

# パルスジェット方式による乳酸菌乾燥の試み

因野 要一・西村 和彦・平康 博章・窪谷 篤芳\*

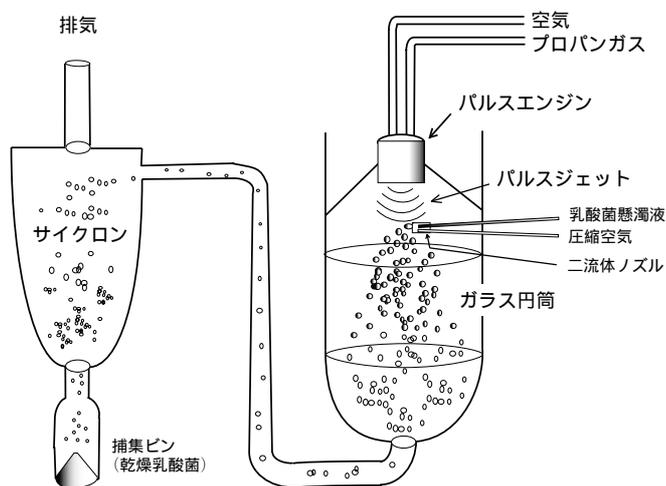
## はじめに

近年、吸収性や反応性など既存の物質に新しい機能性を付与する技術としてナノテクノロジーが注目され、微粒子を作製する粉体化技術が急速な進歩をとげている<sup>4)</sup>。この乾燥、粉体化技術のひとつとしてパルスジェット方式が開発され<sup>3)</sup>、乳酸菌の乾燥<sup>1)</sup>や薬品の溶解性改善<sup>7)</sup>、サブミクロンサイズの無機触媒の作製<sup>8)</sup>に応用されようとしている。この方法はプロパンガスを燃料としたパルスエンジンによりパルスジェット（超音波100Hz~1kHzと熱風）を発生させ、溶液やスラリーおよびエマルジョンを効率的に乾燥させるものである。この乾燥法は60-70 で瞬時的（1/100s）に乾燥を行うために、必要熱エネルギーも少ないことから、熱による蛋白質変性が起こりにくいと考えられ、乳酸菌を生菌のまま低コストで連続的に乾燥できることが期待される。また、乾燥時に運動エネルギーが負荷されるため、微粒子ができやすいとも言われている。乳酸菌の乾燥粉体化技術としては、乳酸菌の活性が乾燥中の熱や空気中の酸素により失われることが多いため、真空凍結乾燥法が主流であった。しかし、真空凍結乾燥法は、電気代などの生産コストがかかり、連続処理が困難なことから、大量処理には不向きであるとされてきた。そこで、今回、新しく開発されたパルスジェット方式により、乳酸菌の乾燥微粒子化の連続処理について検討した。

## 材料および方法

### 1) 実験装置

本研究に用いたハイパルコンミラボテスト機（パルテック株式会社）（処理量0.5kg/時、熱量500kcal/時）の概略図を第1図に示した。この装置はプロパンガスを燃料とするエンジン（1,300Hz）と二流体ノズル（溶液噴霧器：500ml/時）、ガラス円筒（内径50cm）、粒子捕集サイクロンなどからなっており、パルスジェットの吹き出し口直下に、二流体ノズルから原料溶液（乳酸菌懸濁液）が噴霧される。この二流体ノズル内部ではそれぞれ別の配管



第1図 パルスジェット

から来た乳酸菌懸濁液と圧縮空気が混ざり、微細な霧を吹き出せる構造となっている。噴霧された霧は瞬時的（1/100s）に乾燥され、サイクロン中で捕集されて、捕集ビンにたまる。

### 2) 乳酸菌の培養と生菌数の測定

*Lactobacillus plantarum* 1コロニーを白金耳で50mlの乳酸菌用MRS Broth培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に植菌し、25 で48時間静置培養したものを第1シードとし、次いで、別途調製したMRS Broth培地450mlに植菌し、メイン培養として、25 , 48時間静置培養した。培養後の生菌数は培養液を10の7乗から8乗に希釈後、希釈液50 μlをBCP（BCP加プレートカウントアガール、ニッスイ株式会社）寒天培地、MRS寒天培地に塗布した後25 , 48時間培養する事により測定し、CFU（Colony Formation Unit:発生コロニー数）で示した。

### 3) 乳酸菌生菌体の乾燥

乳酸菌培養液450mlを5 で遠心分離（8,000rpm：12,000g、20分間）し、菌体（6.2~7.3g）を沈殿させて回収した。この菌体に5%（W/V）スキムミルク（雪印乳業株式会社）、5%（W/V）各種糖類を懸濁、溶解させた水

\*パルテック（株）（PULTECH Corporation）

Yoichi INNO・Kazuhiko NISHIMURA・Hiroyuki HIRAYASU・Atsuyoshi KUBOTANI\*

Production of Living Lactic Acid Bacterium in Powder by the Pulse Shock Wave Dryer System

溶液500mlを加え、菌体を均一に懸濁、分散させた。この菌体懸濁液をハイパルコンミナラボテスト機を用いて、乾燥室温度70℃、処理量500ml/時の条件で運転し、乾燥乳酸菌粉末を得た。乾燥後の生菌数も2)の培養液の方法と同様に測定した。

#### 4) 乾燥粉末の分析調査

乳酸菌の生存率の計算は乾燥後の乳酸菌粉末1g中の生菌数を乾燥前の懸濁液1ml中の菌数で割り、乾燥前の固形物(100 - 水分%)を乾燥後の固形物で割った係数をかけることによって求めた。すなわち、生存率(%) = 乾燥後菌数 / 乾燥前菌数 × (100 - 乾燥前水分%) / (100 - 乾燥後水分%) × 100の式で求めた。

パルスジェットにより作製した乾燥粉末の安全性を調査するために、燃料の精製が不十分であると発生する窒素酸化物、硫酸酸化物および燃焼が不完全な場合に発生すると考えられるベンゾ[a]ピレン含量を測定した。試料は10%トレハロース水溶液を乾燥温度70℃で乾燥した粉末を用い、硝酸イオン(NO<sub>3</sub>)、亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub>)、亜硫酸イオン(SO<sub>3</sub>)含量はイオン試験紙法(Merck, リフレクトクワント)<sup>6)</sup>で、ベンゾ[a]ピレン含量は衛生試験法注解2005の方法(HPLC, 蛍光検出)<sup>5)</sup>で行った。

### ・結果および考察

#### 1) 乳酸菌の乾燥および生存率

当初、トレハロース10%の等張溶液(330mOsm)に懸濁したものを乾燥したが、乳酸菌の生存率は1%以下であった。

そこで、スキムミルクを5%加えることにより<sup>1)</sup>、乳酸菌の生存率が飛躍的に向上した。5%スキムミルク、5%トレハロース懸濁液で乾燥した結果を第1表に示した。25℃、48時間静置培養した後の菌数は、4~5×10<sup>9</sup> CFU、乾燥後の乳酸菌数は1~2×10<sup>10</sup> CFUとなり、MRS

第1表 乾燥乳酸菌の生存率(5%スキムミルク、5%トレハロース懸濁液)

	乾燥前 (菌体懸濁液1ml) 原液cfu/ml	乾燥後 (粉末1g) cfu/g	生存率* (%)
水分(%)	90	10	
MRS培地	4.2×10 <sup>9</sup>	1.7×10 <sup>10</sup>	45.0
BCP培地	5.4×10 <sup>9</sup>	1.2×10 <sup>10</sup>	24.7

生存率\* = 乾燥後菌数 / 乾燥前菌数 × (100 - 乾燥後水分%) / (100 - 乾燥前水分%) × 100

寒天培地、BCP寒天培地で数値は異なるものの、それぞれ45.0%、24.7%の生存率を得た。この生存率は、文屋ら<sup>1)</sup>の生存率58.2%より劣るが、文屋らは、乾燥室温度60℃の低温で、処理量2L/時で乾燥処理を行ったが、当所の500ml/時の実験装置では、乾燥室温度60℃では、乾燥粉末の水分が20%以上で、飴状となり、十分な乾燥粉末が得られなかった。パルスジェット(超音波100Hz~1kHzと熱風)を発生させ、溶液やスラリーおよびエマルジョンを瞬間的(1/100s)に乾燥させるために、熱によるタンパク質変性が起こりにくいと考えられ、乳酸菌を生菌のまま連続的に乾燥できることが期待されたが、乾燥雰囲気温度は60℃以下で一気に乾燥しなければ高い生存性が得られないことが明らかになった。BCP寒天培地とMRS寒天培地で生存率が異なるのは、デキストロース濃度がMRS寒天培地の1%に対してBCP寒天培地では0.1%と低いため、25℃、48時間ではコロニーの生育が不十分で肉眼で確認できるまで生育せず、コロニー計測から漏れているおそれがある。また、菌数計測シャーレのコロニーの大きさが乾燥後では乾燥前のものより小さく、乾燥処理により、何らかのショックを受けていることも考えられた。

続いて各種糖類およびスキムミルク懸濁液を用いてパルスジェット乾燥を行った後の生存率を第2表に示した。BCP寒天培地で24.4~38.7%、MRS寒天培地で23.3~48.1%とトレハロースでやや低く、グルコース、スクロースで高かったが、グルコースを用いた場合、乾燥粉末は粘着性があるため、利用性に難があった。真空凍結乾燥法の乳酸菌の生存率は、文屋ら<sup>1)</sup>は18.8%、加香ら<sup>2)</sup>は70%前後と文献により、ばらつきがあり、仮に70%程度としても、必要電気量が多く、乾燥コストが高くなる難点がある。このパルスジェット方式は乾燥に必要なエネルギーコストで、真空凍結乾燥法の10分の1以下と試算され、生存率がその半分としても、生存乳酸菌量の回収コストは2~3割に低減されることが期待できる。

#### 2) 乳酸菌の乾燥粉末性状

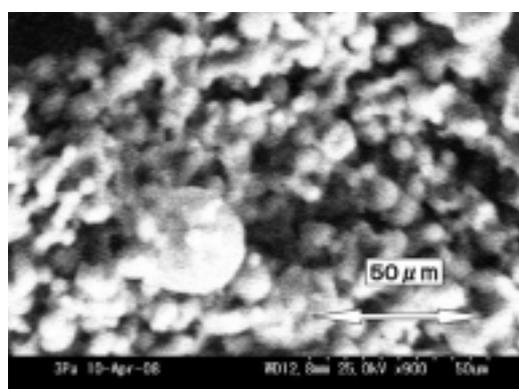
第2図に乳酸菌の乾燥粉末の写真を示した。乾燥物は

第2表 各種糖類添加による乳酸菌の生存率

各種糖類	生存率(%)	
	(BCP培地)	(MRS培地)
トレハロース	24.4	31.1
スクロース	28.0	48.1
ラクトース	30.2	23.3
グルコース	38.7	46.9



第2図 乳酸菌の乾燥粉末写真



第3図 乳酸菌乾燥粉末の電子顕微鏡写真

非常に微粒子でなめらかであり、水分は5~17%であった。続いて第3図に乳酸菌の電子顕微鏡写真を示した。丸い粒径(5~20 $\mu\text{m}$ )の粒子が確認されたが、乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)は直径0.6 $\times$ 長さ2~8 $\mu\text{m}$ のグラム陽性桿菌であるので、この微粒子が懸濁液中に存在した乳酸菌であるとは考えにくい。しかし、乾燥粉末は水分10%前後であるので、萎縮、あるいは重なり合っていることも考えられ、乾燥した乳酸菌がどのような形態を取っているかは今後、詳細な検討が必要である。

### 3) 有害物の分析

二糖類であるトレハロース乾燥粉末より、水抽出を行ったものについて、硝酸イオン、亜硝酸イオン、亜硫酸イオンを測定した結果、いずれも検出限界以下(硝酸イオン<20mg/kg, 亜硝酸イオン<2mg/kg, 亜硫酸イオン<40mg/kg)であった。ベンゾ[a]ピレンもトレハロース乾燥粉末からは検出されず(<2 $\mu\text{g/kg}$ )、不完全燃焼は起こっていないと考えられた。以上のことより、パルスジェットにより作製されたトレハロース乾燥粉末は有害物質を含んでいないものと考えられた。

今回、パルスジェットを用いて機能性を保持した有機性微粒子の作製を目指して、乳酸菌の生きたままの乾燥

について検討した結果、約30%の生存率で、70%以上と言われる真空凍結乾燥法より低いものの、安価、連続的、短時間で乳酸菌の微粒子乾燥粉末を得ることができた。粒径については5~20 $\mu\text{m}$ で、乳酸菌1菌体の粒子は作製できなかったが、微粒子が作製できた。安全性についても、燃焼による窒素酸化物、硫黄酸化物および不完全燃焼物の発生は認められなかった。

本研究は、(独)科学技術振興機構革新技術開発研究事業の一部をパルテック株式会社から受託し、同社製装置(ハイパルコン)を用いて行ったものである。

### ・ 摘要

パルスジェットにより、5%スキムミルクおよび5%各種糖類に懸濁した乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)を70%で乾燥した結果、安価、連続的に約30%生存率の微粒子乾燥粉末(水分4~17%)を得た。粒径は5~20 $\mu\text{m}$ であった。乾燥粉末中の硝酸イオン、亜硝酸イオン、亜硫酸イオン、ベンゾ[a]ピレンはいずれも検出限界以下(硝酸イオン<20mg/kg, 亜硝酸イオン<2mg/kg, 亜硫酸イオン<40mg/kg, <2 $\mu\text{g/kg}$ )であった。

### ・ 引用文献

- 1) 文屋秀雄・西村和彦：特許 特開 2006-197829 微生物菌体の乾燥方法
- 2) 加香芳孝・青木孝良・柳田宏一・小野田實・花田博之(1985)凍結乾燥乳酸菌の実用性に関する研究。鹿大農場研報。10:29-38。
- 3) 小南清和・窪谷篤芳・米原 稔・貴嶋俊二・小野功一：特許 特開 平7-110110 パルス燃焼器
- 4) 窪谷篤芳・清藤勝弘(2008)パルスジェットによる難溶解性薬物の溶解性改善および微粒子合成の応用。化学装置。No.4:77-82。
- 5) 日本薬学会編(2006)衛生試験法・注解2005。p509-510, 金原出版, 東京。
- 6) Reflectquant, Nitrate(116971), Nitrite(116973), Sulfite(116987), Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany。
- 7) 安井真一郎・米澤頼信・砂田久一(2008)。パルス衝撃波による乾燥システムを用いたプランルカスト水和物の溶解性改善, 薬剤学, 68(1):59-66。
- 8) Widiyastuti W., Wang Wei-Ning, Purwanto Agus, Wuled Lenggoro I., and Okuyama Kikuo (2007)。A Pulse Combustion-Spray Pyrolysis Process for the Preparation of Nano- and Submicrometer Sized Oxide Particles, J. Am. Ceram. Soc., 90(12):3779-3785。