

乳酸菌の凍結過程における損傷に関する研究

¹東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

²日本大学生物資源科学部

³広島大学大学院生物圏科学研究科

関口 由起¹, 小林 りか^{2†}, 川井 清司³, 鈴木 徹¹

The Study on Damages of the Lactic Acid Bacterium during Freezing Process

Yuki SEKIGUCHI¹, Rika KOBAYASHI^{2†}, Kiyoshi KAWAI³, Toru SUZUKI¹

¹ Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minatoku, Tokyo 108-8477 Japan

²Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa, 252-0880 Japan

³Department of Biofunctional Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8528 Japan

([†]Corresponding author, e-mail:kobayashi.rika@nihon-u.ac.jp)

Although the commercial lactic acid bacterium is often preserved in a freezing state, the viable rate of the lactic acid bacterium is reduced largely after thawing. In this study, to understand the physical damages caused by ice crystallization during freezing for the lactic acid bacterium suspensions, the suspensions were frozen with three different freezing rate to be observed by the scanning electron microscope (SEM). Furthermore, it is considered that some freezing damages of the lactic acid bacterium would be caused by osmotic pressure alteration due to freezing concentration. So, to prove the presume, the effect of osmotic pressure alteration at room temperature for the damage of the lactic acid bacterium was observed by direct observation with the SEM. As the result, aggregated and compressed lactic acid bacterium between extracellular large ice crystals were observed in the samples which were frozen at slow and medium freezing rate. On the other hand, they could not be observed in the frozen suspension that was prepared at rapid freezing rate. Furthermore, a large step change in osmotic pressure of the medium solution for bacterium suspension, which is considered as a factor of freezing damage, caused shrinking of the configurations of the lactic acid bacterium.

(Received Jul. 19, 2016 Accepted Sep. 12, 2016)

緒 言

研究報告

[Key words: Lactic acid bacterium, Freeze-concentration, Ice crystallization; 乳酸菌, 凍結濃縮, 氷結晶]

微生物の凍結において、細胞内氷晶の生成、および細胞外氷晶生成により生ずる細胞内液の脱水が致命的であるとされる。そのため微生物の凍結後の生残には、冷却速度が大きく影響する¹⁾。冷却が極急

速に進む場合は、細胞内液がガラス化することで氷結による損傷を回避する。また緩慢に冷却される場合は、細胞外に氷晶が生成し細胞内液の脱水が生ずるが、ある程度脱水が緩慢に進むことで、致命的な損傷を回避している。しかしながら、中間速度帯では細胞内氷結晶の生成および浸透圧脱水の双方が生ずることによって致命的な損傷が生ずるとされている²⁾。他方、先に述べた細胞内外の氷晶生成以外に、微生物の凍結障害の原因として、細胞懸濁液の濃縮によって生ずる浸透圧差による細胞の脱水収縮や、懸濁液の共晶生成による影響などが言及されている³⁾⁻⁶⁾。これまでに本研究グループは乳製品を製造する際に使用されることの多い乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (以下 *L.bulgaricus*) に着目し、乳酸菌の生残率に対する冷却速度、および最終凍結到達温度の影響について検討を行ってきた。その結果を総合すると、乳酸菌の生残率は、懸濁液中に共存する溶質の凍結濃縮によって生ずる浸透圧差の大小に依存する可能性が示唆された⁶⁾。しかしながら、先の研究では氷結晶生成の影響に関する検討が不足していた。そこで本研究では微生物の凍結死滅要因のひとつと考えられている、乳酸菌懸濁液内での氷結晶の生成挙動について、電子顕微鏡を用いた凍結乳酸菌組織標本の詳細観察を行ない、乳酸菌の生残率に対する影響の検討を行った。さらに、凍結濃縮による懸濁液内での浸透圧上昇が乳酸菌自体にどのような損傷を及ぼすか明らかにするため、常温下における乳酸菌周囲環境の浸透圧を変化させたモデル実験を行い、乳酸菌の形状変化を電子顕微鏡によって観察を行った。

材料および方法

1. 供試材料

本研究には、乳製品を製造する際に使用されることの多い *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (以下 *L.bulgaricus*) を使用した。独立行政法人製品評価技術基盤機構より菌株を購入し、サンプルの復元後、-90℃保管庫にて保存していたものを使用した。保存試料を常温解凍し、純粋培養を行った後、純粋培養した菌液 4ml を液体 MRS 培地 200ml 中に懸濁し、69 時間培養した。定常期に入ったことを確認した後、直ちに乳酸菌培養液 40ml を 4℃、22920g、15 分間の遠心分離にかけ、沈殿物と上澄

みに分けた。得られた菌懸濁液沈殿物に 10ml の滅菌水を加え、4℃、22920g、15 分間の遠心分離を行い洗浄を行った。洗浄操作は 2 回繰り返して行った。洗浄後の乳酸菌懸濁液に 10ml の滅菌水を加え、攪拌後、1.5ml ずつマイクロチューブに分注し、5 分間遠心分離を行った。上記の手順を経て得られた沈殿物である *L. bulgaricus* 濃厚懸濁液約 25ml を供試試料とした。

2. 凍結速度の違いが乳酸菌懸濁液中における氷結晶生成挙動および乳酸菌体の形状に及ぼす影響

凍結速度によって変化する乳酸菌懸濁液内での氷結晶の生成状態を検討すると同時に、その際に乳酸菌が受ける凍結損傷を菌体の形状変化から検討することを目的に、乳酸菌体凍結標本作製し、走査型電子顕微鏡観察を行った。乳酸菌濃厚懸濁液約 25μL をマイクロチューブに入れ、比較的速い凍結速度、中程度の凍結速度、緩慢な凍結速度の 3 種類の速度で凍結を行った。具体的には、LN₂ (-196℃) 5 分間浸漬凍結処理、-90℃ 静止空气中 24h 凍結処理、-20℃ 静止空气中 24h 凍結処理の 3 種類の凍結を行った。凍結完了後直ちに、凍結乳酸菌懸濁液を LN₂ に浸漬しながら乳鉢で粉碎処理を行い、この試料を真空凍結乾燥に供した。真空凍結乾燥では、棚温度を -40℃ から 5℃ ずつ段階的に上昇させていき 5 日間かけて行なった。得られた乾燥物を乳酸菌体凍結標本とし、走査型電子顕微鏡 (HITACHI : S-4000, 加速電圧 10kv - 20kV) を用いて観察を行った。併せて、同凍結方法の試料に生菌数測定も行った。

3. 乳酸菌周辺環境の浸透圧変化が乳酸菌体の形状に及ぼす影響

乳酸菌周辺環境の浸透圧変化の大きさを変えた場合の乳酸菌の細胞損傷を観察するため、濃度の異なる NaCl 水溶液を用いて、3 パターンの浸透圧変化をさせた試料を以下の手順に従って作成した。-90℃ 雰囲気下で保存されていた乳酸菌液 10μL を常温解凍し、ペプトン液 90μL に加え 100μL の菌懸濁液とした。まず、浸透圧変化を与えない試料として、100μL 菌懸濁液に 900μL のペプトン液を加えて 1ml に調整して作成した (Control)。次に、小さな浸透圧変化を与える試料 (Sample1) を、以下の手順で作成した。すなわち菌懸濁液 100μL を 1% 塩水溶液に 4 分間浸

漬させ、続けて全量を 5%塩溶液に 2 分間浸漬した。それ以降、10%、15%、20%、の各濃度塩溶液 100 μ L に段階的に 2 分間ずつ浸漬し、最後に 23.3%NaCl 溶液 100 μ L に 3 分間浸漬し作成した。最後に、大きな浸透圧変化を与える試料(Sample2)を作成した。すなわち、100 μ L の菌懸濁液を共晶点飽和濃度の 23.3%NaCl 水溶液 100 μ L に一気に浸漬させ、2 分間保持後、全量を再び共晶点飽和濃度 23.3%NaCl 水溶液 100 μ L に 3 分間浸漬させ作成した。その後直ちに各塩溶液に浸漬した乳酸菌懸濁液を、4 $^{\circ}$ C 下にて 2% グルタルアルデヒド溶液で固定し、50%、75%、99% のエタノールで段階的に脱水し、シリカゲルを入れたデシケーター内にて真空引きを行いながら 2 日間乾燥させた。これを観察用試料とし、走査型電子顕微鏡観察に供した。

結果および考察

1. 凍結速度の違いが乳酸菌懸濁液中における氷結晶生成挙動および乳酸菌体の形状に及ぼす影響

Fig.1 に乳酸菌懸濁液の凍結履歴を示す。また Fig.2 に凍結速度を変えた乳酸菌懸濁液凍結標本の電子顕微鏡写真を示す。Fig.2-a, Fig.2-b, Fig.2-c は各凍結の *L. bulgaricus* 懸濁液断面の全体画像であるが、LN₂凍

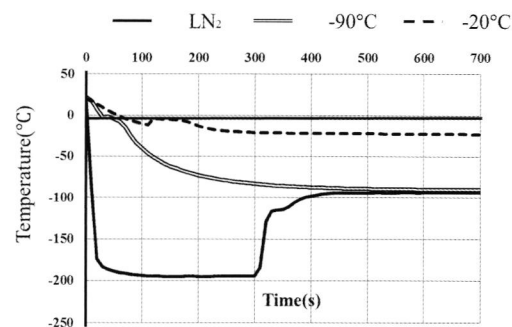


Fig. 1. Temperature profiles of the suspension of *L. bulgaricus* during freezing; black line shows freezing in LN₂. The double line shows freezing at -90 $^{\circ}$ C. The dotted line shows freezing at -20 $^{\circ}$ C.

結試料では乳酸菌体の外に明らかに氷結晶痕と考えられる空隙は見られず、菌が均一に分散している様子が観察された。その一方で、-90 $^{\circ}$ C 凍結や-20 $^{\circ}$ C 凍結試料では、乳酸菌体の外に氷結晶痕と考えられる空隙(図中矢印部分)が存在し、-20 $^{\circ}$ C 凍結試料の方がより大きく広がっている様子が観察された。さらに、高倍率観察によって取得した *L. bulgaricus* の画像を Fig.2-d, Fig.2-e, Fig.2-f に示す。

-90 $^{\circ}$ C 凍結及び-20 $^{\circ}$ C 凍結によって生成した細胞外氷結晶の間隙に、乳酸菌体が密集している様子が観察された。-20 $^{\circ}$ C 凍結試料においては、それが顕著であり、菌体同士が癒着している様子が観察された。その一方で、-90 $^{\circ}$ C 凍結試料では菌同士の癒着

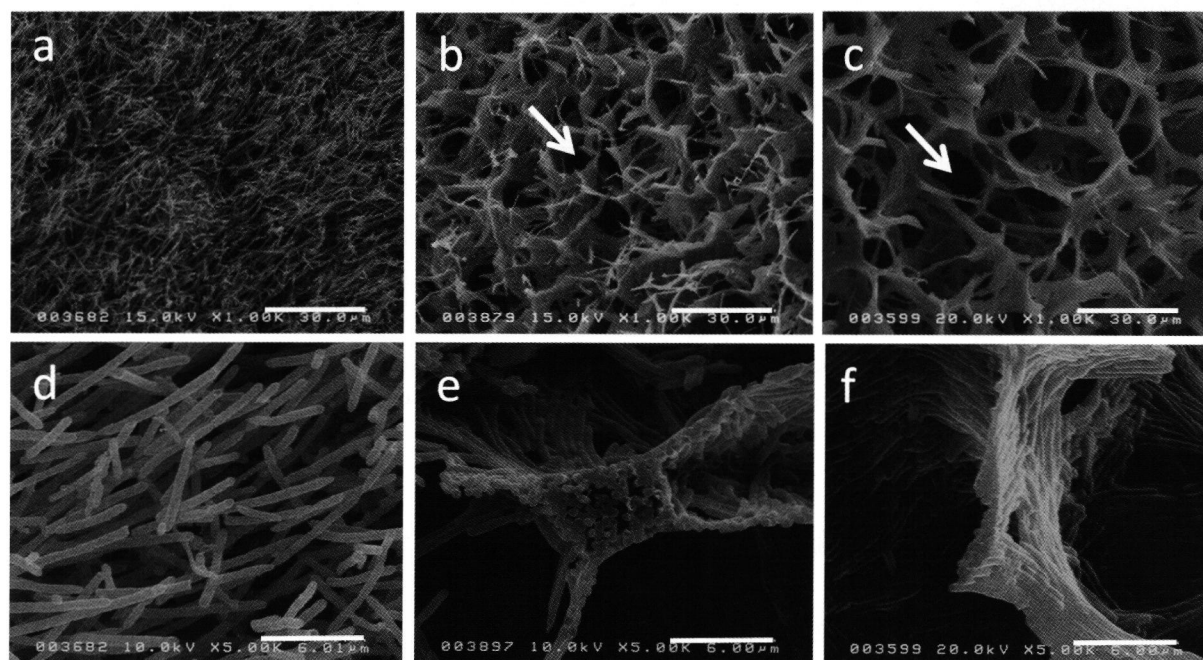


Fig. 2. SEM images of the suspension of *L. bulgaricus* frozen in the Liquid Nitrogen (a)(d), in the air at -90 $^{\circ}$ C (b)(e), and in the air at -20 $^{\circ}$ C (c)(f). 1000 Magnifications, Bars= 30 μ m (a)(b)(c), 5000 Magnifications, Bars= 6.0 μ m (d)(e)(f).

は見られなかった。また、同凍結条件において生菌数測定(n=2)を行った。その結果、生残率の高いものから順に、 -90°C 凍結(73.1%) $>$ LN₂凍結(54.8%) $>$ -20°C 凍結(5.6%)となった。なお、生残率の算出は、Controlの生菌数に対する凍結解凍試料の生菌数の割合とした。 -20°C から -40°C という比較的高い温度は微生物保存温度として相応しくないことは広く認識されているが⁷⁾、本実験の結果より、 -20°C 凍結において大幅な生菌数低下を生じさせる要因は、SEM画像で観察された細胞外氷結晶の生成による菌の凝集進行の結果、菌同士が癒着し菌体表面の損傷が生じることであると考え

られる。一方で、LN₂凍結において生残率が減少した理由としては、細胞内氷結晶が生成することによる菌体の損傷の影響が考えられるが、現時点では不明であり、今後菌体内部の観察も必要がある。

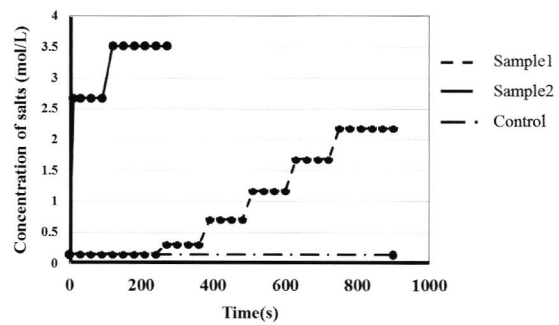


Fig. 3. The changes of NaCl molar concentration in liquid suspension of *L. bulgaricus*.

生じさせていないコントロールの試料と比較して、浸透圧変化を生じさせた試料では、菌体が全体的に小さく収縮しているような像が観察された。

加えて、菌体表面にしわが生じている様子や菌体

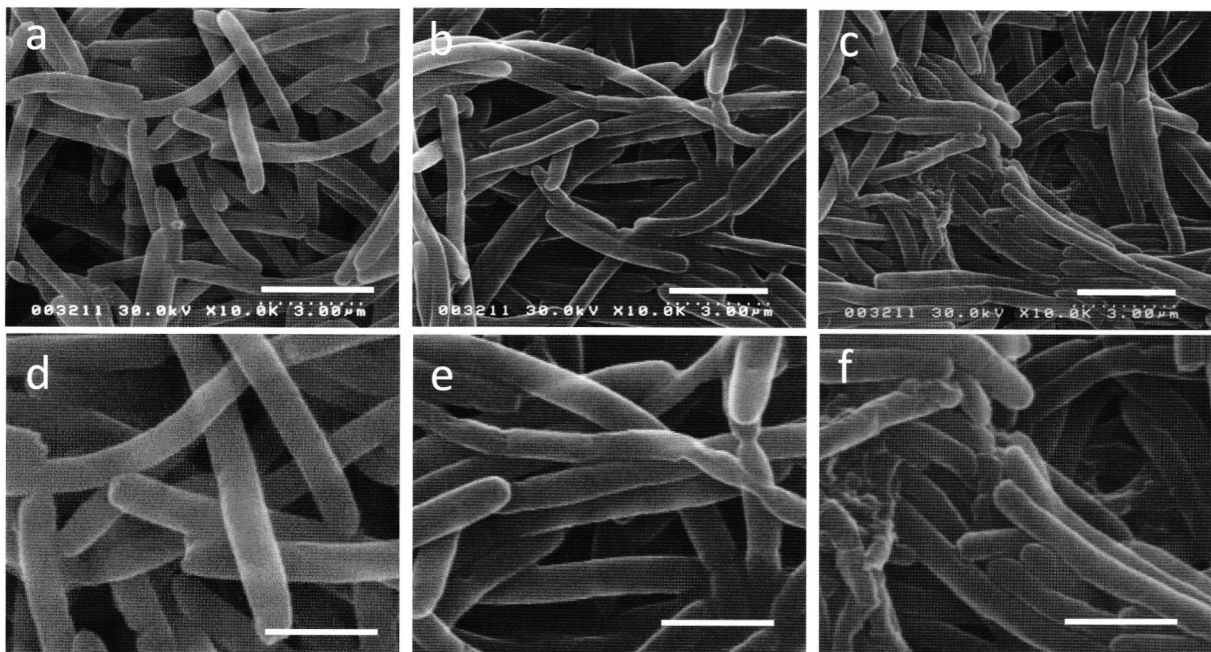


Fig. 4. SEM image of *L. bulgaricus* exposed to changes in osmotic pressure; Control (a)(d), Sample1 (b)(e), and Sample2 (c)(f). 10000 Magnifications Bars= 3.0 μm (a)-(c). Enlarged figure of (a), (b), and (c), Bars= 6.0 μm (d)-(f).

2. 乳酸菌周辺環境の浸透圧変化が乳酸菌体の形状に及ぼす影響

NaCl水溶液を用いた凍結中の浸透圧変化のモデル実験における、各乳酸菌懸濁液内の塩類モル濃度の変化をFig.3に示した。また、その際の乳酸菌体のSEM観察画像をFig.4に載せた。浸透圧変化を

の一部が大きく変形している様子も観察された。これらの変形・損傷は、Sample1よりも、濃度変化が大きいSample2でより顕著に確認された。これらの結果を総合すると、浸透圧変化が大きくなると、菌体からの浸透圧脱水がより大きく進行し、菌体全体を収縮させ、なおかつ菌体の表面、すなわち菌体の細胞膜の損傷を生じさせていると推測されるが、詳細についてはより検討を行う必要がある。

ま と め

乳酸菌 *L.bulgaricus* の凍結損傷要因の1つとされる氷結晶の状態を明らかにするために、凍結速度を変えた凍結乳酸菌の形状観察及びその際の生菌数測定を行った。その結果、 -20°C 凍結乳酸菌においては、細胞外氷結晶によって氷結晶間に圧縮された乳酸菌同士の癒着が見られ、生残率も大幅に低下していた。併せて、凍結損傷要因の1つである浸透圧変化の影響を検討した結果、浸透圧差が大きいほど、菌自体が縮小し、細胞表面のしわが目立ってきていることが観察された。以上より、*L.bulgaricus* は凍結過程における細胞外氷結晶による菌自体の凝集及び、凍結濃縮に伴う浸透圧変化による脱水の双方が死滅の要因であるとされてきた説を裏付ける証拠を示すことが出来た。

文 献

- 1) Dumont F, Marechal PA, Gervais P: Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates, *Appl Environ Microbil*, **70**, 268-272 (2004)
- 2) Mazur P: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology*, **14**, 251-272 (1977)
- 3) 根井外喜男:「凍結・乾燥と細胞障害」,東京大学出版会, 東京, p46 (1972)
- 4) Meryman TM: Freezing Injury and its Prevention in Living Cells, *Ann Rev Biophys Bioeng*, **3**, 341-363 (1974).
- 5) 早川 潔, 佐藤光弘: 共晶生成による致死作用に及ぼす温度の影響, 凍結及び乾燥研究会会誌, **27**, 66-72 (1981)
- 6) Hisatomi, C., Watanabe M., and Suzuki T.: Factors Affecting the Survival of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* on Freezing Process, *Trans. of the JSRAE*, **29**, 327-330 (2012)
- 7) Bond, C.: Cryopreservation of Yeast Cultures, *In "Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Second Edition"*, Day J. G. and Stacey G. N. eds, Humana Press Inc., USA, p109-118 (2007)

