

〔醸酵工学 第63巻 第1号 17-21. 1985〕

水懸濁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 of *Saccharomyces cerevisiae* in aqueous cell suspensions. KIRYOSHI HAYAKAWA (Kyoto Prefectural Comprehensive Guidance Center for Small and Medium Enterprises, 31 Yahata-cho Nishinanajo, Shimogyo-ku, Kyoto 600, Japan) Hakkokogaku 63: 17-21. 1985.

The effects of extracellular crystallization on freeze-thaw damage of *Saccharomyces cerevisiae* in cell suspensions in water was studied. A continuous and complete freezing method was established with the use of micro droplets of cell suspension at supercooling conditions. The viability of yeast cells decreased markedly in water as well as eutectic solutions when the extracellular crystallization was completed below about -10°C . The viability of yeast cells decreased with falling freezing temperature. Freeze-thaw damage of intracellular freezing caused by extracellular crystallization was found to be directly related to the freezing temperature of cell suspensions under supercooling and also to the freezing velocity only by changing freezing temperature.

微生物の凍結障害の原因については種々検討されているが、細胞懸濁液の結晶固化、あるいは、共晶生成との関連において凍結障害を論じた報告は、それらが凍結下で頻繁に見られる現象であるにもかかわらず、ウニの卵¹⁾、ポプラハバチの幼虫²⁾の例が見られるだけで、微生物に関しては、Mazur³⁾の否定的な報告以外には全く見られない。

そこで、著者は、低温下での菌体外液としての塩類溶液の結晶固化、あるいは、共晶生成と酵母の致死作用との関連性について検討した。その結果、凍結により溶液の共晶生成が完結すると、その時点で *Saccharomyces cerevisiae* の生存率が急激に低下すること、⁴⁾ この致死作用は、おおよそ、 $-10\sim-40^{\circ}\text{C}$ の致死温度帯内で共晶を生成する場合に限り見られること、⁵⁾ また、この作用は無機塩類のみならず、グリシン、アラニン等のアミノ酸類、マンニトール、ズルシトール等の糖類⁶⁾ にも見られ、低温下で結晶化する多くの化合物の水溶液に共通する現象であることを見出した。

この致死作用の発現には溶質の種類による特異性がほとんど見られないことから、菌体を取りまく何らかの物理的状況が、致死作用を発現させる可能性が考えられた。

そこで本報では、溶質の存在しない液、すなわち、酵母の水懸濁液中での致死作用、特に、関連性があると考えられる菌体内凍結による致死作用発現の条件について検討した。菌体内凍結については、急速凍結により発現することが明らかにされており、今まで冷却速度面からの検討が主として行われてきたが、最も直接的な指標と考えられる凍結温度面からのものはほとんど見られない。そこで、過冷却下における菌体懸濁液の凍結様式、見かけの凍結温度と生存率との関係等について明らかにし、その温度的指標の妥当性についても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 の培養は、前報⁴⁾と同様の方法により行った。24時間培養後 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、約 6×10^8 cells/ml となるように滅菌水に懸濁し、菌体懸濁液を調製した。

菌体懸濁液の凍結・融解方法 大量 (2 ml) の菌体懸濁液を凍結・融解するためには前報⁴⁾の凍結融解装置を用いた。

30 μl 以下の少量の菌体懸濁液の凍結・融解は、

* 酵母の凍結障害に関する研究 (第5報)

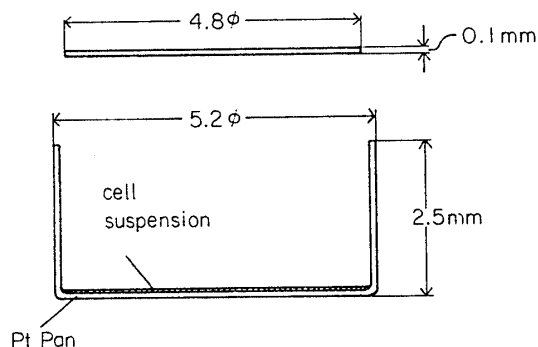


Fig. 1. Differential scanning calorimetry (DSC) pan. A micro droplet of cell suspension was injected in a DSC pan (Ptx). A cover was dropped over the micro droplet.

Fig. 1 の白金パンに試料を入れ、低温形示差走査熱量計を用いて行った。白金パンにはマイクロシリンジで所定の液量を注入した後、蒸発を防ぎ、熱伝導を良くするため上部に蓋を落とし、試料液を圧縮し、円板状にした。白金パン全量で約 50 μ l, 斜線の部分で 1 μ l である。示差走査熱量 (DSC) の測定は試料液と同量の酸化アルミニウム粉末を対照として、1~30°C/min で、通常 -30°C まで凍結後融解し、測定した。菌体懸濁液における DSC の発熱ピークの終了時の温度をチャート上より読み取り、見かけの凍結温度とした。本実験では特にことわらない限り、試料量は 0.1 μ l で行った。

生菌数の測定 凍結・融解した白金パン中の菌体懸濁液は 2 ml の滅菌水中で振とう、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

過冷却条件下での水懸濁液の凍結 酵母の水懸濁

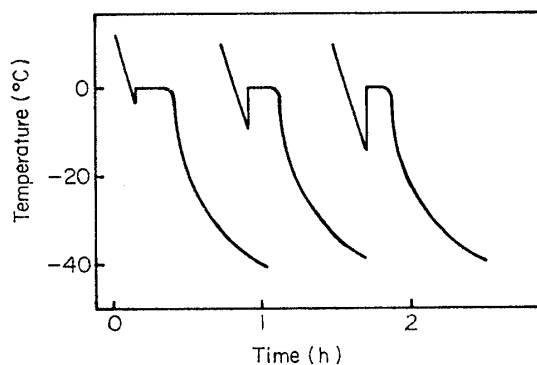


Fig. 2. Fluctuation in freezing curve of H₂O. Two milliliters of water was cooled at -50°C.

液中での凍結障害、特に、菌体内凍結によるものについて、凍結温度面からの検討を行うために、緩慢凍結、過冷却下での水懸濁液の凍結を試みた。

Fig. 2 は 2 ml の菌体懸濁液を -50°C の冷凍庫中で緩慢凍結させた場合の過冷却度の違いによる凍結曲線の比較である。このように液量が多い場合、一旦過冷却した液は、凍結開始と共に発熱し、温度が 0°C に急上昇し、その温度において凍結が継続し、終了する。この場合、過冷却温度が変わっても、凍結の継続、終了温度は常に 0°C となる。この時の生存率は高く、約 60% である。これらより、凍結開始時の過冷却温度は、菌の生存率に影響を与えないことが明らかである。また、生存率との関連が深いと見られる凍結終了時の温度が常に 0°C であり、菌体内凍結を起こす条件ではないので、この方法では大きな致死作用を発現させることはできなかった。

次に、水の凍結温度を変化させ、過冷却条件下で菌体懸濁液を凍結し菌体内凍結を起こさせるために、低温形示差走査熱量計の白金パンを用いて、液量を極端に小さくして検討した。Fig. 3 は液量の違いによる凍結時の DSC の発熱ピークと、その時の温度曲線の変化である。温度降下は 1°C/min の等速度で行った。凍結は必ず過冷却状態で開始するが、液量が大きいと凍結時の発熱のため白金パン下部の検出部の温度が上昇し、温度降下の直線性が失われた。しかし、液量を少なくすると温度上昇のピークがほとんど見られなくなり、発熱も短時間で終了した。このように、液量を少なくすると、周囲の容器に比較して水の熱容量が極端に少なくなり、水の凍結による発熱が直ちに周囲の白

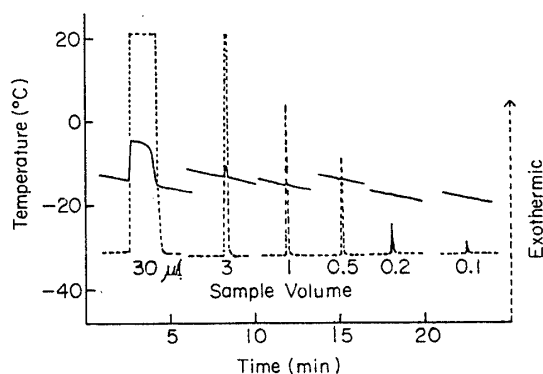


Fig. 3. Effect of sample volume on the change of freezing curve.

Various volumes of cell suspension in a DSC pan were set in low temperature DSC and cooled at 1°C/min.

(—), temperature curve; (---), DSC curve.

金容器に吸収され、短時間で温度が凍結開始温度付近にまで低下する。この場合、懸濁液中の菌体はほとんど脱水を受けずに凍結した外液の低温にさらされ、その温度が十分に低いと菌体内が凍結するものと考えられる。

この方法では、試料溶液は必ずしも過冷却温度付近で凍結しているかどうかは明らかではないが、仮に発熱による温度上昇があっても、凍結した試料が微量であれば熱伝導が速やかに起こり、もとの過冷却温度付近にまで瞬間的に復帰することは明らかである。この場合、菌体内凍結による致死作用との関連上重要なのは、瞬間的に上昇した懸濁液の温度ではなく、凍結した懸濁液中にあって未凍結の菌体が脱水を受けずに最終的にさらされる過冷却点付近の温度である。なぜならば、後者の温度では、前者の温度に比べ菌体外の水と菌体内の過冷却水との化学ポテンシャルの差が大きくなり、菌体内凍結を起こしやすくなるためである。

以上より、発熱ピーク終了時の温度、すなわち見かけの凍結温度を菌体内凍結に係る温度的指標として取り扱うことは妥当と考えられる。

酵母懸濁液の見かけの凍結温度と生存率 Fig. 4 は、低温形差走査熱量計を用い、0.1 μ l の酵母懸濁液を凍結させた場合の見かけの凍結温度と生存率の関係を示したものである。その結果、見かけの凍結温度

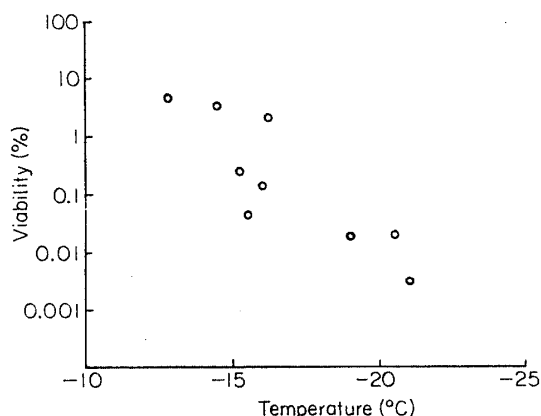


Fig. 4. Survival of *S. cerevisiae* as a function of freezing temperature.

Cell suspension (0.1 μ l) was placed in a DSC pan, cooled to -30°C and warmed to 2°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

The freezing point of the cell suspension was obtained from the temperature at which the peak of exothermic heat flow was over. The number of surviving cells was counted on malt extract medium.

の低下と共に生存率も低下することがわかった。この白金パンによる凍結では、菌体内がほとんど脱水されずに菌体外の低温の氷晶にさらされるため、菌体内凍結の典型的な条件をそなえており、この生存率の低下は主として菌体内凍結によるものと考えられる。従って、見かけの凍結温度の低下による生存率の低下は、菌体外の水と菌体内の過冷却水との化学ポテンシャルの差を大きくし、菌体内凍結の可能性を増大させるためと考えられる。

凍結する酵母懸濁液の液量と生存率 凍結する試料の液量と生存率の関連については、液量の多い場合には生存率が全般的に高くなり、30 μ l では見かけの凍結温度が低下しても生存率の低下はほとんど見られなかった (Fig. 5). この結果は Fig. 3 の結果とも合わせると、次のように解釈できる。凍結する試料の液量の増加により、凍結に伴う発熱が増大し、凍結の開始から終了まで長時間にわたり温度が上昇する。また、凍結がほぼ終了するともとの過冷却温度付近に復帰するが、その速度も試料の液量が多いとゆるやかなものとなり、時間を要する。これらの凍結継続中の時間が長いと、菌体はある程度の脱水を受けることになる。従って、試料の液量が多いと、試料が見かけの凍結温度にまで戻り、菌体が周囲の低温の氷晶にさらされても、脱水を受けているので菌体内凍結を起こしにくくなり、生存率低下が見られないものと考えられる。逆に、液量が少ないと、発熱が少なく、凍結継続時間も短く、そのため脱水をほとんど受けない菌体を周囲の

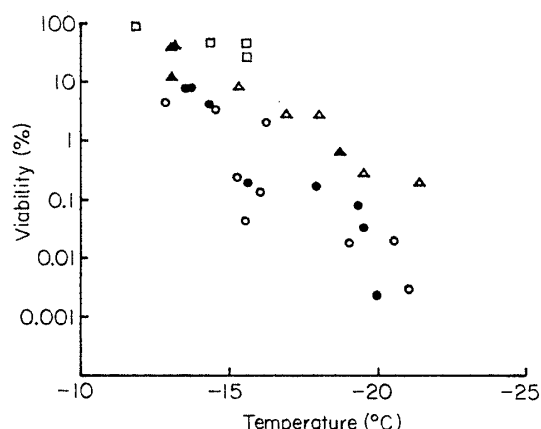


Fig. 5. Survival of *S. cerevisiae* as a function of freezing temperature and sample volume.

Cell suspensions of 0.1 ($\circ$), 0.2 ($\bullet$), 1 (Δ), 3 ($\blacktriangle$), and 30 ($\square$) μ l were placed in a DSC pan, cooled to -30°C and warmed to 2°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

The freezing point of cell suspension and the viability were obtained as described in Fig. 4.

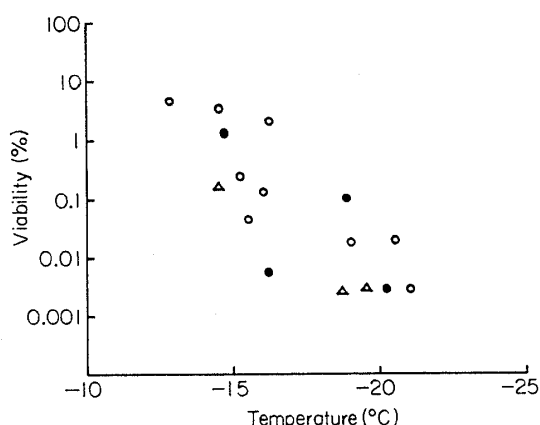


Fig. 6. Survival of *S. cerevisiae* as a function of freezing temperature and cooling rate.

Cell suspension (0.1 μ l) was placed in a DSC pan, cooled to -30°C at 1 (○), 10 (●), and 30 (Δ) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed to 2°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The freezing point of the cell suspension and the viability were obtained as described in Fig. 4.

低温の氷晶にさらすことになり、典型的な菌体内凍結を起こすことができる。

以上より、本実験では可能な限り少量の液量を用いることが妥当である。

凍結速度による影響 過冷却に近い凍結条件下において、凍結速度の違いが見かけの凍結温度と生存率に対して、どのような影響をもたらすかについて検討した。

Fig. 6 は凍結速度を $1\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ に変化させ、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で緩慢解凍した場合である。 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で急速凍結すると、他のものよりも生存率が低くなる傾向が見られたが、大きなものではなかった。

以上の凍結速度による影響は、 $1\sim 30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の温度範囲においては、水の凍結温度を変化させる点以外では、それほど大きな影響は見られなかった。ただし、凍結速度が大きくなると、凍結開始温度と終了温度に大きな温度差ができる。実験の性質上、この差がほとんど見られない緩慢凍結が望ましいと考えられる。

考 察

脱水を受けない菌体が菌体外の低温の氷晶に囲まれた状況を想定し、過冷却に近い条件下における菌体懸濁液の凍結を行った。DSCを用い 0.1 μ l の微量の菌体懸濁液の凍結を行うと、菌体がほとんど脱水されずに菌体外の低温の氷晶に接触するため、Mazur⁷⁾ の言う典型的な菌体内凍結を起こす条件が成り立つものと考えられる。見かけの凍結温度の低下が大きな生存率の

低下をもたらしたことは、温度低下が菌体外の氷晶と菌体内の過冷却水の化学ポテンシャル差を大きくし、菌体内凍結をさらに起こりやすくしたためと考えられる。

この場合、菌体懸濁液の瞬間的な温度の急上昇とその結果としての急冷が、致死作用を発現させているとの見方もある。急冷による致死作用は、菌体の脱水を少なくしたまま菌体内を過冷却し、菌体外の低温の氷晶に接触させ菌体内凍結を起こさせることにより発現する。しかし、本実験条件では微量の懸濁液を用いているため、見かけの凍結温度付近において脱水の少ない状態で菌体内凍結が起こっていると考えられるので、凍結時の温度の急上昇、急冷が起こらなくても致死作用は当然発現すると考えられる。換言すれば、急冷速度が増加すればするほど、過冷却のまま凍結が終了した場合の生存率に近似してくると思われる。従って、本実験条件下では、急冷速度の増加のみが独立して致死作用を増大させるとは考えにくい。

また、この方法では凍結開始後から見かけの凍結温度に至るまでの数秒間は、試料の真の温度が確認されていない要素がある。しかし仮に、大きな温度上昇があるとしても、その温度での菌体外の氷晶と菌体内の過冷却水の化学ポテンシャル差は小さいので、菌体内凍結を起こす可能性は少なく、その差が最大になる見かけの凍結温度付近で菌体内凍結を起こす可能性は最大になる。従って、見かけの凍結温度を菌体内凍結に係る温度的指標として取り扱うことは妥当と考えられる。

菌体内凍結は、菌体懸濁液を急冷することにより生じることは一般に知られている。しかし、菌体内凍結を起こす臨界の凍結速度は、菌体の脱水性に係る多くの因子、菌体の種類、大きさ、膜の透過性等により影響を受ける。この点に関しては、凍結速度は菌体内凍結の間接的な指標にすぎないと言える。また、大きな凍結速度を得ることは実験的にも困難を伴うことが多く、温度の把握等も不正確になりやすい。以上について、本法による見かけの凍結温度は、脱水がほとんど行われない条件下で得られるので影響する因子が少なくなり、菌体内凍結に関し、より直接的な指標になるものと考えられる。

次に、菌体外液が結晶固化し、凍結温度の低下により生存率が低下する点においては、水懸濁液における氷晶生成と化合物懸濁液における共晶生成とは類似しているので、ウニの卵で Asahina¹⁾ が指摘したように、

共晶生成においても菌体内凍結を起こしている可能性はある。また、氷晶生成は過冷却下での凍結という非平衡系での致死現象であり、共晶生成も多くの場合過冷却下で共晶を生成し、 KH_2PO_4 等の化合物においては過冷却が増大すると致死作用も増大する⁵⁾ ので、非平衡系での致死現象としての側面も考えられる。ただし、以上のことが氷晶生成と同様、菌体内凍結に結び付くのか、あるいは菌体膜周辺に強い脱水作用をもたらしているのかは、さらに検討する必要がある。

要 約

菌体外液の結晶固化と致死作用の発現との関連性について知るため、水懸濁液中での酵母の凍結障害について検討した。

その結果、1)微小水滴を過冷却条件下で凍結完了させることができた。2)酵母の水懸濁液においても、共晶化合物の場合と同様、 -10°C 以下での菌体外液の

結晶固化が大きな致死作用をもたらすことがわかった。

3)凍結温度が低くなればなるほど生存率が低下した。

4)致死作用の発現に直接的に関連するのは過冷却下での凍結温度であり、凍結速度による影響は凍結温度を変化させる点においてのみ関連があった。

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59年度日本農芸化学会大会において発表した。

文 献

- 1) Asahina, E.: *Nature*, 196, 445 (1962).
- 2) 丹野皓三: 低温科学, 生物篇, 26, 79 (1968).
- 3) Mazur, P.: *Biophys. J.*, 1, 247 (1961).
- 4) 早川潔, 佐藤光弘: 醸酵工学, 58, 415 (1980).
- 5) 早川潔, 佐藤光弘: 醸酵工学, 59, 289 (1981).
- 6) 早川潔: 醸酵工学, 63, 9 (1985).
- 7) Mazur, P.: *Ann. NY Acad. Sci.*, 125, 658 (1965).

(昭59. 6. 5受付)