

〔醸酵工学 第63巻 第1号 9-15. 1985〕

糖類溶液中における酵母の凍結障害*

早 川 潔

京都府立中小企業総合指導所

Freeze-thaw damage to *Saccharomyces cerevisiae* in saccharide solution. Kiyoshi HAYAKAWA (Kyoto Prefectural Comprehensive Guidance Center for Small and Medium Enterprises, 31 Yahata-cho, Nishinanajo, Shimogyo-ku, Kyoto 600, Japan) Hakkokogaku 63: 9-15. 1985.

The effect of extracellular crystallization on freeze-thaw damage of *Saccharomyces cerevisiae* in saccharide solution was studied.

First, the behavior of saccharide solutions on freezing and thawing was analyzed by differential scanning calorimetry and thermomechanical analyses.

Dulcitol and mannitol solutions crystallized at low temperatures and promoted freezing damage. Saccharides which did not crystallize at low temperatures were cryoprotective.

The viability of yeast cells decreased markedly in dulcitol and mannitol solutions as well as electrolytes when the crystallization of concentrate occurred in the harmful temperature zone.

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の凍結障害の一因として、著者らは各種化合物の菌体懸濁液の共晶・結晶化との関連性について検討してきた。その結果、凍結により塩類溶液の結晶化したものを融解すると、*S. cerevisiae* の生存率が急激に低下すること、¹⁾この致死作用はおおよそ $-10\sim 40^{\circ}\text{C}$ の範囲で共晶を生成する多くの塩類に見られること、²⁾を明らかにした。これらのことに、さらに、普偏性を持たせ、また、致死機構を解明するためには、冷却時、致死温度帯内で結晶化する性質を持つ化合物を、溶液自体に有害なものが多い塩類以外に、むしろ、凍結保護作用を持つとされる化合物、あるいは、その類縁化合物中から見出す必要がある。

糖類が生体試料の凍結に対し凍結保護作用を有することはすでに広く知られ、実用化されている。一方、Mackenzie ら³⁾は、大腸菌の凍結乾燥に際しマンニトールが結晶化するために保護作用が無効であることを報告している。また、マンニトールが凍結乾燥製剤の優れた賦形剤であり、それは結晶化しやすい性質によるものであることが知られている。これらのことは、マンニトール等の結晶化しやすい糖類化合物を含む菌

体懸濁液の凍結に際し、菌体外液の結晶固化による致死作用が発現することを予測させる。そこで、本報では各種糖類溶液中における酵母の凍結障害について、特に、菌体外液の結晶固化と致死作用の関連性について検討した結果について報告する。

実 験 方 法

糖類溶液の示差走査熱量分析 溶液の結晶化について検討するため、低温形示差走査熱量計（理学電機製）により示差走査熱量（以下 DSC と言う）曲線を測定した。DSC は試料溶液 30 μl を 5 mm ϕ の白金製皿に入れ、酸化アルミニウム粉末を対照として、 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で、通常 -60°C まで凍結・融解させ、測定した。

糖類溶液の熱機械分析 熱機械分析 (TMA) 装置（理学電機製）により凍結固化試料の軟化状態を測定した。Fig. 1 に示すように、試料 50 μl を 5 mm ϕ の石英セルに入れ、 -60°C まで温度降下させる。凍結固化した試料表面に 10 g の分銅で加重した 0.5 mm ϕ のピン先端を押し付け圧迫し、 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温した。融解温度付近ではピンが試料中にくい込むのでその変位量がチャート上に記録される。

供試菌株および菌体懸濁液の調製 *S. cerevisiae*

* 酵母の凍結障害に関する研究（第4報）

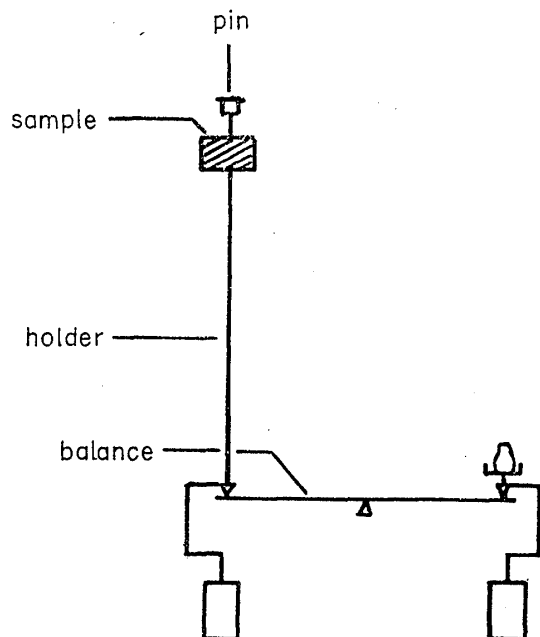


Fig. 1. Apparatus for thermomechanical analysis.

IAM 4274 を用いて、前報¹⁾と同様の方法により、培養および菌体懸濁液の調製を行った。

菌体懸濁液の凍結・融解方法 前述の低温形差走査熱量計を用い、同一の方法で凍結・融解した。

生菌数の測定 白金製皿中の菌体懸濁液 30 μ l を 3 ml の滅菌蒸留水中で再懸濁し、融解後30分以内に麦芽抽出物培地に希釈平板培養し、30°C、72時間培養後計数した。

実験結果

各種糖類溶液の低温下での結晶化 各種糖類溶液の結晶固化について検討するために、DSC および TMA による熱分析を行った。DSC では凍結・融解時における吸・発熱量を測定し、結晶の生成・融解状態について検討した。また、TMA では融解時における凍結試料の機械的強度を測定し、DSC とは異なった物理量から固化試料の融解状態について検討した。Fig. 2~8 にその結果を示した。

Fig. 2 はズルシトール溶液の DSC, TMA 曲線である。DSC 曲線は約 -8°C の過冷却状態になった時に水が氷になり、その発熱が認められる。この発熱量は非常に大きいので試料溶液の温度は直ちに 0°C の氷点近くに上昇し、温度降下の直線性が得られなくなる。従って、水の結晶化継続中には実際の温度は図の表示する温度から高温側に大きくずれることになる。水の結晶化がほぼ終了すると温度降下の直線性が再び得ら

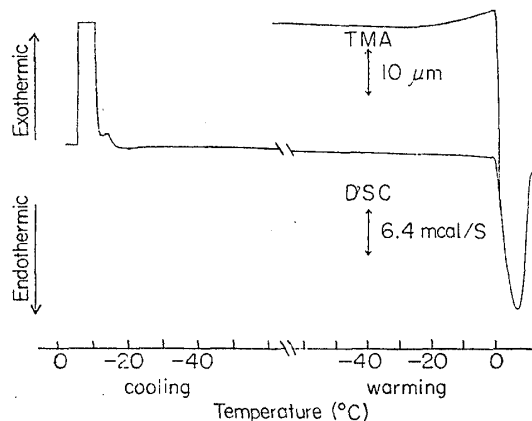


Fig. 2. DSC and TMA thermograms of 0.3 M dulcitol solution. DSC thermogram: The sample (30 μ l) was placed in a DSC pan, cooled to -60°C at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed to 20°C at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. TMA thermogram: The sample (50 μ l) was placed in a TMA cell and cooled to -60°C at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The frozen sample surface was pressed by 0.5 mm ϕ pin and then warmed to 20°C at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Around the thawing temperature, the pin sank in the sample.

れる。水の発熱ピークに続いて $-10 \sim -20^{\circ}\text{C}$ 付近で小さな発熱ピークが現れた。その後 -60°C に至るまで発熱ピークは見られなかった。昇温時には 0°C 付近で急激な融解が始まるまで熱変化は見られなかった。この凍結時の小さな発熱ピークはズルシトール濃度を変化させるとそれにほぼ対応してピークの大きさも変化した。また、凍結速度を $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上にした場合には全く消失し、新たに、昇温時 -30°C 付近に脱ガラス化と考えられる発熱ピークが出現した。次に、あらかじめ $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -60°C まで凍結させた試料の TMA は固体の膨張のみが観察され、 0°C 付近になって初めて固体の急激な融解が起こった。ガラス化している場合には、DSC, TMA 共にサーモグラムは -15°C 付近からゆるやかに吸熱が増加するので、ガラス化した糖液が残存していないことを示している。このようにズルシトールの場合は冷却時に小ピークが出現した時点で、糖液あるいはガラス化した糖液が結晶化したものと考えられる。

Fig. 3 はマンニトール溶液の DSC, TMA 曲線である。冷却時の DSC 曲線にまず水の結晶化の大きな発熱ピークが、さらに温度が低下し約 -32°C になると小さな発熱ピークが現れる。昇温時には -22°C 付近で DSC には吸熱が起こり、続いて小さな発熱ピークが生じた。その後熱的な変化はなく、 0°C 付近で急激な融解の吸熱が起こった。TMA で昇温時の機械的強

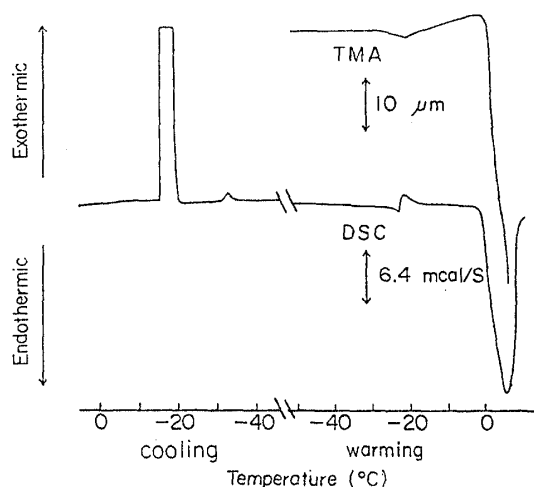


Fig. 3. DSC-and TMA-thermograms of 0.3 M mannitol solution. DSC-and TMA-thermograms were obtained as described in Fig. 2.

度を測定すると、DSC で発熱ピークが生じた -22°C 付近では一旦融解による軟化が起こり、ピンが試料中に貫入する。しかし、すぐに固化が起こり、続いて、温度上昇に伴う固体の膨張が始まる。膨張は 0°C 付近の氷の融解直前まで継続し、次いで、急激に融解する。マンニトール溶液の凍結・融解に関しては、永嶋ら⁴⁾により、凍結および再凍結の起こることがパルス NMR を用いて報告され、解凍過程の再凍結現象は、凍結しているマンニトールの水和クラスターが -25°C 付近で融解軟化するとマンニトールが結晶化し、それに伴って放出された水和水が直ちに凍結するためと説明されており、今回の実験結果ともよく一致する。マンニトールはこのような特異的な挙動を示すが、冷却および昇温時の二つの発熱ピークよりマンニトール溶液が結晶化していることがわかった。なお、

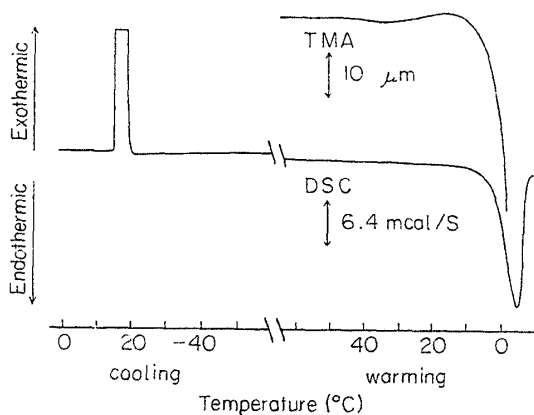


Fig. 4. DSC-and TMA-thermograms of 0.3 M sorbitol solution. DSC-and TMA-thermograms were obtained as described in Fig. 2.

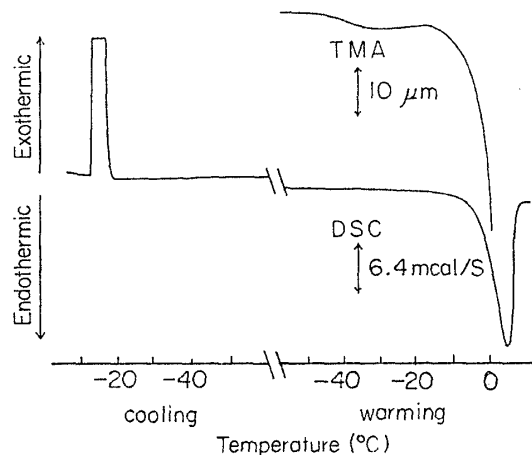


Fig. 5. DSC-and TMA-thermograms of 0.3 M glucose solution. DSC-and TMA-thermograms were obtained as described in Fig. 2.

マンニトールとズルシトール溶液の結晶化温度が低いにもかかわらず、その融解が 0°C 付近まで起こらないのは、融点は 0°C に近いがその結晶化は通常過冷却下で起こるためか、あるいは、これらの結晶化が糖と放出された水和水によるものと考えられ、塩類溶液における共晶融解とは異なった挙動を示したのではないかと考えられる。

Fig. 4 は、ソルビトール溶液の DSC と TMA 曲線である。この場合には、冷却時 DSC 曲線上に水の大いな発熱ピークが見られたが、濃縮されたソルビトール溶液の結晶化のピークは見られなかった。昇温時には -15°C 付近から DSC では吸熱、TMA では軟化が徐々に始まった。これは糖液がガラス化している場合の特徴と考えられる。このようにソルビトールの場合には、マンニトールやズルシトールと異なって、濃縮液の結晶化を示す発熱ピークや、その融解を示す急激な吸熱や軟化点が見られなかった。これは、低温になる

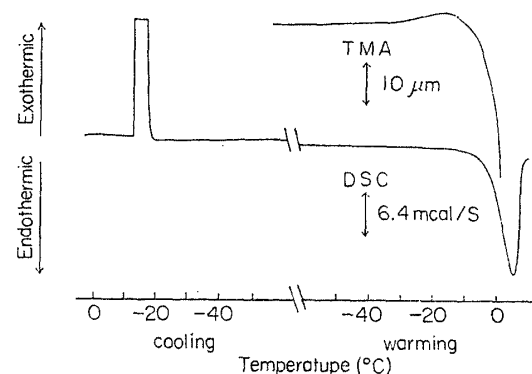


Fig. 6. DSC-and TMA-thermograms of 0.3 M fructose solution. DSC-and TMA-thermograms were obtained as described in Fig. 2.

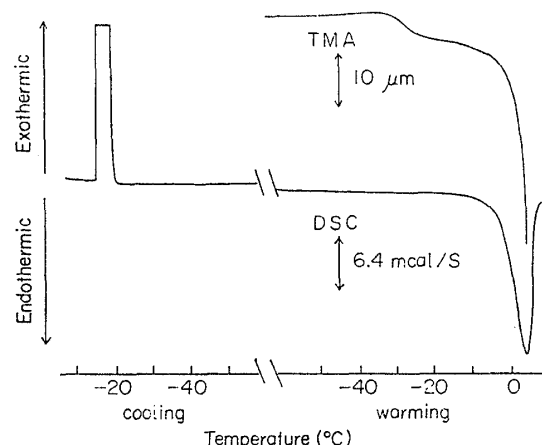


Fig. 7. DSC-and TMA-thermograms of 0.3 M sucrose solution. DSC-and TMA-thermograms were obtained as described in Fig. 2.

とソルビトール溶液の濃縮化が進行し、やがてガラス化していくためと考えられる。

Fig. 5~8 はグルコース、フルクトース、スクロースおよびマンノース溶液の DSC, TMA 曲線である。これらはソルビトールの場合と同様に、低温になっても濃縮液の結晶化が行われず、氷の間隙でガラス化していくものと考えられる。

Franks⁵⁾ は、多価アルコールによる水の性質の変化について検討し、グルコース、マンノース、スクロース等については OH 基の立体配置による水和が大きいのので、溶液が過飽和、過冷却、ガラス化し、不完全な凍結をきたすと述べている。このことは、これらの糖類についての今回の結果とよく一致する。

各種糖類溶液中での酵母の凍結障害 各種糖類溶液中に *S. cerevisiae* を懸濁して -50°C に凍結・融解

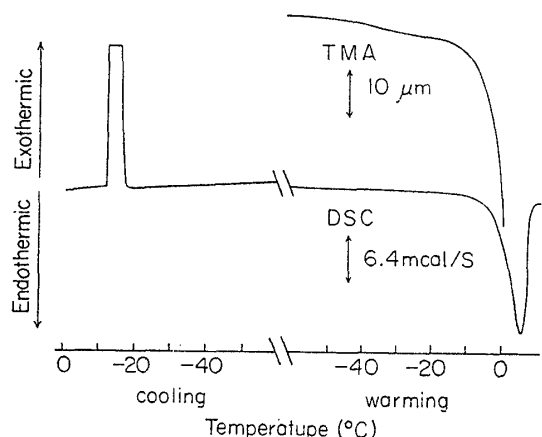


Fig. 8 DSC-and TMA-thermograms of 0.3 M mannose solution. DSC-and TMA-thermograms were obtained as described in Fig. 2.

Table 1. Effect of freeze-thawing on the viability of *S. cerevisiae* in solutions of various saccharides.

Compound (0.3 M)	Crystallization of concentrate	Viability (%)
Glucose	—	85
Fructose	—	80
Mannose	—	76
Sucrose	—	77
Sorbitol	—	79
Dulcitol	+	3.9
Mannitol	+	9.0
H ₂ O		51

The cell suspension (30 μl) of *S. cerevisiae* in 0.3 M saccharide was placed in DSC pans, cooled at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -60°C and warmed.

The cell suspension in DSC pans was resuspended in 3 ml of sterilized water and each sample was spread on the nutrient medium to count survival cells.

した結果を Table 1 に示した。グルコース、フルクトース、マンノース、スクロースの単糖類および二糖類においては、水懸濁液に比較して生存率が高く、いずれも凍結保護作用が見られた。一方、糖アルコールにおいては、ソルビトールには凍結保護作用が見られたが、ズルシトール、マンニトールには、逆に凍結障害促進作用が見られた。

次に、Fig. 9 に凍結・融解の繰り返しによる凍結障害の変化を示した。ソルビトールの凍結保護作用、ズ

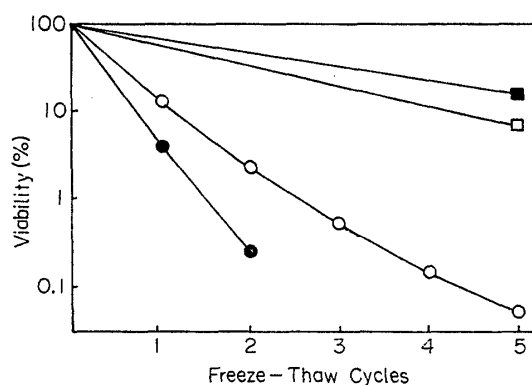


Fig. 9. Effect of repeated freeze-thawing on the viability of *S. cerevisiae* in 0.3 M saccharide. The cell suspension (30 μl) of *S. cerevisiae* in H₂O ($\square$), 0.3 M sorbitol ($\blacksquare$), 0.3 M mannitol ($\circ$), and 0.3 M dulcitol ($\bullet$) was placed in DSC Pans, cooled at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -60°C and warmed to 10°C .

The cooling and warming process was repeated up to 2 or 5 times.

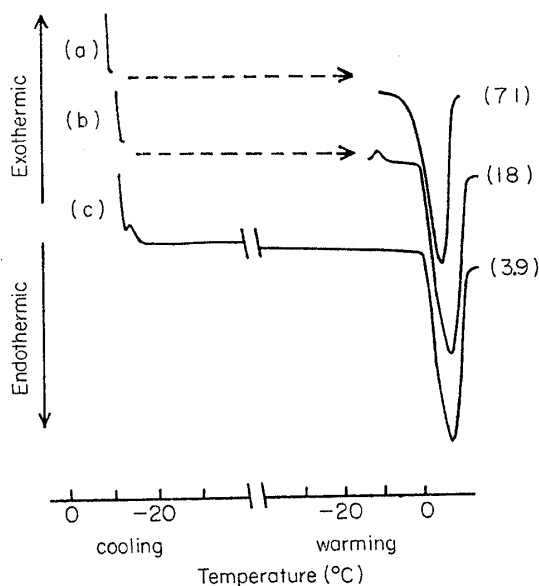


Fig. 10. DSC-thermogram of cell suspension containing 0.3 M dulcitol in cooling and warming process.

The sample (30 μ l) was placed in a DSC pan, cooled at 3°C/min to the indicated temperature and then warmed at 3°C/min to 10°C.

Counting of viable cells was carried out as in Table 1.

The number in parenthesis indicates the cell viability (%).

ルシトールとマンニトールの凍結障害促進作用はそれぞれ凍結・融解の繰り返しにより顕著になった。

Fig. 2~8 において得られた各糖類溶液の凍結時の挙動とそれぞれの凍結障害作用の関連について比較すると、結晶固化するものは生存率が低く、結晶固化しないもの、すなわちガラス化するものは生存率が高くなった。

ズルシトールおよびマンニトールの融解時期と生存率 ズルシトールは水の結晶化と見られる大きな発熱ピークと濃縮糖液の結晶化あるいは脱ガラス化と見られる小さな発熱ピーク、マンニトールはさらに昇温時の脱ガラス化と見られる発熱ピークが現れ、最終的に溶液は結晶化し固化する。どの時点における発熱ピークが致死作用と直接的に関連するかについて検討した。

Fig. 10 はズルシトール溶液の3種類の特徴的なパターンのDSC曲線である。(a)は水の発熱ピークが高い温度で終了したものを直ちに昇温したもので、比較的なだらかな融解曲線が得られた。DSCの昇温速度が平衡に達してから融解までの時間が短いために、(b)で現れる発熱ピークがこの曲線中に含まれているかど

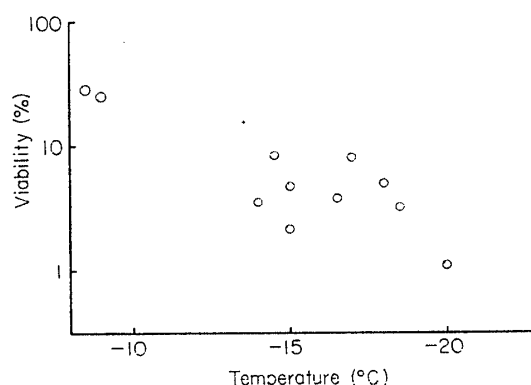


Fig. 11. Relation between the viability of *S. cerevisiae* in 0.3 M dulcitol and the temperature of the minor exothermic peak which was observed just after the major peak of water.

The sample (30 μ l) was placed in a DSC pan, cooled at 3°C/min to -60°C and then warmed to 10°C.

To observe differences in the temperature of the second minor exothermic peak which was observed just after the first major peak in the cooling process, the procedure was repeated.

Counting of viable cells was carried out as in Table 1.

うかは不明確であるが、生存率は71%と高かった。生存率が高いのは、糖液が結晶化しなかったのか、例えば結晶化していても、0°Cに近い温度では致死作用がほとんど現れなかったためと考えられる。(b)の曲線の水の発熱ピークが約-10°C以下の温度で終了した時に昇温したもので、昇温中に小さな発熱ピークが生じた。この場合には、融解が0°C付近で急激に起こったため、糖液は結晶化していたと考えられる。この時の生存率は18%であった。(c)の曲線は-40°Cまで冷却したもので、-14°C付近でズルシトール濃縮液の結晶化あるいは脱ガラス化と見られる発熱ピークが現れた。この場合には生存率が3.9%であった。

(c)の場合、この小ピークの出現する温度は冷却毎に変動した。そこで、発熱ピークの温度と生存率の関係についてFig. 11に示した。その結果、ピーク出現温度の低下に伴って生存率の減少することが判明した。このことは、同一温度範囲において塩類溶液の共晶生成温度の低下が生生存率減少をもたらすことと良く一致している。

Fig. 12 は、マンニトール溶液の3種類のDSC曲線を示した。(a)は水のみ凍結と考えられ、生存率は高く62%であった。(b)は-28°Cまで冷却したもので、冷却時には水以外の発熱ピークは現れなかったが、昇温時、-20°C付近で発熱ピークが見られた。その

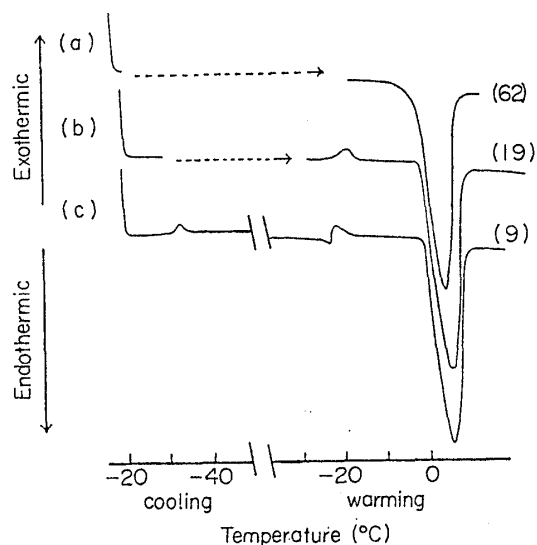


Fig. 12. DSC-thermogram of cell suspension in 0.3 M mannitol in cooling and warming process. The cell suspension in 0.3 M mannitol was cooled and warmed as in Fig. 10. Counting of viable cells was carried out as in Table 1. The number in parenthesis indicates the cell viability (%).

後、0°C 付近で急激な融解が起こるまでは熱変化は全く見られなかった。このことは、ガラス化した糖液が残存していないことを示している。この時の生存率は19%であった。(c)は-50°Cまで冷却したもので、冷却時には-32°C付近で発熱ピーク、昇温時には-22°C付近で再び発熱ピークが常に一定の温度で見られ、その後は(b)の曲線と同じ経過をたどった。この時の生存率は9%であった。

以上のように、ズルシトールの場合には菌体懸濁液の結晶化が致死作用をもたらすことは明らかである。また、マンニトールの場合も特異的な挙動を示すので解析にまだ不十分な点が残るが、やはり最終的には、糖液の結晶化が致死作用をもたらすものと考えられる。

考 察

-10~-40°Cの致死温度帯において、食塩水等の塩類溶液が共晶を生成し、結晶固化すると、懸濁されている*S. cerevisiae*に致死作用が発現した。¹⁾このことが多くの化合物溶液に共通する現象であること²⁾から、致死温度帯内での菌体外液の結晶固化が致死作用をもたらすとの推論が考えられる。

一方、致死温度帯内で溶液が結晶固化する化合物を凍結保護物質やその類縁化合物中に見出し、それが結

晶固化の時点で*S. cerevisiae*に致死作用をもたらすならば、上記の推論は一層普遍的なものとなる。そこで、凍結保護物質である糖類について、低温下での溶液の結晶固化を調べたところズルシトールとマンニトールにその性質が見られた。次に、他の糖類と共に凍結による致死作用を検討したところ、結晶固化しない糖類にはほとんど致死作用が見られない、すなわち凍結保護作用が見られたのに対し、結晶固化した糖類には大きな致死作用、すなわち凍結障害促進作用が見られた。さらに、ズルシトールとマンニトールについて致死作用が発現する時期を調べると、両者共菌体外液の結晶固化が致死作用をもたらすことが明らかとなった。

ズルシトールとマンニトールが共に糖アルコールであることから、冷却下において糖アルコールに固有の致死作用があるとの考え方は、同じソルビトールに致死作用が見られないので正しくない。また、結晶固化しないソルビトールは、同じく結晶固化しないグルコース等の単糖・二糖類と同様に凍結保護作用を持つ。従って、糖アルコールと単糖・二糖類の差異は致死作用や保護作用には無関係である。

なお、従来、経験的に凍結保護作用を持つとされている化合物についても、菌体外液の結晶固化という観点からの再検討が必要である。

今後、致死温度帯内における菌体外液の結晶固化が致死作用をもたらすことをさらに明確にし、その致死機構についても検討するためには、化合物を含まないで菌体外液の結晶固化をもたらす液、すなわち、水自身の凍結についての検討が必要である。

要 約

致死温度帯内での菌体外液の結晶固化と、*S. cerevisiae*の致死作用の関連について糖類を用いて検討し、次のことが明らかとなった。1)低温下での溶液の結晶固化を調べたところ、ズルシトールとマンニトールにその性質が見られた。2)結晶固化しない糖類には凍結保護作用が見られ、結晶固化した糖類には凍結障害促進作用が見られた。3)ズルシトールとマンニトールにおいては、他の塩類化合物と同様、致死温度帯内での菌体外液の結晶固化の時点において菌が死滅することが明らかとなった。

終わりにのぞみ、ご指導賜りました京都大学農学部谷吉樹教授に深謝いたします。なお、本報告の要旨は、昭和58年度日本農芸化学会大会において発表した。

文 献

- 1) 早川潔, 佐藤光弘: 醸酵工学, 58, 415 (1980).
- 2) 早川潔, 佐藤光弘: 醸酵工学, 59, 289 (1981).
- 3) Orndorff, G. R., Mackenzie, A. P.: *Cryobiology*, 10, 475 (1973).
- 4) 永嶋伸也, 鈴木栄一郎: 凍結及び乾燥研究会誌, 28, 26 (1980).
- 5) Franks, F.: *Cryobiology*, 20, 335 (1983).

(昭59. 5. 7受付)