



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酵母のカタラーゼに及ぼす低温の影響 : 第1報 生酵母菌体のカタラーゼに及ぼす低温の影響
Author(s)	小川, 忠人; OGAWA, Tadato
Citation	低温科学, 10, 175-185
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17554
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p175-185.pdf



酵母のカタラーゼに及ぼす低温の影響

第1報 生酵母菌体カタラーゼに及ぼす低温の影響*

小 川 忠 人

(低温科学研究所 醫學部門)

(昭和27年9月受理)

緒 言

生体細胞の機能は種々の物理的・化学的な条件によつて左右される。そのうち物理的要因の一つとしての低温、殊に凍結による影響については、既に多くの生物について種々の条件の下に調べられている¹⁻³⁾。そして得られた成績は生体乃至細胞の種類により、また低温の条件によつて甚だ複雑多岐である。

一般に比較的大きな細胞は一旦凍結すれば殆んど死に至るのに反して、微生物は概して低温に對して甚だ抵抗が強いという特性を持つている。例えば微生物を含む材料を凍結させても、それによつて微生物の受ける影響というものは案外に少ない。従つて微生物の保存の目的に凍結状態のままにしておくことが行われる位である。然しその中でもわりあい形態の大きい酵母の如きものは凍結の条件如何によつてはかなり死滅することが知られている。例えば細胞内に凍結が起れば酵母は死滅するが細胞外凍結だけの時は死に至らないとの事實がみとめられている³⁾。

そこでいかなる機轉でかかる機能障害が起るかを究めるために我々の協同実験者は種々の条件下で低温処理した場合の酵母の機能を各方面から検索中である⁴⁾。著者は酵母の有する酵素の中で、比較的簡単に菌体から分離精製出来る酵素としてカタラーゼを取上げ、菌体内にあるカタラーゼ並びに菌体より分離精製したカタラーゼが、凍結融解の操作によつて如何なる影響をうけるかを追究した。

實 験 方 法

本學應用菌學教室より分與された *Saccharomyces cerevisiae* S. 214 株を用い、麥芽汁寒天の 30°C 1 夜培養菌苔を集めて 3 回遠沈洗滌し、10 倍の蒸溜水浮遊液とした。

* 北海道大學低温科学研究所業績 第 152 號。

之を直径 2 cm の平底試験管に 1cc 入れ、菌液の中央に熱電對の先端を挿入し、冷却に伴う菌液自身の温度變化を記録した。

低温處理の方法は、冷却速度及び冷却温度をいろいろに變える爲に次のようにして行つた。

即ち寒劑には飽和鹽化カルシウム溶液 (豫め -20°C 及び -30°C に冷却したもの) 並びに液体空氣を用い、急速に冷却するには試験管を直接寒劑に浸し、緩慢に冷却するには試験管に二重管を被せて寒劑中に入れた。かくして菌液が周圍より冷されると、次第に温度は低下しやがて凍結するが、更にそのまま放置すると引續き温度は低下して寒劑の温度に接近する。熱電對の讀みから所定の温度に達したことを知ると、試験管を寒劑から引出して 20°C の温浴槽に入れるか (急速融解の場合)、室温 ($10\sim 15^{\circ}\text{C}$) に放置して (緩慢融解の場合) 融解させた。

菌液の融解後、それぞれ一定濃度迄稀釋し、次のようにしてカタラーゼの活性度を測定した。

カタラーゼの定量法には生成酸素ガス容量的測定法と滴定法とがある。酵母、細菌等のカタラーゼ作用檢索には後者に従うものが多い。これはカタラーゼによつて過酸化水素が分解されることを利用し、反應前後に於ける過酸化水素の量を過マンガン酸カリ液で滴定するもので、カタラーゼ活性度 (Kat. *f.*) は Euler-Josephson の式⁵⁾

$$\text{Kat. } f. = \frac{\text{反應恒數 } k}{\text{酵素量 (gr)}}$$

或は Virtanen-Karström⁶⁾ の式

$$\text{Kat. } f. = \frac{\text{反應恒數 } k}{\text{細胞數}}$$

を以て表わすのが適當と云われている。 k の値は次式から計算される。

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$$

t : 反應時間
 A : 最初の過酸化水素の濃度
 $A-x$: 反應後の過酸化水素の濃度

この式については異論もあるが、Euler & Blix⁷⁾ (1919) は酵母菌に於ける實驗で、過酸化水素濃度が比較的低い場合には適合すると云い、Hennichs⁸⁾ (1926) はその場合の過酸化水素濃度を 0.015 N と發表している。本實驗に於ては次の様な反應系を用いた。

N/100 過酸化水素液	5.0 cc
M/15 燐酸緩衝液 (pH 6.8)	5.0 cc
酵母菌液 (凍結融解菌液を更に 5 倍に稀釋)	1.0 cc
蒸留水を加えて總量を 50 cc とす	

之を 20°C で 30 分作用させた後、10% 硫酸を 10 cc 加えてカタラーゼ作用を停止せしめ、残つた過酸化水素量を N/100 過マンガン酸カリ液で滴定した。

カタラーゼ活性度測定は通常 0°C で反應させるが、酵母菌体を破壊せずにその作用を最大に

するには 20°C が適當であり、また一方實驗の都合で濃厚菌液を大量に用いられないにも拘らず、測定値をなるべく大きくする必要があるので 20°C で反應せしめた。

以上の條件の範圍では k の値は酵母量に概ね比例することが豫備實驗で確められた。なお本實驗に於ては主として無處理對照との比較を目的としたので、乾燥菌量 1 mg 當りの k の値 (k/mg) を以て活性度を比較した。

カタラーゼ測定法としては一部 Warburg 檢壓計による發生酸素容量の測定も行つた。此の場合次の反應系を用い、20°C で測定した。

{	菌液	0.5 cc	} 主室
	M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8)	1.0 cc	
	0.31 M 過酸化水素	0.1 cc	} 側室
	20% KOH	0.3 cc	} 副室
更に呼吸を抑制するため N/10 HCN を 1 滴加える			

實驗成績

1) 室温放置時間とカタラーゼ活性度

所要の實驗が完了するまで對照を放置するために、室温 (15~20°C) でのカタラーゼ活性度の變化を調べてみたが、24 時間後に於ても極めて僅かの減少を示すにすぎない。(第 1 表)

第 1 表 室温放置時間とカタラーゼ活性度 ($k \cdot 10^3/mg$)

経過時間	實 験 例			平均値
	No. 1	No. 2	No. 3	
對 照	0.88	0.85	0.83	0.85
2 時 間	0.86	0.79	0.87	0.84
5 時 間	0.82	0.63	1.01	0.82
24 時 間	0.84	0.76	0.80	0.80

2) 冷却速度及び融解速度を變えた場合

實驗方法の項で述べたようにして、いろいろと冷却速度や融解速度を變えて實驗を行つた時の冷却曲線及びカタラーゼ活性度の値は第 1 圖及び第 2, 3, 4 表の通りである。

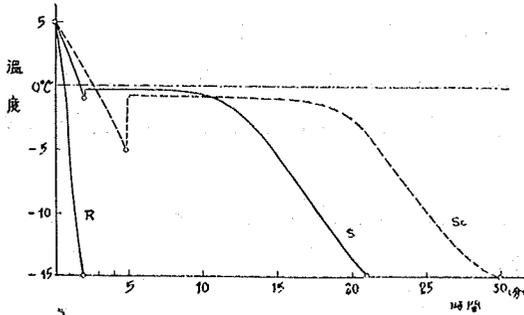
表の示すところによれば、

- (1) 冷却速度の大きいほどカタラーゼ活性度は大きくなる。
- (2) 融解速度はこの範圍内 (15°C/分~30°C/分) では大差は認められない。

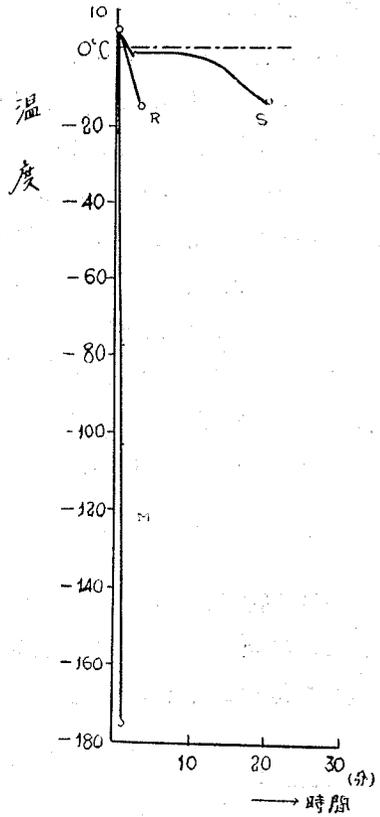
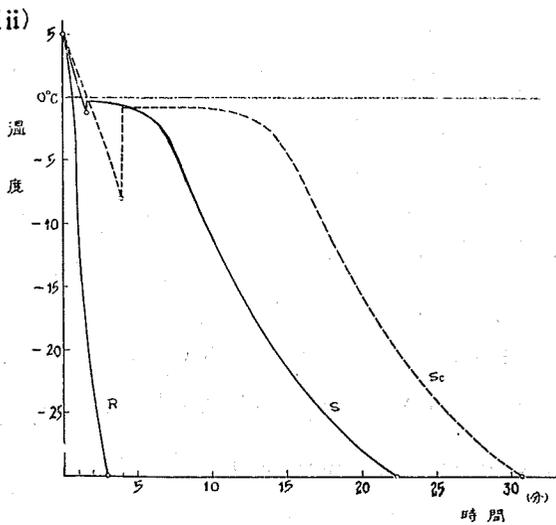
以上のような成績から、

- (A) 液体空気で急速に -180°C まで冷却したもの (M) が最も影響が大きく、
- (B) -15°C までブラインで緩慢に凍結させたもの (S) が最も影響が少なく、
- (C) -15°C までブラインで急速に凍結させたもの (R) はその中間の値を示す。

(i)



(ii)



第1圖 冷却曲線

第2圖 冷却曲線

i -45°Cまで冷却した場合 ii -30°Cまで冷却した場合
 R: 急速冷却 S: 緩慢冷却 Sc: 緩慢冷却 (過冷却した場合)

第2表 -15°Cまで冷却した場合 ($k \cdot 10^3 / \text{mg}$)

處理條件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.67	0.76	0.66	0.74	0.71	100
S-S	0.74	0.79	0.68	0.78	0.75	105
S-R	0.71	0.77	0.71	0.81	0.75	106
Sc-S	0.97	0.99	0.83	0.89	0.91	128
Sc-R	0.69	0.84	0.77	0.96	0.81	114
R-S	0.72	0.81	0.73	0.82	0.77	108
R-R	0.83	0.89	0.86	0.91	0.88	124

註 S-S: 緩慢凍結~緩慢融解
 S-R: 緩慢凍結~急速融解
 Sc-S: 過冷却後緩慢凍結~緩慢融解
 Sc-R: 過冷却後緩慢凍結~急速融解
 R-S: 急速凍結~緩慢融解
 R-R: 急速凍結~急速融解

以下各表とも同様

第3表 -30°Cまで冷却した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

処理条件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.79	0.72	0.81	0.77	0.77	100
S-S	0.92	0.94	1.12	0.95	0.98	128
S-R	0.93	0.92	1.15	0.89	0.97	125
S _c -S	0.98	0.96	1.64	0.86	1.11	144
S _c -R	0.98	0.97	1.09	0.94	0.99	129
R-S	1.13	1.04	1.19	1.78	1.29	167
R-R	1.07	1.10	1.14	1.11	1.11	143

第4表 液体空気で冷却した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

処理条件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	100
R-S	1.67	1.68	1.74	1.74	1.71	194
R-R	1.83	1.82	1.80	1.82	1.82	206

とみとめられたので、これから後の実験は比較的極端なこの3つの条件について行つた。

此の場合の冷却曲線は第2圖に示す通りである。但し (c) の場合の冷却条件をなるべく一定させるため、過冷却を起させない様にした。尙融解速度は急速融解法に依ることにした。

3) 菌液のメヂウムを變えた場合

前項までは凍結の条件によつていかに菌体が影響をうけるかを、蒸溜水に浮遊した場合について調べたのであるが、更に菌液を作る際のメヂウムの種類によつて菌体自身の性状は勿論、菌液そのものの凍結の様式も變ると考えられるので、かかる場合の菌体カタラーゼの機能状態を検討してみた。その結果は第5, 6, 7表に示すように、

第5表 蒸溜水に浮遊した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

処理条件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.88	0.79	0.85	0.86	0.85	100
S	0.96	0.87	0.92	0.95	0.93	109
R	1.22	1.08	1.27	1.19	1.19	141
M	1.61	1.42	1.53	1.59	1.54	182

註 S: -15°Cまでブラインで緩慢凍結したもの
 R: -15°Cまでブラインで急速凍結したもの
 M: -180°Cまで液体空気で急速凍結したもの } 以下同様

第6表 0.3Mグルコース溶液に浮遊した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.82	0.82	0.74	0.74	0.78	100
S	0.94	0.94	0.81	0.81	0.87	112
R	1.02	1.02	0.88	0.94	0.96	123
M	1.13	1.11	1.11	1.10	1.11	144

第7表 1.0Mグルコース溶液に浮遊した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.99	0.90	0.90	0.89	0.90	100
S	1.00	0.99	0.98	1.02	0.99	111
R	1.40	1.34	1.45	1.54	1.43	159
M	1.68	1.76	1.74	1.64	1.70	189

等張液と思われる0.3Mグルコース溶液に於て最も變化少なく、低張、高張の蒸留水、1.0Mグルコース溶液に於ては、等張液の場合より影響が大きいことが認められる。

更に保護膠質と考えられるゼラチンの0.3%溶液に浮遊させた場合は、等張液の場合とほぼ同様の成績を示している。(第8表)

第8表 0.3%ゼラチン溶液に浮遊した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.88	0.90	0.87	0.90	0.89	100
S	1.03	0.99	1.07	0.98	1.02	114
R	1.28	1.38	1.26	1.27	1.30	146
M	1.19	1.48	1.16	1.33	1.29	145

4) 培養條件を變えた場合

いろいろな條件を變えて培養した酵母について低温處理によるカクラーゼの影響を調べてみると次の様である。

(1) 陳舊培養の場合：30°Cに5日間培養した酵母では、無處理の對照に於て既に正常培養のものに比べて k 値は増加しており、低温處理したものではグルコース浮遊液特に等張溶液に浮遊したのもでもかなり大きな影響をうけることがわかつた。(第9, 10, 11表)

(2) 高張培養の場合：さきの實驗で高張糖液をメヂウムに用いた場合には、菌体カクラーゼにかなり大きな影響を認めたので、更に此の點を確める意味で、高張培地に馴らした酵母について低温處理を行つてみた。それには0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5Mと順次にグルコースの含有

第9表 陳舊培養：蒸留水に浮游した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 驗				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	1.23	1.28	1.28	1.26	1.26	100
S	1.79	1.83	1.80	1.80	1.81	144
R	2.37	2.32	2.37	2.36	2.35	186
M	2.26	2.42	2.47	2.55	2.40	190

第10表 陳舊培養：0.3Mグルコース溶液に浮游した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 驗				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.68	0.68	0.89	0.89	0.79	100
S	0.88	0.91	1.12	1.08	0.99	121
R	3.33	3.29	2.79	2.78	3.05	386
M	4.10	4.17	3.92	3.94	4.04	514

第11表 陳舊培養：1.0Mグルコース溶液に浮游した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 驗			例	
	No. 1	No. 2	No. 3	平均値	平均値%
對 照	0.98	0.97	0.98	0.98	100
S	1.06	1.07	1.05	1.06	108
R	1.87	1.92	2.09	1.94	198
M	4.20	4.20	4.44	4.28	437

第12表 高張糖加培地培養：蒸留水に浮游した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 驗				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	1.01	1.01	1.05	1.06	1.03	100
S	1.04	1.19	1.14	1.13	1.13	110
R	1.62	1.46	1.60	1.67	1.59	153
M	1.86	1.80	1.74	1.98	1.84	179

第13表 高張糖加培地培養：1.5Mグルコース溶液に浮游した場合 ($k \cdot 10^3/mg$)

處理條件	實 驗				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.33	0.34	0.35	0.33	0.34	100
S	0.39	0.46	0.42	0.35	0.40	118
R	2.84	2.68	2.76	2.81	2.77	815
M	2.87	3.13	2.98	2.86	2.96	870

濃度をたかめた麦芽汁寒天培地に繼代培養した酵母を用い、蒸溜水と 1.5 M グルコース液（最後の培地と同濃度）との浮遊液についてカタラーゼを測定した。（第 12, 13 表）

即ち蒸溜水浮遊液の場合は正常培養のものとは大差はないが、1.5 M グルコース浮遊液のものは、無処理対照の k/mg 値は極めて小さいのに凍結融解を行うと対照に比べて甚だ大きな値を示すようになる。

5) 凍結融解を反覆した場合

以上の実験は何れもただ 1 回の凍結融解を行つた場合であるが、更にこれを繰返した場合に菌体は如何なる影響をうけるかを追求するため、液体空気にによる -180°C までの急速凍結及び急速融解を反覆してみた。

即ち凍結融解を繰返すに従つて k/mg 値は増して来るが、その増加の割合は回数を増すと共に少なくなる（第 14, 15 表）。然も此の場合も蒸溜水に比べて 0.3 M グルコース液に浮遊したものが変動の少ないことが認められた。

第 14 表 凍結融解を反覆した場合：蒸溜水浮遊液

處理條件	實 験				例	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	平均値	平均値%
對 照	0.73	0.73	0.73	0.71	0.73	100
1 回	1.34	1.32	1.31	1.36	1.33	185
2 回	1.98	1.97	1.88	1.84	1.96	265
3 回	2.29	2.28	2.33	2.27	2.29	316
4 回	—	—	2.47	2.40	2.44	337

第 15 表 凍結融解を反覆した場合：0.3M グルコース浮遊液

處理條件	實 験			例	
	No. 1	No. 2	No. 3	平均値	平均値%
對 照	0.82	0.82	0.82	0.82	100
1 回	1.25	1.20	1.23	1.23	149
2 回	1.39	1.36	1.39	1.38	168
3 回	1.42	1.41	1.44	1.44	174

6) 凍結融解菌浮遊液の吟味 —— 特に上清のカタラーゼ活性度

これまでの実験で、酵母菌浮遊液を凍結融解すれば凍結の条件によつて程度の差はあるがいずれも無処理対照に比べ必ずカタラーゼ活性度の増すことが認められた。これは如何なる機序によるものかを知りたいと考え、凍結融解した菌液を 3000 回転、30 分間遠心沈澱して上清と沈澱とに分け、それぞれの活性度を測定してみた（第 16 表）。

尚これと平行して Warburg の檢壓計によつて、酸素發生量も測定した（第 17 表）。これを圖示すれば第 3 圖の通りである。

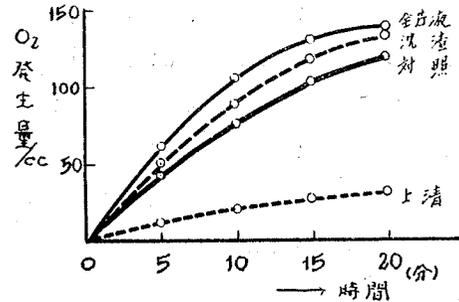
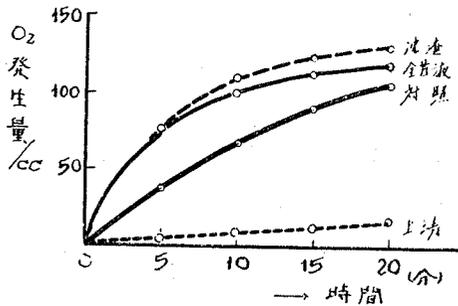
第 16 表 凍結融解後の上清及び沈渣のカタラーゼ ($k \cdot 10^3/cc$)

處理條件		實 驗 例			
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
對 照		4.50	3.84	5.22	5.66
凍 融	全菌液	6.92	6.11	6.08	6.94
	上 清	0.63	0.51	1.57	1.81
	沈渣菌体	7.23	5.87	7.68	8.04

註 對照の上清は洗滌直後ではカタラーゼ作用は 0.5 時間放置後でも 0.02~0.05/cc である

第 17 表 凍結融解後の上清及び沈渣のカタラーゼ (Warburg 檢壓計による 20 分の測定値)

處理條件		實 驗 例	
		No. 1	No. 2
對 照		109.2	120.6
凍 融	全菌液	116.6	141.1
	上 清	23.1	30.9
	沈渣菌体	131.5	135.9



第 3 圖 凍結融解後の上清及び沈渣のカタラーゼ

即ち兩測定法のいずれも、凍結融解菌液の上清にカタラーゼの遊離して出ることが知られる。然も沈渣の菌体に再び元の量まで蒸溜水を加えてそのカタラーゼを測つてみると、凍融後の全菌液よりもカタラーゼ活性度の大きいこともある。

考 察

以上の實驗成績に見られるように、酵母の菌体浮遊液を凍結融解した場合、そのカタラーゼ活性度は無處理の對照菌液に比べて常に増加することが認められた。

これを同一材料について同時に行つた酵母菌の他の機能検査の成績と比較すると、次表の通りになる。

第 18 表 蒸溜水浮游液として凍結融解した場合の各種機能の比較 (4 例の平均)

處理條件	機 能 別		
	生菌數 (メチレン青染色)	醗 酵 力 (CO ₂ 發生效量 mm ³ /mg)	カタラーゼ ($k \cdot 10^3/mg$)
對 照	97 (100%)	74.4 (100%)	0.85 (100%)
S	91 (94%)	70.2 (94%)	0.93 (109%)
R	90 (93%)	69.9 (81%)	1.29 (141%)
M	60 (62%)	8.7 (12%)	1.54 (182%)

第19表 0.3Mグルコース浮遊液として凍結融解した場合の各種機能の比較 (4例の平均)

處理條件	機 能 別		
	生菌數 (メチレン青染色法)	醱 酵 力 (CO ₂ 發生量 mm ³ /mg)	カタラーゼ (k ₁₀ ³ /mg)
對 照	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%)

これ等の表によつても、凍結融解は菌体に有害な作用を及ぼして生菌が死滅したり、醱酵作用が低下することがわかる。しかもその障害程度は凍結条件によつて異なり、凍結速度の大きい程障害の度も大きくなることが認められる。また菌体自身の性状或は菌体を包むメヂウムの種類によつても低温処理による障害の度が左右されることを知つた。

これは凍結速度が大きくなれば細胞凍結を起す菌体の數が増すからであり、又菌体及びメヂウムの条件を變えれば細胞内凍結の起り方に影響を及ぼすからであらうと思われる。

ところでこれ等の菌体の示す諸機能のうちでカタラーゼだけが生菌數や醱酵力とは反對に、對照よりも活性度を増すという事實はいかに説明したらよいであろうか。第6實驗は之に或る程度の解釋を興えるものと考えられる。即ち凍結融解した菌液を上清と沈渣とに分け、沈渣を再び元の量迄蒸溜水を加えて浮遊液とし、それぞれのカタラーゼ量を測つてみると、上清にかなりのカタラーゼが抽出されていることが認められた。但し此の場合は3000回轉で30分の遠沈をしただけであるから、たとえ酵母の菌体は沈降し易いとは云え、菌体の破片は多少上清中に含まれているであろうと想像される。また一方沈渣の菌体についてみても、對照の正常菌体よりも活性度は増しているから、結局凍結融解によつて菌体内のカタラーゼが体外に抽出されると同時に、菌体内に残つたカタラーゼも正常よりは反應し易い状態になるのではないかと考えられる。凍結融解によつて菌体内の成分が遊離されることについては、從來種々の菌体成分の抽出法として凍結融解法が採用されている點からも當然豫想されることである。

さて、クロロホルム、チモール等の原形質毒は、少量でも生酵母菌のカタラーゼ作用を2~6倍に増加し、また生酵母菌浮遊液を55~63°Cに1/2~2時間加温する時は20~30倍になると云う。更にアルコール、エーテル、室温乾燥等の脱水によつて10~15倍に増強するなどと云われているが(Euler & Blix, 1919⁷)これ等の活性度の増強機轉と凍結融解による作用とは必ずしも同一には論ぜられないものと思う。何れにせよ菌体浮遊液を凍結融解した場合、菌体は機械的に障害を受け(特に菌体内が凍結した場合)各種の生活機能は阻害されるが、カタラーゼの如き酵素は前述のような状態の下にむしろ活性度を増加するという結果になるものと思われる。

摘 要

酵母菌の蒸溜水浮遊液を種々の条件で凍結融解すると、菌液としてのカタラーゼ活性度は一般に増加する。特に凍結速度を大きくする程その活性度を増す。

また種々の培養条件の菌体を用い、種々のメヂウムの下で凍結融解を行うと、それぞれの条件に応じて異なつた活性度を示す。

これ等の成績を同一試料について調べた生菌数、醗酵力と比較してみると、逆比例的な関係にあることがわかる。

更に凍結融解によるカタラーゼ活性度の増強の理由を追究してみると、凍結融解に伴う菌体の機械的障害の結果として、菌体よりカタラーゼの遊離することと、菌体自身に残存するカタラーゼの活性度が増加することに基づくものと思われる。

文 献

- 1) Luyet, B. J. & Gehenio, P. M. 1938 The lower limit of vital temperatures. *Biodynamica*, **33**.
- 2) Haines, R. B. 1938 The effect of freezing on bacteria. *Proc. Roy. Soc. London B.*, **124**, 451.
- 3) 根井外喜男 1951 酵母の凍結過程. *科學*, **21**, 44.
- 4) 根井外喜男・小川忠人・兼平信一・秋元博 微生物の耐寒性機構. 低温処理による酵母の機能的變化. 未刊
- 5) Euler, H. u. K. Josephson, 1927 *Liebigs Ann.*, **452**, 158.
- 6) Virtanen, A. I. u. Karström, H. 1923 Quantitative Enzymbestimmungen an Microorganismen. I. Der Katalasegehalt d. Backterien. *Biochem. Zeitschr.*, **161**, 9.
- 7) v. Euler, H. u. Blix, R. 1919 Verstärkung der Katalasewirkung in Hefezellen. *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **105**, 83.
- 8) Hennichs, S. 1926 Zur Kenntniss d. Katalase u. ihrer Beziehung zu biologischen Oxydation II. Mitt. Über Leberkatalase. *Biochem. Zeitschr.*, **171**, 314.

Résumé

This paper presents the work on the effects upon microorganisms of freezing at various degrees of temperature and of cooling at various cooling rates, and in particular, the results of experiments to correlate the effects on the intracellular enzyme with the effects on cell-free enzyme.

Catalase activity in yeast cell suspension was raised by freezing and thawing, and affected by the kinds of suspension media, cultural conditions and the rates of cooling and warming. From the results obtained, it was assumed that the catalase activity might be increased because of liberation of catalase from cells into medium and the intensified activity of residual catalase within injured cells due to mechanical destruction by freezing and thawing.