



Title	微生物の凍結の機構 I : 低音処理酵母の生存率について
Author(s)	荒木, 忠; ARAKI, Tadashi; 根井, 外喜男 他
Citation	低温科学. 生物篇, 20, 57-68
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17662
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p57-68.pdf



微生物の凍結の機構 I*

低温処理酵母の生存について

荒木 忠 根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和37年8月受理)

I. 緒 言

植物や動物細胞に対する凍結の影響についてはその機序がかなり明らかになりつつある。一方、微生物についての低温処理の実験報告^{1)~5)}も決して数少なくないが、機序については殆んどわかっていない。これは細胞が微小なため形態的な観察が困難であることが大きな理由になっていると思われる。

著者の1人、根井^{6)~8)}は微生物材料の1つとして、酵母で既に形態的機能的な見地から細胞凍結の機構に関する研究を行ってきたが、今回は特に、凍結過程に於ける凍結の条件を一層厳密に取扱うことによって、細胞の生死に及ぼす低温の影響を明らかにしようと試みた。このような研究目的の実験材料として、これまで殆んど酵母細胞を主として用いてきたことには次のような理由がある。

第1に、酵母は微生物のうちでも比較的形態が大きく、しかも細胞内構造がはっきりしていること、第2に、培養によって容易にしかも大量に材料を得ることができ、且つ定量的に生死の判定を行なうことができること、第3に、細胞の形態的機能的な諸性状が良く検討されていること等である。これらの点については Mazur⁹⁾も同じ理由を述べている。

II. 実験材料及び方法

1) 使用材料

Saccharomyces cerevisiae (S 214 株) を麦汁寒天培地に 29°C、48 時間培養したものを滅菌蒸溜水で 3 回遠心洗滌し、湿菌量 1 mg/ml 濃度の蒸溜水浮遊液 (以下「菌液」という。) として実験に用いた。

2) 凍結処理方法

上記の菌液を 0.3 ml ずつ小試験管 (7 mm) に入れ、各種の冷却速度で種々の温度まで冷却し、所定の凍結を終了した後はすべて +20°C の温浴槽に移し、振盪しながら急速に融解した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 621 号

この場合、従来のようにかなり高い温度からいきなり冷却したのでは、過冷却の破れる点が一定せず、従って凍結過程の冷却速度を厳密に調整することは困難なので、なるべく高い温度で植氷して凍結を起させてから、直線的に一定の冷却速度で冷却することにした。それには試料を入れた試験管はすべて 0°C の氷水中におき、これを攪拌器つきの魔法瓶中のアルコール ($-1.0^{\circ}\sim-1.5^{\circ}\text{C}$) に移し、試料がその温度まで冷えたことを確かめて、予め -15°C まで冷しておいたニクローム線の先端を試料にふれると植氷されて直ちに凍結が始まり、温度は氷点(ほぼ 0°C に近い)まで上る。凡そ 15 分位この温度を保持した後、低下し始めるので、その時期からそれぞれの速度で冷却を開始する。 $0.05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ から $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ までの間の冷却速度のものは魔法瓶中のアルコールに加えるドライ・アイスの量を加減することによって得られるが、それより大きい $100^{\circ}\sim 1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度のものでは試験管を直接 -79°C のドライ・アイス—アルコール中に又は液体窒素中に浸して急速冷却させた。なおこれらの冷却速度或いは到達温度を測定するために、直径 0.1 mm の銅・コンスタンタンで作った熱電対を菌液中に挿入しておき、電位差計式温度記録計に自記させた。

3) 生存菌数測定

菌液を適当な濃度まで希釈し、その一定量をとって平板培養し 48 時間後に認められる集菌数を数え、無処理対照の生菌数との比率を以って生存率として表わした。この方法による測定誤差は $\pm 5\%$ であった。

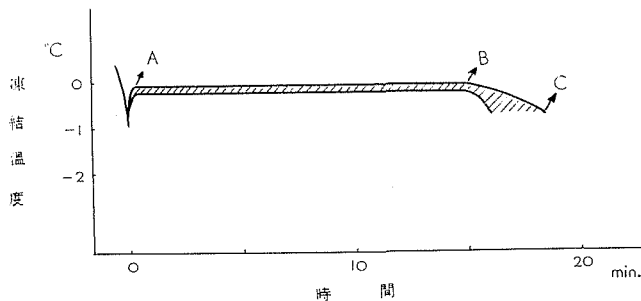
III. 実験成績

1) 過冷却の影響

菌液 (0.3 ml) を植氷せず静かに冷却してゆくと、 -10°C 位まで過冷却し、かなり長時間凍結は起らない。このようなものは温度を上げて生菌数を調べても、第 1 表に見られるように無処理のものと同じ変りない。即ち -13°C 位までは、凍結が起らない限り細胞は全然障害を受けない。この事は既に先人²⁾¹⁰⁾¹¹⁾によって報告されている通りである。

第 1 表 過冷却の影響

冷却時間 到達温度	生存率 (%)	
	到達直後	到達 2 時間後
対 照 (0°C)	100	98~103
-10°C	97~105	95~100
-13°C	98~100	—



第 1 図 $-1.0^{\circ}\sim-1.5^{\circ}\text{C}$ で植氷した場合の凍結温度曲線

↓; 生存菌数を調べた箇所を示す

2) 氷点附近に於ける凍結の影響

実験方法の項で述べたように、冷却速度を統一するため、菌液は $-1.0^{\circ}\text{C} \sim -1.5^{\circ}\text{C}$ で植氷し、その温度で十分に氷を成長させた。この時の温度曲線は第1図に示す通りである。

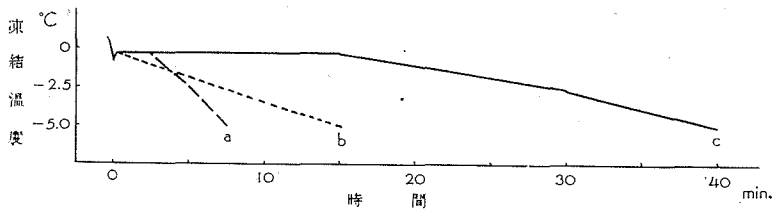
この過程に於ける障害は第2表に示すように、温度曲線の上で氷点を保持している間、生菌数の減少は見られないが、下降が始まると僅かに減少するようにも見える。

この点を第2図に示す3種の温度曲線で -5°C まで下げて、その影響を調べてみると、 -5°C 附近では生菌数が無処理に比べて10%以上の減少が明らかである(第3表)。

第2表 氷点附近における凍結の影響

実験例	凍結終了点		
	生存率 (%)		
	A*	B*	C*
1	98	96	86
2	105	94	94
3	96	105	88
4	107	90	93
5	90	95	90
6	95	97	96

* 第1図上のA, B, Cを示す



第2図 -5°C まで冷却した場合の凍結温度曲線

第3表 -5°C までの冷却条件と生存率の関係

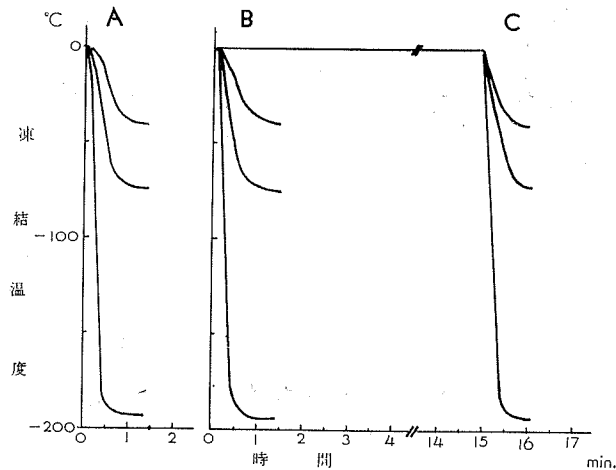
処理方法	生存率 (%)		
	氷点	-2.5°C	-5°C
a	95	95	85
b	100	90	85
c	98	92	88

処理方法 a, d, c は第2図上の冷却条件をさす

本実験では、菌液として蒸留水を用いているので、氷点は殆んど 0°C に近く、 $-1.0^{\circ}\text{C} \sim -1.5^{\circ}\text{C}$ で植氷すると、細胞周囲の水の凍結が起り、その間では殆んど細胞に障害を与えないと思われる。しかし、細胞の増殖能に影響はなくとも、細胞水分に何んらかの変化があるかもしれないので、第3図に示すように $-1.0^{\circ}\text{C} \sim -1.5^{\circ}\text{C}$ での植氷直後のものと、植氷15分後のものとの凍結状態を比較するため、それぞれ第2次急速冷却してみた(第3図のB, C曲線)。更にこの氷点附近での菌液中の氷晶の生成速度の影響を植氷せず直接急速冷却したもの と 植氷して15分後第2次急速冷却したもの とで調べてみた(第3図のA, C曲線)。

根井⁶⁾は急速凍結ほど細胞内凍結を起し易く、生存率も低いことを報告している。従って若し細胞水分が多いほど、細胞内凍結を起す頻度が高く、細胞内凍結によって死滅するとすれば、細胞が全然脱水されていないなら、第2次急速冷却で細胞内凍結が起り易く生菌数の減少が見られるであろうし、かなり脱水されているなら、細胞内凍結が起り難く、生菌数は前者ほど減少しない筈である。

その結果は第4表のように三者の間に殆んど差異は認められず、この程度の第1次凍結で



第3図 -40°C 、 -79°C 、 -196°C に急速冷却した場合の凍結温度曲線

A, 直接急速冷却した場合。B, 植氷直後急速冷却した場合。C, 植氷15分後急速冷却した場合。

は第2次急速冷却での影響が現われるほどの凍結状態の差はないと思われる。またこの範囲の氷晶の生成速度の違いによって細胞に与える障害の差はないと思われる。

3) 各種冷却速度による凍結の影響

0.05° 、 0.1° 、 0.5° 、 1° 、 5° 、 10° 、 20° 、 40° 、 60° 、 100° 、 $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 等の速度で冷却して氷点から -75°C までの間の各温度に到達した直後、 $+20^{\circ}\text{C}$ の温浴槽に移して急速に融解した。いずれの冷却速度でも到達温度が低くなるにつれて生菌数は減少するが -40°C 付近からは殆んど減少が見られない。第4図に4種の冷却速度の場合を示す。

これらの冷却速度の範囲では、冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合が -40°C 以上の各凍結温度での生存率が大きく、それよりも速度が大きくても、逆に小さくても生存率は低下する傾向がみられる(第5図)。

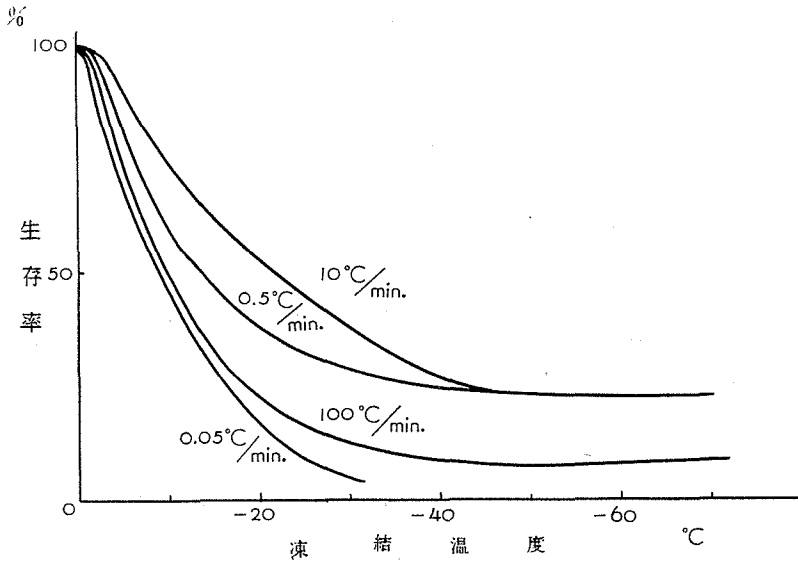
100° 、 $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のような大きな冷却速度の場合は、途中の測定に技術的な難点があるので問題が残されている。例えば、急速冷却の過程では試料中の部位によって温度分布に差違のあることは当然考えられるので、その場合の生存率と温度との関係などに関しては更に検討を要するものと思われる。また $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の冷却速度でも、ある温度に達した直後直ちに融解しているから、果して試料全体の温度が平衡状態に達していたかどうかは疑わしい。

4) 各温度での凍結時間の影響

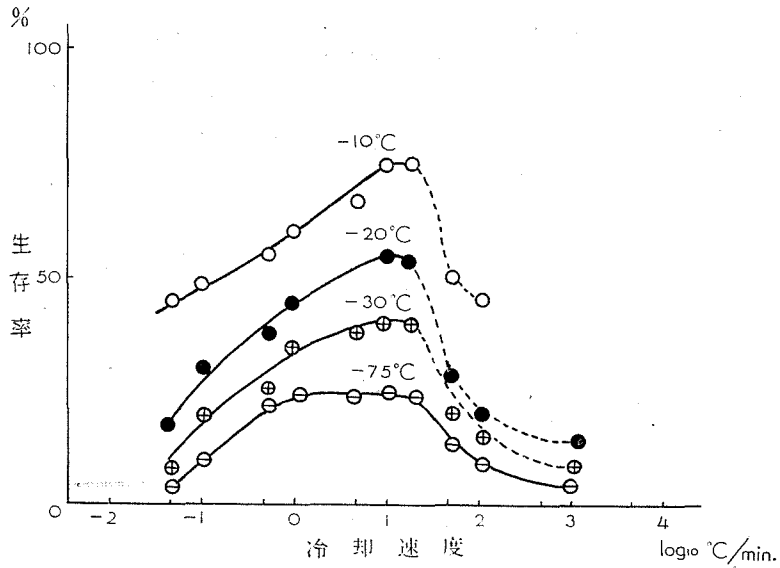
以上の実験は、各温度に到達直後融解したものであるから、各種冷却速度では各温度に到

第4表 各種冷却条件による生存率の比較

最終到達温度	生存率 (%)		
	植氷せず急速冷却	植氷直後急速冷却	植氷15分後急速冷却
-40°C	15~35	25~35	25~35
-79°C	5~10	7~9	5~10
-196°C	<5	2~5	2~5



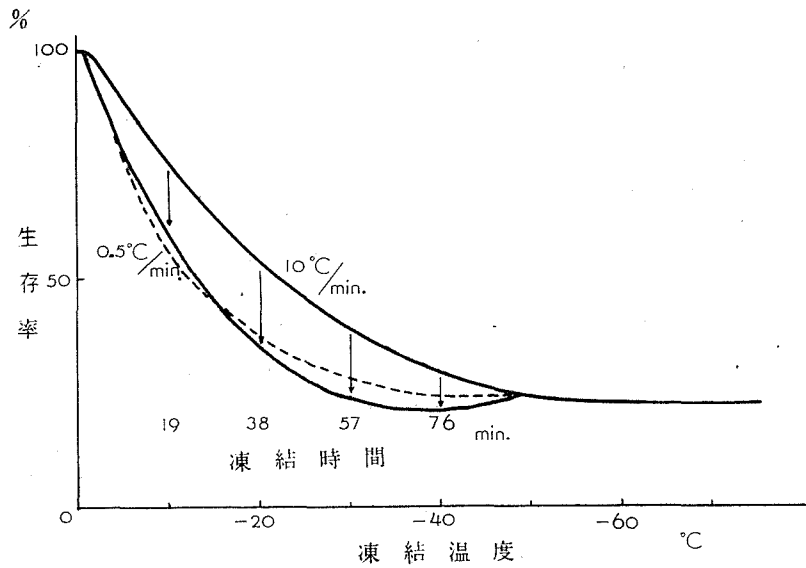
第4図 各種冷却速度による凍結温度と生存率との関係



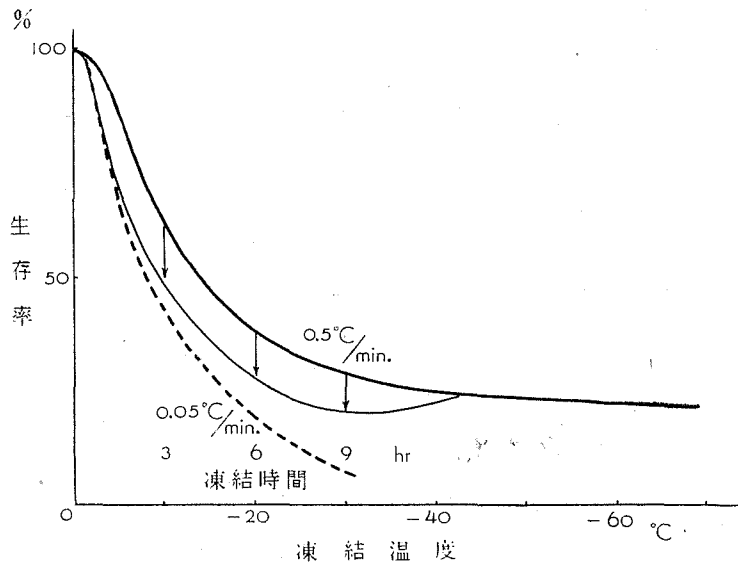
第5図 各凍結温度に於ける冷却速度と生存率との関係

....., 温度平衡に達しているかどうか疑わしい部分を示す。

達するまでの時間が違う。よってそれぞれの時間の差だけ、その温度に置いて、最終凍結時間を全て同一にする実験を試みた。その結果 -5°C から -40°C までの温度範囲では一定温度に或る時間置くことによって明らかに生存率の減少が見られる。例えば第6図のように冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のものを冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合と同じ時間だけその温度におけば、 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度のものと同じ生存率を示すようになる。また第7図のように冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のもの



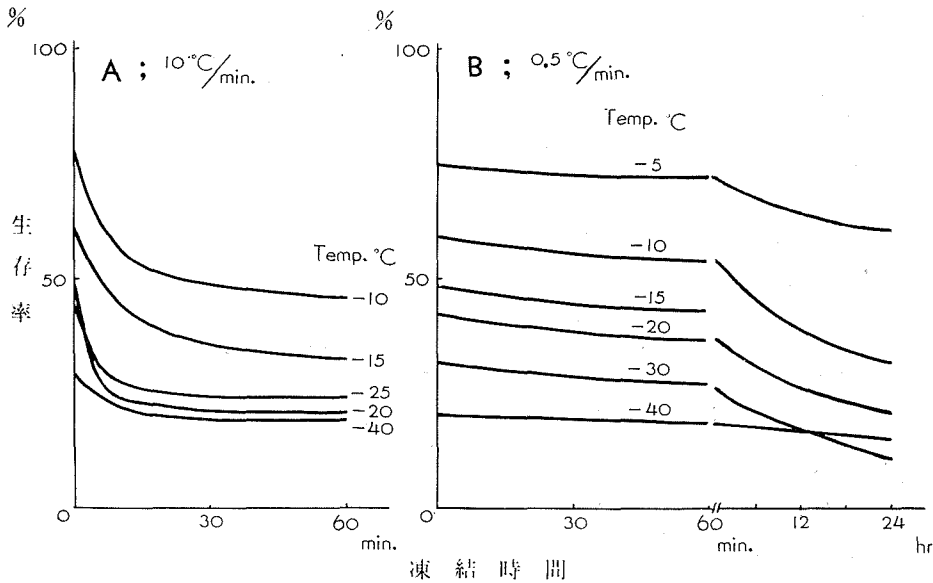
第6図 冷却速度は異なるが凍結している時間を等しくした場合の生存率
↓、各温度に到達後更にその温度に定められた時間
おいたときの生存率の減少を示す。



第7図 冷却速度は異なるが凍結している時間を等しくした場合の生存率
↓、各温度に到達後更にその温度に定められた時間
おいたときの生存率の減少を示す。

を冷却速度 $0.05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合と同じ時間だけその温度に置けば、速度 $0.05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のものと大体同じ生存率を示すようになる。

この点を検討するため、2種の冷却速度で各温度に到達直後、その温度に置いて更に1時間経過する間の生存率の変化を調べてみた。又0.5°C/minの冷却速度の場合のみ更に長時間の経過を調べてみた。その結果は第8図に示すように冷却速度10°C/minの場合は5分乃至10分位までの比較的短時間のうちに急激に減少し、その減少の割合は最終凍結温度-10°C~-20°Cあたりで最も著しかった。しかし、冷却速度0.5°C/minの場合には時間とともに僅かに減少する傾向がみられたに過ぎない。



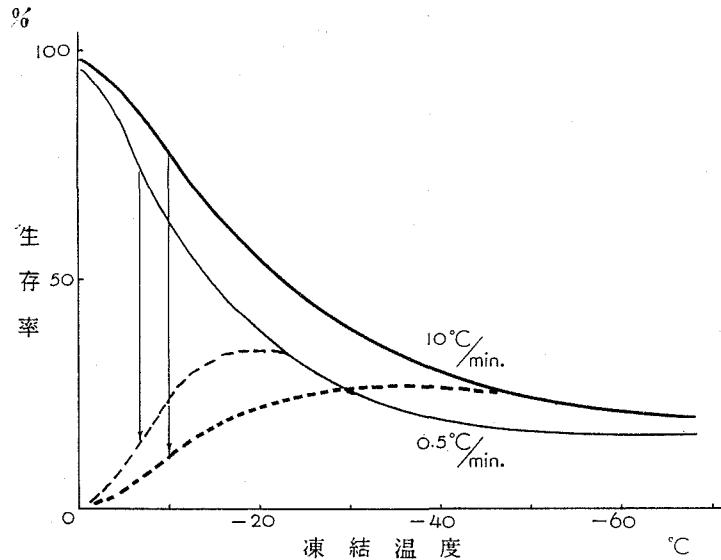
第8図 各凍結温度での生存率の時間的推移

A, 冷却速度10°C/minで各温度まで冷却してからの時間的経過
 B, 冷却速度0.5°C/minで各温度まで冷却してからの時間的経過

このように冷却速度10°C/minの場合、或る温度におくことによつて極めて短時間内に生菌数の急激な減少が見られることから、試料がその温度に達した瞬間には、温度或いは氷晶の量が試料全体としてまだ十分に平衡状態にまで達していないことが想像される。一方、冷却速度0.5°C/minの場合は凍結状態が殆ど各温度で平衡状態に達していると思われる。従つて、この場合の生存率のゆるやかな減少は、脱水による濃縮等によつて2次的に害されるためと考えられる。また冷却速度10°C/minの場合も生存率が急激な初期の減少以後、徐々に減少することはこれと同じ理由によるものであろう。

5) 各凍結温度からの急速冷却による影響

前述のように熱電対で測定された試料の一部位の温度では、所定の温度まで達したように見えても、冷却速度がかなり大きい場合には、試料全体がその温度に達してない場合もあろうし、又個々の細胞の状態を考えれば、ある温度に達した瞬間では、その温度で凍るべき水分が完全に凍結して平衡状態に達するまでになっていないかもしれない。この点を検討するため各



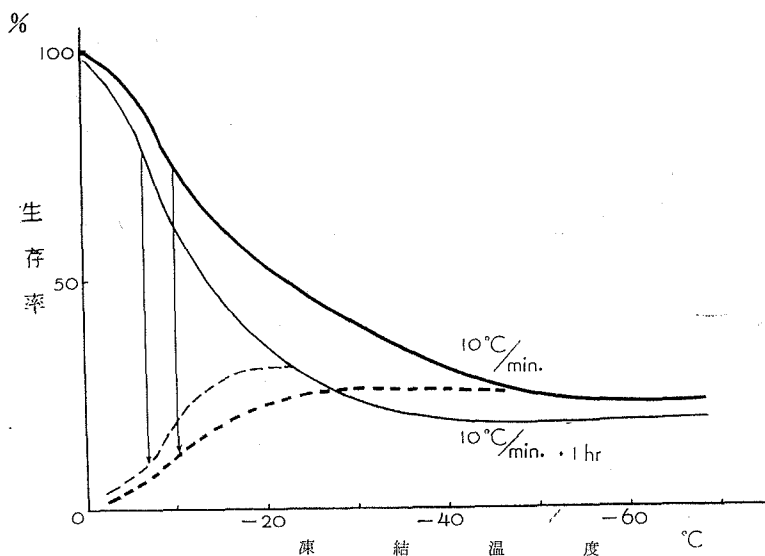
第9図 冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 及び $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で各温度に到達直後 -196°C まで急速冷却した場合の凍結温度と生存率との関係
↓, 急速冷却による生存率の減少を示す。

温度から -196°C (液体窒素) までの急速冷却を試みた。

冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で各温度に到達した直後のものを第2次急速冷却すると、冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合は第2次急速冷却によって生菌数の減少が起るのは -45°C 位までであるのに反して、冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合は -20°C 位までである。又各温度からの第2次急速冷却での生存率は冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ より冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の方が高く、最高の生存率を示す温度は冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合、 -25°C あたりであるが、冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合、 -15°C あたりである(第9図)。

この冷却速度で凍結させ各温度で到達後1時間おいたものを第2次急速冷却すると、冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合は第2次急速冷却によって影響を受ける温度範囲はより狭くなり、又到達直後のものに比べて生存率も高くなり、冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ での到達直後のものを第2次急速冷却した場合と同じ傾向を示す(第10図)。

冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合は到達直後のものと1時間その温度でおいたものとは差は認められなかった。冷却速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の場合のように速度が大きいと各温度で或る時間おくことによって第2次急速冷却の処理で影響を受ける温度範囲は大体 -20°C 以上と狭くなる。しかも、到達直後に第2次急速冷却したものに比して、各温度からの第2次急速冷却の処理による生存率も高くなる。従って、両者の凍結状態が全く同じではなく、到達直後のものの方が恐らくはまだ凍結していない水が細胞内に残っていて、それが第2次急速冷却で凍結を起して生存率の低下を来すのであろうと思われる。



第10図 冷却速度 10°C/min で各温度に到達直後及び1時間おいた後 -19.6°C まで急速冷却した場合の凍結温度と生存率との関係 ↓, 急速冷却による生存率の減少を示す。

IV. 考 察

微生物の低温処理による影響は処理条件や被検材料の種類などで差はあるにしても、多かれ少なかれ細胞が障害を受けることは明らかである。ただどのような機序で障害されるのかはまだはっきりわかっていない。しかし低温処理による障害には凍結という氷晶の形成が主な因子であることは、酵母浮遊液を 0°C 以下の低温にさらしても、それが凍結を起さず過冷却している限り、細胞には何んらの障害を与えないことから明らかであろう。このことは既に佐藤¹¹⁾によって大腸菌で、Mazur¹⁰⁾によって酵母で実証されている。

その凍結にしても、本実験のように -1.0°C ~ -1.5°C で植氷して凍結を開始させても細胞周囲の水が凍りつつある間(凍結温度曲線上の plateau の部分)は殆んど細胞の増殖能に影響がないのである。

この細胞周囲の水が殆んど氷結した後、次第に温度が下降し始めると、本来の細胞水分が細胞から脱水されたり、細胞内に氷晶ができたりして、温度の下降につれて細胞水分の凍結が進み、細胞の障害の程度が増すものと思われる。更に冷却速度による影響をみると、冷却速度 10°C/min の場合見かけ上高い生存率を示すが、温度及び氷への状態変化の平衡を考慮すれば、0.5°C/min の冷却速度が各温度での生存率は大きく、それより速度が大きくても、又逆に小さくても生存率は低い傾向を示した。しかし、いずれの冷却速度の場合でも凍結温度が低くなるほど、生菌数が減少したが、-40°C 近辺より低い温度ではもはや殆んど減少しないことが

みられた。

僧都等¹²⁾は熱量計測定法で細胞水分のうち凍りうる水分は -20°C あたりまでに殆んど凍ると報告している。一方本実験で、種々の温度まで凍結したものを液体窒素に移して第2次急速冷却すると、始めは急速冷却で死滅するものが多いが、 -20°C 近辺以下のものでは殆んど第2次急速冷却の影響がみられなくなる。この事は -20°C までに凍るべき水はすべて凍ってしまい、第2次急速冷却によって、新たに細胞内凍結を起すものはないことを示しているものと思われる。

それでは1次冷却だけのもので、 -20°C 以下 -40°C 位まで、生細胞が次第に減少して行くことは何と説明されるであろうか。細胞内凍結が起きてても、水量として測定にかからないくらい微量なのか、或いは測定不可能な微量の水量増加又は時間の経過の結果、脱水による害が細胞に致命的な障害となるのかもしれない。

いずれにしても、冷却速度によって差があり、ある冷却速度のところで細胞の生存率が高いのは、そこが丁度細胞外凍結を起すのによい条件のところであろう。それより冷却速度が小さいと、冷却過程で余り時間がかかるために、脱水による2次的な害が出るのかもしれない。又逆に冷却速度が大きいと、細胞内凍結を起す頻度が高くなって死滅率を増すのかもしれない。このことは緩慢凍結ほど細胞外凍結を起す頻度が高いのに反して、急速凍結ほど細胞内凍結を起す頻度が高く、生存率が低いという根井の報告⁹⁾より支持される。

摘 要

低温処理が、微生物の増殖能にどのような影響を及ぼすかをみるため、*Saccharomyces cerevisiae*の蒸溜水浮遊液を用いて、種々の冷却条件のもとで検討し、次のような結果を得た。

1) 酵母浮遊液を冷却しても、過冷却して凍結が起らない限り障害は全然受けない。又凍結でも、菌液の氷点附近の温度で凍結させたのでは殆んど障害を受けない。しかし凍結温度が -5°C に達すると10%前後の生細胞の減少を示し、更に温度が低くなるほど、生菌数は減少するが、 -40°C あたりより低くなると、もはや殆んど変化は認められない。

2) 菌液を -1.0°C ~ -1.5°C で植氷して十分に凍らせてから、各種冷却速度で -75°C まで冷却する場合、どの温度までの凍結でも、冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のもの生存率が比較的大きく、冷却速度がそれより大きくても、又逆に小さくても、生存率は小さくなる傾向を示す。

3) 各種凍結温度で一定時間置くと、 -5°C ~ -40°C の温度範囲で徐々に生細胞が減少し、しかも -40°C では減少の割合は非常に小さい。

4) 1次冷却で達した凍結温度から、更に2次的に急速冷却するとき、1次の凍結温度が高いほど、2次急速冷却で障害を受けて生菌数は減少するが、 -20°C 近辺より低い温度では2次急速冷却による影響は認められない。

以上の実験事実から、低温処理による酵母細胞の死滅は明らかに氷晶生成の状況によるものと思われる。特に冷却速度からみて、細胞外凍結と思われるものでは、時間が経つにつれて

2 次的な害はあるが、凍結による直接的な障害は少なく、細胞内凍結と思われるものでは多く致命的な障害を受けることから、細胞内氷晶生成が酵母細胞の凍結障害の主因をなすものと思われる。

文 献

- 1) Haines, R. S. 1938 The effect of freezing on bacteria. Proc. Roy. Soc. London B., **124**, 451-463.
- 2) Weiser, R. S. & Osterud, C. M. 1945 Studies on the death of bacteria at low temperatures. I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. J. Bact., **50**, 413-439.
- 3) Hansen, I. A. & Nossal, P. M. 1955 Morphological and biochemical effects of freezing on yeast cell. Biochim. Biophys. Acta, **16**, 502-512.
- 4) Mazur, P., Rhian, M. A. & Mahlandt, B. G. 1957 Survival of *Pasteurella tularensis* in sugar solutions after cooling and warming at subzero temperatures. J. Bact., **73**, 394-397.
- 5) Mazur, P., Rhian, M. A. & Mahlandt, B. G. 1957 Survival of *Pasteurella tularensis* in gelatin-saline after cooling and warming at subzero temperatures. Arch. Biochem. Biophys., **71**, 31-51.
- 6) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程 (第 1 報). 農化., **28**, 91-94.
- 7) 根井外喜男・小川忠人・兼平信一・秋元 博 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響. 農化., **28**, 94-98.
- 8) 根井外喜男・坂牛栄治・坂上康雄・佐藤正一 1959 凍結融解又は凍結乾燥酵母菌体の電子顕微鏡的観察. 低温科学, 生物篇, **17**, 63-69.
- 9) Mazur, P. 1961 Physical and temporal factors involved in the death of yeast at subzero temperatures. Biophys. J., **1**, 247-264.
- 10) Mazur, P. 1960 The effects of subzero temperatures on microorganisms. Recent Research in Freezing and Drying. Edited by A. S. Parkes & A. U. Smith, Blackwell Sci. Publ., Oxford. pp. 65-77.
- 11) 佐藤 徹 1954 低温処理による細菌死滅の機序について. 低温科学, 生物篇, **12**, 39-62.
- 12) 僧都 博・根井外喜男・尾藤方通 1961 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と生死との関係について. 低温科学, 生物篇, **19**, 49-58.

Résumé

Several experiments were undertaken to investigate the factors affecting the survival of cells subjected to subzero temperatures. Yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*, suspended in distilled water were chosen as experimental organisms.

1) Unless the yeast cell suspensions were frozen, cells underwent no damage, even if they were at subzero temperatures; that is, in the supercooled state. Although they were not affected during the initiation of freezing (by seeding) at -1.0°C and -1.5°C , the percentage survival of cells gradually decreased as the temperature was lowered; 90% of the cells survived at -5°C whereas only about 20% remained at -40°C . Survival curves thus obtained seemed exponential.

2) When the specimens were frozen to desired temperatures between -5°C to -75°C

at various rates of cooling which ranged from 0.05°C/min to 1000°C/min, the cells frozen at the cooling rates of about 0.5°-10°C/min showed the highest value in survival.

3) The survival in cells kept at given constant freezing temperatures between -5°C and -40°C gradually decreased with the duration of freezing. However, at a freezing temperature of -40°C, practically no decrease in the cell survival was found.

4) The specimens, treated to a two-step freezing which included a primary freezing to some specific temperature followed by a transfer to liquid nitrogen, showed different values in cell survival, depending upon the primary freezing temperatures; the cells, transferred to liquid nitrogen from the higher temperatures in primary freezing, survived less than those cooled from the lower temperatures.

From the observations as described above, it is assumed that the location and the configuration of ice crystals formed in the cell suspensions resulting from chosen cooling temperatures and cooling rates plays an important role among the factors affecting the cell survival after freezing and thawing.