



保護物質が凍結乾燥乳酸菌の生菌数に及ぼす影響

¹ 広島大学大学院生物圏科学研究科

² 東海大学生物学部生物学科

³ 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

⁴ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

川井清司^{1,†}, 三ヶ尻脩人¹, 藤達¹, 羽倉義雄¹, 鈴木大², 萩原知明³, 黄川田隆洋⁴, 鈴木徹³

Effect of Protectants on the Survival Rate of Freeze-dried Lactic Acid Bacteria

Kiyoshi KAWAI¹, Shuto MIKAJIRI¹, Teng DA¹, Yoshio HAGURA¹, Dai SUZUKI², Tomoaki HAGIWARA³,
Takahiro KIKAWADA⁴, Toru SUZUKI³

¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima
739-8528, Japan

²Department of Biology, Tokai University, 1-1-1 Minamisawagojou, Minami-ku, Sapporo, Hokkaido, 005-8601, Japan

³Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, 4-5-7 Konan
Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

⁴National Agriculture and Food Research Organization, Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Owashi, Tsukuba,
Ibaraki 305-8634, Japan

([†]Corresponding author, e-mail: kawai@hiroshima-u.ac.jp)

Effect of lyoprotectants on the survival rate of freeze-dried lactic acid bacteria was investigated. Freeze-drying and preservation of the bacteria with disaccharides (sucrose and trehalose) and bovine serum albumin (BSA) achieved much higher survival rates than that with dextrin. In addition, the disaccharide-BSA mixtures showed synergistic effects on stabilization of freeze-dried cells. This result was similar to the stabilization for freeze-dried enzyme. It was suggested that water replacement effect of lyoprotectants was more important than glass transition effect.

(Received. Jun. 8, 2017; Accepted. Jul. 21, 2017)

緒 言

凍結乾燥乳酸菌は食品分野で広く利用されているが、菌株によっては凍結乾燥並びにその後の保存過程で死滅するため、様々な保護物質の利用が検討されている。

凍結乾燥乳酸菌に対する保護メカニズムは酵素の場合と同様に考えられており、主に水置換効果（保護物質が対象と水素結合を形成し、水の代替として構造を安定化）とガラス転移効果（保護物質がガラ

研究報告

[Key words: Glass transition temperature, Water activity, Sucrose, Bovine serum albumin, Water replacement effect; ガラス転移温度, 水分活性, スクロース, 牛血清アルブミン, 水置換効果]

ス状態のマトリクスを形成し、対象を包埋することで速度論的に安定化)とによって説明されている^{1,2)}。

酵素の凍結乾燥保護には二糖（スクロースおよびトレハロース）が有効なことが明らかにされている³⁾。また、二糖とタンパク質とを混合すると、相乗保護効果が認められるという報告もある^{4,5)}。しかし、こうした知見は酵素を対象とした基礎研究によって集積したものであり、乳酸菌に対する保護効果については十分に理解されていない。

本研究では凍結乾燥後に容易に死滅する乳酸菌を試料とし、様々な保護物質並びにそれらの混合効果について検討した⁶⁾。また、驚異的な凍結耐性を有するヌマエラビル⁷⁾から見出された抗酸化物質の保護効果についても検証した。

材料および方法

1. 試料調製

保護物質としてトレハロース（(株)林原）、スクロース（WAKO（株））、牛血清アルブミン（BSA; シグマ-アルドリッチ）、マルトデキストリン（MD; サンエイ糖化（株））、L-カルノシン（WAKO（株））を、乳酸菌として *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T（(国研)理化学研究所バイオリソースセンター）をそれぞれ用いた。

乳酸菌溶液を1 ml 採り、40 ml のMRS培地を入れた遠沈管に添加し、37 °C で24時間培養した。得られた乳酸菌溶液を3,300×gで10分間遠心分離し、上澄みを捨て、PBS溶液で懸濁した。この操作を3回繰り返した。得られた乳酸菌溶液の吸光度を測定し、PBS溶液を添加して乳酸菌の濃度を 2×10^{10} cells/ml に設定した。各種保護物質を溶解させたPBS溶液はマイクロフィルター（0.2 μm）でろ過（滅菌）した。試料は20 ml のバイアル瓶に0.5 ml の乳酸菌溶液と0.5 ml の保護溶液とを混合して調製した。

2. 凍結乾燥および保存

各試料を-35 °C に設定した凍結乾燥器内で1時間予備凍結した後、70 Pa 以下で21時間、一次乾燥を実施した。その後10 °C/h で5 °C まで昇温し、二次乾燥とした。凍結乾燥直後において、一部の試料は T_g 、水分活性（ a_w ）、生菌数の測定に用いた。その

他の試料は密封し、37 °C で4週間保存した後、生菌数を調べた。

3. 示差走査熱量測定

凍結乾燥試料の T_g は示差走査熱量測定（DSC120, セイコーインスツル（株））によって調べた。試料（約15 mg）をアルミニウム製耐圧パンに封入し、-60~120 °C の温度範囲を3 °C/min で昇温走査した。ガラス状試料（ $T_g > 25$ °C）に関しては、試料調製時の熱履歴をリセットするため、セカンドスキャンによって得られた吸熱シフトのオンセットを T_g として読み取った⁸⁾。

4. 水分活性

凍結乾燥試料の a_w は水分活性測定装置（HP23-AW, ロトロニック）によって調べた。試料（10~50 mg）を専用シャーレにセットし、平衡モードにて25 °C での a_w を測定した。

5. 生菌数

乳酸菌の生菌数は平板培養法によって調べた。段階希釈した乳酸菌懸濁液（0.1 ml）をMRS寒天培地に塗り広げ、37 °C で2日間培養後、コロニー数をカウントした。凍結乾燥前の生菌数（ N_0 ）に対する凍結乾燥直後或いは保存後の生菌数（ N ）の変化を生存率（%）として次式によって表した。

$$\text{生存率 (\%)} = 100 \times \log N / \log N_0$$

結果および考察

各試料の a_w は0.36以下にあり、十分に乾燥した状態にあることを確認した。一方、各試料の T_g は15~69 °C にあり、本研究で採用した保存温度（37 °C）において、スクロースおよびスクロース-BSA試料はラバー状態に、それ以外はガラス状態にあることが分かった（data not shown）。

凍結乾燥前後における乳酸菌の生存率はいずれも90%以上の高い値を示した。一方、各試料の保存後（37 °C, 4週間）の生存率は保護物質の種類によって大きく変化した（Fig.1）。コントロール（保護物質無添加）の生存率は検出限界以下であったが、保護物質を含む試料はいずれも高い生存率を示した。MDの保護効果は最も低かった。凍結乾燥酵素を対象とした研究において、多糖は T_g が高く、ガラス転

移特性に優れているにもかかわらず、保護効果は低いことが知られている⁴⁾。これは、セグメント間(MD分子間)の絡み合いによって酵素との水素結合形成が阻害され、水置換効果に劣るためと理解され、乳酸菌に対しても同様であったと考えられる^{7,8)}。

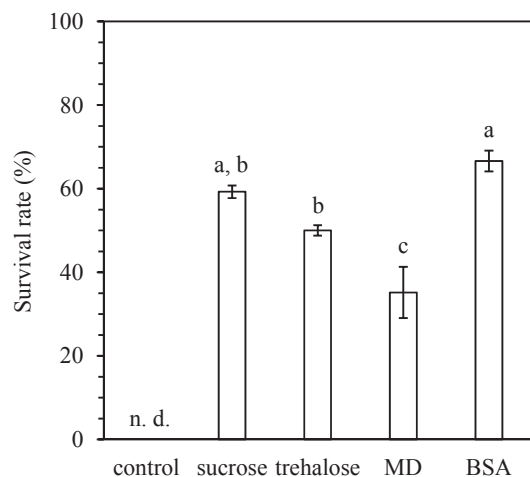


Fig. 1. Survival rate of freeze-dried lactic acid bacteria with a single protectant after storage at 37 °C for 4 weeks. The values are expressed as mean \pm SD (n = 3). Values with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$.

本保存条件では、前述したようにトレハロース試料はガラス状態に、スクロース試料はラバー状態に、それぞれ置かれていた。ガラス転移効果を考慮すると、前者に高い生存率が期待される。しかし、両者の生存率に有意差は無かった。以上の結果より、凍結乾燥乳酸菌の安定化においては、ガラス転移効果よりも水置換効果の方が支配的であると考えられる。但し、ラバー状態での長期保存は結晶化のリスクを伴う。保護物質の結晶化によって水置換効果は消失するため、ガラス状態での保存の方が望ましいといえる。

BSA 試料は、スクロース試料と同様に高い生存率を示した。BSA は球状タンパク質であり、MD のような立体障害による水置換効果の阻害の可能性は低いと考えられる。また、BSA 表面に存在するアミノ酸の側鎖が、水素結合だけでなく、静電的相互作用や疎水的相互作用として乳酸菌の構造維持に働きかける可能性も考えられる。事実、アルブミンは多くの電荷を持ち (pH 7 のとき、1 分子あたり 185 イオン)、脂肪酸を包埋するための疎水領域も有している⁹⁾。更にアルブミンは抗酸化作用を持つことも知ら

れており¹⁰⁾、保存過程における酸化ストレスの低減効果も期待される。

二糖 (スクロースおよびトレハロース) と高分子 (MD および BSA) との混合添加が凍結乾燥乳酸菌の保存後の生存率に及ぼす影響を Fig.2 に示す。二糖・MD 混合系は二糖を単独で用いた場合の効果と大差は無かった。一方、二糖・BSA 混合系は、それぞれを単独添加した場合より高い生存率を示した。このことは、二糖と BSA との混合により、相乗保護効果が生まれることを意味する。先述の通り、BSA には静電的相互作用、疎水的相互作用、抗酸化作用など、二糖には無い安定化効果が期待される。しかし BSA は二糖と比べると巨大分子であるため、水置換効果については不十分であり、BSA がカバーできなかった乳酸菌界面の水和サイトを二糖が埋めることで、保護効果が向上したと考えられる。

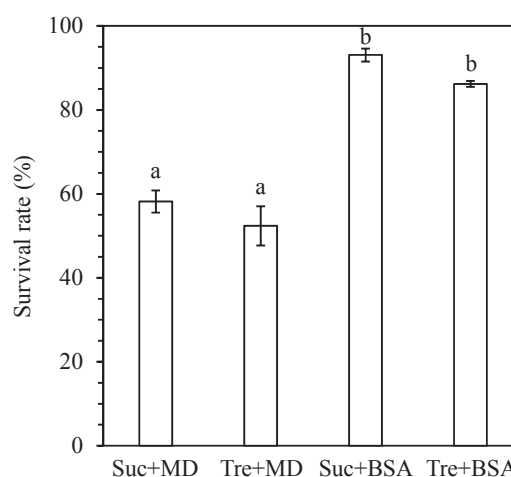


Fig. 2. Survival rate of freeze-dried lactic acid bacteria with combinations of protectants after storage at 37 °C for 4 weeks. The values are expressed as mean \pm SD (n = 3). Values with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$.

近年、我々の研究グループでは驚異的な凍結耐性を有するヌマエラビルが凍結融解後に抗酸化物質であるカルノシンを体内に蓄積させることを明らかにした (data not shown)。その効果について多角的に検証するため、本研究では乳酸菌に対するカルノシンの保護効果についても検証した。その結果、カルノシンは単独で用いた場合でも、スクロース・BSA 混合系と同等の高い保護効果を示した (data not shown)。カルノシンの保護効果については今後さらに詳細な検証を進める予定である。

ま と め

凍結乾燥乳酸菌の安定化にはガラス転移効果より水置換効果の方が支配的であることが示唆された。一般に、水置換効果は乾燥物の構造的な安定化に寄与すると考えられているが、乳酸菌に対しては酸素を遮蔽する（酸化を抑制する）ことによる安定化効果も期待される。抗酸化物質の効果については今後詳細に検討する予定である。

謝 辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金事業・基盤研究 B（課題番号 15H04577）の助成によって実施された。トレハロースは株式会社林原より、デキストリンはサンエイ糖化株式会社よりそれぞれ提供されたものであり、感謝の意を表す。

文 献

- 1) De Giulio B, Orlando P, Barba G, Coppola R, De Rosa M, Sada A, De Prisco PP, Nazzaro F: Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying, *World J Microbiol Biotechnol*, **21**, 739-746 (2005)
- 2) Oldenhof H, Wolkers WF, Fonseca F, Passot S, Marin M: Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ fourier transform infrared spectroscopy study, *Biotechnol Prog*, **21**, 885-892 (2005)
- 3) 川井清司, 鈴木 徹, 萩原知明, 高井陸雄: 二糖類によってガラス包埋した凍結乾燥タンパク質の貯蔵時における安定性, *低温生物工学会誌*, **49**, 139-143 (2003)
- 4) Srirangsan P, Kawai K, Hamada-Sato N, Watanabe M, Suzuki T: Improvement in the remaining activity of freeze-dried xanthine oxidase with the addition of a disaccharide-polymer mixture, *Food Chem*, **119**, 209-213 (2010)
- 5) Srirangsan P, Kawai K, Hamada-Sato N, Watanabe M, Suzuki T: Stabilizing effects of sucrose-polymer formulations on the activity of freeze-dried enzyme mixture of alkaline phosphatase, nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase, *Food Chem*, **125**, 1188-1193 (2011)
- 6) Teng D, Kawai K, Mikajiri S, Hagura, Y: Stabilization of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T with the addition of disaccharide, polymer, and their mixture. *Biosci Biotechnol, Biochem*, **81**, 768-773, (2017)
- 7) Suzuki D, Miyamoto T, Kikawada T, Watanabe M, Suzuki T: A leech capable of surviving exposure to extremely low temperatures, *Plos One*, **9**(1), 1-5 (2014)
- 8) Kawai K, Hagiwara T, Takai R, Suzuki T: Comparative investigation by two type analytical approaches on enthalpy relaxation for glassy glucose, sucrose, maltose and trehalose, *Pharm Res*, **22**, 490-495 (2005)
- 9) Crowe H, Leslie SB, Crowe LM: Is vitrification to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology*, **31**, 355-366 (1994)
- 10) Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF: Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins, *Advan Drug Delivery Rev*, **46**, 307-326 (2001)
- 11) Peters T: Serum albumin, *Advan Protein Chem*, **37**, 161-245 (1985)
- 12) Faure P, Troncy L, Lecomte M, Wiernsperger N, Lagarde M, Ruggiero D, Halimi S: Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal, *Diabetes Metabol*, **31**, 169-177 (2005)