

〔醸酵工学 第58巻 第6号 415-421. 1980〕

## 食塩水の共晶生成と酵母の凍結障害\*

早川 潔・佐藤 光弘

京都府立中小企業総合指導所

Effect of formation of eutectic mixture on freeze-thaw damage of yeast. HAYAKAWA, K. and M. SATO (Kyoto Prefectural Comprehensive Guidance Center for Small and Medium Enterprises, 31 Yahatacho, Nishinanajo, Shimogyo-ku, Kyoto 600) Hakkokogaku 58 : 415-421. 1980.

The effect of formation of a eutectic mixture of NaCl and H<sub>2</sub>O on the freeze-thaw damage of *Saccharomyces cerevisiae* suspended in NaCl was studied. The survival rate of the yeast decreased markedly, when the suspension was frozen to the temperature of the formation of the eutectic mixture. Freezing to temperatures above the eutectic point hardly affected the survival rate of the yeast in NaCl at concentrations of 0.1 to 4 M. The maximal death occurred just before the completion of formation of the eutectic mixture. KCl, disodium succinate and L-alanine showed the same effect as NaCl on the freeze-thaw damage of the yeast. On the other hand, formation of eutectic mixture did not damage the halotolerant yeast *Saccharomyces rouxii*.

微生物の凍結融解に伴う死滅に関しては Mazur,<sup>1)</sup> 森地,<sup>2)</sup> 石田,<sup>3)</sup> 僧都,<sup>4)</sup> Meryman<sup>5)</sup> の総説があり、蒸留水中での死滅は、菌体内氷結とその成長による細胞組織の破壊、菌体外氷結による菌体からの溶出物質の濃縮、脱水に伴うストレスなどが要因となって引き起こされることが知られている。細胞懸濁液中に種々の化合物が含まれている場合には、化合物の種類により凍結障害に対する保護作用あるいは促進作用がそれぞれ考えられ、死滅原因はより複雑となる。

食塩による微生物の凍結障害については、障害を促進させるとするもの<sup>6,7)</sup> 酵母については障害に対し保護的に働くとするもの<sup>1,8)</sup> など凍結条件にもよるが評価は一定でない。共晶生成と細胞障害については、動物細胞ではウニの卵が共晶点で細胞障害を起こすとの報告<sup>9)</sup> が見られるが、微生物に関しては、無関係であるとする Mazur の報告<sup>1,8)</sup> 以外には全く見られない。

本報においては、食塩水等での酵母の凍結障害について、食塩と水とが混合状態で晶出する、いわゆる共晶の生成を中心として検討したので報告する。

## 実験方法

供試菌株および菌体懸濁液の調製 *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4274 (東京大学応用微生物研究所より分譲) の培養は麦芽汁培地 10 ml に前培養液を 10  $\mu$ l (約  $3 \times 10^5$  cells) 接種し、30°C で 24 時間培養した定常期の菌体を用いた。*Saccharomyces rouxii* IAM 4962 (同研究所より分譲) は 5% 食塩添加同培地 10 ml に前培養液を 10  $\mu$ l (約  $6 \times 10^4$  cells) 接種し、30°C で 96 時間培養した定常期の菌体を用いた。

培養後 5,000 rpm, 5 分間遠心分離して得た菌体を滅菌水で 3 回洗浄後、目的とする化合物の溶液に *S. cerevisiae* は約  $3 \times 10^8$  cells/ml, *S. rouxii* は約  $6 \times 10^6$  cells/ml となるように懸濁し、その 2 または 7 ml を 15×100 mm のプラスチック試験管に入れ、被凍結試料とした。なお本実験は特に断らない限り *S. cerevisiae* を用いて行った。

凍結・融解方法および温度曲線の測定 凍結は、温度を調節した冷凍庫に試験管のまま、または試験管を後述の凍結融解装置にセットした状態で入れ、任意の凍結速度を設定できるようにした。試料の温度は 1 mm $\phi$  の白金測温体を試料中心部に挿入して測定し、

\* 酵母の凍結障害に関する研究 (第 1 報)

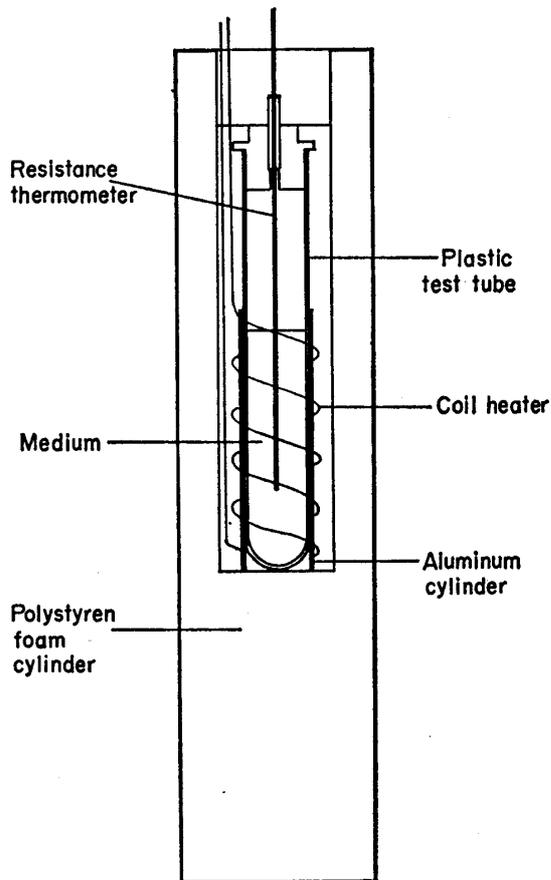


Fig. 1. Apparatus for cooling and thawing.

温度変化をレコーダーに同時記録した。融解は、30°C のふ卵器または Fig. 1 の凍結融解装置を用いて行った。この装置では任意の凍結時期を選んで加温することができ、またスライダックで任意の融解速度を設定できるようにした。なお、氷結点以下の最大温度勾配を凍結速度または融解速度とし、通常は凍結速度 1°C/min, 融解速度 3°C/min で実験を行った。

**共晶生成率の測定** 異なる濃度の食塩水を凍結、融解した際の経時変化を Fig. 2 に示した。食塩水を冷却すると 0°C 以下で水が凍結し始めるために温度降下がゆるやかに温度曲線に台地状の部分が見れる。さらに冷却を続けると、-21.6°C 以下の過冷却状態で食塩と水との共晶が生じるために温度降下が止まり再び台地状の部分が見れる。共晶の生成が終わると温度が降下し、やがて冷凍庫の温度に到達する。融解する場合は、ヒーターで温度を上げると -20°C 付近で共晶が溶け台地状の部分形成する。この台地状の部分の長さは共晶の生成量に応じて変化する。Fig. 3 は異なる濃度の食塩水を凍結させた時、食塩初濃度と生成した共晶の融解に必要な時間との関係を表し

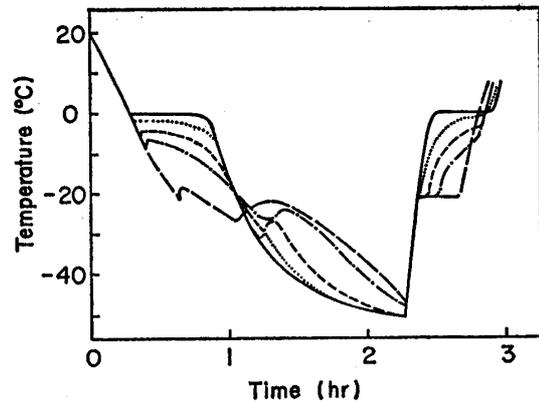


Fig. 2. Change of temperature during cooling and thawing of NaCl solution.

NaCl solution (7 ml) in concentrations of 0 M (—), 0.3 M (·····), 1 M (---), 2 M (-·-·-) or 4 M (----) was cooled to -50°C in the apparatus and then heated by 2 W heater.

たもので、直線的な比例関係を示している。このことは、共晶が NaCl 初濃度に比例して生成するはずであるので、共晶の量と一定容量のヒーターでの加熱融解時間が比例することを示している。従って、共晶の生成途中でヒーターを入れて共晶生成量を調節した場合には、共晶生成直前を 0%, 共晶生成完了時を 100% として融解時間を測定することにより、その時の共晶

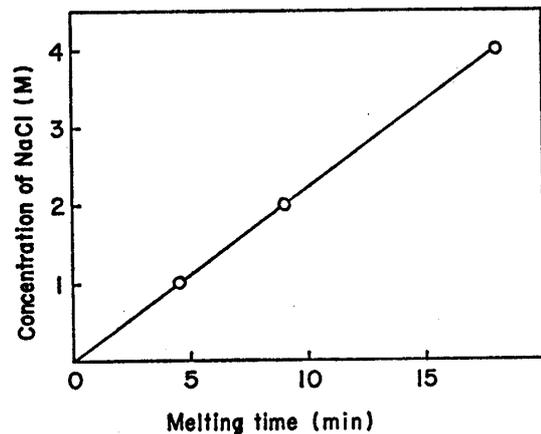


Fig. 3. Relation between the concentration of NaCl solution and the required melting time for the eutectic mixture.

When 7 ml of NaCl solution in concentrations of 1, 2 or 4 M was cooled to -50°C in the apparatus, the eutectic mixture was formed in proportion to the concentration of NaCl. Then the eutectic mixture in the frozen solution was thawed by 2 W heater to measure the required melting time.

生成率を逆算することができる。共晶生成率は具体的には次のものを表す。

(共晶点到達時よりの氷晶と塩結晶生成潜熱)/(共晶点到達時より完全共晶生成に必要な氷晶と塩結晶生成潜熱)×100

**生菌数の測定** 凍結融解処理前後の生菌数は、*S. cerevisiae* は麦芽抽出物培地を、*S. rouxii* は5%食塩添加同培地を用い、希釈平板培養法で、30°C、72時間培養後計数した。

### 実験結果

**凍結障害に対する凍結温度の影響** 0.9%食塩水に懸濁した菌体を0°Cから-70°Cまでの各温度で凍結し、それぞれの温度で貯蔵し、一定時間後30°Cのふ卵器中で融解した。その生存率の経時変化について検討した結果をFig. 4に示した。凍結融解による直接的な死滅は各曲線を0日目に挿入した点であると考えられる。これらの死滅は凍結温度の低下に伴って大きくなり、特に-20°Cから-30°Cにかけて変化が顕著であるが、-30°C以下では一定となること明らかとなった。凍結下における貯蔵日数の延長による死滅は曲線の勾配によって示され、-20°Cまでは温度の低下と共に大きくなるが、-30°Cでは逆に小さくなり、それ以下の温度においても同一曲線となった。以上を食塩水の共晶点との関連で見れば、貯蔵による死滅は共晶点より高い温度で大きく、逆に、凍結融解による

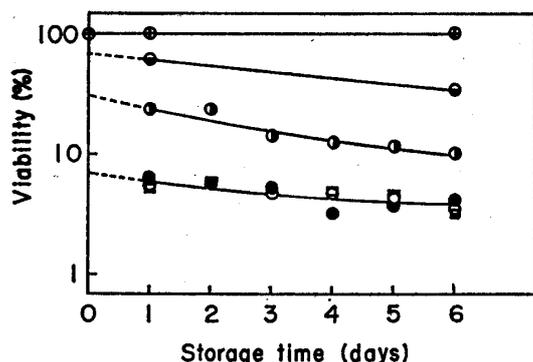


Fig. 4. Survival of *S. cerevisiae* as functions of storage time and temperature.

Cells of *S. cerevisiae* were suspended in 0.9% NaCl and cooled in the freezer held at 0°C (⊕), -10°C (⊙), -20°C (⊚), -30°C (●), -40°C (○) or -70°C (□). After each interval, the suspension was thawed at 30°C and the number of surviving cells was counted.

直接的な死滅は共晶点より低い温度で大きくなっている。死滅機構はそれぞれ異なるものと思われるが、これらの凍結障害が食塩水の共晶点と関連があることを示唆している。

**共晶の生成と凍結障害** 共晶点前後での死滅を詳細に検討するために、1M食塩水に懸濁した菌体を共晶点前後で加熱融解し、その結果をFig. 5に示した。共晶の生成直前で加熱融解した場合には生存率が46%であり、共晶生成直後に加熱融解した場合には生

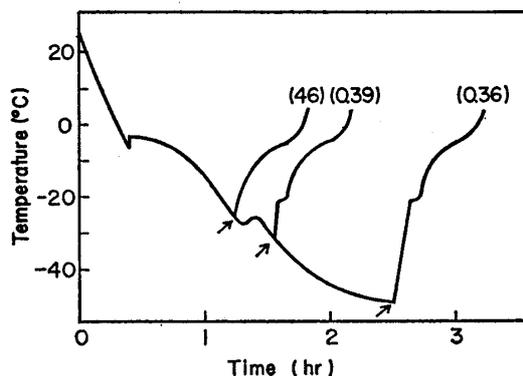


Fig. 5. Effect of cooling on viability of *S. cerevisiae* in 1 M NaCl.

The cell suspension of *S. cerevisiae* in 1 M NaCl was cooled to indicated temperature in the apparatus and thawed at the time shown with arrow by the heater. The figures in parentheses indicate viability (%).

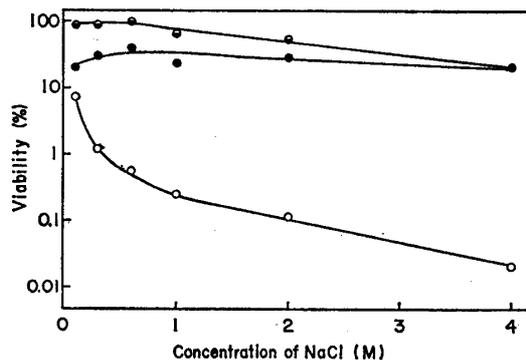


Fig. 6. Survival of *S. cerevisiae* as functions of NaCl concentration and cooling temperature. The cell suspension of *S. cerevisiae* in various concentrations of NaCl was cooled in the apparatus to the indicated temperature, then thawed by the heater, and the number of surviving cells was counted.

○ : The cell suspension was cooled slightly below the eutectic temperature (about -32°C) ;  
● : slightly above the eutectic temperature (about -26°C) ;  
⊙ : stored at 5°C for 2 hr.

存率が 0.39%, さらに低温に冷却した場合には 0.36% であった。すなわち, 共晶の生成前後においては 1/100 以下という著しい生存率の低下がみられ, 共晶の生成と菌の死滅の間には密接な関係があることが判明した。

Fig. 6 は菌体を懸濁する食塩濃度を变化させて共晶生成前後の生存率を検討した結果である。共晶生成直後および直前で融解した場合ならびにブランクとして食塩水と接触後 5°C で 2 時間放置した場合を示した。やはり, 共晶生成直前までの濃縮過程での死滅は少なく, 共晶の生成により生存率は大幅に低下した。また, 共晶生成直前に融解したものは, 0.1~4 M までの濃度差があっても凍結することによって濃縮され, 共晶生成直前では飽和食塩水の濃度に達して菌体と接触するためか, いずれの濃度においてもほとんど同じ程度の障害が見られた。

次に, 菌体を懸濁した食塩水を共晶生成直前の状態 (-21°C) および共晶生成完了直後の状態 (-24°C) にそれぞれ保ち, 菌体が濃厚食塩水と接触する状態 (-21°C) および接触しない状態 (-24°C) での貯蔵時間の延長による影響について調べた結果を Fig. 7 に示した。その結果, 菌体と濃厚食塩水との接触時間が長くなるに従って生存率が低下したが, その割合は 2 時間の接触により 1/4 程度のゆるやかなものであった。また本実験において, 共晶生成融解時の菌体と濃厚食塩水との接触時間は 30 分以内であると考えられる。従って, 1/100 以下という著しい菌体の死滅率は, 濃厚食塩水との接触と直接関連はないといえる。

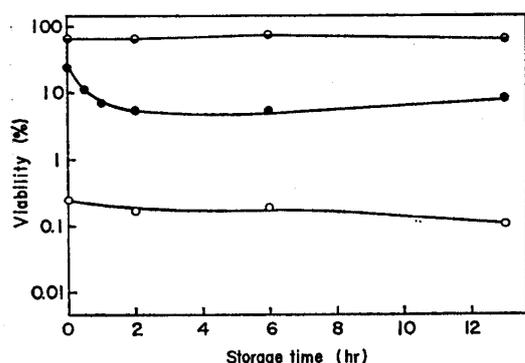


Fig. 7. Survival of *S. cerevisiae* as functions of storage time and cooling temperature.

The cell suspension in 1 M NaCl was kept at 5°C (●), -21°C (●) and -24°C (○). After each interval, the suspension was thawed by the heater and the number of surviving cells was counted.

凍結障害に対する共晶の生成率の影響 共晶の生成途中でヒーターを入れ, 共晶生成量を調節し, 生存率との関係を求めたのが Fig. 8 である。共晶生成初期に生存率は 10% 前後に減少するが, その後横ばいとなり, 共晶生成が完了する直前に急激に減少するこ

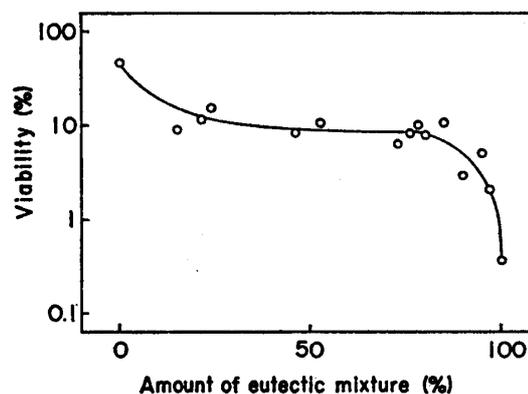


Fig. 8. Effect of amount of eutectic mixture on the viability.

The cell suspension in 1 M NaCl was cooled in the apparatus for various times at -50°C, then heated. The amount of eutectic mixture formed was determined by measuring the required melting time.

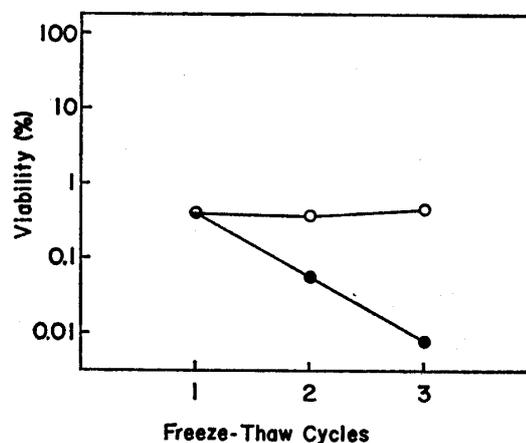


Fig. 9. Effect of repetition of freeze-thawing on the viability of *S. cerevisiae* in 1 M NaCl. The cell suspension of *S. cerevisiae* in 1 M NaCl was cooled in the apparatus at -50°C. When the formation of eutectic mixture was completed, the frozen suspension was thawed by the heater.

When eutectic mixture only (○) or both eutectic mixture and ice crystal (●) had melted, the cell suspension was cooled again. This freezing and thawing process was repeated up to 3 times.

とが明らかとなった。

#### 共晶の融解・再結晶の繰り返しによる凍結障害

菌体を懸濁した食塩水を冷却していくと氷の結晶が生じ、さらに低温に冷却するとやがて共晶が生成し、この時点で菌の急激な死滅が起こることが以上の実験結果より明らかとなった。そこでこの共晶の生成・融解を繰り返した場合の生存率の変化について検討した (Fig. 9)。共晶の融解後ヒーターを切り飽和塩溶液から再度共晶を生成させ、さらにこの操作を繰り返した場合には、生存率の変化はほとんど見られなかった。これに反して、共晶の融解後さらに加熱を続け氷を溶かして完全に液化した後再び冷却し共晶を生じさせた場合には、生存率は明らかに減少した。

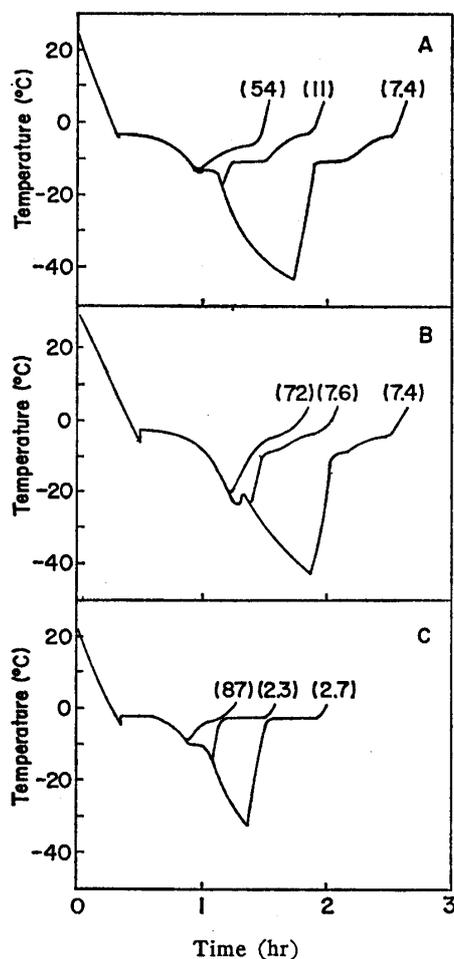


Fig. 10. Effect of cooling on viability of *S. cerevisiae* in several other compounds.

The cell suspension of *S. cerevisiae* in 1 M KCl (A), 0.5 M disodium succinate (B) or 1 M L-alanine (C) was cooled in the apparatus to the indicated temperature in  $-50^{\circ}\text{C}$  freezer, then thawed by the heater. The figures in parentheses indicate viability (%).

#### 種々の化合物の共晶生成による凍結障害 食塩以外

の化合物を共存させた場合にも、菌体の死滅と共晶生成との間に関連性が見られるかどうかを検討した。

Fig. 10 (A) は塩化カリウム溶液に菌体を懸濁し凍結融解を行った結果である。共晶生成直前に融解すると生存率 54% であり、直後が 11%、さらに低温に凍結した場合 7.4% となり、共晶生成前後で生存率は約 1/5 に減少した。(B) はコハク酸 2 ナトリウムについて、(C) はアラニンについて示したものであり、やはり共晶生成の前後で生存率は減少している。逆に、共晶の生成が必ずしも死滅を伴わない例として Fig. 11 の塩化カルシウムがあった。これは過冷却状態の

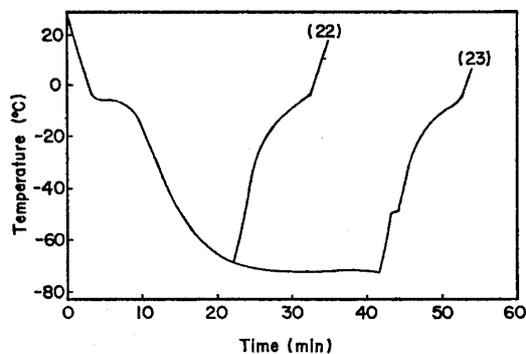


Fig. 11. Effect of cooling on viability of *S. cerevisiae* in  $\text{CaCl}_2$ .

The cell suspension of *S. cerevisiae* in  $\text{CaCl}_2$  was cooled to the indicated temperature in an alcohol bath held at  $-80^{\circ}\text{C}$ , transferred immediately to the apparatus, then thawed by the heater. The figures in parentheses indicate viability (%).

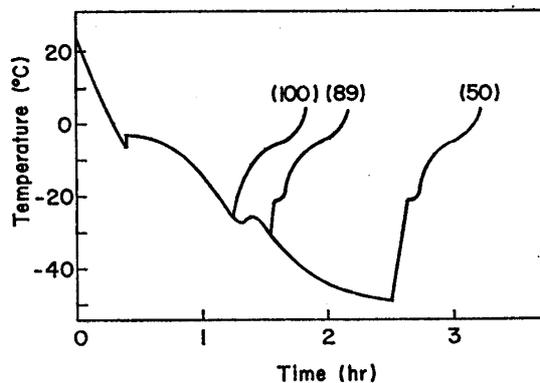


Fig. 12. Effect of cooling on viability of *S. rouxii* in 1 M NaCl.

The cell suspension of *S. rouxii* in 1 M NaCl was cooled to the indicated temperature in the apparatus, then thawed by the heater. The figures in parentheses indicate viability (%).

-70°C 付近で共晶を生成するが、それによる生存率の減少は全く見られなかった。

**S. rouxii の食塩水中での凍結障害** 食塩水中における凍結障害が耐塩性酵母に対しても同様に見られるかどうかを調べるために *S. rouxii* を用いて検討した。その結果、Fig. 12 に示すとおり、共晶生成前後における生存率の減少はほとんど見られなかった。

## 考 察

食塩水中での *S. cerevisiae* の凍結障害について検討した結果、生存率は共晶の生成前後において著しく減少することが明らかとなった。この共晶生成時の微生物の死滅現象については、死滅と関連がないとする Mazur の報告<sup>1)</sup>を除くと直接的に言及した報告は全く見られない。一方動物細胞については、ウニの卵<sup>2)</sup>、ポプラハバチの幼虫<sup>10)</sup> が共晶生成により障害を受けることが報告されている。ウニの卵については KCl の結晶の成長が細胞表層に達した時、細胞内が瞬間的に凍結するというもので、細胞の種類、構造、大きさ等に大きな隔たりはあるが、*S. cerevisiae* においても同様の現象が起こっている可能性もある。しかし、ポプラハバチの場合は、濃縮された細胞間液の潤滑作用が共晶生成により失われ、その結果多細胞生物であるポプラハバチの細胞組織が温度低下によるひずみで破壊されるというもので、単細胞生物である酵母の場合には該当しない。

*S. cerevisiae* を懸濁した 1 M の食塩水を約 1°C/min で冷却していくと、まず -3°C 近辺で水が氷結し始めるが、この時点では菌の死滅はほとんど起こらなかった。続いて温度降下に伴って溶液の濃縮化が進むと、菌体はこの飽和食塩水の直前にまで濃縮された溶液と接触することにより死滅するが、まだ大きなものではなかった (Fig. 6, 7)。やがて飽和食塩水の濃度にまで冷却されると、食塩と水との共晶が析出し始めた。菌の死滅が急激に生ずるのは、この共晶生成の前後であった (Fig. 5)。共晶生成の完了直前に死滅が著しいこと (Fig. 8) は、その時期に溶液系に生じる変化が何らかの形で菌体に強い作用を及ぼすことを示唆する。すなわち、食塩が共晶を作るのに 2.5~2.7 倍の水を必要とし、しかも共晶生成後には不凍水はなくなるという報告<sup>11)</sup>からも、菌体の懸濁液が完全に固化する時の物理的破壊、共晶の成長による膜の損傷、あるいは共晶の生成完了直前における食塩水の異常

濃縮や菌体からの強い脱水作用などが考えられる。共晶完結後の死滅が食塩初濃度によってかわる (Fig. 6) 理由としては、食塩初濃度が高くなると共晶の生成量も多くなるので、菌体を受ける作用も強くなるためと思われる。耐塩性酵母である *S. rouxii* が共晶生成によりほとんど死滅しない (Fig. 12) のは、この強い作用に対して耐塩機構が機能しているためと考えられる。共晶の飽和塩溶液への融解 (共晶点温度域での融解)・再結晶を繰り返しても、新たな死滅がほとんど生じないという結果 (Fig. 9) は、必ずしも共晶の生成・融解による菌の死滅を否定するものではない。すなわち、共晶融解後生じた飽和食塩水は浸透圧の低下を伴わずにただちに再度共晶を生成するため菌体が新しい障害を受けにくいことや、共晶生成によって生じた障害が融解に伴う浸透圧の低下によって拡大され死を引き起こすことなどが考えられる。共晶生成の前後において生存率が減少する化合物としては、食塩の他に、塩化カリウム、コハク酸 2 ナトリウム、アラニンなどがあったが、塩化カルシウムは生存率の変化がほとんど見られなかった (Fig. 10, 11)。これは化合物によって共晶の生成融解がかならずしも致死的作用を伴うとは限らないことを示すと共に、致死的作用の発現には共晶の生成融解速度、物理的状態、生成場所等種々の条件が存在することも考えられる。

今後、共晶生成による死滅機構や凍結保護剤との関連性を詳細に検討することにより、凍結による効果的な殺菌法あるいは凍結を利用した微生物の保存法にとって、有意義な知見が得られるものと期待される。

## 要 約

食塩等の溶液中での酵母の凍結障害について、食塩と水とが混合状態で晶出する、いわゆる共晶の生成を中心として検討した。その結果、1) *S. cerevisiae* の生存率は共晶生成の前後で著しく減少した。2) 共晶生成直前までの濃縮過程での死滅は少なく、かつ、0.1~4 M の濃度差があっても濃縮による死滅効果はほとんど一定となった。3) 共晶生成による死滅は共晶生成完了直前に著しく生じた。4) 共晶生成の前後において生存率が減少する化合物としては、食塩の他に、塩化カリウム、コハク酸 2 ナトリウム、アラニンなどがあった。5) 耐塩性を有する *S. rouxii* は共晶生成前後における生存率の低下がほとんど見られなかった。

終わりにのぞみ、ご指導賜りました京都大学農学部山田秀明教授、谷吉樹助教授に深謝いたします。なお、本報告の要旨は昭和54年日本醸造工学会大会において発表した。

## 文 献

- 1) Mazur, P. : *Cryobiology*, 214, Academic Press, New York (1966).
- 2) 森地 : 化学と生物, 7, 405 (1969).
- 3) 石田 : 食品工誌, 18, 538 (1971).
- 4) 僧都 : 化学と生物, 18, 78 (1980).
- 5) Meryman, H. T. : *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3, 341 (1974).
- 6) Postgate, J. R., Hunter, J. R. : *J. Gen. Microbiol.*, 26, 367 (1961).
- 7) Calcott, P. H., Macleod, R. A. : *Can. J. Microbiol.*, 21, 1960 (1975).
- 8) Mazur, P. : *Biophys. J.*, 1, 247 (1961).
- 9) Asahina, E. : *Nature*, 196, 445 (1962).
- 10) 丹野 : 凍結・乾燥と細胞障害, (根井), 105, 東京大学出版会, 東京 (1970).
- 11) 若松, 佐藤 : 農化, 53, 415 (1979).

(昭55. 5. 12受付)