

低温下における乳酸菌の生残に与える諸因子

Factors Affecting the Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on Freezing Process

久富 智恵*

渡辺 学*

Chie HISATOMI

Manabu WATANABE

小林 武志**

鈴木 徹†

Takeshi KOBAYASHI

Toru SUZUKI

- * 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食機能保全科学専攻(108-8477 東京都港区港南 4-5-7)
Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, The Graduate School of Marine Science and Technology (4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477)
- ** 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科海洋生命科学専攻(108-8477 東京都港区港南 4-5-7)
Department of Marine Life Sciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, The Graduate School of Marine Science and Technology (4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477)

Summary

Factors affecting the survival on freezing process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suspension were investigated. At first, the survival rate as a function of cooling speed (from $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) was examined. The results showed the least survival rate at $-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$, however, the differences in the all cooling rates were not significant. Subsequently, adding NaCl in medium, the effect of the final temperature (T_{fa}) from -15°C to -50°C on the damage of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was investigated at a cooling rate of $-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$. It was found that the survival rate in the range $T_{\text{fa}} > -21.1^{\circ}\text{C}$ (eutectic temperature of NaCl solution) decreased significantly with T_{fa} , but it was constant and independent of T_{fa} below -21.1°C . These results suggested that the freeze concentration effect during freezing process damages *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* significantly. Finally, we studied the change of survival rate when *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was immersed at room temperature in solution of NaCl and glucose with the same osmotic pressure as that observed during freezing. The results showed that there was no difference among solutions but the survival rate decreased by 70% in a short time even at room temperature. These results support that the main factor of damaging *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* during freezing is the freeze concentration effect.

Key words: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Freeze concentration, Osmotic pressure, Survival rate, Eutectic

† Fax: +81-3-5463-0585 E-mail: toru@kaiyodai.ac.jp

1. 緒言

微生物の凍結保存や凍結耐性に関して、古くから非常に多くの研究が行われてきた¹⁾。それらの研究によると、凍結耐性に影響を与える因子には菌種、凍結保存温度や凍結貯蔵時間などが挙げられる²⁾が、なかでも一般に冷却速度が大きく影響することが知られている³⁾。冷却速度が遅い場合では、細胞外溶液の凍結により細胞内の自由水が外へ流出して細胞は濃縮効果によってある程度ダメージを受ける。しかしその後細胞内の水分は結晶化せずにガラス化するため、死に至るほどの損傷を受けない。また超急速凍結においては、細胞内から自由水が脱水される前に細胞内がガラス化するため、大きなダメージを受けない。しかし、その間の中間的な速度帯においては、ある程度細胞内の自由水が脱水されるために濃縮効果で細胞はダメージを受け、さらに細胞内氷結晶が生成することから、細胞膜、細胞内部組織が破壊され決定的な死に至る³⁾。ただし、このダメージの大きくなる冷却速度は冷却速度と細胞、微生物体からの脱水速度との兼ね合いで決まり、微生物、細胞種により水の透過性に大きく依存している⁴⁾。このように一般論はある程度知られているが、乳酸菌、特に乳製品を製造する際に使用される *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (以下 *L. bulgaricus* と表記) においては研究例が少なかった⁵⁾。よって、我々のグループでは、*L. bulgaricus* を試料として、水に分散させたときの凍結過程における冷却速度の影響、NaCl 水溶液中に分散させた場合の最終到達温度の影響、および凍結濃縮効果の与える影響を確かめるために常温にて高濃度の NaCl または グルコース溶液に分散させた場合のダメージを調べ、総合して凍結ダメージの因子に関して検討した。(ただし、本実験結果はこの菌株特有のものであるとする。)

2. 材料および方法

2.1 冷却速度の乳酸菌生残に及ぼす影響

蒸留水で洗浄後、-90℃で保存した対数増殖期の濃縮乳酸菌 *L. bulgaricus* を常温で解凍し、こ

こから 100 mg 採取、蒸留水 900 mg を加え、菌液 1 g を調製した。この菌液を DSC セル (アルミニウムセル) に約 10 mg とり示差走査熱量計 (PerkinElmer Diamond DSC, 以下 DSC と記載) を用いて 25℃から-100℃まで降温、-100℃から 25℃まで昇温し熱分析を行うと同時に種々の冷却速度にて同様の実験を行った。この際冷却速度を 1, 7, 40℃/min と変化させ、それぞれ解凍 (昇温) 速度は冷却速度と同じとした。

操作後の試料を 10 倍ずつ段階希釈した。この希釈液各 100 μL を BCP (ブロムクレゾールパープル) 加プレート寒天培地(栄研化学株式会社)に塗沫し 35℃で 2 日間嫌気培養後、コロニーを計測した。なお、段階希釈には 0.1%ポリペプトン (日本製薬株式会社) を含む生理食塩水 (以後希釈水と記す) を用いた。また未凍結試料の菌数を調べ、初期菌数を 2.1×10^{10} cfu/g とした。

2.2 最終到達温度の乳酸菌生残に及ぼす影響

上記と同様に調製した菌液 1 g に 1% NaCl (NaCl 10 mg) を加えてよく攪拌した。先と同様に、そこから約 10 mg 量り取り、アルミニウムセルに入れて DSC を用いて 7℃/min (選定理由は結果および考察 1. に記載) で 25℃から-15, -20, -22, -30, -40, -50℃まで降温、各温度から 25℃まで昇温する操作を行った。操作後の生残数の測定は前述の方法と同様に行った。

2.3 濃縮による生菌数変化

凍結濃縮時におけるダメージの大きさに関して、手がかりを得るために以下の方法にて、まず常温下での浸透圧によるダメージを調べた。前述菌液を、希釈水 100 μL に懸濁した。あらかじめほぼ等しい浸透圧 (約 10.4 osmol) となるよう NaCl 溶液(23.3%, 約 5.2 mol/L)および比較のためのグルコース溶液(65.1%, 約 10.4 mol/L) を調製し、これらをマイクロチューブにそれぞれ 990 μL ずつ加えた。なおここで用いた浸透圧は実験 2 の条件で冷却・解凍した場合に想定される、細胞がさらされる最も高い浸透圧である。ここに、菌懸濁液を 10 μL ずつ入れて良く攪拌してそれらを試料とし、常温 (25℃) 下で、0 ~ 3 時間浸漬し 30 分間隔で 10 μL ずつを取り出し、生残数の測定を前述の方法と同様に行った。

3. 結果および考察

3.1 冷却速度の乳酸菌生残に及ぼす影響

Table 1 に冷却速度と生残数の関係を示した。7°C/minの時に生残数が最も低く、1, 40°C/minではこれよりも生残数が高かった。この原因は1°C/min, 40°C/minでは乳酸菌は脱水されガラス化することで損傷は比較的小さいと考えられる。一方、7°C/minで損傷が大きかった原因として、従来説によると細胞内凍結が生じたと考えられるが、十分な証拠はない。別の仮説として、凍結濃縮により細胞が損傷したとも考えられる。いずれにせよ乳酸菌ではおおよそ7°C/minの冷却速度がダメージの大きい中間的な速度と見なせ、材料および方法2以降では7°C/minで実験を行った。

Table 1 Relation of survival counts and cooling rate. (n=3)

Cooling rate °C/min	Viable cells cfu/g	Average of viable cells cfu/g
Before freezing	1.2E+10	2.1E+10
1	8.4E+09	6.4E+09
	5.0E+09	
	6.2E+09	
	5.8E+09	
7	1.1E+09	2.0E+09
	3.2E+09	
	1.8E+09	
40	2.0E+09	3.8E+09
	2.5E+09	
	5.6E+09	
	6.0E+09	
	3.0E+09	

3.2 最終到達温度の乳酸菌生残に及ぼす影響

Fig. 1 に NaCl を培地を含む菌液を様々な最終到達温度まで冷却した場合の生残数を示した。結果より、-15°Cの場合初期菌数に比べて2桁減少し、最終到達温度の降下に従って-22°Cまで生

菌数が減少し、初期菌数の3桁程度の減少が見られた。

NaCl の共晶温度である-21.1°Cまでは菌液において菌体外で凍結濃縮が起こり、菌体は高塩濃度に晒されると考えられる。この結果、溶液効果によって細胞が損傷すると推察される。また-30°Cから-50°Cでは、-22°Cの生菌数とほぼ同数になった。一方、Fig. 2 に NaCl 添加の菌液の DSC 曲線を示すが、-20°C付近には NaCl と氷の共晶の融解と見られる吸熱ピークが認められ、-20°C以下では菌体の周囲は共晶状態にあると推察される。そのため、-30°Cから-50°Cの生菌数が-22°Cの生菌数とほぼ同数で変化しなかったのは-21.1°C以下の温度では共晶生成の終了により凍結濃縮の進行が停止したためと考えられる。

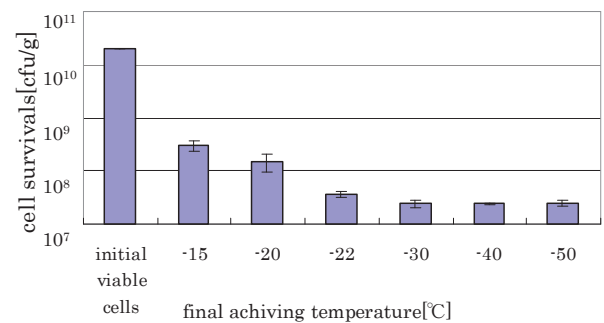


Fig. 1 The effect of minimum temperature for the survival rate. (n=2)

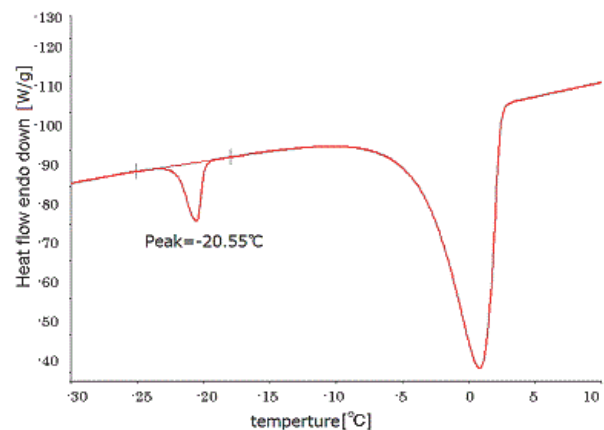


Fig. 2 DSC warming trace at 7°C/min for *L. bulgaricus* suspension in medium solution with sodium chloride.

3.3 濃縮による生菌数変化

Fig. 3 に NaCl およびグルコース各溶液に常温で浸漬した時の生存率の時間変化を示す。

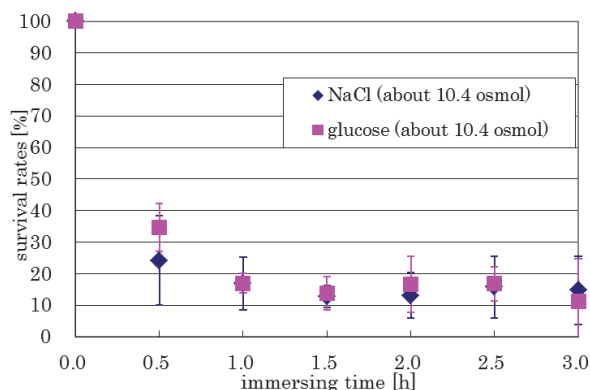


Fig. 3 Changes of survival rate after immersing in the solution of sodium chloride and glucose. (n = 3)

浸透圧をそろえた場合、各溶液の違いによる生存率の低下挙動に大きな差を認めることができなかったが、いずれも浸漬時間が 0.5 時間までの短時間で生存率は急激に 20~35%まで減少し、1 時間後からは生存率はあまり変動しなかった。

本研究で調べた NaCl 添加菌液を冷却速度 7°C/min で最終到達温度が-22°C以下にまで冷却した場合、凍結過程において菌体が濃縮溶液に晒される時間は、25°Cから濃縮の止む共晶温度-21.1°Cまで温度域を 7°C/min で冷却しているので、冷却・解凍の両過程で 13.1 分と推算できる。

よって常温における高濃度溶液浸漬試験における結果とあわせると、乳酸菌の凍結濃縮過程におけるダメージの主因子は浸透圧によるものであると推察できる。すなわち NaCl 添加試料では-21.1°Cまでは凍結濃縮による浸透圧ダメージにより菌体は死滅が進み、-21.1°C以下では濃縮が止まり、菌体内部も一定の高脱水状態となるため、それ以上温度が低下しても生残数は変化しないものと考えられる。

4. 結 論

L. bulgaricus は冷却・解凍速度が 7°C/min の時に最も生残数が低下した。また最終到達温度が-22°Cよりも高い場合に生残数は最終到達温度

に依存し、-22°C以下では生残数低下が見られなかった。これらの結果は、菌体周囲の溶液の凍結濃縮が傷害の原因であることを強く示唆している。また常温で高濃縮溶液に試料を浸漬したところ、浸漬時間 0.5 時間で 40%まで生残率が低下したことから、凍結濃縮過程の短い時間 (0.5 時間) 以内でも濃縮が *L. bulgaricus* へ大きなダメージを与えることがわかった。

謝 辞

実験に協力頂いた白石真人氏, Dr. Sk. Mustafizur Rahman に感謝する。

文 献

- 1) Mazur. P.: "Cryobiology", Harold Thayer Meryman, pp. 213-315, Academic Press, London(1966)
- 2) Lund. B.M.: "Freezing, The microbiological safety quality food", Barbara M. Lund, Tony C. Baird-Parker, Grahame Warwick Gould, pp. 122-45, Aspen Publishers, Gaithersburg(2000)
- 3) Mazur. P.: Cryobiology, **14**, 251-72(1977)
- 4) Dumont. F., Marechal. P.A. and Gervais. P.: Appl. Environ. Microbiol., **70**(1), 268-72(2004)
- 5) Fonseca. F., Marin. M.: Appl. Environ. Microbiol., **72**(10), 6474-82(2006)