



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酵母細胞の発酵に及ぼす凍結融解の影響
Author(s)	荒木, 忠; ARAKI, Tadashi
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 97-109
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17700">https://hdl.handle.net/2115/17700</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p97-109.pdf



## 酵母細胞の醗酵に及ぼす凍結融解の影響\*

荒 木 忠

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 40 年 7 月受理)

### I. 緒 言

酵母細胞の凍結融解による障害については、いろいろの報告がされているが、その多くものは増殖能に注目して細胞の生死を調べたものである。細胞が増殖するためには、少なくとも外界から物質を取り入れ、自己の必要な細胞構成成分に転換しなければならない。そのためには、絶えずエネルギーを消費しなければならない、そのエネルギーを酸素存在下では呼吸によって、無酸素状態では醗酵によって産出している。従って、このエネルギーを産出する代謝系の凍結障害の機序を明らかにすることによって、細胞の構造及び機能が凍結融解でどのような影響を受けるか、その凍結障害の一端がうかがえるものと考えられる。

Lynen<sup>1)</sup> は液体窒素での凍結処理によって、ビール酵母の代謝能が著しく低下すること及び僅かであるがフラクトース-1,6-二リン酸が醗酵されるようになることを報告している。また Krebs<sup>2)</sup>, Hansen and Nossal<sup>3)</sup> 等は本来細胞内に透過できないため代謝されないコハク酸塩がドライ・アイスで凍結融解した細胞では、僅かであるが代謝されるようになるということから、凍結処理によって細胞の透過性の増大することが示唆されると述べている。

本実験では、細胞の代謝系のうちでも最も良く知られた醗酵系に注目し、基質が醗酵されることをその基質の細胞内への透過性と醗酵に関与する酵素系との関連においてとらえ、それぞれの凍結融解による影響を検討した。

### II. 材料及び方法

#### 1. 使用材料

**細胞浮遊液**： 実験にはすべて市販のパン酵母（日甜イースト）を用いた。これを脱イオン水で3回遠心洗滌（6000×g, 15分）してから、湿細胞量を秤量し、脱イオン水を加えて500 mg/ml 濃度の細胞浮遊液を作り、この細胞浮遊液を適宜に希釈して実験に供した。

**無細胞抽出液**： 洗滌沈殿細胞に5 mM ニコチン酸アミドを含んだ0.1 M 磷酸緩衝液（pH 5.8）を加えて、湿重量で濃度500~125 mg/ml の細胞浮遊液を作り、約30 ml ずつ French presser cell に入れて、約500 kg/cm<sup>2</sup> の加圧の下で毎分数 ml の噴出速度で細胞を破碎した。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第739号

この粘稠な破碎した細胞浮遊液を遠心 ( $6000 \times g$ , 30 分) して、正常細胞及び大きな破片を除き更に遠心 ( $60000 \times g$ , 30 分) して微細な破片を除き、その上清を抽出液として用いた。

**プロトプラスト：** 麦汁培地又は White<sup>4)</sup> の合成培地にて、 $30^\circ\text{C}$  で 17 時間培養した対数期の細胞をクエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.8) で 3 回遠心洗滌 ( $6000 \times g$ , 15 分) してから、 $0.8 \text{ M}$  マニトールを含んだ上記緩衝液に浮遊させて、湿重量で濃度  $200 \text{ mg/ml}$  の細胞浮遊液を作った。この細胞浮遊液 9 容に細胞壁溶解酵素液 1 容を加えて、 $30^\circ\text{C}$  で約 7 時間振盪しながら作用させてから、 $0.8 \text{ M}$  マニトール加緩衝液で 3 回遠心洗滌 ( $3000 \times g$ , 5 分) して、溶解した細胞壁を取り除き、その沈澱物をプロトプラストとして用いた。細胞壁溶解酵素液は snail enzyme (L'industrie Biologique Francaise の Suc digestif d'Helix pomatia stabilisé) を Sutton and Lampen<sup>5)</sup> に従って調整したものをを用いた。

## 2. 凍結融解処理

内径 3 cm の平底アルミ缶に試料約 5 ml ずつ入れ、液体窒素に浸して急速に凍結させ、充分に時間 (5 分) をおいてから缶を取り出し、直ちに  $30^\circ\text{C}$  の温水にて振盪しながら融解した。反覆する場合は上記操作を繰り返して行なった。

## 3. 醗酵能測定法

Warburg manometer を用いて、 $28.5^\circ\text{C}$ 、嫌気条件下で発生する炭酸ガス量を測定した。反応混液は試料 2.0 ml (主室) と基質溶液 1.0 ml (側室) との全量 3.0 ml で、窒素ガスでガス交換を行なってから、恒温槽で温度平衡を行ない 15 分後基質溶液を加え反応を進行させた。基質としてはグルコース、フラクトース-1, 6-二リン酸 (FDP) を用いた。これと平行して同じ反応系で糖の消失を測定するため、反応混液から一定時間毎に一定量の試料を取り出し、 $\text{ZnSO}_4$  を加えて反応を止め、更に  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  を加えて除蛋白し、Somogy-Nelson<sup>6,7)</sup> の方法で還元糖を比色定量した。

## 4. 透過度合の測定法

遠心洗滌した沈澱酵母細胞に等量の各種溶液を加えて、一定時間放置後遠心してから、その上清の濃度を定量し、混合前後における溶液の濃度差から溶質の細胞内への透過する度合を算出した。いま混和前の溶液の濃度を  $C_0$ 、混合後の溶液の濃度を  $C_m$  とすれば、溶質の細胞内へ透過できる度合 ( $S$ ) は次式より求められることが Conway and Downey<sup>8)</sup> によって導き出された。

$$S = C_0/C_m - 1$$

使用した溶液は 3~5% イヌリン溶液、5% 乳糖溶液、5% グルコース + 10 mM モノ沃度酢酸溶液で、溶液の濃度は、乾物重量法又は比色法で定量した。細胞の乾物量は  $105^\circ\text{C}$  で恒量になるまで乾燥して求めた。

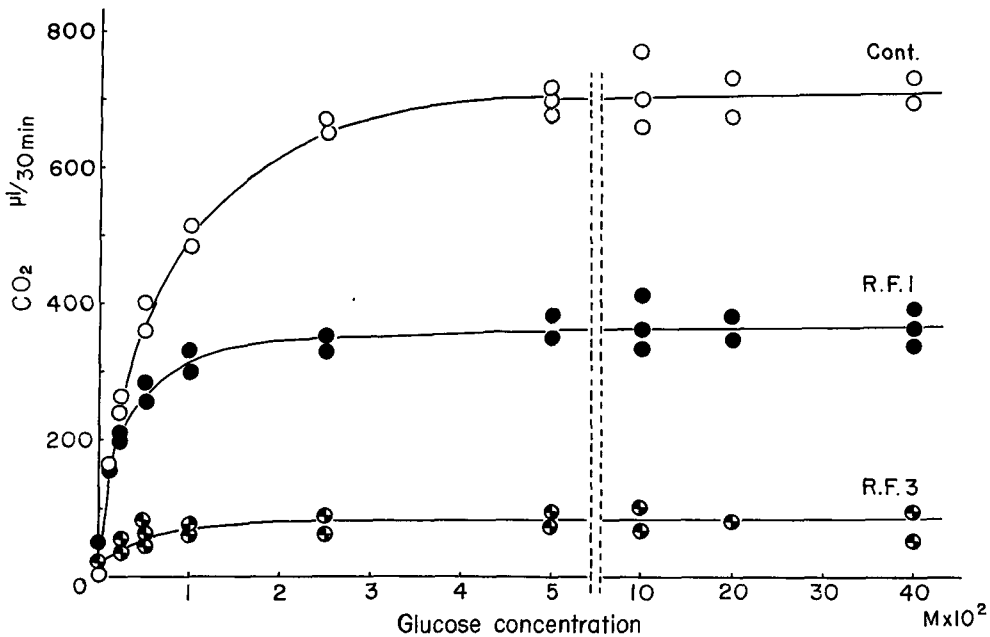
## 5. 細胞数及び生残率測定法

細胞浮遊液をそれぞれ適当な濃度まで希釈し、Thoma の血球計算板で細胞数を数えて算出した。また、適当な濃度まで希釈した細胞浮遊液の一定量に麦汁寒天培地を注加して平板培養し 48 時間後に認められた集落数を算定し、対照に対する百分率で生残率を表わした。

### III. 結 果

#### 1. 凍結融解細胞の醗酵能と生残率

無処理及び凍結融解細胞の基質濃度に対する醗酵能を基質添加後 30~60 分間に発生する炭酸ガス量で表わすと、第 1 図に見られるように、いずれの場合でも基質濃度の増加に伴って醗酵能が増大し、グルコース濃度 25 mM 以上ではそれぞれ一定の醗酵能を示した。処理細胞の醗酵速度は対照のものに対して、急速凍結 1 回のもので 50%，同じく 3 回のもので 15% であり、別に調べた各々の生残率も 50%，10% 前後であり、糖の飽和濃度以上では醗酵速度と生残率が殆んど一致することが認められた。従って、凍結融解によって増殖できない細胞はグルコースの醗酵系も障害を受けると考えられる。酵母細胞の醗酵系はグルコースが細胞内に能動的に透過された後に、醗酵に関与する酵素系によって炭酸ガスとエタノールに分解されると考えられているから、醗酵系の凍結障害は酵素系が不活性化されたためか、透過系が障害されたためか、或いは両者の障害によるためかのいずれかが考えられる。



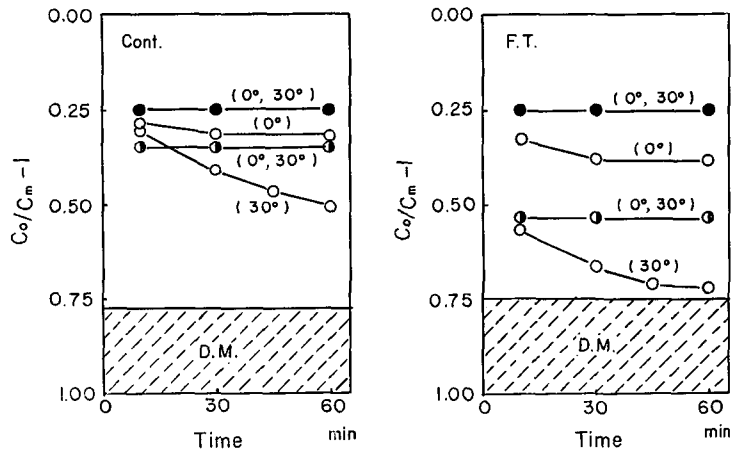
第 1 図 基質濃度に対する無処理及び凍結融解細胞の醗酵

濃度 250 mg/ml の細胞浮遊液を凍結融解処理後 1/25 に希釈した試料 (3 mg dry wt./ml) 2.0 ml に基質溶液 1.0 ml を加えて反応させ、30~60 分間の値で醗酵速度を表わした。28.5 ± 0.05°C, N<sub>2</sub>

#### 2. 凍結融解細胞の透過性

先ず、酵母細胞の透過性が凍結融解によってどのように影響されるかを調べるために、実験方法の項で述べたように、細胞内に透過しないイヌリン、細胞壁の部分まで透過すると考え

られている乳糖，能動的に透過されるグルコースを用いた。この3種の物質の細胞内へ透過する割合を無処理及び凍結処理細胞について比較するため， $0^{\circ}$ 及び $30^{\circ}\text{C}$ で，10，30，60分と物質の透過する経過を測定し，それぞれの遠心沈澱細胞量（重量）を1.00として，それに対する割合で表わすと第2図に示す通りである。イヌリン，乳糖のいずれの場合でも放置温度による差は認められず，混合後10分ですでに平衡に達し，更に長時間放置しても変化はみられない。ただ，イヌリンの場合では，無処理及び凍結融解の両者の細胞とも透過できる割合は0.25で等しいが，乳糖の場合では無処理細胞が0.34，凍結融解細胞が0.53で，凍結融解によって乳糖の透過できる割合が増大した。グルコースの場合では，いずれの温度でも時間とともに透過できる割合の増加がみられ，特に放置温度 $30^{\circ}\text{C}$ での無処理のものは混和後10分後0.30であるが60分後には0.50まで増大する。この値はCirillo<sup>9)</sup>が細胞水分の80%まで透過すると報告しているのに比べて値は小さいが，これは攪拌していないためと思われる。このグルコースの透過できる割合を10分後にみると，凍結融解によって増大することがみられ，細胞膜の透過性の増大が明らかである。

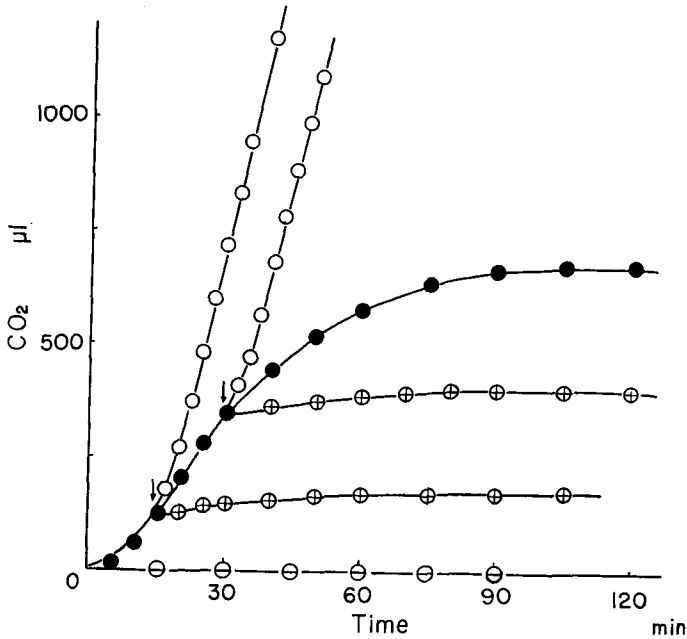


第2図 無処理及び凍結融解細胞の透過性の比較

$C_0/C_m - 1$  は全沈澱細胞量に対する溶質の透過できる割合を表わす。●：イヌリン，◐：乳糖，○：グルコース

### 3. 無細胞抽出液の凍結融解による影響

前節の実験結果から，凍結融解によって細胞膜の透過性が増大しているにも拘らず，醗酵能が低下しているということはもう一つの因子である醗酵に関与する酵素系の障害に起因することが考えられる。それで，抽出した酵素系が生細胞内に存在する酵素系と同じものであるか否かは問題であるが，細胞内酵素系の機能を検討するための一つの手段として，先ず，細胞から抽出した液について，その中の酵素系の凍結融解によって受ける影響を調べた。250 mg/ml濃度の細胞浮遊液を French presser cell で破砕して得られた抽出液は第3図にみられるように，基質を添加しなくても炭酸ガスの発生がみられるが，0.6 M グルコースを添加すると炭酸ガス発生速度が増大し約  $500 \mu\text{l}/10 \text{ min}$  であった。この抽出液の炭酸ガス発生能が酵素反応に



第3図 無細胞抽出液の酵素活性

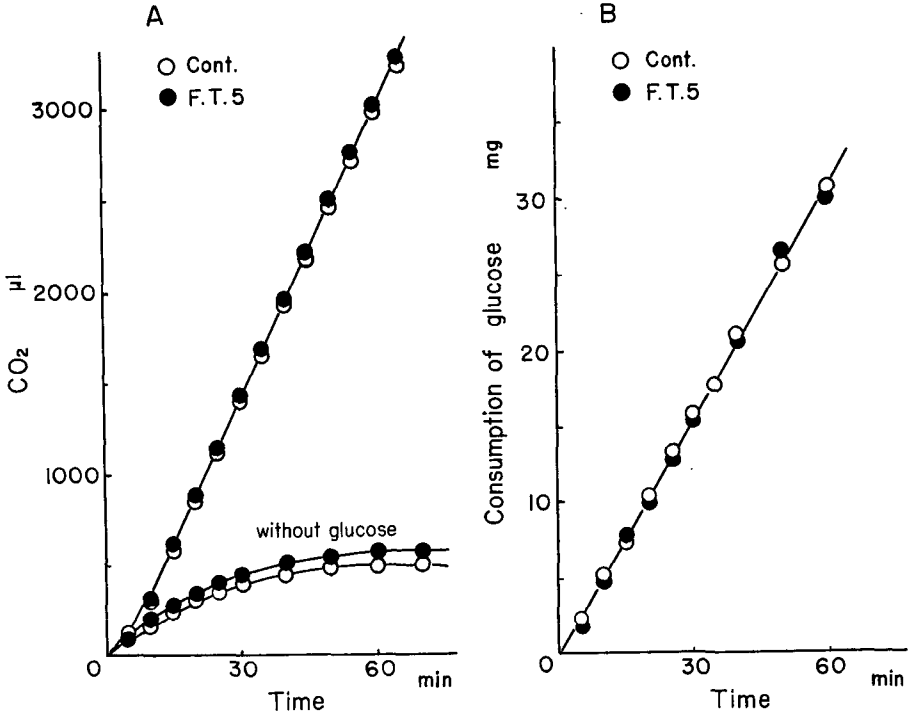
無細胞抽出液 (72.2 mg dry wt./ml) 2.0 ml に基質溶液 1.0 ml を添加した。28.5 ± 0.05°C, N<sub>2</sub>, ●: 緩衝液を 0 分に添加 (基質無添加), ○: 0.6 M グルコース溶液を ↓印のところで添加, ⊕: 0.6 M グルコース + 15 mM モノ沃度酢酸を ↓印のところで添加, ⊗: 無細胞抽出液 (100°C で 5 分間煮沸) に 0.6 M グルコースを 0 分に添加

よることは 100°C で 5 分間煮沸したり、或いは基質が存在しても 15 mM モノ沃度酢酸の添加で、炭酸ガス発生が殆んど阻害されることより明らかであり、Lebedew's juice と同じものと考えられる。この抽出液は急速凍結を 5 回繰り返しても炭酸ガス発生速度に変化はみられないし (第 4 図 A)、また同一条件の下で反応液中のグルコースの消失を測定しても、凍結融解による酵素活性の変化は認められず (第 4 図 B)、無処理対照の抽出液と同一であった。このように抽出液の醗酵に関与する酵素系は凍結融解の影響を全然受けないことが明らかである。

#### 4. 無細胞抽出液の酵素活性と凍結融解細胞の醗酵能との比較

抽出液の酵素活性は生細胞の醗酵能に比して非常に低いものではあるが、凍結融解の影響を全く受けないことから、凍結による酵素系の不活性化があったとしても最低この程度の酵素活性は凍結融解細胞に残存していることが予想される。それで、高濃度の細胞浮遊液を用いて French presser cell で破碎した場合と凍結融解した場合とで、その醗酵能に及ぼす影響を比較してみた。その結果は第 1 表に示す通りである。濃度 250 mg/ml の細胞浮遊液を破碎処理すると、その生残率は約 10% で、顕微鏡の下で細胞の形態をとどめる細胞数も 156 × 10<sup>7</sup> cells で生細胞数 (110 × 10<sup>7</sup> cells) と等しく 10% 前後であった。しかし、凍結融解した場合には生残率は約 10% で破碎処理の場合と同率であるが、細胞数は 1074 × 10<sup>7</sup> cells で殆んど無処理の細胞

数 ( $1080 \times 10^7$  cells) と変りなく、殆んどすべての細胞が凍結融解してもその細胞の形態をとどめている。このような処理細胞浮遊液のグルコースの醗酵速度は破碎処理の場合も凍結融解処



第4図 無細胞抽出液の酵素活性に及ぼす凍結融解の影響

- A 無細胞抽出液 (32.9 mg dry wt./ml) 2.0 ml に 0.6 M グルコース溶液 1.0 ml を加えて、 $28.5 \pm 0.05^\circ\text{C}$ ,  $\text{N}_2$  で反応させた
- B 反応混液の組成及び条件は A に同じ

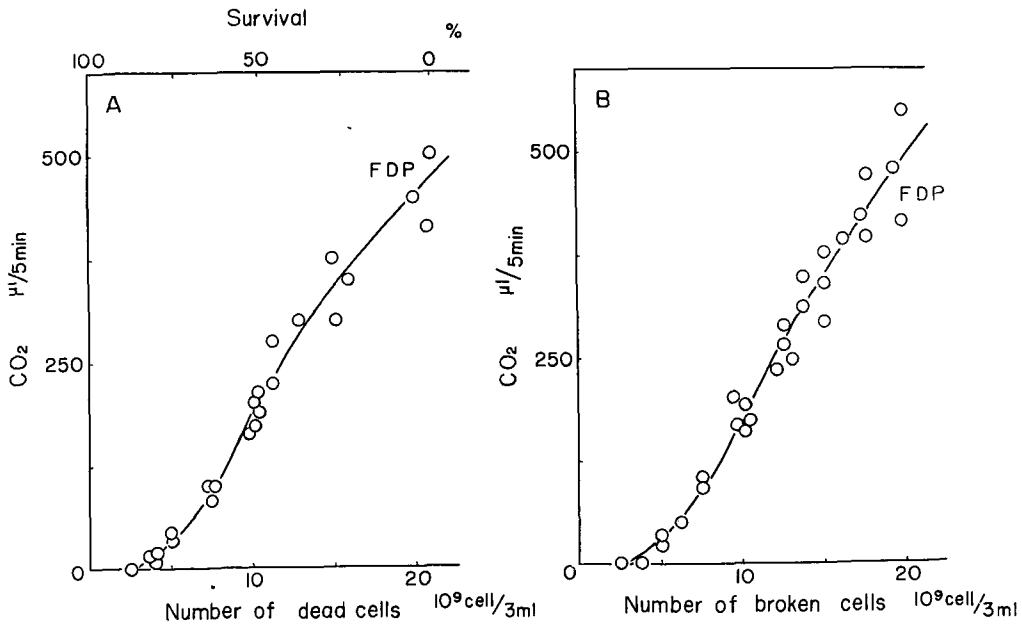
第1表 生細胞の醗酵に及ぼす物理的破碎及び凍結融解の影響

試料	反応混液中の全細胞数 (cells/3 ml)	反応混液中の生細胞数 (cells/3 ml)	醗酵速度 ( $\mu\text{l CO}_2/5 \text{ min}$ )		
			基質無添加	グルコース添	フラクトース二磷酸添
無処理対照	$1080 \times 10^7$	$1052 \times 10^7$	0	2940*	5
物理的破碎処理	$156 \times 10^7$	$110 \times 10^7$	46	605	270
遠心分離 (6000×g, 15分)	—	—	上清	294	242
			沈澱物	304	10
凍結融解処理3回	$1074 \times 10^7$	$102 \times 10^7$	55	654	255
遠心分離 (6000×g, 15分)	—	—	上清	15	10
			沈澱物	10	396

\* 1/10 希釈した試料で測定した値を 10 倍して求めたもの  
 反応混液の組成は試料 2.0 ml と基質溶液 1.0 ml で、これを  $28.5 \pm 0.05^\circ\text{C}$ ,  $\text{N}_2$  条件の下で反応させて、30~60 分間に於ける定常速度で醗酵速度を表わした

理の場合も、無処理のものに対して約20%で同率であるが、生細胞の割合より大きい値を示した。これらを遠心して上清と沈澱画分に分けると、破碎処理の場合では遠心上清に酵素活性がみられ、沈澱物には生細胞の割合と一致する醗酵能しかみれないが、凍結融解処理の場合では遠心上清に酵素活性はみれず、沈澱物にも生細胞の割合と一致する醗酵能しかみられなかった。しかし、凍結融解した場合、その細胞浮遊液の醗酵速度は生細胞の割合より大きく2倍近い値を示し、破碎処理の場合と殆んど同じ値を示すことから、醗酵に関与する酵素系の酵素群は沈澱物にあるが、醗酵系の低分子の補酵素や他の因子が細胞外液中に遊出し、遠心したとき上清に分けられるためと考えられる。それで、凍結融解による死細胞に残存する酵素活性を調べるため、醗酵過程の中間代謝物でありながら生細胞では細胞内に透過されないため醗酵できないフラクトース-1,6-二磷酸(FDP)を基質として炭酸ガスの発生量を測定してみた。FDPが基質の場合、凍結融解細胞浮遊液の炭酸ガス発生速度は255  $\mu\text{l}/5\text{min}$ で、破碎処理細胞浮遊液及びその遠心上清の炭酸ガス発生速度(270, 242  $\mu\text{l}/5\text{min}$ )と殆んど一致した。このことから、凍結融解によって細胞膜及び細胞構造の破壊が起るが、丈夫な細胞壁があるために醗酵に関与する酵素系の酵素群は外液中に遊出することはなく、細胞内に残存することが示唆される。

このように凍結融解による死細胞にも生細胞に比れば非常に低いが、破碎して得られる抽出液と同程度の酵素活性が残存することが明らかである。それで、更に濃度125~500 mg/mlの細胞浮遊液で凍結融解処理の回数を変えたり、凍結融解5回のものに無処理のものを加えたりして、各種の生残率をもつような試料を作り、一方破碎して得た抽出液を適当に希釈して各



第5図 凍結融解細胞及び無細胞抽出液の醗酵速度の比較

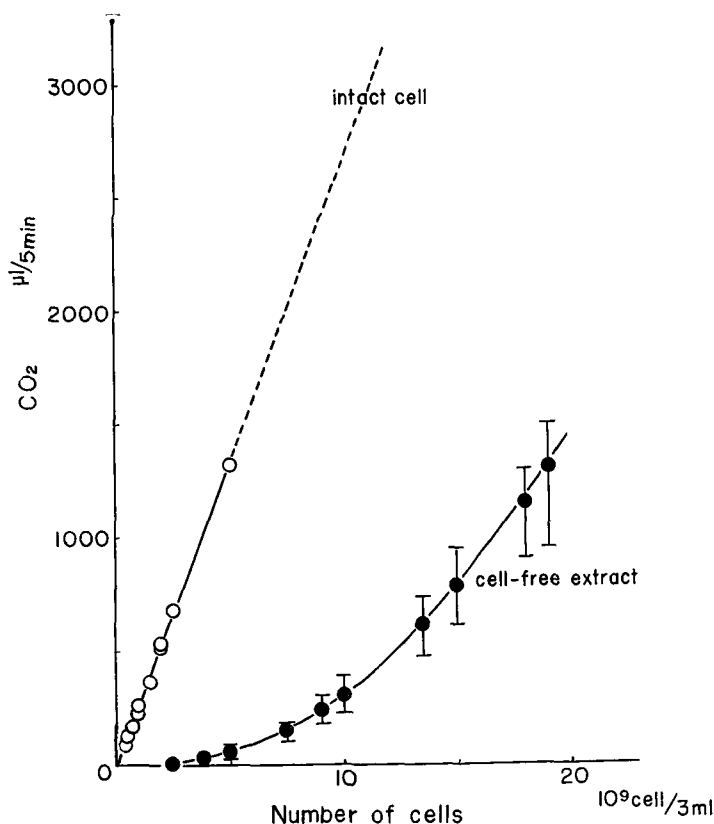
Aは凍結融解処理細胞のフラクトース-1,6-二磷酸醗酵の場合

Bは無細胞抽出液の場合。反応混液の組成、条件は第1表と同じ

種濃度の抽出液を作り、それぞれの FDP の醱酵速度を測定して両者の比較を試みた。凍結融解の場合、死細胞数の少ないものほど即ち生残率が高くなるにつれて、醱酵速度の低下がみられるが、死細胞数と醱酵速度との間に直線関係は示さず、死細胞数の少ないところほど死細胞当りの酵素活性の低下が著しかった(第5図 A)。同じく抽出液の場合も、凍結融解の場合と同一傾向を示した(第5図 B)。このように死細胞又は破壊細胞数の少ないところほど、死細胞又は破壊細胞当りの酵素活性が著しく低下することがみられた。

### 5. 生細胞の醱酵能と無細胞抽出液の酵素活性との比較

前節の実験結果から、凍結融解による死細胞にも抽出液と同程度の酵素活性が残存していることは明らかであるが、生細胞の醱酵能に比して非常に低い酵素活性しか示さない。それで、醱酵に参与する酵素系が細胞構造の破壊のときに不活性化されるかどうかを調べるため、125~500 mg/ml 濃度の細胞浮遊液を破碎して得た抽出液を適当に希釈して、各種濃度の抽出液を作り、グルコースを基質として、その抽出液の酵素活性と生細胞の醱酵能を比較してみた。その結果は第6図に示す通りである。破碎抽出操作の反覆による誤差は相当大きく、常に一定



第6図 生細胞及び無細胞抽出液の醱酵速度の比較

- : 生細胞のグルコースの醱酵速度
  - : 無細胞抽出液のグルコースの醱酵速度
- 反応混液の組成及び条件は第1表に同じ

の酵素活性を有する抽出液は得られにくい、破碎された細胞数に対してその上清に抽出された液の炭酸ガス発生速度をとってみると、FDP が基質の場合に比べて炭酸ガス発生速度は大きい、破碎細胞数と酵素活性との間に直線関係はみられなかった。しかも、FDP が基質の場合と同じように、破碎細胞数が少ないところほど、破碎細胞当りの酵素活性が著しく低下することが認められた。しかし、生細胞の場合には生細胞数と醗酵速度との間に直線関係がみられ、生細胞当りの醗酵能は一定である。このように生細胞の醗酵能が細胞数に比例し、各細胞がそれぞれ独立に一定の醗酵力を有することは良く知られた事実である。従って、細胞を破碎して得た抽出液では、各細胞の醗酵を行なう場での酵素群及び補酵素等の酵素系の濃度が細胞構造の破壊のときに細胞外液で薄められ、そのために酵素活性の低下が起ると考えられる。また、酵素群の一部の酵素が破碎抽出のときに不活性化されるためかもしれない。

### 6. プロトプラストの凍結融解の影響

以上の実験結果から、凍結融解によって細胞膜及び細胞構造の破壊が起るにも拘らず、細胞壁があるため酵素群の遊出が妨げられるということが示唆されたので、細胞壁のないプロトプラストでは凍結融解によって、外液中に醗酵に関与する酵素系が溶出されるであろうと考え、その点を確かめてみた。snail enzyme で処理して得られるプロトプラストの量を知るために、滲透圧が等調以上の溶液では細胞の形態を保っているが、低調な溶液(マニトールを含まない緩衝液)では lysis してしまう細胞をプロトプラストとみなして数えてみると、全細胞数に対して 50~90% に当り、処理例によってかなりの差がみられた。これらのプロトプラスト浮遊液を凍結融解すると、形態的に細胞と認められるものの数は低調溶液処理後に認められる細胞数と同じであるから、凍結処理によってプロトプラストはすべて破壊されたことになる。この凍結融解処理の遠心上清 (6000×g, 15 分) には炭酸ガス発生能がみられるが、FDP に比べてグルコースが基質の場合の炭酸ガス発生速度は著しく低かった (第 2 表)。しかし、この凍結融

第 2 表 プロトプラストの醗酵に及ぼす凍結融解の影響

試 料	醗 酵 速 度 ( $\mu\text{l CO/hr}$ )		
	基質無添加	グルコース 添 加	フラクトース 二磷酸添加
無処理プロトプラスト浮遊液 ( $310 \times 10^7$ cells/ml, 90%)**	20	17400*	340
凍 結 融 解 処 理 上 清	230	360	1220
低調溶液による破壊処理上清	180	960	1140
無処理プロトプラスト浮遊液 ( $382 \times 10^7$ cells/ml, 52%)**	15	21400*	75
凍結融解処理プロトプラスト浮遊液	320	—	1020
凍 結 融 解 処 理 上 清	110	230	600
無処理プロトプラスト浮遊液 ( $518 \times 10^7$ cells/ml, 70%)**	20	29100*	—
凍 結 融 解 処 理 上 清	145	580	1800

\* 1/20 希釈した試料で測定したものより求めた値

\*\* 括弧内の数値はプロトプラスト浮遊液の濃度及びその全細胞のうちのプロトプラストのパーセントを表わす

解処理上清の FDP の醗酵速度は低調溶液によって破壊した上清のグルコース及び FDP の醗酵速度と等しい値を示し、また無細胞抽出液の場合と殆んど同程度の活性を示した (第 5 図参照)。このように、プロトプラストの醗酵に関与する酵素系は凍結融解によって、細胞外液中に溶出することが明らかである。しかし、凍結処理上清のグルコースの醗酵速度が著しく低いことはグルコースから FDP までの醗酵過程の酵素群が凍結処理によって不活性化されるためとも思われるが、恐らく遠心の際に、沈澱区分に分布されるようになり、上清に溶出されないためと考えられる。

#### IV. 考 察

酵母細胞にとって最も重要なエネルギー産生の反応系の一つである醗酵系が凍結融解によって障害され、醗酵能の低下がみられることは良く知られた事実である。それで、酵母細胞の凍結障害の機構を解明する一端として、この醗酵系が凍結融解によってどのような機序で障害されるかを検討した。

酵母細胞の醗酵は細胞数に正比例し、各細胞がそれぞれ独立に一定の醗酵力を有する。その醗酵速度は糖濃度 0.5~10% の広い範囲にわたって、濃度に関係であるという事実から、糖の醗酵速度は細胞内にとり入れられた糖の濃度によって決まり、細胞内への透過能に支配されると考えられており、細胞膜が大きな役割を演じていると考えられる。この細胞膜が凍結融解によって影響されることは、細胞内成分の遊出が著しくなること<sup>3),10)</sup>及び本来透過しないため代謝されない物質が代謝されるようになることから<sup>1),2)</sup>示唆された。このように凍結融解によって細胞膜の透過性が増大することは、細胞内に透過しないと考えられている乳糖が凍結融解によって透過するようになること (第 2 図) から支持される。若し凍結融解処理細胞では乳糖が吸着されるようになるためとすれば、温度によって吸着量に差を生じるはずである。実際には、0°, 30°C でも同一の透過する度合を示すことから、このことは否定される。また代謝阻害剤の存在下で、グルコースの透過する度合の経時的变化をみても、凍結処理細胞の方が透過する度合が著しく大きいことから細胞膜の透過性の増大が明らかである。

従って、凍結融解による醗酵能の低下は膜の透過性の問題よりも、むしろ醗酵に関与する酵素系の障害に起因するのではないかと考えられた。そこで、この点の吟味を行なった結果、物理的 (機械的) 破壊によって得た抽出液の醗酵系は凍結融解の影響を全然受けないこと (第 4 図)、生細胞では透過できないため醗酵されないフラクトース-1,6-二磷酸が、凍結融解細胞で醗酵されるようになると共に、抽出液と同程度の活性を示すこと (第 5 図)、及びプロトプラストを凍結融解すると、それが破壊されて上清に酵素系が遊出されるようになること (第 2 表) などの事実から、凍結融解処理によって直接醗酵系の酵素自身が不活性化されないと考えられる。しかし、この抽出液に於いて、フラクトース-1,6-二磷酸の醗酵速度がグルコースの場合に比して低く、酵素濃度が高い程著しい差がみられる (第 5 図 B)。これは恐らく Harden break<sup>11)</sup>と同じ原因によると思われる。今この基質が Embden-Meyerhof-Parnas scheme に従って分解され、他に ATPase が存在しないとすれば、フラクトース-1,6-二磷酸 1 モルから 4 ATP が過

剩りに生成され、ADP及び無機燐の不足を来たすことになり、従つて酵素濃度が高いほど著しく不足するはずである。この実験条件下では無機燐酸が十分に存在しているためADPの不足に起因すると考えられる。このように、生細胞との違いがみられることから、破碎抽出した醗酵系が細胞内に存在する醗酵系と同一状態のものであるか否かが問題になる。酵素活性を炭酸ガス発生及びグルコースの消失で測定して、生細胞の活性と抽出液の場合を比較してみると抽出液の酵素活性は非常に低く(第6図)、破壊細胞数の少ないところ即ち抽出液の濃度の低いところほど、酵素活性の著しい低下がみられた。このことから、抽出液の酵素活性が生細胞の醗酵能に比して低いことは、各細胞内の醗酵を行なう場での醗酵に関与する酵素群及び補酵素等の酵素系の濃度が細胞構造の破壊によって、細胞外液で薄められるためであるという可能性が考えられる。今生細胞の容積と外液が等量である500 mg/ml濃度の細胞浮遊液の場合を例にとってみると、この浮遊液は破碎処理によって、90%の細胞が破壊されるから、抽出液の酵素系の濃度は生細胞内の酵素系の濃度の約47% ( $45/45+50 \div 0.474$ ) となり、更に試料2 mlに基質溶液1 mlを加えるので最終濃度は生細胞の酵素系の濃度の約32% ( $0.474 \times 2/3 \div 0.316$ ) となる。実際に、第6図にみられるように、この抽出液の醗酵速度は破碎細胞数が  $18 \times 10^9$  cells であるから、 $1150 \mu\text{l}/5 \text{ min}$  であった。この活性は反応混液中の破壊された細胞によるものであるから、それに相当する生細胞数は  $18 \times 10^9$  cells で、その醗酵速度は  $4770 \mu\text{l}/5 \text{ min}$  ( $265 \mu\text{l}/5 \text{ min}/10^9 \text{ cell} \times 18$ ) となる筈である。この生細胞の醗酵能が破碎処理によって、生細胞の醗酵能の約24% ( $1150/4770 \div 0.242$ ) に低下したことになり、酵素系の濃度を算出した32%に比べてやや低い程度で、余り大差は生じない。このように、醗酵を行なう場である細胞内の酵素系の濃度が、細胞構造の破碎によって、細胞外液で薄められるために、抽出液の酵素活性が生細胞の醗酵能に比して低いのであつて、破碎抽出操作による酵素自身の不活性は起らないのかもしれない。従つて、低濃度の細胞浮遊液での凍結融解による醗酵能の低下(第1図)は醗酵を行なう場である細胞内の酵素系が細胞外液によって薄められるためと考えられる。しかも、Lynen<sup>1)</sup>、Meyerhof<sup>11)</sup> 等が報告しているビール酵母と違つて、このパン酵母では凍結融解によつて細胞壁の破壊が殆んどみられないこと及び細胞外液中に酵素群の遊出もみられないこと(第1表)等の事実から、この細胞外液で薄められるための影響は酵素自身が薄められるというより、むしろ、醗酵に関与する低分子の補酵素や他の因子が細胞外に遊出して薄められるためか、或いは醗酵に関与する酵素群の一部の酵素の遊出によることが想像される。この点に関しては現在実験中である。

基質の存在しない場合に、低濃度の細胞浮遊で凍結融解によつて炭酸ガス発生量が大きくなること(第1図)は、遊出された細胞成分が生細胞の基質となることによると考えられる。このことは次の実験結果(未発表)からも支持される。代謝系は阻害しないが生細胞への基質の透過を阻害するため、生細胞では基質を醗酵できなくなることが知られている  $\text{UO}_2$  イオンを凍結処理した低濃度の細胞浮遊液に加えると炭酸ガスの発生は殆んど完全に阻害されるという結果からも明らかである。

上述したように、凍結融解によるパン酵母細胞の醗酵能の低下は醗酵系の酵素自身が不活

性化されるというより、むしろ、細胞膜の破壊によって、醗酵に関与する低分子の補酵素や他の因子或いは醗酵系の一部の酵素が細胞外に遊出し、その濃度が薄められることに起因すると考えられる。この細胞膜の破壊が細胞死滅の原因であるか、結果であるかは不明で、今後更に検討を加えたいと考えている。

終りに御指導くださった根井教授に感謝する。

## V. 摘 要

酵母細胞の醗酵能に及ぼす凍結融解処理の影響を基質の細胞内への透過性と醗酵に関与する酵素系との関連において検討した。

1. 生細胞では透過しない乳糖、フラクトース-1,6-二磷酸が凍結融解処理によって透過されるようになるが、細胞壁を透過できないと考えられているイヌリンは凍結融解細胞でも透過せず、生細胞の場合と変りなかった。このことから、凍結融解処理によって細胞壁の破壊は起らないが、細胞膜の透過性が増大していることが明らかである。

2. 生細胞のグルコース醗酵は生細胞数に比例し、各細胞が独立に一定の醗酵力を有する。凍結融解処理を行なうと、高濃度の細胞浮遊液では生細胞数に相当する醗酵能以上の活性がみられるが、細胞外液に醗酵に関与する酵素系のうちの酵素群の遊出はみられなかった。しかし、snail enzyme を作用させて得たプロトプラストは凍結融解処理によって破壊され、その酵素系が外液中に溶出されることがみられた。

3. 生細胞では醗酵できないフラクトース-1,6-二磷酸が凍結融解細胞によって醗酵されるようになるが、その酵素活性は死細胞数との間に比例関係はなく、死細胞当りの酵素活性は死細胞数が少ないほど著しい低下を示した。

4. French presser cell で破碎して得た無細胞抽出液はグルコース、フラクトース-1,6-二磷酸を醗酵することができ、その酵素活性は凍結融解処理によって全然影響を受けなかった。またその酵素活性は抽出液の濃度に比例せず、濃度の低いところほど著しい低下を示した。

以上の実験結果から、酵母細胞の醗酵が凍結融解処理によって低下することは、酵素自身の不活性化されるというよりも、細胞膜の破壊によって醗酵に関与する酵素系の低分子の補酵素や他の因子或いは一部の酵素が遊出されるようになり、それらが細胞外液で薄められるためと推定される。

## 文 献

- 1) Lynen, F. 1939 Über den Stoffwechsel der Hefe nach dem Einfrieren in flüssiger Luft. Ann. Chem. Justus Liebig's, **539**, 1-39.
- 2) Krebs, H. A., Gurin, S. and Eggleston, L. V. 1952 The pathway of oxidation of acetate in baker's yeast. Biochem. J., **51**, 614-628.
- 3) Hansen, I. A. and Nossal, P. M. 1955 Morphological and biochemical effects of freezing on yeast cells. Biochim. Biophys. Acta, **16**, 502-512.
- 4) White, J. and Muns, D. J. 1950 Yeast growth method for determination of biotin, pantothenic acid and inositol activities in raw materials. J. Inst. Brew., **56**, 141-149.

- 5) Sutton, D. O. and Lampen, J. O. 1962 Localization of sucrose and maltose fermenting systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 303-312.
- 6) Nelson, N. 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.
- 7) Somogyi, M. 1952 Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- 8) Conway, E. J. and Downey, M. 1951 An outer metabolic region of yeast cell. *Biochem. J.*, **47**, 347-355.
- 9) Cirillo, V. P. 1962 Mechanism of glucose transport across the yeast cell membrane. *J. Bacteriol.*, **84**, 485-491.
- 10) 坂上康雄 1959 酵母の発育及び代謝に及ぼす凍結融解の影響. *低温科学, 生物篇*, **17**, 105-124.
- 11) Meyerhof, O. 1945 The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.*, **157**, 105-119.

### Summary

In order to investigate the effect of freeze-thawing upon the physiological functions of yeast cells, the permeability of cell membrane and the fermentation of cells were examined.

1) With freeze-thawing, cells became permeable to lactose and fructose-diphosphate, which cannot penetrate cell membranes in untreated normal cells; but they did not become permeable to inulin. This proves some increase in permeability of cell membrane on freeze-thawing.

2) Normal yeast cells fermented glucose. The extent of fermentation in cell suspensions was parallel to the number of viable cells contained. As a result of freeze-thawing, cell suspension in high concentrations showed higher fermenting activity than that corresponding to the number of intact cells, but the supernatant showed no activity. This suggests that cells injured by freeze-thawing still retain some fermenting activity.

3) As a result of freeze-thawing, cells changed to be able to ferment fructose-diphosphate. Such fermenting activity fairly decreased in low concentrations of cell suspensions, when compared to high concentrations.

4) Protoplasts of yeast cells, yielded by a treatment with snail enzyme, were damaged by freeze-thawing. Some enzymes, which were not released from normal protoplasts, were released from freeze-thawed protoplasts into surrounding media.

5) Cell-free supernatant, extracted by mechanical destruction, maintained activity fermenting glucose and fructose-diphosphate. This fermenting activity was not affected by freeze-thawing, but showed relatively less value in the lower concentration of the extract.

As results obtained from these experiments, it was assumed that a decrease in fermenting activity of freeze-thawed cells might be caused by the dilution of some enzymes and/or co-factors in intracellular enzymatic systems with surrounding media, resulting from damage in the cell membrane due to freeze-thawing.