

生物的材料の保存

高野光男*

1. はじめに

発酵工業では生命をもった微生物が中心的な工業材料であり、時間と場所をとわずその機能を発揮できるように必要量が倉庫に保存されていなくてはならない。しかし‘生きている’ということは外界と非平衡状態にあってそれ自身変化するということであり、変わらないように保存することは不可能な課題である。また微生物は最少限生き残りが1匹いれば簡単に1億匹以上のコピーを作ることができる。したがって発酵屋の多くは保存というと標本保存ぐらいの意味しか考えなかった。事実、研究者や技術者にとって創造こそが常に血をわかせるテーマであり、変わらないことを目標とする保存の仕事は魅力にとほしいものであろう。一方、医療の面では古くから痘苗、ワクチン、血液などが機能をもった形で保存され、供給されなくてはならなかった。そこで、これら保存技術の基礎のための‘低温生物学 (cryobiology)’なる領域が確立されて来た。最近発酵工業においても、

- 1) 遺伝育種技術により、遺伝的に不安定な特殊機能をもった株がよく使われるようになったこと、
- 2) 厳密なプロセス管理を行なうために、安定な種 (たね、シード) の供給が要求されるようになったこと、
- 3) バルクスターター、固定化菌体、パン生地のように増殖プロセスを含まず、保存した細胞の機能をそのまま使用する場合が多いこと、

などの理由からあらためて、生産プロセスにつながるような保存技術が確立される必要があると思われる。

2. 微生物の脱水と耐久化

生物を耐久化させる共通の手段は細胞中枢部分の脱水にあることは、種子や胞子のような休眠生命体の観察、凍結あるいは乾燥生物の経験

から容易に理解できる。水は生物の構成成分比のうち最大のものであり、すべての反応の場となっている。したがって、そのような水の除去は確かに耐久化に有効であろう。しかし、一方で水は生体構成高分子の構造に密接に関わり合っている。このような水が除かれると、しばしば高分子などの不可逆な変化につながってくる。したがって、生体をいためずに保存するためには、溶媒として働きる水を除き、構造に関わる水をできるだけ残すことがのぞましい。

生体内の水の働きは、水の化学ポテンシャル (μ_w) または水分活性 (a_w) で示される。未凍結試料の場合、 a_w は温度依存性が少なく、試料のモル分率あるいは含水量の函数となる。また、試料と気相と水分平衡をとらせることにより伝意の a_w の試料を作ったり、試料の a_w を求めたりすることが可能である。水を含む凍結試料の場合、 a_w は試料の含水度に関係なく温度のみの函数となる。

3. 限界水分活性と乾燥障害

生細胞の水の存在状態については NMR をはじめ多くの方法で測定されているが、著者らは -50°C 以下までの冷却で凍結しうる水と凍結しえない水に区分する方法を用いた。凍結現象は水その他の物質移動を伴う現象なので、ある伝意の温度での水の状態を知る点では難があるが、実用的な保存法として、乾燥および凍結を取扱う上で便利である。

酵母を 25°C で種々の関係湿度下で平衡させて a_w の異なるいくつかの試料を作り、それらを走査型熱量計で -100°C 以下まで冷却しその後の昇温サーモグラムの融解熱から凍結水を求めた。別にそれぞれの試料の含水量を求め、 A_w および含水量と凍結水量との関係を図1に示した。それぞれの関係を示す線の横軸への切辺は、限界水分活性および不凍水量を示している。種

*高野光男 (Mitsuo TAKANO), 大阪大学, 工学部, 醗酵工学科, 助教授, 殺菌食糧貯蔵工学

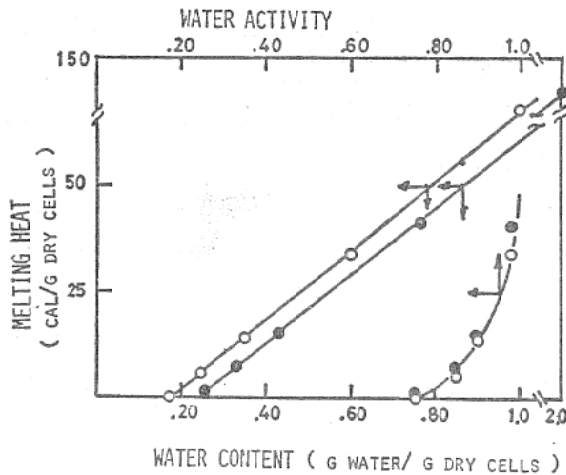


図1 酵母細胞の水分レベルと凍結水量。生酵母を所定の a_w まで部分乾燥（黒丸）するか乾燥酵母を所定の a_w まで加湿（白丸）して DSC にて -100°C まで凍結し、昇温サーモグラムから凍結水の融解熱を求めた。

々の生物的材料で不凍水量を求めると10~30%（水分量/乾燥重量，%）の間で変化した。図1で示すように、同様な試料でも生酵母を部分乾燥したものと、凍結乾燥酵母を湿潤化したものでは異なった不凍水量を示した。一般に生理的に活性な細胞は不凍水量が大で、耐久型細胞などでは少であることが知られている。ところがこれを a_w のスケールでみた場合の限界水分活性は如何なる場合でも a_w 0.75付近であった²⁾。不凍水は結合水、構造水の他に、強度に付着した水、微少な区域にとじ込められた水などが含まれるであろう。根井らは凍結乾燥で不凍水分が失われる過程で大腸菌や酵母の生残菌数が著しく低下することを示した。著者らもこの乾燥過程で脱水と死滅が速度論的に併行することを認めた²⁾。不凍水が失われることによっておこる細胞障害の部位はいろいろ考えられるが、著者らは DNA に注目した。その理由の1つは、Falk らが DNA フィルムを作って、それを乾燥しながら光学的に構造変化をしらべると、 a_w 0.75付近で DNA の立体構造に貢献している重要な水分子が失われ、可逆的なコンフォメーションの変化をおこすことを見出していたこと、第2に、乾燥によって変異がおこるとい報告が、Webb、桧枝らによって示されていたからである。大腸菌を疎水性フィルターの上に単層以下となるようにのせ、種々の

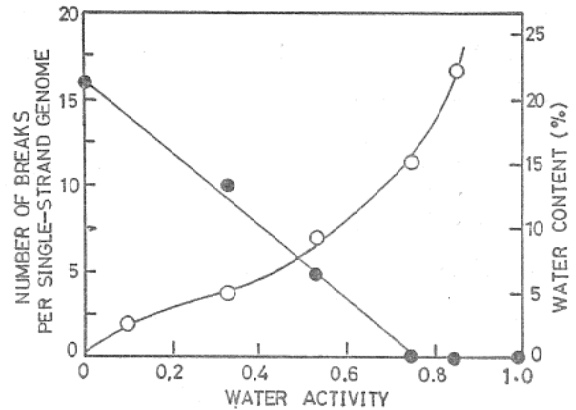


図2 大腸菌の乾燥における a_w と DNA—本鎖切断数との関係（黒丸）。白丸はこの菌の等温吸着曲線を示す。

RH 下で減圧下におくと数分で所定の a_w の菌をうるることができる。この菌より DNA をアルカリ性蔗糖密度勾配の上で抽出し、分子量分布を沈降像よりしらべ、1本鎖 DNA におこったとみられる切断数を計算した。図2に示すように、 a_w 1.00からの乾燥過程で a_w 0.75までは全く DNA の切断はおこらず、 a_w 0.75以下への乾燥、すなわち不凍水の脱水が DNA 鎖の切断をもたらすことが明らかとなった。変異は損傷 DNA の修復ミスによっておこることが知られている。したがって変異の誘発も a_w 0.75までの乾燥ではおこらず、 a_w 0.75以下への乾燥でみられる筈であり、その事実も確かめられた³⁾。

以上のように、細胞への損傷を少くしかつ溶媒として働く水をとるためには、乾燥を a_w 0.75に止めればよい。しかし、そのような部分的な乾燥では長期間保存できるような試料は得られない。これは相当量の試料がある場合、水分の均一化がきわめて困難であること、不凍水⇌凍結水の交換があるためなどによるのであろう。通常の凍結乾燥では a_w 0.05以下とするのが普通である。このような低い a_w で微生物を生存させるためには、グルタミン酸ソーダ、血清、脱脂乳などの保護物質の使用が不可欠である。有効な保護物質は細胞表層成分の水素結合とうまく交互作用するための構造が要求される。これらの物質は水の離脱を防止しているのではなく、水の代りに構成高分子の高次構造を安定化させているらしい。しかし、乾燥による

変異の誘発は通常の保護物質では防止できず、ある種のラジカル抑制剤が有効であることが最近わかってきた。

4. 凍結細胞

一般に氷晶生成のない過冷却は全く生細胞に損傷をあたえない。すなわち、冷却による細胞損傷は氷晶生成に起因する。

実用的な冷却速度（毎分10°C以下）では氷核は常に細胞外に生成し、氷晶成長に伴って溶質を濃縮し、これが細胞に浸透圧をあたえて脱水する。緩速凍結による損傷はこの溶質効果が主で、これを防止するため凍結保護剤としてグリセリン、ジメチルスルフォキシド、などが用いられる。これらは(1)束一性による有害塩のモル分率の低下効果、(2)氷晶生成の防止効果、(3)ラジカル抑制効果、などにより細胞を保護しているとみられる。溶質効果は冷却速度をあげるに従い、低減させることができる。しかし比表面積の少ない細胞、水の透過性の悪い細胞では、わずかに冷却速度を増大させるだけで致死的な細胞内凍結をおこす。これを防止するためには-10°C~-20°C近傍で一定温度を保持して細胞内の脱水をうながし、その上で-80°Cまで冷却する2段階法が利用されている。

前述のように氷晶が存在する場合の a_w は温

度のみ依存する。氷点曲線から a_w 0.75はほぼ-30°Cの凍結試料に相当する。-30°C以下の冷却によって計算上の a_w は低下するが、細胞内は不凍水のみで凍結による脱水はおこらない。この点で凍結は乾燥に比べて生物的材料に損傷をあたえることが少ない保存法と言える。たとえば、DNAの損傷、変異の誘発は凍結保護剤存在の凍結によっては全くおこらない。しかし塩類の濃縮を伴う凍結ではDNA損傷⁴⁾、変異誘発⁵⁾がおこる。この原因の1つとして共晶凍結が考えられる。共晶は一部の不凍水をうばい細胞にしばしば致死的事であることが知られている。

文 献

- 1) Asada, S., Takano, M., Shibasaki, I. : Appl Environ Microbiol., 37, 266 (1979).
- 2) Takano, M., Terui, G. : Freezing and Drying of Microorganism (Nei, T.), 131, Univ. of Tokyo press, Tokyo (1969).
- 3) Asada, S., Takano, M., Shibasaki, I. : Appl, Environ. Microbiol., 40, 274 (1980).
- 4) Takano, M., Snskey, A. J. : Freege-Drying of Biological Maferials (Nei, T.), 61, IIR, C-I, Paris (1974).
- 5) Calcott, P. H., Gargett, A. M. : FEMS Microbiol. Letters, 10, 151 (1981).

