリモシラクトバチルス・ロイテリとしては、例えば、市販の発酵乳から公知のラクトバチルス属用の寒天培地（例えば、MRS寒天培地、BCP加プレートカウント寒天培地）で単離される乳酸菌であってもよい。

[0031] (培地)

本発明において、単に「培地」という場合には、NADを含有していないもの、すなわち、NADの添加前の培地を示す。本発明に係る培地としては、前記NMN産生乳酸菌を培養可能な培地であれば特に限定されず、例えば、MRS培地、GYP培地、乳成分含有培地が挙げられる。これらの中でも、本発明のNMN製造方法及びNMN産生量向上方法においては乳成分含有培地であることが特に好ましく、本発明のヨーグルト製造方法においては、乳成分含有培地であることが必要である。なお、本発明において、単に「乳成分含有培地」という場合には、乳成分を含有し、かつ、NADを含有していない培地を示す。

[0032] 本発明において、前記乳成分とは、少なくとも無脂乳固形分を含有する（すなわち、無脂乳固形分を全乳固形分から脂肪分を差引いた残りの成分として検出可能な）乳及び乳製品を示し、例えば、生乳（例えば、ウシ、スイギュウ、ヒツジ、ヤギ等の乳）、ホエイ、及びこれらの加工品（例えば、脱脂乳、脱脂粉乳、脱脂濃縮乳、全脂乳、全脂粉乳、全脂濃縮乳、殺菌乳、練乳、ホエイ粉、バターミルク、バター、クリーム、チーズ、ホエイタンパク質濃縮物（WPC）、ホエイタンパク質単離物（WPI）、 α -ラクトアルブミン（ α -La）、 β -ラクトグロブリン（ β -Lg））等が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0033] 前記乳成分含有培地としては、前記乳成分のみからなるものであっても前記乳成分と他の成分とを含有するものであってもよい。前記他の成分として

は、水（超純水等）、酵母エキス、糖類、糖アルコール類、ミネラル類、ビタミン類、タンパク質、ペプチド、アミノ酸類、有機酸、pH調整剤、澱粉及び加工澱粉、食物繊維、果実・野菜及びその加工品、畜肉、動物及び植物生薬エキス、天然由来高分子（コラーゲン、ヒアルロン酸、コンドロイチン等）、油脂、増粘剤、乳化剤、溶剤、界面活性剤、ゲル化剤、安定剤、緩衝剤、懸濁化剤、粘稠剤、賦形剤、崩壊剤、結合剤、流動化剤、保存料、着色料、香料、矯味剤、甘味剤等が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上の組み合わせであってもよい。本発明において、前記酵母エキスとは、酵母の内容物の抽出物であり、前記酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セルビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）が好ましい。前記酵母エキスは、アミノ酸、ペプチド、核酸、ミネラル等を含含有しており、これらの組成は前記酵母の種類や培養条件、抽出条件等によって異なるが、酵母エキスであれば特に制限なく用いることができる。

[0034] 前記乳成分含有培地における前記乳成分の含有量としては、無脂乳固形分の含有量で、乳成分含有培地全量（NADは含まず、以下同じ）に対して5～35w/w%であることが好ましく、10～23w/w%であることがより好ましく、15～22w/w%であることがさらに好ましく、16～21w/w%であることがさらにより好ましい。なお、前記無脂乳固形分の含有量は、日本の「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（以下、場合により「乳等省令」という）」に記載の方法で測定することができる。

[0035] また、前記乳成分含有培地が前記酵母エキスを含含有する場合、その含有量としては、乳成分含有培地全量に対して0.001～1w/w%であることが好ましく、0.001～0.1w/w%であることがより好ましい。このような乳成分含有培地のpHとしては、通常、6～7である。

[0036] なお、下記の賦活培養をおこなう場合、2回目以降の賦活培養や培養工程に用いる培地には、その前の培養後の培養液の一部又は全部が含まれてもよい。前記培地としては、それぞれ、滅菌処理又は殺菌処理が施されたものであることが好ましい。

[0037] (NAD含有培地)

本発明に係る培養工程に用いる培地は、前記培地（好ましくは乳成分含有培地、ヨーグルト製造方法においては乳成分含有培地）に、NADが添加された培地（本明細書中、場合により「NAD含有培地」という）である。本発明のNMN産生量向上方法においては、前記培地にNADを添加して前記NAD含有培地とする。前記NAD含有培地において、NADの含有量としては、NAD⁺換算で、前記NAD含有培地の全量に対して $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ ng/mL}$ であることが好ましく、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8 \text{ ng/mL}$ であることがより好ましく、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7 \text{ ng/mL}$ であることがさらに好ましい。

[0038] 本発明において、前記培地へのNADの添加方法としては、NAD⁺やNADHそのものを前記培地に添加して前記NAD含有培地を調製する方法であってもよいが、他の態様として、例えば、前記培地でニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを産生するNAD産生菌（好ましくは、下記のNAD産生ストレプトコッカス・サーモフィルス）を前記培地に添加し、培養をおこなうことで、同培地中にNADを産生させて前記NAD含有培地とする方法であってもよい。この場合、前記NMN産生乳酸菌と前記NAD産生菌とは両者を同時に前記培地に接種しても、先に前記NAD産生菌を接種してもよい。先に前記NAD産生菌を接種する場合、前記NAD含有培地におけるNADの含有量は、前記培地で先にNAD産生菌を培養することで予め上記に挙げた含有量となるようにすることができる。他方、両者を同時に接種する場合、前記NAD含有培地におけるNADの含有量は、少なくとも培養開始から12時間以内、好ましくは3時間以内に上記に挙げた含有量となることが好ましい。

[0039] [NAD産生菌]

本発明に係るNAD産生菌としては、前記培地でニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを産生するストレプトコッカス・サーモフィルスとビフィドバクテリウム属に属する菌とが挙げられ、これらのうちの1種であっても2

種であってもよい。

[0040] ・ストレプトコッカス・サーモフィルス

ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) は、サーモフィルス菌とも呼称される連鎖球菌であり、乳糖から乳酸を産生することが可能な乳酸菌である。本発明に係るストレプトコッカス・サーモフィルスとしては、1種のみであっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0041] 本発明に係るストレプトコッカス・サーモフィルスとしては、NAD産生能を有するもの、本発明においてすなわち、前記培地でNADを産生可能なもの(NAD産生ストレプトコッカス・サーモフィルス)であれば特に限定されるものではないが、例えば、SMY培地(脱脂粉乳10w/w%、酵母エキス0.1w/w%)に、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cfu/g接種し、37℃で12時間嫌気培養したときに、培養後の前記SMY培地中にNAD⁺を1000 ng/mL以上、より好ましくは3000 ng/mL以上産生するものを選択することができる。なお、本発明において、NAD⁺量は、例えばLC-MS/MS分析により測定することができ、その条件としては、例えば下記の実施例に記載の条件を採用することができる。なお、ストレプトコッカス・サーモフィルスであれば、通常、上記条件を満たす。

[0042] 本発明に係るストレプトコッカス・サーモフィルスとして、より具体的には、例えば、受託番号NITE BP-02875号で特定されるストレプトコッカス・サーモフィルス(以下、場合により「St OLS4496株」という)等の菌株が挙げられるが、これらに制限されるものではない。St OLS4496株は、(1)識別の表示: *Streptococcus thermophilus* OLS4496、(2)受託番号: NITE BP-02875号、(3)受託日: 2019年2月5日で、(4)寄託機関: 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(郵便番号292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)に寄託されている。なお、St OLS4496株としては、同株の継代

株、又は本発明の効果を阻害しない範囲内において、同株又はその継代株の人工変異株、自然変異株、遺伝子組み換え株、又は派生株等であってよい。

[0043] ・ビフィドバクテリウム属に属する菌

前記NAD産生菌としては、他に、ビフィドバクテリウム属に属する菌が挙げられる。前記ビフィドバクテリウム属に属する菌として、より具体的には、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ JCM1192^T、ビフィドバクテリウム・ロンガム JCM1217^T、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス JCM1275^T、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム JCM1205^Tが挙げられ、これらの株の継代株、又は本発明の効果を阻害しない範囲内において、同株又はその継代株の人工変異株、自然変異株、遺伝子組み換え株、又は派生株等であってよい。これらの菌は、賦活培養液をGAMブイヨン（日水製薬株式会社、#05422）へ1v/v%接種し、37℃で24時間嫌気培養したときに、それぞれ1178、237、945、947ng/mLのNAD⁺を培養後の前記GAMブイヨン中に産生することが確認されている。また、他の複数株のビフィドバクテリウムも同様の培養で276~1390ng/mLのNAD⁺を産生することから、ビフィドバクテリウム属に属する菌株であれば、通常、NAD産生能を有するといえる。

[0044] （培養工程）

本発明のNMN製造方法、NMN産生量向上方法、及びヨーグルトの製造方法では、前記NAD含有培地で前記NMN産生乳酸菌を培養する。なお、本発明のヨーグルト製造方法において、前記乳成分含有培地（NAD含有）で前記NMN産生乳酸菌を培養することと、当該乳成分含有培地を当該NMN産生乳酸菌で発酵させることは同義である。

[0045] 〔賦活培養〕

本発明に係る培養に供するNMN産生乳酸菌及び必要に応じて前記NAD産生菌は、低温（例えば10℃以下）保存又は凍結保存後等の場合、下記の培養の前にそれぞれ賦活培養したものであることが好ましい。かかる賦活培

養としては、例えば、前記培地（好ましくは乳成分含有培地）において、37℃、嫌気条件下で4～40時間、培養をおこなうことが好ましい。このとき、賦活培養に供する菌量としては、特に制限されないが、前記培地に対する各菌量が1白金耳／5mLとなる量、より具体的には、生菌数で $1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^8$ cfu/gとなる量であることが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ cfu/gとなる量であることがより好ましい。なお、本発明において、生菌数の測定は、例えば、適当に希釈した乳酸菌含有液を、好適な寒天培地に広げて培養し、出現するコロニー数をカウントすることにより測定することができる。

[0046] 前記賦活培養の方法としては、特に限定されないが、従来乳酸菌の嫌気培養条件として知られている条件下での静置培養が挙げられる。前記嫌気培養条件としては、例えば、窒素通気条件下での培養や、ガス濃度調整剤（例えば、三菱ガス化学社製アネロパック（登録商標、以下同じ））を用いた培養を採用することができる。前記賦活培養としては、複数回（好ましくは2回）繰り返してもよい。

[0047] 〔培養〕

本発明に係る培養工程においては、前記NAD含有培地に、前記NMN産生乳酸菌（又は前記賦活培養後のNMN産生乳酸菌）を接種して培養する。

[0048] 前記NAD含有培地に対する前記NMN産生乳酸菌の接種量（NMN産生乳酸菌が2種以上である場合にはその合計、以下同じ）としては、前記NAD含有培地に対して、生菌数で、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ cfu/gとなる量であることが好ましく、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ cfu/gとなる量であることがより好ましく、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cfu/gとなる量であることがさらに好ましい。

[0049] また、前記培地へのNADの添加方法として、前記NAD産生菌としてストレプトコッカス・サーモフィルスを添加する場合、本発明に係る培養工程としてより具体的には、前記培地に、前記NMN産生乳酸菌（又は前記賦活培養後のNMN産生乳酸菌）と、ストレプトコッカス・サーモフィルス（又

は前記賦活培養後のストレプトコッカス・サーモフィルス)とを接種して培養する。ストレプトコッカス・サーモフィルスの接種は上述のとおり前記NMN産生乳酸菌の接種と同時であってもこれより先であってもよい。

[0050] 前記培地へのNADの添加方法としてストレプトコッカス・サーモフィルスを添加する場合、前記培地に対する前記NMN産生乳酸菌の接種量(NMN産生乳酸菌が2種以上である場合にはその合計、以下同じ)は上記と同様である。ストレプトコッカス・サーモフィルスの接種量としては、得られるNAD含有培地におけるNAD含有量が上記条件を満たす量であれば特に限定されないが、例えば、前記培地に対して、生菌数で、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ cfu/gとなる量であることが好ましく、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ cfu/gとなる量であることがより好ましく、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cfu/gとなる量であることがさらに好ましい。

[0051] 前記培養工程における培養条件としては、添加される各NMN産生乳酸菌やNAD産生菌の生育条件、前記NAD含有培地や培地の量等に応じて適宜選択することができ、特に制限されないが、培養温度は、 $25 \sim 55^\circ\text{C}$ であることが好ましく、 $30 \sim 46^\circ\text{C}$ であることがより好ましく、 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ であることがさらに好ましく、 $38 \sim 44^\circ\text{C}$ であることがさらに好ましい。

[0052] 前記培養工程における他の条件としては、従来乳酸菌の培養条件やヨーグルトの発酵条件として知られている条件を適宜採用でき、好気条件及び嫌気条件のいずれであってもよく、静置培養及び攪拌培養のいずれであってもよい。また、培養時間としては、通常2～24時間であり、より好ましくは3～12時間、さらに好ましくは3～6時間である。さらに、培養液(NAD含有培地)のpHが5.5以下となるまで培養することが好ましく、pH4.6以下となるまで培養することがより好ましい。

[0053] (NMN含有組成物)

前記培養工程により、前記NAD含有培地中にはNMNが産生されるため、前記培養後にNMNを含有する培養物を得ることができる。また、本発明

のヨーグルト製造方法においては、前記培養工程により、前記乳成分含有培地が発酵されると共にNMNが産生されるため、前記培養（発酵）後に、前記培養物として、NMNを含有するヨーグルトを得ることができる。前記培養物（ヨーグルトを含む、以下同じ）は、NMN、前記NMN産生乳酸菌、前記NAD含有培地由来成分、及び必要に応じてストレプトコッカス・サーモフィルスを含有する。

[0054] 前記培養物におけるNMNの含有量としては、特に制限されないが、本発明の製造方法によれば、例えば、 2 ng/mL 以上とすることができ、より好ましくは 5 ng/mL 以上、 10 ng/mL 以上とすることができ、さらに好ましくは、 15 ng/mL 以上とすることができ、さらにより好ましくは、 $100\sim 1\times 10^7\text{ ng/mL}$ とすることができる。なお、前記培養物（好ましくはヨーグルト）に含有されるNMNとしては、前記培養物又は前記NAD含有培地に別途添加されたものであってもよいが、本発明においては、かかる添加されたNMNを除くNMN、すなわち、前記NAD含有培地及び前記NMN産生乳酸菌に由来して産生されたNMNとすることができ、好ましい。或いは、本発明のNMN産生量向上方法によれば、前記NMN産生乳酸菌によるNMN産生量を、NADを添加しない培地で培養した場合に 0 ng/mL であったものを 1 ng/mL 以上とすることができ、又は、NADを添加しない培地で培養した場合に比べて2倍以上とすることができ、より好ましくは5倍以上、10倍以上とすることができ、さらに好ましくは15倍以上とすることができる。

[0055] 前記培養物において、前記NMN産生乳酸菌の含有量（生菌の含有量、2種以上の場合には合計量、以下同じ）としては、培養物の全質量に対して、 $1\times 10^6\sim 1\times 10^{11}\text{ cfu/g}$ であることが好ましく、 $5\times 10^6\sim 5\times 10^{10}\text{ cfu/g}$ であることがより好ましく、 $1\times 10^7\sim 1\times 10^{10}\text{ cfu/g}$ であることがさらに好ましい。

[0056] また、前記培養物がストレプトコッカス・サーモフィルスを含有する場合、その含有量（生菌の含有量、以下同じ）としては、培養物の全質量に対し

て、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/gであることが好ましく、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{10}$ cfu/gであることがより好ましく、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/gであることがさらに好ましい。

[0057] 本発明に係る培養工程により得られた培養物は、これより公知の方法又はそれに準じた方法によりNMNを精製してもよい。また、そのまま、又はこれを濃縮、希釈、乾燥、凍結、破碎、一部精製、加工等して、NMN含有組成物としてもよい。

[0058] 前記NMN含有組成物の態様としては、例えば、組成物を投与又は摂取する目的、対象、方法、用量等に応じて、例えば、医薬組成物、医薬部外組成物、飲食組成物、又は飼料組成物とすることができる。

[0059] 前記医薬組成物及び医薬部外組成物としては、例えば、製剤とすることができ、その形態は特に限定されないが、例えば、錠剤、丸剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤；一般液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等の液剤；ゼリー剤；経腸投与剤；坐剤等の外用剤等が挙げられる。前記製剤は、例えば、前記培養物（又はその濃縮物、希釈物、乾燥物、凍結物、破碎物、一部精製物等）に製剤化補助剤や他の成分を加えて、公知の方法又はそれに準じた方法によって製造することができる。

[0060] 前記製剤化補助剤としては、例えば、溶剤、分散剤、乳化剤、増粘剤、増粘安定剤、ゲル化剤、界面活性剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤、溶解助剤、懸濁剤、コーティング剤、担体（固体担体、水等の液体担体）、保存剤、香料、着色剤、pH調整剤が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0061] 前記他の成分としては、例えば、水、脂質、ミネラル類、ビタミン類、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、有機酸、他の乳酸菌や酵母及びこれらの処理物（破碎処理物、加熱処理物等）や発酵物が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0062] 前記飲食組成物の形態としては、特に限定されず、例えば、バーのような固形状、飲料や流動食のような液状、ペースト状、半液体状、ゲル状（ゼリ

一状)、ゲル状油脂(半固形状油脂)、粉末状等の形態が挙げられる。また、前記飲食組成物としては、流動食、粉末流動食、栄養ペースト、経口・経管栄養剤、飲料、ゲル状食品などとして、経口・経腸栄養患者や高齢者、乳幼児等に摂取させることもできる。

[0063] 前記飲食組成物の例としては、特に限定されないが、例えば、飲料(茶類、炭酸飲料、ココア、コーヒー、乳酸菌飲料、豆乳飲料、果汁・野菜汁飲料、清涼飲料、栄養飲料、アルコール飲料等)、加工食品(チョコレート、ガム、グミ、ゼリー、焼菓子(パン、ケーキ、クッキー、ビスケット等)、キャンデー等)、乳製品(調製粉乳(粉末ミルク等)、調整乳、乳飲料、アイスクリーム、ヨーグルト、チーズ、クリーム、バター、マーガリン、練乳等)、調味料(ソース、スープ、ドレッシング、マヨネーズ、マヨネーズタイプ調味料、クリーム等)、サプリメント、食用油、機能性食用油脂が挙げられる。このような飲食組成物は、例えば、既存の飲食品又はその原料若しくは製造過程の中間産物に、前記培養物を配合する方法等によって製造することができる。この場合に配合する培養物は、前記医薬組成物又は医薬部外組成物の形態であってもよい。

[0064] また、前記飲食組成物の他の態様としては、上述のように、本発明のヨーグルト製造方法に係る培養工程により得られた前記培養物(ヨーグルト)をそのまま、又はこれを濃縮、希釈、乾燥、若しくは凍結等して、発酵乳であるヨーグルトとすることもできる。

[0065] 前記ヨーグルトとしては、例えば、前記乳等省令による「発酵乳」の規格を満たす発酵乳(より具体的には、無脂乳固形分の含有量が8.0%以上、乳酸菌数(前記NMN産生乳酸菌数及び必要に応じてストレプトコッカス・サーモフィルスの合計数、以下同じ)が1,000万/mL以上のもの)が挙げられる。また、前記ヨーグルトには、前記乳等省令による「乳製品乳酸菌飲料」の規格を満たすもの(より具体的には、無脂乳固形分の含有量が3.0%以上、乳酸菌数が1000万/mL以上のもの);「乳酸菌飲料」の規格を満たすもの(より具体的には、無脂乳固形分の含有量が3.0%未満

、乳酸菌数が100万/mL以上のもの)も含む。なお、前記乳酸菌数は、前記乳等省令で定められた検査法により測定される生菌数である。

[0066] 前記ヨーグルトには、飲食品に含有させることが可能な各種成分をさらに含有させてもよい。前記各種成分としては、特に制限されないが、例えば、糖類、糖アルコール類、ミネラル類、ビタミン類、タンパク質、ペプチド、アミノ酸類、有機酸、pH調整剤、澱粉及び加工澱粉、食物繊維、果実・野菜及びその加工品、動物及び植物生葉エキス、天然由来高分子（コラーゲン、ヒアルロン酸、コンドロイチン等）、油脂、増粘剤、乳化剤、溶剤、界面活性剤、ゲル化剤、安定剤、緩衝剤、懸濁化剤、粘稠剤、賦形剤、崩壊剤、結合剤、流動化剤、保存料、着色料、香料、矯味剤、甘味剤等が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上の組み合わせであってもよい。

[0067] このようなヨーグルトとしては、具体的には、プレーンヨーグルト等のセッタイプヨーグルト（固形状発酵乳）、ソフトタイプヨーグルト（糊状発酵乳）、及びドリンクタイプヨーグルト（液状発酵乳）が挙げられ、これらを材料として用いたフローズヨーグルトであってもよい。また、前記ヨーグルトは、チーズ、発酵クリーム、発酵バター、ケフィア等の発酵食品の材料として用いることもできる。

[0068] 前記飲食組成物としては、例えば、一般食品、健康食品、機能性食品、保健機能食品（例えば、特定保健用食品、栄養機能食品、栄養補助食品、機能性表示食品等）、特別用途食品（例えば、幼児用食品、妊産婦用食品、病者用食品等）、メディカルフード（米国食品医薬品局（FDA）及びオーストラリア食品医薬品局により定義された医師の管理において処方される食品）、治療食（治療の目的を果たすものであり、医師による食事箋に従って栄養士等が作成した献立に基づいて調理されたもの）、食事療法食としてもよい。また、前記飲食組成物には、その製品においてNMNによりもたらされる作用・効能（例えば、加齢による疾患の予防又は改善、便秘の予防又は改善や炎症性腸疾患の予防又は改善）が表示されていてもよい。

[0069] 前記飼料組成物としては、飼料組成物を投与又は摂取する目的、対象、方

法、用量等に応じて、上記飲食組成物を適宜改変したものが挙げられる。

[0070] 前記NMN含有組成物は、NMNを有効成分として含有することで、対象の生体内において、NMN濃度を向上させ、かかるNMNを前駆体とするNAD、さらにはその代謝物（ニコチンアミド、ニコチン酸、NAMN、NAD等）の産生も向上させ、生体内濃度を向上させることが可能である。そのため、前記NMN含有組成物は、生体内におけるNMN濃度向上及びNAD濃度向上のために用いることができる。

[0071] さらに、前記NMN含有組成物は、生体内のNMN濃度及びNAD濃度を向上させることで、NMNやその代謝産物であるNADの投与又は摂取によって予防又は改善されることが報告されている各種疾患や症状である、加齢による疾患（非特許文献1～4）、便秘（非特許文献5）、炎症性腸疾患（Navarro et al., Br J Pharmacol., 2022, 179, p. 1839–1856）などの予防又は改善のために用いることもでき、加齢による疾患の予防又は改善のため、便秘の予防又は改善のため、又は、炎症性腸疾患の予防又は改善のために用いることが好ましい。

[0072] 前記加齢による疾患としては、加齢（ヒトにおいて好ましくは、40歳以上、より好ましくは50歳以上、さらに好ましくは60歳以上）によって惹き起こされることが報告されている各疾患が挙げられ、例えば、肥満、インスリン抵抗性低下、脂質代謝能低下、眼機能低下、骨密度低下、免疫機能低下、耐糖能低下、酸化ストレス上昇、炎症、概日リズムの乱れ、肝機能低下、腎機能低下、骨格筋機能低下、心機能低下、アルツハイマー型認知症、中枢神経機能低下が挙げられる。

[0073] 前記対象としては、ヒト又は非ヒト哺乳動物が挙げられ、前記非ヒト哺乳動物としては、マウス、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウマ、サル、イヌ、ネコ、ウサギ等が挙げられる。

[0074] 前記NMN含有組成物は、そのまま、より好ましくは上記の各組成物として前記対象に投与することができ、前記対象に経口又は経腸で投与することが好ましい。なお、本明細書において、経口投与には、前記飲食組成物や前

記飼料組成物等の摂取も含む。

- [0075] 前記NMN含有組成物の投与量又は摂取量（以下、場合により「用量」ともいう）としては、組成物の形態；投与又は摂取の目的や方法；対象の種、年齢、体重、性別、症状の程度等を考慮して、個々の場合に応じて適宜決定することができる。よって、特に限定されるものではないが、例えば、ヒト（好ましくは、成人）に対する用量としては、NMNの量で、対象の体重1 kgあたり、かつ、1日あたり、0.0001～10 mgであることが好ましく、0.001～5 mgであることがより好ましい。なお、投与回数は、1日1回～適当な回数に分けることができる。

実施例

- [0076] 以下、試験例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の例に限定されるものではない。なお、下記の各試験例において、「%」の表示は、特に記載のない場合、重量／容量（w／v：g／mL）パーセントを示す。

- [0077] <LC-MS/MS分析>

下記の各試験例において、NMN濃度（ng/mL）の測定及びNAD⁺濃度（ng/mL）の測定は、LC-MS/MS分析によりおこなった。LC-MS/MS分析は次の条件：

カラム：Hypercarb 3 μm、2.1 mm×100 mm Column

移動相：

A液：0.05 v/v %水酸化アンモニウム含有7.5 mM酢酸アンモニウム水溶液

B液：0.05 v/v %水酸化アンモニウム含有アセトニトリル溶液

移動相中のA液及びB液の割合：

移動相の通液開始→0分：A液95 v/v %－B液5 v/v %

0分→1.8分：A液95 v/v %－B液5 v/v %

1.8分→14分：A液95 v/v %－B液5 v/v %→A液46 v

／v％－B液54v／v％

14分→14.1分：A液46v／v％－B液54v／v％→A液10v／v％－B液90v／v％

14.1分→17.1分：A液10v／v％－B液90v／v％

17.1分→17.2分：A液95v／v％－B液5v／v％

17.2分→32.2分：A液95v／v％－B液5v／v％

カラム温度：60℃

流速：0.2mL／分

インジェクション量：2μL

イオン化：ESIポジティブモード

NMNのm／z：

プリカーサーイオン（Q1 Mass、(Da)）：335.1

プロダクトイオン（Q3 Mass、(Da)）：123.0

NAD⁺のm／z：

プリカーサーイオン（Q1 Mass、(Da)）：664.2

プロダクトイオン（Q3 Mass、(Da)）：428.2

にておこなった。

[0078] <試験例1>

まず、SMY培地で下記の表1に示すラクトバチルス・デルブルッキー、リモシラクトバチルス・ロイテリ、及びストレプトコッカス・サーモフィルスの各菌株を37℃、18時間を2回、アネロパックによる嫌気下で賦活培養した。SMY培地は、脱脂粉乳（株式会社明治製）10w／w％、酵母エキス（Difco社製）0.1w／w％を水に溶解後、115℃において15分間オートクレーブ滅菌して調製した培地（無脂乳固形分含有量：9.55w／w％）である。次いで、各賦活培養後の培養液をそれぞれ新たなSMY培地に対して1v／v％（ $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cfu／g）となるように接種し、37℃で12時間、嫌気培養した。培養後の培養液20μLを採取し、88.8v／v％メタノールを200μL加え、よく混合した後に3

0分間氷上で静置した。静置後、15,000rpm、4℃、2分間の条件で遠心分離して上清170μLを採取し、遠心エバポレーターにより乾固させた。乾固物を10mM酢酸アンモニウム溶液で溶解後に0.22μm径フィルターでろ過し、ろ液をLC-MS/MSに供して、培養後のSMY培地中におけるNMN濃度(ng/mL)を測定した。結果(SMY)を下記の表1及び図1に示す。なお、以下の表及び図中、「St」は「*Streptococcus thermophilus*」の、「Lr」は「*Limosilactobacillus reuteri*」の、「Lb」は「*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*」の、それぞれ略記であり、「O」は、NMNが検出されなかったか、検出限界未満であったことを示す。

[0079] <試験例2>

各賦活培養後の培養液を接種する培地を、前記SMY培地に代えてSMY+NAD培地としたこと以外は試験例1と同様にしてラクトバチルス・デルブルッキー、リモシラクトバチルス・ロイテリ、及びストレプトコッカス・サーモフィルスの各菌株を培養し、培養後のSMY+NAD培地中におけるNMN濃度(ng/mL)を測定した。SMY+NAD培地は、オートクレーブ滅菌後のSMY培地にNAD⁺(sigma aldrich社製)を終濃度5,000ng/mLとなるようにさらに添加したこと以外は前記SMY培地と同様にして調製した培地である。結果(SMY+NAD)を下記の表1及び図2に示す。

[0080]

[表1]

		SMY	SMY+NAD
培地のみ		0	0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	St MHD202311	0	0
	St MHD202312	2	4
	St MHD202313	0	2
	St OLS4496	0	0
	St JCM17834T	2	0
	St MHD202314	0	0
	St MHD202315	1	0
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Lr MHD202316	0	250
	Lr MHD202317	3	261
	Lr MHD202318	2	234
	Lr MHD202319	0	221
	Lr MHD202320	0	225
	Lr MHD202321	1	242
	Lr JCM1112T	0	227
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Lb MHD202322	0	2
	Lb MHD202323	0	30
	Lb MHD202324	2	52
	Lb MHD202325	0	4
	Lb MHD202326	0	3
	Lb JCM1002T	1	19

NMN濃度(ng/mL)

[0081] 表1及び図1に示したように、SMY培地において、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリの一部でNMNを産生す

ることが確認されたが、その量はわずかであった。他方、表 1 及び図 2 に示したように、SMY 培地に NAD⁺ を添加したことにより、SMY 培地のみでは NMN を産生しなかったラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリにおいても NMN を産生できるようになることが確認され、さらにその産生量も顕著に増加することが確認された。一方、ストレプトコッカス・サーモフィルスは、いずれの菌株及び培地においても NMN を産生しないか、ほとんど産生しなかった。なお、表 1 に示したラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリの培養物は、いずれもヨーグルト状の物性を呈していた。

[0082] <試験例 3>

NAD⁺ の添加に代えて、NAD⁺ を産生するストレプトコッカス・サーモフィルスの添加による NMN 産生量の向上を検証した。以下の試験に用いたストレプトコッカス・サーモフィルスの、試験例 1 の培養後に測定された SMY 培地中の NAD⁺ 濃度 (ng/mL) を下記の表 2 に示す。表 2 に示したように、いずれのストレプトコッカス・サーモフィルスも SMY 培地において十分な量の NAD⁺ を産生した。

[0083] [表2]

培地のみ	0
St MHD202311	4009
St MHD202312	5039
St MHD202313	3986

NAD⁺ 濃度(ng/mL)

[0084] 先ず、前記 SMY 培地で、下記の表 3～4 に示すラクトバチルス・デルブルッキー、リモシラクトバチルス・ロイテリ、及びストレプトコッカス・サーモフィルスの各菌株をそれぞれ、37℃、18 時間で 2 回、アネロパックによる嫌気下で賦活培養した。次いで、新たな SMY 培地に対して、下記の表 3～4 に示す組み合わせで、各菌株の賦活培養後の培養液がそれぞれ 1 v

／v％（ $1\times10^6\sim1\times10^8$ cfu／g）となるように接種し、37℃で12時間、嫌気培養した。培養後の培養液を試験例1と同様にしてLC－MS／MSに供し、培養後のSMY培地中におけるNMN濃度（ng／mL）を測定した。結果を下記の表3～4及び図3～4に示す。

[0085] [表3]

	Lr MHD202317
~	3
St MHD202311	19.3
St MHD202312	15.2

NMN濃度(ng/mL)

[0086] [表4]

	Lb MHD202324
~	2
St MHD202312	5.7
St MHD202313	5.2

NMN濃度(ng/mL)

[0087] 表3～4及び図3～4に示したように、ラクトバチルス・デルブルッキー又はリモシラクトバチルス・ロイテリのみ（表、図中の「－」）ではNMNの産生量は少なかったが、NAD⁺を産生するストレプトコッカス・サーモフィルスの添加によっても、試験例2の結果と同様に、これらラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリによるNMN産生量が増加することが確認された。なお、表3に示したリモシラクトバチルス・ロイテリ及びストレプトコッカス・サーモフィルスによる培養物と、表4に示したラクトバチルス・デルブルッキー及びストレプトコッカス・サーモフィルスによる培養物は、いずれもヨーグルト状の物性を呈していた。

[0088] <試験例4>

上記で確認されたNAD⁺の添加によるNMN製造に好適な温度及び培地条

件を検証した。先ず、前記SMY培地において、前記脱脂粉乳の濃度を10w/w%（無脂乳固形分濃度：9.55w/w%）、15w/w%（無脂乳固形分濃度：14.33w/w%）、又は20w/w%（無脂乳固形分濃度：19.10w/w%）としたこと以外は同様にして、各濃度のSMY培地（10%SMY、15%SMY、20%SMY）を調製した。これらSMY培地を用い、菌株の組み合わせをLr MHD202317とSt MHD202312との組み合わせ、又は、Lb MHD202324とSt MHD202312との組み合わせとし、かつ、培養温度を、37℃又は43℃としたこと以外は試験例3と同様にして、培養後のSMY培地中のNMN濃度（ng/mL）を測定した。結果を下記の表5及び図5～図6に示す。表5及び図5～図6に示したように、いずれの組み合わせにおいても、脱脂粉乳濃度20w/w%、かつ、培養温度43℃において最もNMN産生量が高まることが確認された。

[0089] [表5]

		Lr MHD202317	Lb MHD202324
		St MHD202312	St MHD202312
37℃	10%SMY	15.2	5.7
	15%SMY	12.2	11.5
	20%SMY	14.4	22.4
43℃	10%SMY	17.4	16.3
	15%SMY	27.7	17.0
	20%SMY	63.3	25.6

NMN濃度(ng/mL)

[0090] <試験例5>

先ず、脱脂粉乳（株式会社明治製）10kg、酵母エキス（アサヒグループ食品株式会社製）0.1kg、水89.9kgを混合し、95℃に達温させ加熱殺菌した後に、43℃に冷却した。次いで、乳酸菌スターター（Lr MHD202317とSt MHD202312）0.1kgを接種し、

容器に充填して、43℃の恒温室にて静置発酵させ、ヨーグルト状の組成物を得た。試験例1と同様にしてLC-MS/MSに供し、この組成物中のNMN濃度を測定したところ、17.4 ng/mLであった。

[0091] <試験例6>

まず、脱脂粉乳（株式会社明治製）10 kg、酵母エキス（アサヒグループ食品株式会社製）0.1 kg、水89.9 kgを混合し、95℃に達温させ加熱殺菌した後に、43℃に冷却した。次いで、乳酸菌スターター（Lb MHD202324とSt MHD202312）0.1 kgを接種し、容器に充填して、43℃の恒温室にて静置発酵させ、ヨーグルト状の組成物を得た。試験例1と同様にしてLC-MS/MSに供し、この組成物中のNMN濃度を測定したところ、16.3 ng/mLであった。

[0092] <試験例7>

まず、脱脂粉乳（株式会社明治製）10 kg、酵母エキス（アサヒグループ食品株式会社製）0.1 kg、水89.9 kgを混合し、95℃に達温させ加熱殺菌した後に、43℃に冷却した。次いで、NAD⁺（sigma aldrich社製）1 g、乳酸菌スターター（Lb MHD202324とSt MHD202312）0.1 kg、及びLr MHD202317 0.1 kgを接種し、容器に充填して、43℃の恒温室にて静置発酵させ、ヨーグルト状の組成物を得た。試験例1と同様にしてLC-MS/MSに供し、この組成物中のNMN濃度を測定したところ、260 ng/mLであった。

産業上の利用可能性

[0093] 以上説明したように、本発明によれば、ラクトバチルス・デルブルッキー及びリモシラクトバチルス・ロイテリを用いてニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）を十分量含有するヨーグルトを製造可能なヨーグルトの製造方法を提供することが可能となる。また、本発明によれば、NMNを十分量製造可能なNMN製造方法、及び前記乳酸菌によるNMN産生量を向上させることが可能なNMN産生量向上方法を提供することも可能となる。

受託番号

[0094] 1.

(1) 識別の表示 : S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u
s O L S 4 4 9 6

(2) 受託番号 : N I T E B P - 0 2 8 7 5

(3) 受託日 : 2 0 1 9 年 2 月 5 日

(4) 寄託機関 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セン
ター

請求の範囲

- [請求項1] 乳成分含有培地にニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを添加したNAD含有培地で、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*) 及びリモシラクトバチルス・ロイテリ (*Limosilactobacillus reuteri*) からなる群から選択される少なくとも1種のNMN産生能を有する乳酸菌を培養し、ニコチンアミドモノヌクレオチドを含有するヨーグルトを得る培養工程を含む、ヨーグルトの製造方法。
- [請求項2] 前記ヨーグルトにおける、前記NAD含有培地及び前記乳酸菌に由来するニコチンアミドモノヌクレオチドの含有量が5 ng/mL以上である、請求項1に記載のヨーグルトの製造方法。
- [請求項3] 前記乳成分含有培地における乳成分の含有量が、無脂乳固形分の含有量で、5～35 w/w%である、請求項1に記載のヨーグルトの製造方法。
- [請求項4] 前記培養における温度が25～55℃である、請求項1に記載のヨーグルトの製造方法。
- [請求項5] 前記NAD含有培地におけるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの含有量が、前記NAD含有培地の全量に対して $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ ng/mLである、請求項1に記載のヨーグルトの製造方法。
- [請求項6] 前記培地へのニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの添加が、前記培地でニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを産生するストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) の添加である、請求項1に記載のヨーグルトの製造方法。