HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 微生物の水分とその凍結 ： 特に酵母並びに大腸菌の菌体水分量と生死との関係について |
| Author(s) | 僧都, 博; 根井, 外喜男; 尾藤, 方通 |
| Citation | 低温科學. 生物篇, 19, 49-57 |
| Issue Date | 1961-12-20 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/17651 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 19_p49-57.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi SOUZU, Tokio NEI and Masamichi BITO 1961 Water of Microorganisms and Its Freezing. With Special Reference to the Relation between Water Content and Viability of Yeast and Coli Cells. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 19.*** (With English résumé p. 56)

# 微生物の水分とその凍結*

## 特に酵母並びに大腸菌の菌体水分量と生死との関係について

僧都　博　根井外喜男
(低温科学研究所　医学部門)
尾藤方通
(農林省　東海区水産研究所)

(昭和36年7月受理)

## I. 緒　　言

生物材料を凍結するとか，乾燥する場合，そこに起る現象の主役をなすものは水であろう。従って生物材料の凍結或いは乾燥に関する研究を行なうときは，先ずもって水分量に関する定量的なデータを備えておかなければならない。ところが従来この点について充分な検討がなされているとはいい難いようである。酵母の細胞水分については最近 Wood 等[1] の報告があるが，他のものについてはあまり詳細なものはないように思われる。

凍結乾燥に関する研究では，我々はいろいろな立場から観察を行なった上，それらを総合して，本態的な機構の解釈を下したいと考えている。その一つとして，凍結乾燥に於ける水分量と細胞活性の関係について調べているが，その場合にも第一にこの細胞水分量の定量性が問題となる。

本実験はその意味で，まず酵母と大腸菌の菌体の持つ水分量及び凍結水分量を測り，それと菌の活力の関係について検討して見た。

## II. 材料及び方法

新鮮なパン酵母を，氷冷した 1/15 N の燐酸一カリ溶液で二度洗浄し，最後に同じ液で，3,000 r.p.m. 15 分遠心した沈渣について，細胞間水分を求めた。此の条件をもとにして，菌濃度を決定し，乾物重量，或いは凍結水量を求めた。

大腸菌の場合は，普通寒天培地で 37°C 一昼夜培養したものを蒸溜水で三度洗浄し，最後に，同じ水で 10,000 r.p.m. 30 分遠心した沈渣について，同様の測定を行なった。

### 細胞間水分の測定

White[2] の方法に従ったが，ペプトン濃度の測定にはキエルダール法の代りに乾燥重量法

* 北海道大学低温科学研究所業績　第588号

を用いた。即ち滲透濃度の影響がなく，又容易に細胞内に入らない物質としてポリペプトンを用い，これを酵母の場合には1/15 N 燐酸一カリ，大腸菌の場合は蒸溜水で4% 溶液としておく。このものを，先の条件で沈澱させ正確に秤量しておいた菌体2～4 g に3 ml 正確に加え，充分に攪拌して均等な浮遊液としたのち，再び同じ条件で遠心する。この上清から注意して約1 ml を秤量瓶に取り正確に秤量してから105°C で6時間乾燥したものと，別に対照として4% ペプトン溶液を約1 ml 正確に秤量して乾燥したものとの乾物量の比から，細胞間水分を算出した。

**細胞水分の測定**

先の条件で沈澱させた酵母，又は大腸菌約1 g を秤量瓶にとり正確に秤量してから105°C で充分恒量になるまで(5～6時間)乾燥する。冷後再び正確に秤量し乾燥による減量から，細胞間水分の蒸発による減量を差し引いたものを細胞水分とした。

**氷量の測定**

Miller 等[3]の使用した熱量計と同じ原理の熱量計を用いて測定した。

デュワー瓶中に銅板で作った水の入る容器を置き，これにベックマン温度計，補助温度計，攪拌装置を備えたもので，これら全部の熱容量は，11.7 カロリーである。通常の測定にはこのものに水225.0 ml を入れて使用したので全熱容量は236.7 カロリーとなる。使用したベックマン温度計は通常の型のもので0.002°C まで正確に読めるようになっている。攪拌機はモーターで廻転させるものでこの運動による熱量は全く無視出来る程度のものである。試料の容器は薄い銅板で作った径1.5 cm，深さ約3 cm の筒形のもので，上縁につけた二本の細針金で吊り下げられるようになつている。このものの熱容量は0.56 カロリーである。実験には普通，酵母の場合には，菌体量が試料全体の3分の2を占めるように調製した乳液状の試料3 ml，大腸菌では同じく2分の1を占めるようにしたもの2 ml を，試料の容器にとり，正確に重量を測って用いた。

予め測定しようとする温度に保った寒剤中に試験管を没して置き，その中に試料容器を上縁が完全に液面下まで下がるように入れて凍結する。温度が十分平衡に達したのち(最低30分)引き上げ，熱量計の蓋にあけた小穴から素早く熱量計の水中に移す。細針金の上端に取りつけたゴム栓は，熱量計の蓋の穴に丁度合うようになっているので，これで熱量計中の空気の出入りを断つと同時に容器を丁度良い深さに固定することが出来る。この操作に要する時間は約3秒である。

**生菌数の測定**

凍結温度と菌生残率の関係は，氷量測定に使用した試料を引き上げ，その中から1 ml を取って適当な濃度にうすめ，麦汁寒天培地で，28°C，3日間培養して，その集落を数え，未処理の対照と比較して求めた。

**減圧乾燥法**

凍結以外の方法で細胞から脱水して，その脱水度を求めるには，氷量測定に使ったのと同

じ試料を適当量秤量瓶に取り，減圧で乾燥する方法をとった。

細胞浮遊液を凍結することなく減圧すると，液が突沸をすること，乾燥の進行につれて，乾燥表面に膠状の被膜を生じて，深部の乾燥に時間がかかり，試料全体として脱水が均一に起らないこと，更に乾燥後の復水に時間を要する等の，困難な問題がある。

これらの問題を除くために，試料の浮遊液にハイフロスーパーセル(以下ハイフロと略する)を加え，全体を固煉りにしたものを，真空乾燥装置で乾燥した。このものでは突沸もなく，細胞間にはさまれたハイフロが水蒸気の通る間隙を作るので，膠状の膜も防止され，乾燥後水を加えるとハイフロの吸水性のために，直ちにもとの状態に戻る。

生残率を調べるためには，ハイフロを加えたための容積変化を補正すれば良く，通常は一割以内である。またハイフロを加えただけでは細胞の生死には何の影響もない。

試料の一例を示せば次のようである。

| 細胞間水分 | 細　胞 | ハイフロ | 総　量 |
|---|---|---|---|
| 0.336 g | 0.673 g | 0.050 g | 1.059 g |

これを秤量瓶に入れて秤量してのち，小寒暖計と共に乾燥用アンプルに入れ，温度が0～5°C の間にあるように真空度を加減しながら乾燥する。適当な時間に試料のひとつを取り外し秤量して重量減から脱水度を算出し，直ちにその分だけ水を加えてもとの濃度に直してから生残率を測定した。

## III. 結　果

### 細胞間水分

3,000 r.p.m. 15 分間遠心した酵母浮遊液沈渣についての細胞間水分は次のようである。

水分量は沈渣全重量に対する百分比で表わすことにして，測定は二度行ない，一度の測定は4例の平均である。これから一度目は 17.5%，二度目は 18.1% を得，それぞれ4例の間での誤差は 1% 以内であった。この結果，以後の実験はすべてこの条件で遠心して，細胞間水分 18% として行なった。

大腸菌については 10,000 r.p.m. 30 分の遠心沈渣について，同じような実験を行ない各3例宛の平均 40.7% と 40.6% を求め，この条件の遠心沈渣では，細胞間水分 41% として，以後の実験に使用した。

### 細胞水分

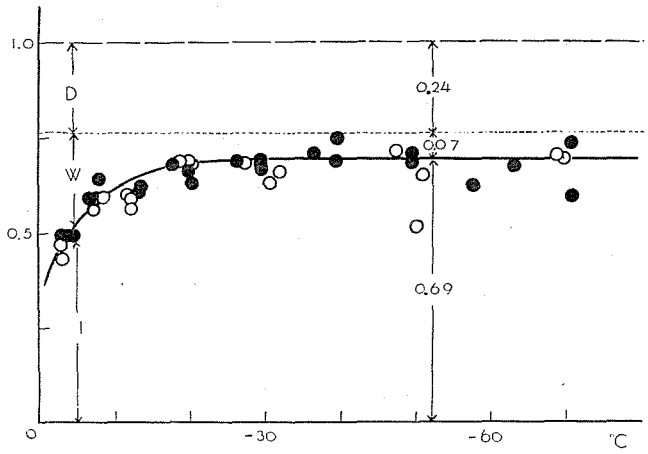
実験方法からわかるように，ここでいう細胞水分とは，105°C 6 時間の熱乾燥(凍結乾燥の結果も全く同じ値であったが)によって細胞から取り去り得る水という意味で，厳密にいえば，“細胞の持つ全水分”とは多少意味が異なるものである。この水分の全菌体重量に対する比率は酵母に於ては，各々3例ずつの平均値 75.9% と 75.8% から 76%，大腸菌に於ては，同じく 64.8% と 66.5% から 66% であり，以後の実験はすべてこの値をもとにして行なった。

### 凍結水分

実験方法の項に書いた熱量計を使って測定した数値を Wood[1] の式に入れて，細胞水分中

凍結した水分の割合を求めた。この式は氷が細胞内でできていても，細胞外でできていても成りたつから，これだけでは，出来た氷の位置が細胞内であるか細胞外であるかは全くわからない。

第1図に酵母，第2図に大腸菌の，全細胞を1とした時，細胞水分及び凍結水分の占める率を示す。

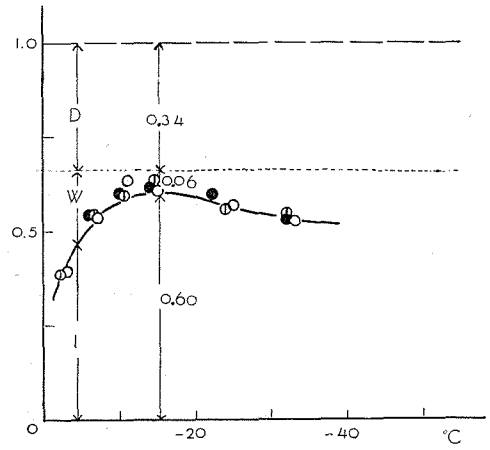



**第1図** 酵母に於ける凍結温度と凍結水量の関係
縦軸 全細胞を1としたとき各部分の占める比率
D 乾物量，W 未凍結水，I 氷
横軸 凍結温度
○ 9月1日測定 ● 9月9日測定
1/15 N $KH_2PO_4$ 浮遊液

どちらも試料の温度が氷点以下，次第に低くなると，氷量の割合もそれにつれて増加するが，酵母の場合は −20°C 附近で最大となり，それ以上温度を低下しても氷の量は増さない。この時の氷の占める比率は全細胞の69%，全細胞水分の91% に当る（第1，4図参照）。

大腸菌の場合は，−15°C 附近で極大値を示し，それより温度が低下すると氷は再び減少するように見える。この極大の時の氷の占める比率は全細胞の60%，全細胞水分の91% で，後者は酵母のそれに一致する。

この結果，酵母の場合は −20°C 以下，大腸菌の場合は −15°C 以下でも，細胞水分の9% は凍らないまま残っていることになる。




**第2図** 大腸菌に於ける凍結温度と凍結水量の関係
縦軸 全細胞を1としたとき各部分の占める比率
D 乾物量，W 未凍結水，I 氷
横軸 凍結温度
○ 凍結融解1度 ① 同2度 ● 同3度
蒸溜水浮遊液

この凍結しない水の部分が，細胞成分に結合しているものであれば，凍結融解を繰り返し，細胞の障害を大きくすることによって，結合をきりはなすことができるならば，自由になった水は凍結するのではないかと考え，同一試料で凍結融解を反復して氷量を測定して見た。結果は酵母では −20°C 附近に於ける二度のくり返しでは凍結水分量の変化は認められなかった。

大腸菌でも −3°C から −35°C にわたる全域で三度づつ凍結融解をくり返して氷量を測っ

たが，これも測定誤差の範囲内で三度共氷量が一致した。このことから，凍結融解をくりかえしても，凍結水分量は増さないことを知った。また試料が一定温度に達したのち，更に時間が経過することによって，氷量が増減するかどうかについては，酵母の場合のみ，各温度に到達直後，30分後，60分後の三度，測定をしたが，いずれの場合も三度の測定値は誤差範囲内で一致し，結局一定温度では，時間が経過しても，氷量に変化のないことがわかった。

**細胞水分量とその生死**

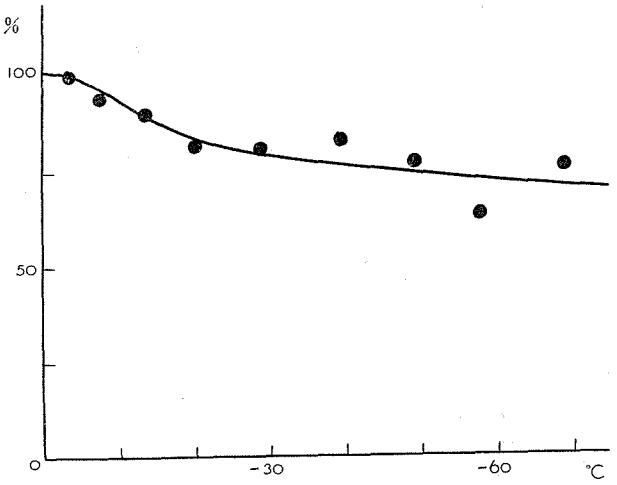
1) 凍結による脱水率と生残率との関係

氷量を測定した酵母細胞試料について，同時に求めた生残率を第3図に示す。

これは，氷量との関連という意味についてのみ，みたものであって，厳密にいえば凍結速度，融解速度等は一定なものではない，一例として，冷却速度についていえば，−5°C附近では毎分約1°C，−25°C 附近では毎分約2°C である。

この図の示すように生残率の低下は −5°C 附近から始まり，−20°C 前後の所までやや急に，それ以下では再びゆるやかになっている。そうして全域を通じて，かなり高い生残率を示している。

この結果は，凍結したままで更に一時間おいたものでも殆んど違わない。




**第3図**　酵母に於ける凍結温度と菌生残率との関係
縦軸　菌生残率　　横軸　凍結温度
1/15 N　$KH_2PO_4$ 浮遊液

大腸菌についてしらべた生残率は，氷点以下 −35°C までの各温度において，未処理の対照と比較してあまり大きな低下はなかった。特に凍結融解をくり返したものについては，一度目，二度目，三度目とも生残率は殆んど同じで，凍結融解の回数による変化は見られなかった。要するにこの凍結水分測定に用いた菌濃度や冷却速度では，凍結による細胞障害は殆んどなかったというわけである。

以上の実験結果から考察を進めると，凍結障害の原因となるものには種々あろうが，その一つとして，凍結による脱水で起る障害を考えてみても，細胞水分中，結合水（通常の凍結条件で凍結しない水分を細胞成分に結合しているものとみなしてこう呼ぶことにすれば）を除く部分のみが凍結する限りは，細胞は殆んど死なないという結果になっている。

またこの結果から逆におしすすめて，結合している水こそ，細胞障害に直接の関係を持つものであるとすれば，此の実験条件での凍結は，結合水まではとらない温和な脱水条件といえよう。

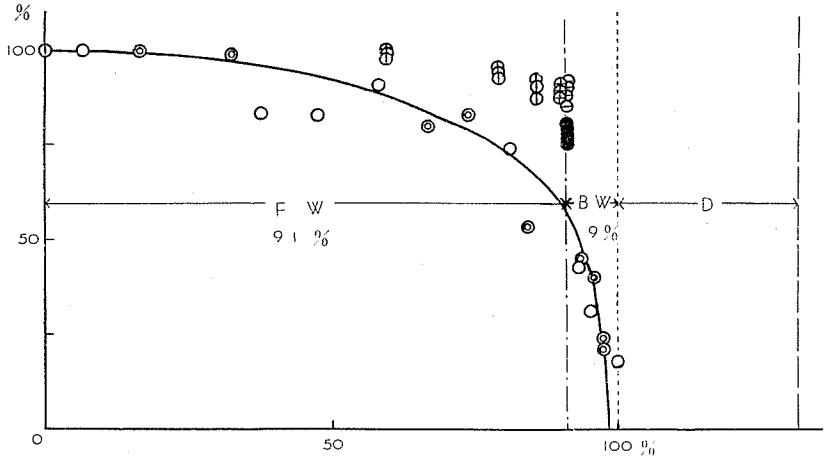
そこでもっと強い脱水の方法を考え，減圧乾燥を行なうことによって，その脱水度と細胞の生存との関係を調べて見た。

2) 乾燥(液状よりの減圧乾燥)による脱水率と生残率の関係

酵母細胞浮遊液を，凍結が起らないように注意しながら減圧乾燥した時の脱水率と生残率の関係を第4図に示す。

図には凍結した水分量を脱水と考えた場合の数値も同時に入れてある。

図からわかるように，乾燥による脱水量が，−20°C 以下で凍結し得る水分と同じくらいまでの範囲では，凍結による脱水の際の生残率とほぼ同じ程度のかなり高い生残率を保っているがそれ以上乾燥脱水されて結合水の部分まで失なわれると，生残率は急激に低下している。




**第4図** 酵母に於ける乾燥及び凍結による脱水率と菌生残率との関係
実線は乾燥によるもの，線のないのが凍結を脱水と考えて換算したもの。
○ 蒸溜水浮遊液 ⊖ 凍結温度 0°～−20C° ⊕ 同 20°～45°C
◎ 1/15N $KH_2PO_4$ 浮遊液 ● 凍結温度 −45°C 以下
D 乾物量 B.W 結合水 F.W 自由水 1/15 N $KH_2PO_4$ 浮遊液
縦 軸 菌生残率 横 軸 脱 水 率

## IV. 考 察

この実験は，微生物試料を凍結したときに，その細胞水分のうち，凍結し得る部分と，凍結し得ない部分の量比を知ることと，同時にその水の量が細胞の受ける障害と，どのような関連を持つかを知るのが目的であった。

細胞水分の凍結量をしらべる為には，試料全体のうちで細胞の占める比率を正確に決める必要があり，この為に細胞間水分の量を正しく決定することが先決である。

この細胞間水分は，微生物の種類，遠心の条件，溶媒の性質等によってかなり異なるので従来普通に使われている湿菌量という言葉はこの意味で厳密なものとはいい難いようである。精密な測定には，遠心沈澱の間に残っている溶媒量を差し引いた真の菌体量を湿菌量として用

いる必要があり，本実験で乾燥物重量比が通常示されている数値より高いのはこの為である。

次に凍結しない水については，酵母では −20°C 以下で全細胞水分の 9% が残っており，此の分は凍結融解を二度くり返しても，また定温到達後時間をおいても変化しない。

大腸菌の場合も凍結しない部分は全水分の 9% であるが，これに達する温度は −15°C 前後と，酵母にくらべてやや高いようである。

大腸菌においては，それより温度が低くなると，不凍水分が増加しているように見えるがそのようなことは考え難いので，やはり，Wood[1] のいうように，結合水の比熱の問題がきいてきているのかも知れない。しかしそれだけで説明するには，傾斜が少しきつ過ぎるようであり，また同じ方法で測定した酵母の場合に，このことが見られなかったのと考え合わせて，不審に思われるが原因はよくわからない。

細胞水分と生残率という立場から考えてみると酵母では −20°C 以下，大腸菌では −15°C 以下の凍結では，もはや氷量に変化はなく，更に凍結融解を反復したり，また時間をおいたりしても同じように氷量は変化しない。

これに平行して調べた生残率についても，ほぼ同じことがいえる。

以上は，凍結を一種の脱水と考えると，その脱水には限度があって，凍結だけでは細胞障害は少いということを意味する。しかしこれはいわゆる細胞外凍結で，細胞水分が細胞外にひき出されて凍結する場合を考えたもので，細胞内で凍結が起きれば，細胞障害の大きいことは既によく知られているところである。通常の凍結実験でかなりの細胞の死滅をみるのは，凍結水分量からだけでは説明がつかず，結局細胞内凍結による細胞成分の物理的，化学的破壊を考えなければならない。この点についてはまた後でふれる。

一方乾燥による脱水の場合にも，凍結によって失ったと等しい量の水分の脱水の間は，生残率が凍結実験の場合にほぼ平行しているのに，凍結し得ない水の部分まで脱水が進むと急激に低下する。

このことから，細胞はその結合水を失なうことが障害の一つの原因であり，この実験の場合のように，結合水に変化のないような凍結の場合には，細胞の障害は殆んど起らないのであろうと考えられる。

しかし脱水の場合に乾燥度が 90% より少くても生残率が幾分低下してくるのは，乾燥の進むに従って表層部と深層部で脱水の程度に差が出来ること，及び室温で脱水状態にさらされる時間が長いこと (4〜5 時間) によるものと思われるが，凍結の場合には −5°C から −20°C の間で 20% 近い生残率の低下のあること，脱水率は −20°C 以下で同じなのにもかかわらず，凍結温度が低くなる程，生残率も低くなっていること (第 4 図参照)，及び凍結の条件によっては，温度の低下と共に生残率の低下が非常に大きくなる場合がある等のことから (通常の実験ではかなり低い生残率を示すのが普通であり，此の実験の場合のような高い生残率はむしろ珍らしい，これは主として，菌濃度が高いこと，凍結速度が小さいことに起因するものと思われる) 必ずしも障害が脱水の為だけで起るとは考え難く，常に他の多くの要素 (例えば細胞内凍結)

と相俟って起るものと考えなければならない。凍結の条件を変えることによって，或いは凍結によって失われる結合水の分が増してくるのかも知れないが(より速い凍結の場合)，速い凍結をする為には試料の量を減らさなければならないので，氷量測定が正確に行かなくなる恐れがある。結局，今の測定精度では，これを細胞水分量だけの問題として考えるのは無理だと思われる。

大腸菌の場合には，此の条件の凍結融解では生残率は僅かしか低下せず，凍結融解をくり返しても，その都度一致した値を示した。

大腸菌については，減圧乾燥の場合の生残率はしらべなかったが，根井[4]らの行なった凍結乾燥の実験から，やはり細胞水分の9%をさかいにして，それ以前の脱水に於ける生残率は60%前後，それ以下に脱水されると生残率は急に数%以下に低下することが知られており，この事実からも，乾燥による脱水の場合には酵母に近い結果の出ることが予想される。

## V. 結　　論

1) 酵母及び大腸菌について測定した結果，細胞水分量は76%と66%，凍結水分量は69%と60%(全水分量に対して共に91%)という値を得た。

2) 酵母の上記試料について同時にしらべた凍結融解後の生残率を，減圧乾燥により脱水した後の生残率と比較考察することにより，細胞水分の意義をもとめ，結合水の奪われることが細胞障害の一つの要因になるものと考えた。

著者の1人尾藤は，農林水産技術会議より国内留学を命ぜられて，低温科学研究所に於て研究に従事中，本実験の一部である凍結水分量の測定を分担したものである。

## 文　　献

1) Wood, T. H. & Rosenberg, A. M. 1957 Freezing in yeast cells. Biochim. Biophys. Acta ***25***, 78–87.
2) White, J. 1954 Yeast Technology. John Wiley & Sons, New York.
3) Miller, J. G., Heinemann, H. & McCarter, W. S. W. 1950 Heat of wetting of activated bauxite and Attapulgus clay. Ind. Eng. Chem., ***42***, 151–153.
4) 根井外喜男・僧都 博・花房尚史・荒木 忠 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 VIII. 乾燥過程での試料中の部位による含水率と菌生残率との関係について(第2報). 低温科学，生物篇，***19***, 59–72.

## Résumé

As a fundamental study on freeze-drying of biological materials such as microorganism, precise determination of water content of those cells should be made.

According to the intercellular water content in cell deposit measured by White's method and the weight of dried material, water content of cells was calculated. It was 76% of the total wet weight of cells in Saccharomyces cerevisiae and 66% in Escherichia coli.

Water content of cells frozen at low temperatures ranging from the freezing point to −70°C was also determined at each temperature on yeast and coli cells. Percentage of frozen water gradually increased as temperature decreased. It reached maximum value of 91% of the total water content at −20°C in yeast cells and at −15°C in coli cells.

The relationship between water content and survival of cells in suspensions after dehydration was investigated in a case of drying under vacuum at room temperature or of freezing. Even if 91% of water content was removed from the cells by freezing, under assumption that dehydration was caused by extra-cellular freezing, most of the cells survived. But, the death rate of cells increased as the cells were more dehydrated under vacuum beyond 91% of the total water content.