

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 凍結乾燥 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T の常温安定化に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

学生番号 D140124

氏 名 藤 達

乳酸菌を常温で保存可能にするための方法として、凍結乾燥が利用されている。しかし、一部の菌株にとっては凍結乾燥並びにその後の保存過程で生じる様々なストレスが致命傷となり、生菌数が低下する。このストレスから材料を保護する目的で様々な保護物質の利用が検討されている。糖質の酵素に対する凍結乾燥保護については幅広く検討されており、そのメカニズムは水置換効果（乾燥状態において非晶質の糖質が酵素と水素結合を形成することで、水の代替として振る舞い、酵素の構造を安定化する）とガラス転移効果（糖質が分子運動性の低いガラス状態となり、その中に酵素を包埋することで速度論的に安定化する）とによって説明されている。凍結乾燥乳酸菌の安定化メカニズムについても酵素と同様に理解されているが、その詳細は十分に解明されていない。例えば、酵素を対象とした研究では、少糖と高分子との混合によって相乗的な保護効果が発揮される場合があるとの報告がある。これは、酵素に対する作用が少糖と高分子とでは異なるためであり、混合によってお互いの効果を補完するためと考えられている。一方、乳酸菌を対象とした研究では様々な少糖や高分子の効果が検討されているが、それらを単独で添加したときの効果を調べたものが殆どであり、混合添加に関する報告は殆ど無かった。本研究では、凍結乾燥並びにその後の保存によって生菌数が大幅に低下する乳酸菌（*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T）を乳酸菌試料として用い、各種保護物質の単独並びに混合添加による凍結乾燥保護効果について検討した。

1章では上記の研究背景および目的を述べると共に、乳酸菌の乾燥保護に関する既往の研究報告を整理した。

2章では本研究に用いた乳酸菌、保護物質（スクロース、トレハロース、マルトデキストリン；MD、ウシ血清アルブミン；BSA）、各種実験操作について説明した。

3章では各種保護物質の単独並びに混合添加が凍結乾燥乳酸菌の生存率に及ぼす影響を調べた。各凍結乾燥試料の水分活性(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。また、ガラス転移効果が凍結乾燥乳酸菌の安定性に及ぼす影響を検証するため、各試料のガラス転移温度(T_g)を示差走査熱量計によって調べた。無添加試料（コントロール）の凍結乾燥直後の生存率（17%）は比較的高かったが、その後の保存過程（37℃、4週間）において検出限界以下にまで減少した。本研究で用いた保護剤（スクロース、トレハロース、MD、BSA）はいずれも保存後の生存率を高めたが、特に二糖（スクロースおよびトレハロース）およびBSAの保護効果が高かった。更に二糖とBSAとを混合して使用した場合、相乗的な保護効果が認められた。スクロース-BSA混合物は保存過程においてラバー状態（ $T_g < 37^\circ\text{C}$ ）であったにもかかわらず、最も高い乳酸菌の生存率（22%）を示したことから、本乳酸菌の凍結乾燥保護に対しては、ガラス転移効果よりも水置換効果の方が支配的であることが示唆された。

4章では本研究で検討した保護物質の中で最も高い生存率を示したスクロース-BSA試料を対象とし、保存条件（温度、酸素の有無、および a_w ）が乳酸菌の生存率に及ぼす影響を調べた。スクロース-BSA試料（ $a_w = 0.25$ ）を様々な温度で保存し、1次反応速度として得られた死滅速度をアレニウスの式によって解析した。その結果、25℃で保存したコントロールの死滅速度は60℃で保存したスクロース-BSA試料とおおよそ一致することが分かった。得られた活性化エネルギーの値から想定される乳酸菌の死因は酸化であり、スクロース-BSA混合物による水置換効果が乳酸菌に酸化防止効果も与えることが示唆された。また、凍結乾燥乳酸菌を窒素置換して保存すると生存率が上昇することを確認した。一方、スクロース-BSA試料を様々な a_w で保存（25℃、4週間）した結果、 $a_w < 0.52$ では a_w の増加によって生存率は僅かに低下する程度であったが、 $a_w = 0.75$ では生存率は検出限界以下にまで低下した。これは、 a_w の増加によって乳酸菌の細胞内部の分子運動性が回復した結果、乾燥によって停止していた代謝（各種化学反応）が復活し、栄養不足に陥ったために死滅が加速したと考えられる。即ち、凍結乾燥乳酸菌は外層と内層とから構成された二層非晶質固体として捉えるべきであり、外層は主に水置換効果によって、内層は主にガラス転移効果によって、それぞれ安定化されることが示唆された。

以上の研究成果より、乳酸菌（*L. paracasei* JCM 8130^T）を安定化するための条件を明らかにした上で、そのメカニズムを解明するための重要な示唆を得ることができた。今後、他の乳酸菌や乾燥方法（噴霧乾燥および熱風乾燥）への適用についても検討する価値がある。本研究成果により、不安定な乳酸菌を常温で保存することが可能となり、今後益々盛んになると考えられるプロバイオティクス開発を支える保存技術が構築されることを期待する。