

세균포자의 건열에 대한 열저항성

韓 鳳 浩*

THERMAL RESISTANCE OF BACTERIAL SPORES TO DRY HEAT

Bong-Ho HAN*

Thermal resistance of dried bacterial spores against dry heat was determined. Spore suspensions of *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372, *Bacillus stearothermophilus* Oxoid Code BR 23 and *Clostridium sporogenes* ATCC 19404 were located on aluminium strips, dried in electric oven under vacuum at room temperature for 10 minutes. The aluminium strips were laid in the middle of gas flow (hot air and superheated steam) with the velocity of 6 m/sec and heated at 120°C for 180 seconds. The calculated D-values showed that there were no remarkable differences in the heat resistance of bacterial spores between $R.H. \leq 0.012$ and $R.H. = 0.51$. Furthermore the thermal resistance of *B. subtilis* spores to dry heat was greater than that of *B. stearothermophilus*.

서 론

통조림산업의 발달에 따른 습열살균기술은 Esty *et al.* (1922)의 보고를 기초로 하여 급격히 발전하였으며, 현재 pH>4.5인 식품의 경우 우선 *Cl. botulinum*포자의 수를 10^{-12} 로 감소시키는 것을 살균목표로 하고 있다. 살균시간은 식품의 저장조건에 따라 120°C에서 150 내지 1000초까지 변화시키고 있다(Loncin, 1975). 무균포장의 경우 초고온살균 방법에 의하여 액체식품의 살균은 최대의 살균효과와 최소의 품질손실이 보장되나(Ingram, 1969; Loncin, 1973), 그 포장재료의 살균에 있어서는 아직도 많은 문제가 제기되고 있다(Loncin, 1975). Pflug(1960), Collier *et al.* (1956) 및 Fox *et al.* (1969)에 의하여 건열살균이 습열살균보다는 살균효과가 못하다는 것이 보고 되었으나, 열저항성이 약한 포장재료의 경우 습열살균이 불가능 함으로 초고온살균원리에 따른 건열살균의 가능성을 모색하기 위하여 세균포자의 건열살균에 대한 저항성을 실험하였다.

재료 및 실험방법

1. 재 료

B. subtilis var. *niger* 및 *B. stearothermoph-*

ilus; 진공동결건조상태의 포자를 살균된 제증류수에 현탁시킨 후, 그 중 약 1 ml씩을 Standard-I-nutrient broth (Merck)가 들어있는 시험관에 넣고, 80°C에서 20분간 열처리한 후 (Stumbo, 1965) 이어서 34°C (*B. subtilis*) 및 58°C (*B. stearothermophilus*)에서 48시간 배양하였다. 각 배양액 2 ml씩을 밀이 넓은 삼각플라스크 안에 표면적이 크도록 준비된 고형배지 [glucose 0.025%, Bacto casamino acid 0.25%, yeast extract 0.5%, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.001% (*B. stearothermophilus*는 0.01%), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0014%, agar-agar 3%] 위에 고르게 퍼뜨린 후 플라스크 아궁이는 살균된 여과지로 덮고 34°C에서 5일간 (*B. subtilis*) 또는 58°C에서 9일간 (*B. stearothermophilus*) 배양하였다(Angelotti *et al.*, 1968; Prado, 1975). 배양 후 포자층은 교반기를 이용하여 살균된 제증류수로 씻어내고, 그 현탁액을 용기에 모았다.

Cl. sporogenes; 진공동결건조상태의 포자를 위와 같이 현탁시킨 후 Standard-I-nutrient broth에 80°C에서 15분간 열처리하고(Stumbo, 1965), 37°C에서 48시간 배양하였다(Muhammed *et al.*, 1975). 배양액을 2 ml씩 thioglycolate broth (peptone (from casein) 1.5%, yeast extract 0.05%, D(+)-

* Karlsruhe대학교 화학공학과 식품공학연구소

* Institut fuer Lebensmittelverfahrenstechnik, Fakultät fuer Chemieingenieurwesen der Universität Karlsruhe, Karlsruhe, W-Germany

cystein 0.05%, NaCl 0.25%, sodium thioglycolate 0.05%]가 들어있는 삼각플라스크에 넣은 후 플라스크를 고무마개로 막고 37°C에서 5일간 배양하였다.

위와 같이 처리한 각 포자현탁액을 4~10°C에서 4회 원심분리(4000 r. p. m.) 한 후 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

실험장치 Fig. 1과 같이 Prado *et al.* (1974)의 장치를 개량하여 여과된 공기 및 과열수증기가 살균실에 이르기 전에 원하는 온도까지 가열되도록 하고, 살균실내에서는 가열된 가스가 포자를 부착한 aluminium strip (5.5cm×1.0cm×30μm)를 길이를 따라

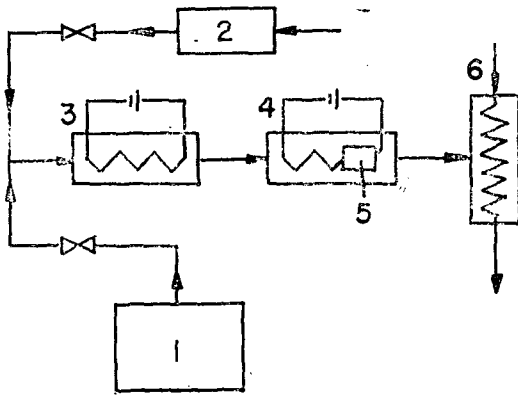


Fig. 1. Illustration of sterilization apparatus.
1) Steam generator 2) Air filter
3) Heat exchanger 4) Heat exchanger for sterilization chamber
5) Sterilization chamber 6) Condenser

흐르도록 하였다.

살균 자 aluminium strip위에 1cm²당 5·10⁷의 포자를 얹은 후 실온에서 drying oven에 넣어 진공하에 10분간 건조 시킨후 살균실로 옮겨 120°C에서 180초 동안 열처리 하였다(Fig. 1). 이때 가스의 속도는 6 m/sec로 하였다.

생균수 측정 열처리한 포자를 0.5g의 모래와 10 ml의 0.1% Tween 80 용액이 담긴 시험관에 옮겨, 유리막대로 포자를 aluminium strip로부터 잘 문질러 탈락시켜 진탕기로 진탕한다음 생리식염수로써 단계적으로 희석하여 plate count 방법에 의하여 살아남은 포자수를 측정하였다.

Plate count에 사용된 배양조건 및 배지는 다음과 같다.

*B. subtilis*는 34°C, *B. stearothermophilus*는 58°C에서 48시간 배양하였고, 배지조성은 Lab-Lemco powder (Oxoid) 0.3%, tryptone 0.5%, dextrose 0.1%, agar-agar 1.5% 및 전분 0.15%이며, *Cl. sporogenes*는 37°C에서 48시간 배양하였고, 배지조성은 포자 배양시와 같았으며 1.5%의 agar-agar를 첨가하였다.

살균시의 건조포자의 손실 살균실내에서의 가스의 흐름에 의한 aluminium strip로부터 건조포자의 손실을 확인하기 위하여, 포자를 증류수와 함께 aluminium strip 위에 얹은 것을 대조구로하고 비교구로서는 포자를 0.2% gummi arabicum용액과 혼합하여 aluminium strip위에 얹은 후 건조시켜 살균실험에 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Aluminium strip의 가열시간

가스와 aluminium strip간의 열교환에 의한 aluminium strip의 가열시간은 다음 식으로 결정하였다

$$\frac{T_g - T_a(t=0)}{T_g - T_a(t=t)} = e^{\left(-\frac{2h_c}{\Delta X \rho c_p} t\right)} \quad (1)$$

열교환계수 h_c 는 0.6 < P_r < 2000 및 R_e < 5.0·10⁵의 조건하에서 N_u -number, 즉

$$N_u = 0.664 \sqrt{R_e} \sqrt[3]{P_r} \quad (2)$$

로 구할 수 있었으며 (Loncin, 1969; Schluender, 1970; Schluender, 1972; VDI-Waermeatlas, 1974) 식(1)은 다음과 같이 변형시킬 수 있었다 (Schluender, 1972)

$$\lim_{B_i \rightarrow 0} \frac{T_g - T_a(t=0)}{T_g - T_a(t=t)} = e^{(2 \cdot B_i \cdot F_o)} \quad (3)$$

본 실험에서는 120°C의 건조공기 ($R.H. \leq 0.012$) 및 과열수증기 ($R.H. = 0.51$)의 경우 $B_i < 0.1$ 이었다.

Heldmann(1975)에 따르면 $B_i < 0.1$ 의 경우 열전달에 대한 aluminium내부의 열저항성이 표면의 그것보다 현저히 적다고 하였다. 따라서 aluminium strip내부의 열저항성은 무시할 수 있었다. 가스와 aluminium strip사이의 온도차를 1°C로 택한다면, 식(1)에서 구하여지는 aluminium strip의 가열시간은 120°C의 건조공기 및 과열수증기의 경우 모두 5초 이내이며, 이는 전체 살균시간(180초)의 약 2.7

%에 해당되므로 무시할 수가 있었다.

$$\frac{dm}{dt} = -k_m \cdot m \quad (4)$$

2. 세균포자의 열저항성

치사온도에서의 포자의 불활성화 속도는 다음과 같이 표시되며 (Bigelow, 1921; Stumbo, 1950; Pflug *et al.*, 1953; Pflug, 1960; Loncin, 1969; Drummond *et al.*, 1970)

$m_o(t=0)$ 로부터 $m_t(t=t)$ 사이의 적분에 의하여

$$D = t / (\log m_o - \log m_t) \quad (5)$$

로 표시된다. D 는 $2,303/k_m$ 을 의미하며, 본 실험에서의 D 값은 Table 1과 같다.

Table 1. D-values (in sec) of dried bacterial spores at 120°C in the flow of air and superheated steam with the velocity of 6 m/sec

Bacterial spores	Air (R. H. ≤ 0.012)	Superheated steam (R. H. = 0.51)
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372	560	547
<i>B. stearothermophilus</i> Oxoid Code BR 23	400	578
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 19404	50	57

살균과정의 계산을 위한 indicator organism으로서, 습열살균의 경우에는 *B. stearothermophilus* 및 P. A. 3679 포자가 대표적으로 사용되고 있으나 (Chetel *et al.*, 1937), 건열살균에 대하여서는 Craven *et al.* (1968)의 보고가 있을 뿐이다. Table 1에 의하면 습열살균시와는 달리 건열살균시에는 *B. subtilis* 포자의 열저항성이 *B. stearothermophilus*의 그것보다 오히려 큼을 알 수 있었으며 이러한 현상은 Bruch *et al.* (1963)도 보고 하였다.

B. subtilis 포자의 경우, *B. stearothermophilus* 및 *Cl. sporogenes* 포자와는 달리, 열전달 매개체인 가스의 상대습도가 증가함에 따라 열저항성이 다소 감

소하였다. Drummond *et al.* (1970)은 가스의 상대습도가 커짐에 따라 포자의 열저항성이 증가한다고 하였으나, 세 종류의 포자모두가 외부 상대습도의 변화에 대하여 현저한 열저항성의 변화를 보이지 않았다.

3. 세균포자의 손실

살균중의 유체의 흐름에 의한 건조 포자의 손실을 실험한 결과는 Table 2와 같다. 포자의 손실은 식 (5)의 m_t 의 정확한 측정을 불가능하게 하며, 따라서 정확한 D 값의 측정이 어렵게 된다. 그러나 Table 2에 의하면 두드러진 포자의 손실이 없었던 것으로 보여진다.

Table 2. D-values of dried bacterial spores in air flow with the velocity of 6 m/sec and R. H. ≤ 0.012

Bacterial spores	Treatment	D_{120} in sec
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> ATCC 9372	Sporesusp. + H ₂ O	558
	Sporesusp. + GA	579
<i>B. stearothermophilus</i> Oxoid Code BR 23	Sporesusp. + H ₂ O	403
	Sporesusp. + GA	410
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 19404	Sporesusp. + H ₂ O	50
	Sporesusp. + GA	51

Sporesusp. : Spore suspension

Sporesusp. + H₂O : Sporesuspension + H₂O (1:1)

Sporesusp. + GA : Spore suspension + 0.2% Gummi arabicum solution (1:1)

결론 및 요약

본 실험에서는 습열살균시에 대표적으로 열저항성이 큰 *B. stearothermophilus*와 *Cl. sporogenes* 그리고 Craven *et al.* (1968)에 의하여 제시된 *B. subtilis* 포자의 전열에 대한 열저항성을 실험하였다.

습열살균시와는 달리 전열살균시에는 *B. subtilis* 포자의 열저항성이 *B. stearothermophilus* 포자의 그것보다 오히려 컸으며, 전열살균시의 열전달 매개체인 가스의 상대습도의 변화는 실제응용의 경우 큰 의미를 가지지 못함을 확인하였다.

사 사

본 연구에 있어서 실험을 협조하여 주신 Karlsruhe대학의 Marcel Loncin교수님(Leiter des Instituts fuer Lebensmittelverfahrenstechnik)께 충심으로 감사드립니다

기 호 표 시

- B_i Biot number
- c_p specific heat (kJ/kg °C)
- D decimal destructions time (sec)
- F_o Fourier number
- k_m inactivation velocity constant (1/sec)
- m number of spore
- m_o initial spore number
- m_t final spore number
- N_u Nusselt number
- P_r Prandtl number
- R_e Reynolds number
- t time
- ΔX thickness of aluminium strip (m)
- h_c heat transfer coefficient (kJ/m² sec K)
- T_g gas temperature (°C)
- T_a temperature of aluminium strip (°C)
- ρ density (kg/m³)
- $R.H.$ relative humidity of gas phase

문 헌

Angelotti, R., J. H. Maryanski, T. F. Butler, J. T. Peeler and J. E. Campbell(1968):

Influence of spore moisture content on the dry heat resistance of *Bacillus subtilis* var. *niger*. Appl. Microbiol. 16, No. 5, 735—745.

Bigelow, W.D. (1921): The logarithmic nature of thermal death time curves. J. Infect. Dis. 29, 528—536.

Bruch, C. W., M. G. Koesterer and M. K. Bruch (1963): Dry-heat sterilization: Its development and application to components of exobiological space probes. Develop. Industr. Microbiol. 4, 334—342.

Cheftel, H. and G. Thomas (1967): Grundlagen und Methoden fuer die Aufstellung von Sterilisationsmaßstäben bei Lebensmittelkonserven. Verl. Guenter Hempel Braunschweig.

Collier, C. P., and C. T. Townsend(1956): The resistance of bacterial spores to superheated steam. Food Technol. 10, 477—481.

Craven, C. W., J. A. Stern and G. F. Ervin (1968): Planetary quarantine and space vehicle sterilization. Astronaut. Aeronaut. 6, 18—48.

Drummond, D. W. and I. J. Pflug (1970): Dry-heat destruction of *Bacillus subtilis* spores on surface: Effect of humidity in an open system. Appl. Microbiol. 20, No. 5, 805—809.

Esty, J.R. and K. F. Meyer (1922): The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. J. Infect. Dis. 31, 650—663.

Fox, K. and B. D. Eder (1969): Comparison of survivor curves of *Bacillus subtilis* spores subjected to wet and dry heat. J. Food Sci. 34, 518—521.

Heldmann, D.R. (1975): Food process engineering. AVI.

Ingram, M. (1969): Spore formers as food spoilage organisms. In Gould, G. W. and Hurst, A. (ed.): The bacterial spore. Academic Press, London and New York.

Loncin, M. (1969): Die Grundlagen der Verfah-

- renstechnik in der Lebensmittelforschung. Aarau, Frankfurt/M. Verl. Sauerlaender.
- Loncin, M. (1973): Probleme der Htzesterilisation in der Lebensmittelverfahrentechnik. Verfahrenstechnik. 7, 195—198.
- Loncin, M. (1975): Einfuehrung in das Symposium. Preprints zum Symposium ueber Reinigen und Desinfizieren lebensmittelverarbeitender Anlagen. VDI-Gesellschaft, Duesseldorf E. S. 1—5.
- Loncin, M. (1975): Personal communication.
- Muhammed, S. I., S. W. Morrison, and W. L. Boyd (1975): Nutritional requirements for growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. J. appl. Bact. 38, 245—253.
- Pflug, I. J, and W. B. Esselen (1953): Development and application of an apparatus for study of thermal resistance of bacterial spores and thiamine at temperatures above 250°F. Food Technol. 7, 237—241.
- Pflug, I. J. (1960): Thermal resistance of microorganisms to dry heat. Design of apparatus, operational problems and preliminary results. Food Technol. 14, 483—487.
- Prado Fihlo, L. G. and P. Kiefer (1974): Versuchsanlage zur thermischen Behandlung von Bakteriensporen in Gasphasen mit einer Wasseraktivitaet <1,0. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 7, Nr. 4, 245—246.
- Prado Fihlo, L. G. (1975): Die thermische Abtoetung von Sporen von *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372 in Gasphasen mit einer Wasseraktivitaet <1,0. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 8, 29—33.
- Schluender, E. U. (1970): Ueber eine zusammenfassende Darstellung der Grundgesetze des konvektiven Waermeueberganges. Verfahrenstechnik. 4, Nr. 1, 11—16.
- Schluender, E. U. (1972): Einfuehrung in die Waerme- und Stoffuebertragung. Braunschweig. Vieweg Verl.
- Stumbo, C. R., J. R. Murphy and J. Cochran (1950): Nature of thermal death time curves for P. A. 3679 and *Clostridium botulinum*. Food Technol. 4, 321—326.
- Stumbo, C. R. (1965): Thermobacteriology in food processing. Academic Press, New York, London.
- VDI-Waermeatlas (1974): Berechnungsblaetter fuer den Waermeuebergang. Duesseldorf VDI-Verlag.