ヘキサメタリン酸塩あるいはコール酸塩共存下で凍結された *Escherichia coli* の凍結損傷部位^{*1}

(昭和 59 年 7 月 7 日受理)

金田 弘 拳^{*2} 渡 辺 忠 雄^{*2} 堤 将 和^{*3}

Sites of Injury in *Escherichia coli* Induced by Freezing in the Presence of Hexametaphosphate or Cholate

(Chilling or Freezing Injury of Microorganisms in Chilled or Frozen Foods. Part 1)

Hiroataka KANEDA^{*2}, Tadao WATANABE^{*2}
and Masakazu TSUTSUMI^{*3}

(*2)Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University: Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan;

*3)Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ibaraki University: Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki, Japan)

The location of injured sited in *E. coli* JE1011 induced by freezing and thawing in the presence of hexametaphosphate or cholate was investigated. The lag time of the freeze-injured cells was markedly elongated in a nutrient broth but no effect on the subsequent exponential growth was observed in the same medium. A considerable amount of cell components was released by freezing and thawing with these chemicals in the suspending medium, and the respiratory activities of the injured cells were decreased significantly. These results suggest that the injured sites in the cells are at least partly on the cell membrane. Therefore the permeability of the outer membrane to the substrates was investigated in normal cells and freeze-injured cells with SDH or LDH which is a cytoplasmic membrane-bound enzyme as a marker enzyme. The results indicated that the permeability of the outer membrane was altered by freezing and thawing in the presence of hexametaphosphate or cholate.

(Received July 7, 1984)

Key words: ヘキサメタリン酸塩 hexametaphosphate; コール酸塩 cholate; 凍結損傷菌 freeze-injured cells; 大腸菌 *Escherichia coli*; 呼吸活性 respiratory activity; コハク酸脱水素酵素 succinate dehydrogenase; 乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase; 細胞膜結合酵素 membrane-bound enzymes

食品の凍結は重要な食品保蔵法の一つである。また多くの場合食品を生鮮状態で保存できるため、製造業者あるいは消費者にとっても理想的な食品保蔵法といえる。

*1 低温貯蔵食品中の微生物の低温損傷 (第1報)

*2 九州大学農学部食糧化学工学科; 福岡県福岡市東区箱崎

*3 茨城大学農学部畜産学科; 茨城県稲敷郡阿見町

従って近年は保存性, 安全性, 栄養性に加えて経済性, 嗜好性, 便宜性をも満たした冷凍食品が市場に数多く出回るようになり, 食生活の上でも大きな変化を与えている。しかし一方ではまだ多くの問題が残されている。その一つとして低温貯蔵食品の微生物汚染に関する問題がある。すなわち微生物は凍結するだけでは完全に殺菌されないため, 適当な生育環境におかれると再び増殖して

くることはよく知られている。従って若し食品が微生物汚染を受けたまま低温貯蔵されるとすれば、これは食品衛生上重要な問題を含むことになる。著者らは予期せぬ食品の変敗、食中毒の発生を防止するための基礎的研究を行った。特に凍結-解凍と薬剤添加の併用による食品の長期保存を目指し、本実験を企画した。この方法により多くの微生物は凍結損傷を一層促進し、場合によっては死滅することも期待できる。なおこの併用効果に関してはすでに高野^{1),2)}、芝崎³⁾、著者ら⁴⁾によっても研究が行われ、多くの成果が得られているが、薬剤の違いによる作用の違いや凍結損傷部位の解明など、まだ研究の及ばない部分が残されている。従って本報告では、多くの薬剤に対して比較的抵抗性の強いグラム陰性菌の一つとして、また汚染指標細菌でもある大腸菌を用い、これまで報告が見当たらないヘキサメタリン酸塩並びにコール酸塩共存下での凍結損傷とその部位について検討した。

実験材料並びに実験方法

1. 試薬類

- 1) コール酸ナトリウム：半井化学 KK 製、特級品
- 2) ヘキサメタリン酸ナトリウム：ポリホス化学 KK 製
- 3) エールリッヒ肉エキス：極東製薬 KK 製
- 4) ポリペプトン：大五栄養化学 KK 製
- 5) その他の試薬類はすべて市販の特級品または一級品を使用した。

2. 供試菌

大腸菌は東京大学応用微生物研究所の松橋通生教授より分譲していただいた菌株で、*E. coli* K-12 株由来の *E. coli* JE 1011 を用いた。

3. 培地並びに培養

培地は 1% 肉エキス-ポリペプトン培地 (肉エキス 10 g, ポリペプトン 10 g, 水 1000 ml, pH 7.0) を用い、30° で振とう培養を行った。

4. 菌液の調製

斜面培養より 1 白金耳を培地に接種し、30° で 1 夜振とう培養した。この前培養液 0.5 ml を培地 9.5 ml に加え、同条件で対数期中期まで培養を行い、集菌、洗浄後滅菌水を加え、660 nm の吸光度を 0.30 ($OD_{660}=0.30$) として菌液とした。なお各種漏洩物質、基質酸化能、酵素活性などの測定では菌液の濃度を $OD_{660}=1.10$ として用いた。

5. 凍結-解凍の条件

菌液 0.5 ml をそれぞれの試験液 9.5 ml に加え、滅菌シャーレに移し、-20° の冷凍室にて凍結した。1 週間後シャーレを取り出し、室温 (20°) に放置して解凍した。なお冷却速度は試験区 (滅菌水) で 4°/min (0° まで)、その後 1.3°/min (-20° まで) であった。未凍結区として 50% グリセリン区を設けた。その冷却速度は

1.7°/min (-20° まで) であった。解凍すなわち液化までの加温速度は試験区で 1.0°/min、50% グリセリン区では 2.5°/min であった。

6. 凍結-解凍による損傷の測定

一般に損傷菌の識別は 2 種の培地 (例えば選択培地と非選択培地) を用いて行われるが、本実験では損傷の程度をより細かく知るために、一定条件下での増殖の遅れを指標として示した。すなわち培地 8.5 ml に正常な菌液 (正常菌) あるいは滅菌水中で凍結-解凍した菌液 (処理菌) 0.5 ml、滅菌水 1.0 ml を加え、30° で振とう培養を行い、経時的に菌の増殖を測定し、これを対照区とした。また正常菌に指定濃度の薬剤 (pH 7.0) を添加した後すばやくその 0.5 ml を培地 8.5 ml に加え、さらに滅菌水 1.0 ml を加えたものも対照区としてその増殖を測定した。試験区は指定濃度の薬剤を共存させて菌を凍結-解凍した後対照区と同様にその増殖を測定した。なお OD_{660} の測定は東京光電 KK 製の光電比色計 ANA-1 型を用いた。

7. 生菌数の測定

3. で示した培地組成に寒天 15 g を加えて寒天培地を調製した。生菌数の測定は平板法で行った。すなわち試料 1.0 ml を直径 90 mm の滅菌シャーレにとり、寒天培地 20 ml を添加して均一になるように混合した。平板作成後さらに 0.5% 寒天液 5.0 ml を加えて重層し、30° で 48 時間培養し、出現したコロニー数を算出した。なお菌液の希釈は 10 倍希釈法で行った。また 1 サンプルに 5 枚の平板を作成し、出現コロニー数の特に多いものあるいは少ないものは除外して 1 枚当りの平均値を求めた。

8. 各種漏洩物質の測定

凍結-解凍した菌液を 4° で遠心分離 (20,000×g, 5 分間) した後、その上清中の菌体成分を以下の方法で測定した。

タンパク質：牛血清アルブミンを標準物質として Lowry 法⁵⁾ で定量した。

リポ多糖類：供試菌から調製したリポ多糖画分を標準物質として、チオバルビツール酸法⁶⁾ で測定した。

リン脂質：Bligh & Dyer 法⁷⁾ に従って脂質画分を得、その画分中のリンを定量した⁸⁾。なおリン脂質含量は定量したリン含量に 25 を乗じて表示した。

マグネシウム：原子吸光分析法により定量した。原子吸光分析装置は東芝ベックマン NF-IB (Mg カソードランプ、波長 2,852 Å) を用いた。

紫外外部吸収物質：分光光度計 ((株) 日立製作所製, 139 型) を用いて 260 nm の吸光度 (A_{260}) を測定した。結果の表示は $A_{260}=0.22$ を 10 $\mu\text{g/ml}$ として算出した。

なおそれぞれの分析値は滅菌下の五酸化リン上で乾燥した乾燥菌体重量当りの値として表示した。

Fig. 1. Growth of *E. coli* frozen and thawed in the presence of sodium cholate (SC)

○—○, control-1 (unfrozen); ⊙—⊙, control-2 (frozen); △—△, 0.1% SC; △—△—△, 0.5% SC; △—△—△—△, 1.0% SC; ●—●, 50% glycerin; ▲—▲, 0.1% SC-50% glycerin; ▲—△—△, 0.5% SC-50% glycerin; ▲—△—△—△, 1.0% SC-50% glycerin

Fig. 2. Growth of *E. coli* frozen and thawed in the presence of hexametaphosphate (HP)

○—○, control-1 (unfrozen); ⊙—⊙, control-2 (frozen); △—△, 0.1% HP; △—△—△, 0.5% HP; △—△—△—△, 1.0% HP; ●—●, 50% glycerin; ▲—▲, 0.1% HP-50% glycerin; ▲—△—△, 0.5% HP-50% glycerin; ▲—△—△—△, 1.0% HP-50% glycerin

9. 基質酸化能の測定

終濃度が 10 mM の基質 (D-glucose, DL-lactate, succinate, L-malate, pyruvate) それぞれを含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液中で菌体の基質酸化能を酸素電極 (Rank Brothers 社製, クラーク型電極) を用いて測定した。

10. 脱水素酵素活性の測定

菌体のコハク酸脱水素酵素 (SDH) 及び乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。測定法は Slater & Bonnen⁹⁾ の方法を若干改変した方法¹⁰⁾で行った。

結 果

1. 薬剤共存下での凍結損傷

ヘキサメタリン酸塩 (HP) あるいはコール酸塩 (SC)

Table 1. Growth of *E. coli* JE 1101 Frozen and Thawed in the Presence of HP or SC

Chemical	Unfrozen	Storage at -20°C	
		50% Glycerin	Sterile water
Control	6.0 ^(hr)	7.9 ^(hr)	9.8 ^(hr)
0.1% SC	6.0	7.4	16.1
0.5% SC	9.0	7.3	16.4
1.0% SC	10.1	8.7	19.1
0.1% HP	7.8	10.8	17.1
0.5% HP	8.2	14.8	18.5
1.0% HP	9.3	16.7	23.8

* Each value shows the time until OD₆₆₀ reached 0.25.

Table 2. Viable Counts of *E. coli* Frozen and Thawed in the Presence of HP or SC

Chemical	Viable counts/ml
Control-1*	8.0 × 10 ⁷
Control-2**	3.8 × 10 ⁵
0.1% SC	9.5 × 10 ³
0.5% SC	9.0 × 10 ³
1.0% SC	8.3 × 10 ²
50% Glycerin	2.0 × 10 ⁷
0.1% SC-50% glycerin	9.3 × 10 ⁶
0.5% SC-50% glycerin	5.0 × 10 ⁶
1.0% SC-50% glycerin	7.0 × 10 ⁵
0.1% HP	8.3 × 10 ²
0.5% HP	8.3 × 10 ²
1.0% HP	1.2 × 10 ²
0.1% HP-50% glycerin	4.1 × 10 ⁴
0.5% HP-50% glycerin	9.6 × 10 ³
1.0% HP-50% glycerin	1.0 × 10 ³

* Unfrozen cells (normal cells)

** Frozen cells (without chemicals)

共存下で凍結-解凍した菌の増殖を Fig. 1 と Fig. 2 に示した。凍結-解凍を行った菌 (処理菌) はすべて誘導期の延長が認められたが、対数期の増殖には影響がみられなかった。従って以後 OD₆₆₀ が 0.25 上昇するまでの時間を測定し、損傷の程度を示した。

Table 1 から明らかなように、凍結-解凍を行わなかった菌では HP, SC の影響をそれ程強く受けなかった。しかし HP, SC 共存下で凍結-解凍処理した菌 (薬剤処理菌) は著しく増殖が遅れたことから、菌の損傷も大きいものと思われる。また未凍結の 50% グリセリン中で保存した菌 (未凍結菌) では、HP の影響は認められたが、SC 添加の影響はほとんど認められなかった。

Table 3. Release of Cell Components from *E. coli* Frozen and Thawed in the Presence of HP or SC

Cell component	Values of released components		
	Control*	1.0% SC	1.0% HP
Protein	20.3 (3.6)	225.0 (39.8)	64.4** (11.4) ***
Phospholipid	2.0 (2.7)	35.9 (48.5)	2.6 (3.5)
Lipopolysaccharide	0.8 (1.9)	16.5 (40.7)	7.0 (17.3)
Magnesium	0.1 (2.5)	1.1 (28.2)	3.3 (86.8)
UV-absorbing substance	15.1	42.0	23.2

* Cells frozen and thawed without chemicals

** Each value is calculated on the basis of cell dry weight (mg/g dry weight).

*** Percentage to each component is listed in parenthesis.

Table 4. Respiratory Activities of *E. coli* Frozen and Thawed in the Presence of HP or SC

Substrate	Respiratory activities			
	Unfrozen	Storage at -20°C		
		Control*	1.0% SC	1.0% HP
D-Glucose	401	0	0	0**
Succinate	378	31	11	227
DL-Lactate	810	65	0	270
L-Malate	66	0	0	0
Pyruvate	362	0	0	0

* For control, see Table 3.

** Each value shows oxygen uptake (ng atom of oxygen/min/mg protein).

2. 生菌数の測定

薬剤処理菌の増殖の遅れをより正確に知るために各試験区の生菌数を測定した。Table 2 から明らかなように、生菌数は凍結-解凍処理によってかなり減少した。また薬剤共存下で凍結-解凍処理を行うと生菌数はさらに減少し、この傾向は SC よりも HP 共存下で大きかった。なお Table 2 の結果から、Fig. 1, Fig. 2 でみられた増殖の遅れは、菌の凍結損傷に加えて生菌数の著しい減少にも起因することが明らかとなった。

3. 凍結-解凍により漏洩する菌体成分

Table 3 で示したように、SC 共存下で菌を凍結-解凍すると、菌体の重要な構成成分であるタンパク質、リン脂質、リポ多糖類などの著しい漏洩がみられた。一方 HP 共存下の場合 SC に比べ漏洩量は少なく、とりわけリン脂質の漏洩は微量であった。しかしマグネシウムは全菌体の約 90% が漏洩した。結果の図示は省略したが、漏洩した紫外外部吸収物質を酸加水分解した後、ペーパークロマトグラフィーで核酸系物質を分析した。その結果、アデニンとグアニン、ウラシルのみが検出され、

シトシンとチミンは検出されなかった。

4. 基質酸化能

Table 4 から明らかなように、菌を凍結-解凍すると D-glucose, L-malate, pyruvate の酸化能は消失した。succinate, DL-lactate の酸化能も大きく減少した。SC 共存下で凍結-解凍を行うと、succinate の酸化能はさらに減少し、DL-lactate の酸化能は消失した。一方 HP 存在下の場合、succinate, DL-lactate の酸化能は正常菌の場合に較べると減少しているものの、SC 共存下の菌あるいは対照区の菌に較べると、その酸化能は安定に保たれていた。

5. 酵素活性

Table 5 から明らかなように、菌の凍結-解凍処理は、細胞質膜結合酵素である SDH や LDH の活性を増大した。一方 HP 共存下で凍結-解凍を行うと、SDH や LDH 活性はさらに増大した。しかし SC 共存下の場合、SDH 活性は増大したが、LDH 活性は消失した。また両酵素の漏洩についても検討したが、薬剤共存下で凍結処理しても、酵素の漏洩は全く認められなかった。

Table 5. Enzyme Activities of *E. coli* Frozen and Thawed in the Presence of HP or SC

Enzyme	Enzyme activities			
	Unfrozen	Storage at -20°C		
		Control*	1.0% SC	1.0% HP
Succinate dehydrogenase	0.03	0.60	0.56	1.48**
Lactate dehydrogenase	0.44	0.87	0	1.36

* For control, see Table 3.

** Each value shows the enzyme activities ($4E_{400} \times 10^2/\text{min/mg protein}$).

考 察

一般にグラム陰性菌は凍結損傷を受けやすいが、薬剤に対しては比較的抵抗性である。一方グラム陽性菌は凍結損傷を受けにくい種々の薬剤に対して感受性のものが多い。従って凍結-解凍と薬剤作用の併用は多くの菌に対してより効果的な増殖抑制作用が期待できる。例えば高野ら¹⁷⁻²⁰⁾はサルモネラ菌を用い、ラウレートまたはその誘導体共存下で凍結-解凍を試み、菌に対する致死効果のあることを明らかにした。また Souzu は酵母を用いて、凍結-解凍処理が菌体内の酵素に及ぼす影響について検討している。しかし SC あるいは HP 共存下で凍結-解凍処理を行い、殺菌効果あるいは静菌効果を明らかにした報告は見当らなかった。そこで著者らは大腸菌 (*E. coli* JE 1011) を用いてこれらの点を検討した。その結果、SC あるいは HP 共存下で凍結-解凍することにより、本菌の凍結損傷は大きく促進され、解凍後の菌の増殖を著しく遅延した。なお黄色ブドウ球菌の場合は SC 存在下で凍結すると、凍結期間中にも徐々に損傷が進み、解凍後の増殖も凍結期間に比例して遅延することが報告されているが⁴⁾、本菌の場合は凍結期間の延長に伴う増殖の遅れは認められなかった。

次に SC あるいは HP の凍結損傷促進作用の作用部位について検討した。種々の菌の凍結損傷に関してはこれまでも数多くの研究がなされ、森地によってその概要が紹介されている¹²⁾⁻¹³⁾。これによると、共通的な変化として細胞膜の損傷とそれに伴う膜透過性の変化が指摘されている。一方著者らは SC や HP が細菌の細胞膜に作用して、菌体成分を漏洩させることを明らかにした^{14), 15)}。そこでこの処理にさらに凍結処理を加えることにより、より大きな損傷促進を期待して実験を行った。その結果、SC はタンパク質、リン脂質、リポ多糖類を、HP はマグネシウムを著しく漏洩させた。以上のように、SC あるいは HP 共存下で凍結-解凍することは、本菌の膜系に損傷を与えていると考えられるので、膜系に存在する呼吸系に注目してさらに検討を進めた。なおこの分野の研究として荒木、僧都らの報告がある。荒木¹⁶⁾は酵母の凍結損傷を解明するため、酵母のミトコン

影響について検討した。また肝臓ミトコンドリア膜の凍結損傷についても詳しく検討し¹⁷⁾⁻¹⁹⁾、呼吸系のどの部位が凍結損傷を受けるのかを明らかにした。一方僧都^{11), 20)}は酵母を用い、凍結-解凍処理が酵母の細胞膜脂質に変化を与えることを明らかにし、リパーゼ系の酵素活性との関連について言及している。また凍結による大腸菌の細胞膜の破壊と細胞膜酵素の活性変動との関連について報告している²¹⁾。著者らも本報告において、凍結-解凍処理が大腸菌の膜機能に影響を与えることを明らかにした。すなわち本菌は凍結-解凍処理によって呼吸能が低下し、基質によってはその酸化能が消失した。この原因として電子伝達系、輸送系の損傷が考えられる。特にコハク酸と乳酸を基質とした場合は他の基質の電子伝達系と異なり途中 NADH を基質としない、コハク酸と乳酸の酸化能のみが完全に消失しなかった原因の一つとして、以上のような電子伝達系の違いが考えられる。

次に酸化能低下の原因をさらに明確にするために、細胞質膜の結合酵素であり、電子伝達系においても重要な役割を演じているコハク酸脱水素酵素 (SDH) 並びに乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の凍結処理による変動を測定した。その結果本菌の凍結-解凍処理は両脱水素酵素の活性を高めた。これは菌の外膜が損傷を受け、基質の外膜透過が促進されていることを示唆する。この現象は HP 存在下で凍結-解凍することによりさらに促進された。一方このことは電子伝達系においてこの酵素系が凍結-解凍処理によって、それ程強い損傷を受けていないことを示している。なお SC 存在下で凍結-解凍処理を行うと、LDH 活性が消失した。この原因は現在のところ明確ではないが、少なくとも LDH が細胞質膜より遊離し、細胞外に漏洩したためではなかった。

以上凍結損傷と薬剤作用の併用効果並びに作用機作について若干の知見を得ることができたが、本菌の呼吸系の損傷についてはチトクローム系を含め電子伝達系をさらに詳細に検討する必要がある。また膜系以外の損傷部位についても検討し、併用効果の発現機作をより包括的に解明する必要があると考える。

要 約

HP あるいは SC 共存下で凍結-解凍された *E. coli* の凍結損傷と損傷部位について検討した。

1. HP や SC は *E. coli* に対してほとんど抗菌力を示さず、また著しい損傷も与えなかった。しかしこれらの物質の共存下で菌の凍結-解凍を行うと、菌の損傷は大きく、また生菌数の著しい減少もみられ、結果として普通ブイヨンでの lag time の延長が認められた。なお未凍結での低温処理 (50% グリセリン中) では HP の影響のみがみられた。

2. 菌の凍結解凍処理は菌体成分の漏洩を促進した。SC 共存下ではタンパク質、リン脂質、リポ多糖類が、HP 共存下の場合はマグネシウムの顕著な漏洩が認められた。

3. 薬剤非共存下でも菌の凍結解凍処理は glucose, malate, pyruvate の基質酸化能を阻害した。また succinate, lactate の酸化能も減少した。SC 共存の場合 succinate の酸化能はさらに減少し、lactate の酸化能は完全に消失した。HP 共存下では SC 共存の場合と比べ酸化能の低下は軽微であった。

4. 菌の凍結解凍処理は薬剤非共存下でも SDH や LDH 活性をみかけ上増大した。HP を共存させた場合、これらの酵素活性はさらに増大したが、SC 共存下では LDH 活性のみ消失した。

5. 以上の結果から、HP あるいは SC 共存下での凍結解凍処理による損傷部位は菌の膜系であると思われる。なお菌の外膜透過性が著しく増大していることを酵素実験により明らかにした。

文 献

- 1) Takano, M., Nguitragol, M., Shibasaki, I.: Cryobiology **15**, 692 (1978).
- 2) Takano, M., Simbol, A. B., Yasin, M., Shiba-

saki, I.: J. Food Sci. **44**, 112~115 (1979).

- 3) 芝崎 勲: “新・食品殺菌工学” p. 403~408 (1983) 株式会社光琳.
- 4) 堤 将和, 松岡麻男, 正崎栄一郎, 竜口和恵, 渡辺忠雄: 食衛誌. **19**, 426~430 (1978).
- 5) Lowry, O. H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L., Radall, R. J.: J. Biol. Chem. **193**, 265~275 (1951).
- 6) Osborn, M. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. **50**, 499~505 (1963).
- 7) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: Can. J. Biochem. Physiol. **37**, 911~917 (1957).
- 8) 山本 章, 足立 進, 石部 武: 臨床栄養 **19**, 121~165 (1972).
- 9) Slater, C. E., Bonnen, W. D.: Biochem. J. **52**, 185~196 (1952).
- 10) 堤 将和, 尾山勇一, 須田郁夫, 渡辺忠雄: 九大農学芸誌. **35**, 89~95 (1981).
- 11) Souzu, H.: Cryobiology, **10**, 427~431 (1973).
- 12) 森地敏樹: 化学と生物, **7**, 400~406 (1969).
- 13) 森地敏樹: “最新食品微生物制御 システム データ集” p. 151~182 (1983) サイエンスフォーラム.
- 14) 堤 将和, 成田 環, 松岡麻男, 渡辺忠雄: 食衛誌. **21**, 283~287 (1980).
- 15) 須田郁夫, 宮山哲夫, 松岡麻男, 堤 将和, 渡辺忠雄: 農化. **55**, 111~116 (1981).
- 16) 荒木 忠: 低温科学. **27**, 31~40 (1969).
- 17) 荒木 忠: 同上, **28**, 1~9 (1970).
- 18) 荒木 忠: 同上, **30**, 23~31 (1972).
- 19) 荒木 忠: 同上, **33**, 1~9 (1975).
- 20) 僧都 博: 同上, **27**, 23~30 (1969).
- 21) Souzu, H.: Cryobiology **15**, 690 (1978).