



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酵母のカタラーゼに及ぼす低温の影響 : 第3報 精製酵母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, 191-195
Issue Date	1953-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17556
Type	departmental bulletin paper
File Information	10_p191-195.pdf



酵母のカタラーゼに及ぼす低温の影響

第3報 精製酵母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

既に前報¹⁾で報告したように、酵母の菌体浮遊液を凍結融解すると菌体カタラーゼが如何なる影響をうけるかについて検討した結果、凍結の方法、菌体の性状、浮遊液のメヂウムの種類等、いろいろの条件によつてカタラーゼの活性度がそれぞれ異なるのを認めた。しかも何れの場合でも常に對照の無處理の菌液よりもカタラーゼ活性度が増加していることを知り、それが凍結融解により菌体から遊離したカタラーゼの量の増加と、菌体内に残存するカタラーゼの反応性の増強とに基くものであらうと推定した。

しかし菌体内に含有されるカタラーゼが、活性度は變らないにも拘らず菌体内の構造變化の結果、過酸化水素と反應し易い状態になつたのであるか、或はまた凍結融解という外的条件によつてカタラーゼ自身の活性度が増強されたものであるかは明らかでない。更にまた、菌体より遊離したと考えられるカタラーゼは凍結融解によつて如何なる影響を蒙るかについても、菌体とは別個に遊離カタラーゼについての検索を行う必要がある。

かかる意味に於て、第2報²⁾に述べたような方法で酵母より分離した精製カタラーゼを用い、各種條件の凍結融解がカタラーゼに如何なる影響を及ぼすかについて追及した。

實 験 方 法

試料としては別報²⁾の如き方法によつて壓搾酵母を處理して得たカタラーゼの結晶、或は硫酸處理迄を行つて得たカタラーゼ沈澱を夫々水に溶解したものをを用いた。

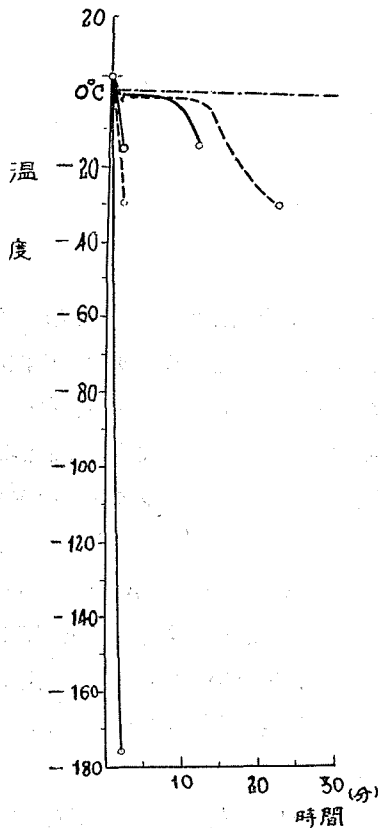
之等のカタラーゼ液1ccを試験管にとり、一定の冷却で凍結させるために熱電對によつて温度を測定しながら冷却した。その低温處理の方法は前報¹⁾の菌液の場合と全く同一にして行つた。ただ融解時は水の消失を目標として温度を $+2^{\circ}\text{C}\sim+3^{\circ}\text{C}$ 以上に上げない様に注意した。

* 北海道大學低温科学研究所業績 第154號

また、試料液は低温処理以外は 0°C の水浴中に保つて活性度の低下しないようにつとめた。

活性度の測定には過マンガン酸カリ (N/100 液) による滴定法を用い、反応系には次の如き混液を使用した。

N/100 過酸化水素液	5.0 cc	} 水を加へて總量を 50 cc とし 0°C にて 10 分間作用
M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.8)	5.0 cc	
酵素液	1.0 cc	



第 1 圖
冷却曲線

酵素液には低温処理した試料を更に 5 倍に稀釋しその 1 cc を用いた。従つて以下の實驗に於ける k の値はこの 5 倍液 1 cc 當り、従つて凍結に用いたカタラーゼ液の 0.2 cc 當りの k 値である。但し活性度の比較には、同時に測定した無處理の對照液の k 値に對する百分率即ち、

$$\text{relative } k = \frac{\text{試料液の } k \text{ 値}}{\text{對照液の } k \text{ 値}} \times 100$$

を用いた。

實驗成績並びに考察

1) 冷却曲線

-20°C, -35°C のブライン及び液体空氣で緩慢並びに急速凍結を行つた場合のカタラーゼ液の溫度變化をそれぞれ曲線で表わすと第 1 圖に示す通りである。

2) 凍結溫度及び凍結速度を變えた場合のカタラーゼに及ぼす影響

試料を -15°C 及び -30°C まで急速に或は緩慢に凍結させた場合の活性度の變化は第 1 表の通りである。

即ち溫度一定なる時は凍結速度の緩やかな程活性度は低下し、凍結速度一定なる時は溫度の低い程活性度の低下は著しいという傾向を示している。しかし極端な場合の例として行つた液体空氣で急激に冷却したものは、溫度差が大きいにも拘らず活性度の低下は僅かであつた。

このことは實驗中に認められた次の様な事實、即ち、溶媒に M/100 磷酸緩衝液 (pH 6.8) を用いたものは水溶液の場合よりも活性度の低下は 5% 前後少ないこと、稀釋度の大きい溶液では濃厚液よりも低下の割合が大きいこと、また緩慢凍結の場合で -18°C 附近で一時的の溫度上昇を示した例では然らざるものより、5~10% 低下度が大きいこと、等の點を考え併せると、活性度の低下は凍結時の氷結品の形成状態に基くものではないかと思われる。

3) 融解時の條件とカタラーゼ作用

第1表 凍結速度及び凍結温度を変えた場合の活性度の變化 (rel. % 値)

実験例	凍 結 速 度				
	-15°C まで		-30°C まで		-180°C まで
	緩慢凍結	急速凍結	緩慢凍結	急速凍結	急速凍結
No. 1	87.7	90.9	80.4	80.1	96.7
No. 2	90.5	91.6	79.8	82.0	95.1
No. 3	85.8	92.7	77.9	82.9	95.7
No. 4	85.7	88.3	87.7	82.4	97.5
No. 5	85.8	92.0	79.7	83.3	95.5
No. 6	92.3	91.7	77.1	80.0	95.5
No. 7	87.3	92.2	75.3	83.3	96.4
平均値	87.9 ±0.91	91.3 ±0.48	79.7 ±0.80	82.0 ±0.66	96.1 ±0.29

氷の結晶は温度の低下する場合のみならず、低温から漸次温度が上昇して行く過程に於ても種々形を変えて行く。従つてもし凍結による活性度の低下が氷結晶の形成に關係あるものとするれば、融解速度の緩急によつても低下の程度に差を生ずるだろうことは當然考えられる。

そこで -30°C までのブラインによる急速及び緩慢凍結並びに液体空気による急速凍結を行つた3者をそれぞれ +20°C の水浴中 (急速融解の場合) 又は室温 (+20°C) (緩慢融解の場合) で融解せしめ、その活性度を比較してみた。その結果は第2表に示すように緩慢凍結を行つたものでは融解速度による活性度の差は少ないが、急速に凍結したものでは緩慢に融解したものは急速融解のものに比べて著しい低下を示しており、従つて緩慢融解したものは凍結条件の如何に拘らずいずれもほぼ等しい活性度を示している。

第2表 融解速度を変えた場合の活性度の變化 (rel. % 値)

実験例	凍 結 条 件					
	緩慢凍結 (-30°C まで)		急速凍結 (-30°C まで)		急速凍結 (-180°C まで)	
	緩慢融解	急速融解	緩慢融解	急速融解	緩慢融解	急速融解
No. 1	77.1	76.9	81.4	85.0	83.2	97.7
No. 2	76.4	78.6	84.8	88.3	79.8	95.1
No. 3	76.6	77.6	82.8	86.6	80.6	96.5
平均値	76.7 ±0.36	77.7 ±0.32	83.0 ±0.83	86.6 ±0.45	81.2 ±0.84	96.4 ±0.61

以上の結果から、カタラーゼの低温処理による活性度の低下は、凍結条件のみならず融解の条件によつても左右されることがしられた。

4) 反覆凍結融解とカタラーゼ作用

これまでの実験では、ただ1回の凍結融解による影響をみたのであるが、同一条件の凍結融解を繰返した場合活性度の低下はどうなつてゆくかということを見るために、-30°C までの急速凍結 (寒剤ブライン) 及び +20°C の水浴中に於ける急速融解を數回繰返してみた。その結果は第3表の如く、最初の凍結融解でかなり活性度は低下するが、第2回以後は漸次その程度を

減じ、第3回、第4回では殆んどその間に活性度の差は認められなくなる。

第3表 凍結融解を繰返した場合の活性度の變化 (rel. k 値)
(-30°C まで急速凍結～急速融解を繰返したものの5例の平均)

活性度	凍 融 回 數				
	對 照	1 回	2 回	3 回	4 回
$k \cdot 10^3/\text{cc}$	9.111	7.296	6.769	6.456	6.353
rel. k 價	100.1	80.1	74.3	70.9	69.8

考 察

カタラーゼ溶液を凍結融解するとその活性度が低下することは、凍結の條件を變えると低下の程度が異なることからわかるように、主として凍結に伴う溶液内氷結晶生成に起因するものと考えられる。

一般に水または溶液を急速に冷却すると小さな氷結晶が一時に多數生ずるが、徐々に冷却した場合は一部に出來た氷結晶が漸次成長してゆくのので比較的大きな氷結晶が僅かであるにすぎないということが分つている。従つて冷却速度によつて活性度の低下の度合が異なるのは恐らくそれぞれの條件で形成される氷結晶の性状が異なることによるものであろうと考える。結局カタラーゼの不活性化は氷結晶形成によつてカタラーゼ分子の活性基に何等かの變化を來すためと想像される。

Stoland & Walling³⁾ (1912) は血液カタラーゼを $-10 \sim -14^{\circ}\text{C}$ に20分おいた場合、カタラーゼは一部破壊されて30~50%の活性度の低下をみると報告しているが、その作用機轉は明らかでない。

次に前報でも述べたように、酵母菌液を凍結融解すれば菌液のカタラーゼ作用は増すのに、今回のカタラーゼ溶液では活性度は低下するという全く正反對の事實が認められた。菌体カタラーゼの凍結融解による活性度の増強については前にも述べたように、メヂウム中に遊離したカタラーゼによると共に、更に菌体内に残存するカタラーゼの反応性が増すことによるものであろうと推定される。従つて同一酵素であつてもそれが生細胞内にある場合と、他に共存物質のない全く純粹な溶液として存在する場合とでは、凍結という外的條件によつて受ける影響にもおのづから差異があらうと考えられる。

また酵母菌液では冷却速度が大きくなる程カタラーゼ活性度が増す、即ち菌体への障害が大きくなると考えられるのに、カタラーゼ溶液では反對に冷却速度が大きくなる程カタラーゼに對する障害が少なくなるという全く逆の所見からみても、試料全体が均一な溶液の如き状態のものと、菌液のようにメヂウム中に細胞の浮遊した状態のもとでは、液の凍結の仕方は違ふであらうし、或はまたほぼ同様であつたとしても溶質と細胞とでは凍結によつて受ける影響は當

然差異があろうということは想像される。

摘 要

酵母から分離精製した結晶性カタラーゼの溶液を凍結融解すると、その活性度は低下する。然もその活性度の低下は凍結融解の条件によつて異り、酵母菌体の場合とは逆に液体空気による急速凍結では障害が少ない。また凍結融解を繰返せば漸次活性度を低下する。

要するに、酵母菌体の浮遊液を凍結融解した場合は、菌液のカタラーゼ作用は増加したが結晶カタラーゼ溶液では必ず活性度は低下する。

文 献

- 1) 小川忠人 1953 酵母カタラーゼに及ぼす低温の影響. 第1報 生酵母菌のカタラーゼに及ぼす低温の影響. 低温科学, 10, 175.
- 2) 小川忠人 1953 酵母カタラーゼに及ぼす低温の影響. 第2報 酵母カタラーゼの精製分離について. 低温科学, 10, 187.
- 3) Stoland, O. O. & Walling, L. 1912 The effect of various temperatures on blood catalase. Amer. J. Physiol., 55, 305.

Résumé

As described in the preliminary report (Part 1.), it was recognized that the catalase activity in yeast cell suspension was raised by freezing and thawing. In this experiment, on the contrary, the crystalline catalase in solution purified from yeast cells decreased its activity under similar conditions of freezing, and particularly, the more rapid the rate of cooling, the less was the activity diminished.