(15) 朝比奈英三 : 低温科学, 4, 85 (1948); 科学, 20, 324 (1950).

Summary

When a drop of aqueous suspension of yeast cells is cooled under various conditions, we can observe the following two freezing types :

One is the extracellular freezing that occurs at relatively slow cooling rate as the result of ice-inoculation at about $-2 \sim -10^\circ$, and the other is the intracellular freezing which is found when the cooling rate is very rapid.

In the former type, the cells are scarcely injured, while, in the latter, the cells are seriously damaged.

酵母の機能に及ぼす低温の影響

根井外喜男, 小川忠人, 兼平信一, 秋元 博 (北海道大学低温科学研究所)

昭和 27 年 1 月 7 日 受理

Effects of Low Temperature on the Functions of Yeast Cells.

By T. NEI, T. OGAWA, S. KANEHIRA and H. AKIMOTO (Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University)

緒 言 多くの生物の中で微生物が低温に対して最も抵抗が強いといわれている。じじつ微生物を低温でいろいろと処理したこれまでの多数の実験に於て、いずれもかなり抵抗の強いことが証明されている⁽¹⁻²⁾。しかしその耐寒性の機構についてはまだ充分明らかになつていない。

吾吾はかかる点について検討を試みたいと考え、微生物中でも比較的形態が大きく観察に便な酵母を被検材料としてとりあげた。そしてさきに著者の一人⁽³⁾は低温に於ける酵母の形態的变化を追究し、酵母浮游液の冷し方によつて酵母の菌体自身が凍る場合と凍らない場合のあること、即ち急速凍結では菌体内凍結、緩慢凍結では菌体外凍結の起ることをみとめた。その際融解後にみられる酵母の障害については、ごく少量の試料について染色による生死の吟味を行つたにすぎないので、今回は更に大量の試料を用いて凍結融解の操作を行い、その結果起る酵母の機能的な変化を種種の角度から検索してみた。

実験方法 *Saccharomyces cerevisiae*, S. 214 株 (本学応用菌学教室より分譲) の麦汁寒天 30° , 24 時間培養菌体を蒸留水で 3 回遠心洗滌し、沈渣に約 9 容のメヂウムを加えて洗游液とし、その 1 cc を直径 2 cm の平底試験管に入れブライン又は液体空気で冷却した。冷却速度は試験管をそのまま又は 2 重管にすることによつて加減し、融解は室温或は 20° の温浴槽で行つた。なおその間の温度経過は菌液中に挿入した熱電対によつて測定した。凍結融解後菌液を適宜にうすめて、methylen blue 染色性、醗酵力、catalase 活性度について同時にしらべた。

(1) Methylen blue 染色 : 生菌数測定に代える目的で FINK 液を用い菌液と等量に加えて、数視野で 300 箇の菌数を数えその中の methylen blue 不染菌数を総菌数に対する比率で表わした⁽⁴⁾。

(2) 醗酵力 : 処理菌液量の関係で WARBURG 検圧計を用い、 20° で次のような反応系のもとに発生する CO_2 量を測定した。

主室	菌液 (凍結融解後 5 倍に希釈)	0.5 cc	副室 水	0.5 cc
	M/30 ブドウ糖液	0.5 cc		
	N/10 HCN 溶液 (之を 1 滴加えると全体の HCN 濃度は凡そ N/1000 となる)	1 滴		

対照には水の代りに KOH を加えて完全に CO_2 を吸収させて O_2 呼吸の行われていないことを確めた。なお N/1000 HCN で CO_2 発生量も多少阻止されるといわれるが、本実験ではすべて対照との比較値のみを問題とした。

(3) Catalase による H_2O_2 の分解作用 : N/100 H_2O_2 5 cc, M/15 phosphate buffer (pH 6.8) 5 cc, 酵母液 (凍結融解後 5 倍希釈) 1 cc, に水を加えて総量 50 cc とし、 20° で 30 分間作用させた後 10% 硫酸液 5 cc を加えて反応を停止させ、残つた H_2O_2 量を M/100 KMnO_4 溶液で滴定した。対照として加熱菌液を加えて滴定したものとの差を分解 H_2O_2 量とした。各試料間の比較には $k = 1/t \log A/(A-x)$ を計算し k/mg の値

でその活性度を表わした。

実験成績

予備実験 室温放置による酵母の機能的変化： 酵母の蒸留水浮游液では菌液を作ってから室温（10～15°）に放置して少くも5時間時には24時間でもその生理的機能に余り大きな影響がない（表省略）。従つて数時間で完了する低温処理の本実験では時間の経過に作る変化は殆ど考慮する必要はない。

Fig. 1. Freezing Curves.

の附近で人為的に過冷却を破つて凍結させたもの S と、 $-7\sim-8^{\circ}$ 附近で自然に過冷却が破れたもの Sc がある。但し両条件による凍結融解後の成績はほぼ似ている。

同様の凍結融解の操作を -30° のブラインによる冷却についても行い、結局、緩急冷却速度、緩急融解速度を組合せ菌液の最低到達温度 -15° 及び -30° について行つた実験成績は Table 1 に示す通りである。その主な

Table 1. Activity of Yeast Cells frozen and thawed under Various Conditions, especially cooled to -15° or -30°C .

Values given in the following tables (Table 1~4.) are averages taken of 4~5 cases.

Cooling temperature $^{\circ}\text{C}$	Cooling rate	Warming rate	Cells unstained by methylene blue staining %	Fermentation (Q_{CO_2}) cmun %	Catalase activity 10^3k/mg %
-15°	untreated	control	96 (100)	74.4 (100)	0.70 (100)
	slow	slow	95 (99)	68.9 (93)	0.79 (112)
	slow	rapid	95 (99)	70.1 (94)	0.76 (109)
	rapid	slow	95 (99)	66.9 (90)	0.77 (110)
	rapid	rapid	87 (90)	69.9 (94)	0.87 (125)
-30°	untreated	control	98 (100)	126.9 (100)	0.77 (100)
	slow	slow	90 (92)	87.5 (69)	0.98 (128)
	slow	rapid	91 (93)	90.6 (71)	0.97 (125)
	rapid	slow	71 (73)	43.1 (34)	1.29 (167)
	rapid	rapid	79 (81)	58.5 (46)	1.11 (143)

けは数値が逆)。

次に液体空気を用いて1そう急激に凍結させたものでは障害の度が更に大きいことがわかつた。しかしその場合も融解速度による差は殆どみ

Table 2. Activity of Yeast Cells frozen in Liquid Air.

Cooling rate	Warming rate	Cells unstained by methylene blue staining %	Fermentation (Q_{CO_2}) cmun %	Catalase activity $10^3 \times \text{k/mg}$ %
control	99	(100)	122.6 (100)	0.88 (100)
rapid	slow	53 (54)	6.3 (5)	1.71 (194)
rapid	rapid	57 (57)	8.7 (7)	1.82 (206)

での急速凍結。(3) -190° までの急速凍結・凍結曲線は Fig. 2 に示す如く、又融解はいずれも 20° の温浴槽で行つた。

実験 II. 菌液のメヂウムを変えた場合： 媒液の種類をいろいろ変えることにより、凍結によつて菌体の受ける障害の機序を知りたいと考え、等張液として 0.3M ブドウ糖液、低及び高張液として蒸留水と 1M ブド

所見をあげれば、(1) 菌液が一旦凍結すれば多かれ少なかれ酵母は障害を受け、(2) 凍結の条件としては、緩慢凍結より急速凍結が障害が多い。(3) 最低到達温度の -15° と -30° では低いほうが障害の度が著しい。

(4) 融解条件では、急速加温(約 $15^{\circ}/\text{min.}$)と緩慢加温(約 $3^{\circ}/\text{min.}$)とでは著しい差がみとめられない。(5) 酵母の各機能の消長は各処置条件ではほぼ行っている(但し catalase だ

場合も融解速度による差は殆どみとめられなかつた (Table 2)。

そこで以後の実験は比較的極端な例として次の3つの凍結条件のもとに行つた。(1) -15° までの緩慢凍結、(2) -15° ま

Fig. 2. Freezing Curves

実験 III. 酵母の培養条件を変えた場合

(1) 長時間培養菌：麦汁寒天に 30°, 5 日間培養を行つた酵母は新鮮培養菌に比し一般に機能は低下している。かかる菌を用いて低温処理を行つたところ全般的に新鮮菌に比し障害の割合が大きい。就中、蒸留水浮游液では大差ないに拘らず、高張或は等張液では破壊の度が大きいようである。特に catalase の値は無処置対照の 4~5 倍に達する (Table 3)。

(2) 高張培地継代培養菌
前実験で高張液に浮游させた場合特に冷却速度の速いときに障害の度の大きいことをみとめたので、ブドウ糖を 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5M に含んだ麦汁培地に順次継代し高張培地にならした菌を用い

て、蒸留水と 1.5M ブドウ糖液の浮游液とすると、その菌液の活性は新鮮正常培養菌とあまり変わらない。これらを低温で処理すると障害度の大きさの順で -190° 急冷, -15° 急冷, -15° 緩冷となることは前項までの他の実験例と同一傾向であるが、新鮮正常菌に比較して一般に凍結による障害が大きくその所見はやや長時間培養菌に似ている。中でも 1.5M のブドウ糖液での catalase の数値が極端に大きい (Table 3)。

実験 IV. 凍結融解を反覆した場合：これまでの実験はいずれもただ 1 回の凍結融解を行つた場合であるが、次に最も障害度の大きい操作である液体空気による凍結融解を反覆してみた。それによれば第 1 回の処理で大半の機能は失われ、第 2 回以後は障害度の割合が漸減する (Table 4)。

ウ糖液を用い、また膠質液として 0.3% セラチン溶液を使用した。その成績は Table 3 に表示される如く、(1) 冷却速度による差は前実験同様、-190° 急冷が最も障害大きく、-15° 急冷, -15° 緩冷の順となる。(2) メヂウムの種類による差は機能によつて必ずしも一致しないが、大体の傾向は 0.3M ブドウ糖液, 0.3% セラチン液の間に大差なく、1M ブドウ糖液に於てやや障害の度が大きかつた。

Table 3. Activity of Yeast Cells under Various Conditions of Medium and Culture.

Cultural conditions	Kinds of medium	Freezing rate	Cells unstained by methylene blue staining		Fermentation (Q CO ₂)		Catalase activity	
			%	%	cmm	%	10 ⁸ × k/mg	%
Cells cultured for 24 hours	Distilled water	Control	97	(100)	74.4	(100)	0.85	(100)
		S	91	(94)	70.2	(94)	0.93	(109)
		R	90	(93)	69.9	(81)	1.19	(141)
		M	60	(62)	8.7	(12)	1.54	(182)
	0.3 M Glucose solution	Control	100	(100)	75.9	(100)	0.78	(100)
		S	93	(93)	78.4	(103)	0.88	(112)
		R	70	(70)	34.8	(46)	0.96	(123)
		M	72	(72)	16.2	(21)	1.11	(144)
	1.0 M Glucose solution	Control	99	(100)	90.1	(100)	0.80	(100)
		S	98	(99)	86.5	(96)	0.99	(125)
		R	55	(55)	58.8	(59)	1.43	(178)
		M	53	(54)	4.2	(4)	1.70	(213)
	0.3% Gelatine	Control	99	(100)	77.0	(100)	0.89	(100)
		S	97	(98)	71.2	(92)	1.02	(114)
		R	86	(87)	32.2	(42)	1.30	(146)
		M	79	(79)	11.2	(14)	1.29	(145)
Old cells cultured for 5 days	Distilled water	Control	77	(100)	17.8	(100)	1.26	(100)
		S	59	(77)	14.1	(79)	1.78	(141)
		R	56	(72)	14.2	(80)	2.38	(189)
		M	42	(55)	7.0	(39)	2.33	(185)
	0.3 M Glucose solution	Control	93	(100)	35.3	(100)	0.79	(100)
		S	96	(93)	34.4	(97)	0.95	(121)
		R	52	(56)	12.2	(35)	3.10	(395)
		M	47	(50)	3.8	(11)	4.03	(514)
	1.0 M Glucose solution	Control	94	(100)	42.2	(100)	0.98	(100)
		S	91	(97)	37.4	(89)	1.06	(108)
		R	61	(65)	28.7	(68)	2.06	(210)
		M	25	(27)	3.5	(8)	4.28	(437)
Cells subcultured successively in hypertensional media	Distilled water	Control	99	(100)	112.3	(100)	1.03	(100)
		S	95	(97)	109.2	(97)	1.15	(112)
		R	79	(80)	31.1	(28)	1.58	(153)
		M	83	(84)	9.8	(9)	1.84	(179)
	1.5 M Glucose solution	Control	99	(100)	115.5	(100)	0.34	(100)
		S	98	(99)	115.7	(100)	0.40	(118)
		R	75	(76)	46.2	(40)	2.94	(864)
		M	60	(61)	14.0	(14)	2.82	(830)

S : Slow cooling to -15°

R : Rapid cooling to -15°

M : Rapid cooling to ca -190°

Table 4. Activity of Yeast Cells frozen and thawed repeatedly

Kinds of medium	Repetition of freezing and thawing	Cells unstained by methylene blue staining		Fermentation (QCO ₂)		Catalase activity		考 察
		%	%	cmm	%	10 ³ × k/mg	%	
Distilled water	Control	98	(100)	92.4	(100)	0.72	(100)	微生物は一般に低温に対して抵抗が強いといわれているが、いかなる低温処置によつても影響を受けないというわけではなく、方法によつてはかなりの障害を受けることがわかつた。ところが微生物ではかなり低温におかれても過冷却状態にあつて
	1 time	60	(61)	8.5	(9)	1.34	(185)	
	2 times	31	(32)	3.2	(3)	1.92	(265)	
	3 "	16	(16)	3.2	(3)	2.29	(316)	
	4 "	11	(11)	1.3	(1)	2.44	(337)	
0.3 M Glucose solution	Control	96	(100)	133.6	(100)	1.64	(100)	害を受けることがわかつた。ところが微生物ではかなり低温におかれても過冷却状態にあつて
	1 time	10	(10)	4.1	(3)	2.45	(149)	
	2 times	1	(1)	3.0	(2)	2.76	(168)	
	3 "	0	(0)	2.3	(2)	2.85	(174)	

凍結さえおこななければ殆ど障害をうけないことが知られているので、低温による障害としては凍結という現象に伴う影響が最も大きいと考えられる。一般に供試材料が肉眼的に凍つた状態になれば、その中に含まれる微生物の細胞内にも必ず凍結が起つたかのようにみなされていたが、実際は酵母のような細胞でも冷却のしかたによつて細胞内に凍結の起る場合と起らない場合のあることはさきにも報告した通りである⁽³⁾。従来微生物の低温による影響についての報告は極めて多数に上るが、必ずしも一定の成績が得られていない^(1,2,5)。(詳細な文献的考察については別の機会に述べる)。中でも急速凍結と緩慢凍結のいずれが大きな障害を与えるかについては種種の議論があつてどちらとも決定されていなかったが、前回の形態的観察と今回の機能的測定との総合的な検索の結果、凍結速度と細胞内凍結の有無、及びそれらによる機能的障害の関係などが多少は明らかになつたものと思う。従つて吾々の得た所見の凍結速度が大きいほど障害が大きいという事実とその根拠はみとめられてもよいではなからうか。

さて問題の凍結という現象が起るためには当然試料中に含まれる水分の存在が重要な因子となる。しかも試料が均一な溶液である場合は比較的簡単であるが、微生物の浮游液などを扱う場合微生物自体の本来の性状はもちろん細胞の内外にある水分の量や状態などをよく考慮しなければならない。そこで今回は菌体内外の水分を加減する目的でメヂウムに低張、等張、高張液を用いたり、菌の状態を変える意味で高張培地への継代培養や長時間培養など培養条件を変えてみたのであるが、その結果としては菌体内水分の多いと考えられる蒸留水浮游液に於て必ずしも障害の度が大きいわけではなく、むしろ逆に菌体内水分の少ないと思われる高張液に於て障害の大きいことがみとめられた。この場合実際に菌体内水分量を定量したわけではないが、以上のような事実や菌体周囲のメヂウムは溶質の濃度が大きくなるほど凍りにくくなることなどを考え合せても、凍結に伴う障害の機構については簡単な解釈は下せないように思われる。細胞内の凍結の有無は殆ど凍結速度によつてきまり、細胞外の凍結の状態はメヂウムの性状によつて左右されるものと考えてさしつかえないのではあろうが、単に水分の問題ばかりでなく菌体構成諸成分の性質とその変化などをも充分念頭におかねばならぬものと考えられる。

なお本実験では機能検査の手段としてかりに methylene blue 染色法、醗酵力と catalase 活性度の測定等を取りあげて、同一試料について同時観察を行つたが、いずれの機能も概ね平行してほぼ同様の障害を受けることを知つた。このことから凍結によつて酵母がうける障害は菌体全般に及ぶ機械的な影響が主で、代謝過程の一部を阻害するようなある種の化学的因子などとは異なるものと想像される。ただこの場合 catalase の活性値だけが逆になることは小川⁽⁶⁾が別に論じているように、凍結融解によつて菌体自身に含まれる catalase が反応しやすい状態になるばかりでなく菌体から一部遊離した catalase までは作用するためであらうと考えられる。

結 論 微生物の耐寒性機構を知るためにはまず凍結によつておこる障害の本質を究めなければならない。その目的のために種種の条件で培養した酵母を各種のメヂウムで浮游液とし冷却並びに加温の条件を変えながらその菌液の凍結融解を行い、融解後の菌の methylene blue 染色性、醗酵性及び catalase 活性等を検索した。実験の結果、酵母の機能は菌液の凍結融解によつて障害をうけることをみとめた。しかもその障害の程度は冷却の条件、メヂウムの種類、酵母自身の性状等によつて異なることがわかり、前報⁽³⁾の所見と総合して障害の主因は細胞内凍結に基くものと想像されるが、それらの機序については未だ不明の点が多いので今後の研究にまきたい。

御助言をいただいた応用菌学教室佐々木西二教授並に麦汁を分与して下さつたビール会社花田緑朗工場長に感謝します。本研究の一部は文部省科学研究費の補助によつたことを併せて感謝します。

- (1) B. J. LUYET and P. M. GEHENIO : *Bio-dynamica*, No. 33 (1938). 155 (1952).
 (2) O. RAHN : *Bact. Rev.*, Sept. (1945). (5) R. B. HAINES : *Proc. Roy. Soc. London*, B, 124, 451 (1938).
 (3) 根井外喜男 : 農化, 28, 91 (1954). (6) 小川忠人 : 低温科学, 10 輯 (1953).
 (4) 根井外喜男, 秋元 博 : 北海道医誌, 27,

Summary

Some experiments were carried out in order to investigate the resistance of yeast cells against low temperature.

Cells of *Saccharomyces cerevisiae*, cultured and suspended in various sorts of media, were frozen and thawed, varying the conditions of cooling and warming. After thawing, the viability, fermentation and catalase activity of organisms thus treated were measured.

The results obtained were as follows :

- 1) The greater the cooling rate was, the more severely were organisms injured.
- 2) At the warming rate within $3^{\circ}\sim 15^{\circ}/\text{min}$, there was no marked difference in the effect on the organisms.
- 3) The cells, grown in the serial successive broth cultures with hypertensional concentration of glucose, or suspended in hypertensional media, were more intensively affected by freezing and thawing than those in hypotensional conditions.
- 4) When the yeast suspensions were repeatedly frozen and thawed, almost all of the organisms were damaged by the first or second treatment.

夏蜜柑果汁製造に關する基礎的研究 (第 11 報)

果汁中の溶存酸素について

野 村 男 次 (山口大学農学部農芸化学研究室)

昭和 28 年 7 月 20 日 受 理

Fundamental Studies on the Manufacture of Natudaidai Juice.

Part 11. Dissolved Oxygen in the Juice.

By Danji NOMURA. (Facult. of Agr., Yamaguchi Univ.)

1. 緒 言 先に著者は果汁の褐変の原因は溶存酸素にあることを述べた⁽¹⁾が、この外この果汁中の溶存酸素は果汁の貯蔵による悪変のあらゆる原因を形成しており、果汁の製造工程に於いては脱気という工程は是非必要な工程になっている。そのため果汁製造工場ではこの脱気設備に大きい費用をかけている。

果汁の品質を向上させるためには是非この脱気操作を行わねばならない。然し現在日本で市販されているジュースではこの脱気の完全なものが著者の測定では殆んど見当らない現況である(愛媛県産のボンジュースなどは後でその結果をあげるが、かなりの脱気成績をみせている)。これは日本のジュースが所謂日本式のものであつて、天然果汁には程遠いものであり、脱気に対する考慮が余り払れていないためであらう。

果汁中の溶存酸素の測定法には一般的にはガス分析法⁽¹⁰⁾が用いられているが、著者は最近この方面に広く用いられているポーラログラフ法を利用してみた。

ポーラログラフ法を最初に酸素の測定に利用したのは VITEK⁽²⁾氏であるが其の後いろいろ研究されている⁽³⁾。柑橘果汁中のものの測定に應用したのは LINDQUIST⁽³⁾、LEWIS、MCKENZIE⁽⁴⁾の諸氏である。而して LINDQUIST 氏は半波電位、 -0.8 V に於いての測定を、LEWIS 氏等は -0.4 V に於ける測定を報告している。著者はこれらの報文を参考に酸素波の測定を試みた。特にいずれの波の測定がジュースの酸素波測定に適用出来るか、又褐変と酸素波との関係を取り扱つてみた。尙実験に使用したポーラログラフは島津式のものであつた。

2. 実験方法及び結果

(1) 酸素のポーラログラム : Fig. 1 に見るように果汁中の酸素の波は 1 段波で典型的なポーラログラムを与える。これは HARTMAN 氏⁽⁵⁾等がミルク中の酸素の波を求めたのや山田氏⁽⁶⁾等が麦芽汁中の溶存酸素の波を求めたのとよく一致する。一般に酸素は 2 段波を示すのが原則とされているが果汁中では 1 段波を示す。其の原因については LEWIS⁽⁴⁾氏は果汁中の枸橼酸にあるとしているが、著者は後に述べるように林檎酸にあること