

加熱滅菌의 動力學的研究

禹 鍾 鶴*

(Received October 8, 1963)

Chong Hak Woo : Studies on the Kinetics of the Heat Sterilization

The destruction rate of microorganisms by heat follows the first order reaction. In this experiments, the calculated sterilization velocity constants of *Escherichia Coli* are $1.97 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. (45°C), $9.53 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. (50°C), $4.77 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$. (55°C) and 1.858 min^{-1} .(60°C); that of *Bacillus Subtilis* are $6.33 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.(60°C), $1.41 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.(70°C), $2.89 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.(80°C), $1.32 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$.(90°C), $2.87 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$. (95°C), $7.91 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$.(100°C) and 1.777 min^{-1} .(105°C). In the results, the activation energy of *E. Coli* is $62.0 \text{ Cal mole}^{-1}$.(45°-60°C), that of *B. Subtilis* are $17.8 \text{ Cal mole}^{-1}$ (60°-80°C) and $47.1 \text{ Cal mole}^{-1}$ (90°-105°C)

細菌의 加熱滅菌에 關한 研究는 오래前부터 許多히 報告되어 있으며 加熱時間과 生殘菌數사이에는 半對數의 關係가 있음은 여러 學者들이 이미 報告하였고¹⁾²⁾⁵⁾ 이와 같은 半對數의 關係의 理論에 對하여서는 Henry Eyring et al의 說이 있다.¹⁾

또 滅菌溫度와 菌의 死滅時間과의 關係에 對하여서는 死滅時間의 對數와 死滅溫度가 直線關係가 있음이 알려져 있다.²⁾⁵⁾

한편 1950年 Higuchi等은 菌의 加熱滅菌反應에 있어서의 活性化 energy가 一般的으로 化學反應의 그것에 比하여 顯著히 큰것에 着眼하여 藥品의 安全性을 最大限度로 維持하면서 滅菌을 滿足하게 할 수 있는 高溫短時間 加熱滅菌에 對하여 報告하고 있다.³⁾⁴⁾

著者는 注射劑溶液의 滅菌의 動力學의 知見을 얻고져 比較的 熱에 對하여 不安全한 *E. Coli*와 芽胞를 形成하여 比較的 耐熱성이 있는 *B. Subtilis*의 蒸留水中에서의 加熱滅菌의 反應速度論의 研究를 實施하여 各菌에 對한 滅菌速度定數, 活性化 energy, Q_{10} 등의 特性值를 얻었고, *B. Subtilis*에서는 溫度域에 따라서 相異한 두개의 活性化 energy가 나타나는 것을 實驗에 依하여 認定되었기에 이를 報告하고자 한다.

이 研究를 遂行함에 있어서 研究費를 支援하여 주신 서울大學校 研究委員會와 菌株의 選擇에 對하여 忠言하여 주신 서울大學校 醫科大學 朴鎮泳教授 李鎬汪講師, 國立防疫研究所 閔昌泓技監과 諸般 便宜를 圖謀하여 주신 洪文和, 禹麟根 兩教授에게 深甚한 謝意를 表하며 實驗에 協力한 金信根, 李民和, 權順慶君에게 感謝한다.

實 驗

1. 菌株.—*Escherichia Coli* 0-127, *Bacillus Subtilis*.
2. 培地.—液體培地 : Bacto Nutrient Broth Dehydrated (Difco 社製). 8g을 蒸留水에 溶解하여 1000 cc로 하였다. (pH 6.8)
固體培地(1.5% 透明寒天培地) : 上記 液體培地에 1.5w/v%의 比率로 寒天을 加하여 固化시켰다. (pH 7.2)

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

3. 菌數計數.—Dark field Quebec Colony Counter(American Optical Co. 製)를 사용하여 計數하였다.

4. 實驗操作 E.Coli 의 培養.—液體培地를 適當數의 30 cc 試驗管에 10 cc씩 넣고 126.5°C(20 파운드압)에서 15 分間 滅菌한 다음 이 試驗管에 菌株를 接種하여 48 時間, 37°±1에서 培養한 菌株를 使用하였다.

B. Subtilis 의 培養.—上記 E. Coli 의 培養에서와 같은 操作으로 菌液을 만들고 芽胞形成을 促進시키기 위하여 冷藏庫(2~5°)中에서 一晝夜放置한것을 使用하였다.

E. Coli 의 滅菌試驗.—E. Coli 의 滅菌試驗은 45°C, 50°C, 55°C, 60°C 의 네 溫度條件에서 試驗하였다. 4개의 內容 300 cc의 Elenmyer's flask에 各各 蒸留水 100 cc를 넣어 滅菌한 것을 各各 45°±1, 50°±1, 55°±1, 60°±1의 恒溫槽에 넣고 flask 內의 蒸溜水가 위의 各各의 溫度에 이르렀을때 上記 E. Coli 의 培養菌液 0.3 cc를 넣고 迅速히 混合한다. 混合 即時⁵⁾와 每 一定時間마다 pipette로 正確하게 1 cc를 滅菌試驗管에 넣고 即時 冷却, 菌液을 稀釋하기 위하여 9 cc의 滅菌生理食鹽水를 加하여 잘 混合, 正確하게 10 cc로 하고 그 0.1 cc를 正確하게 取하여 上記 固體培地 20 cc를 넣은 滅菌 Petri-dish에 잘 混合한 다음 37°±1의 Incubater에서 24 時間 및 48 時間 培養

TABLE I.—Number of survivors of E. Coli. (at 45°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	177	
10	142	2.15×10^{-2}
20	122	1.85×10^{-2}
30	103	1.81×10^{-2}
40	82	1.92×10^{-2}
50	64	2.03×10^{-2}
K ₂₇₃₊₄₅ E. Coli= 1.95×10^{-2}		

TABLE II.—Number of Survivors of E. Coli. (at 50°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	89	
10	35	9.35×10^{-2}
20	13	9.62×10^{-2}
30	5	9.59×10^{-2}
40	2	9.44×10^{-2}
50	—	
K ₂₇₃₊₅₀ E. Coli= 9.50×10^{-2}		

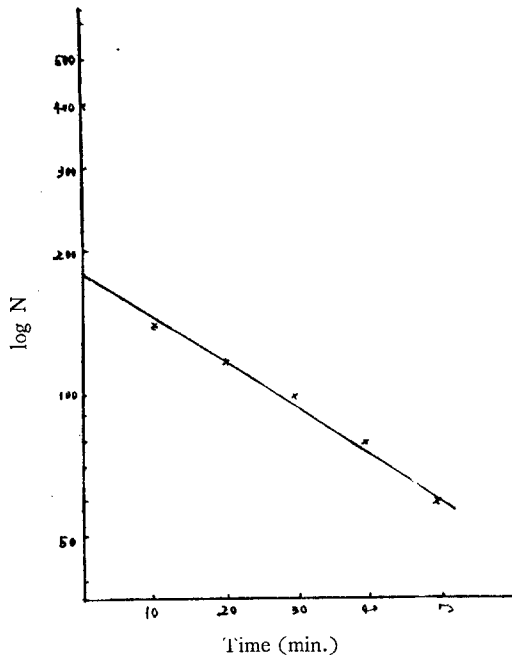


Fig. 1.—Number of Survivors of E.Coli.(at 45°C)

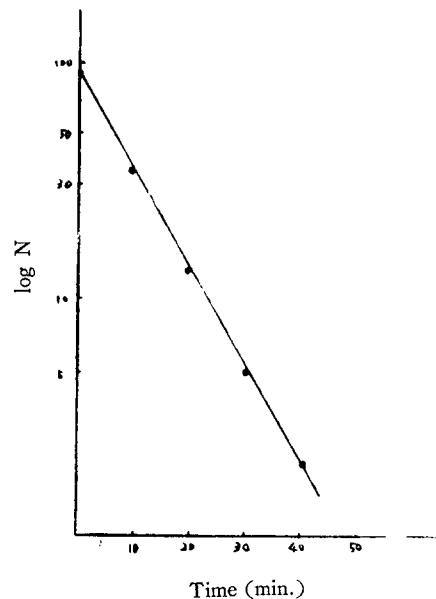


Fig. 2.—Number of Survivors of E. Coli.(at 50°C)

한 다음 Colony Count 하였다. 但 55°C와 60°C에 있어서는 菌의 死滅速度가 빠름으로 菌液을 1 cc 代身 5 cc 를 取하고 滅菌生理食鹽水를 加하여 10 cc 로 하였다.

B. Subtilis의 滅菌試驗.—B. Subtilis의 滅菌試驗은 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C 일곱 溫度條件에서 試驗하였으며 試驗操作은 E. Coli의 滅菌試驗에 準하였으나 菌液을 比較의 低溫에서는 1 cc 씩, 比較의 高溫에서는 1 cc 代身 2 cc 씩을 各各 取하였다.

5. 實驗結果

E. Coli.—各 溫度條件에 있어서의 加熱時間과 生殘菌數와의 關係는 Table I, II, III, IV 같다. 이 結果를 Semilog graph 로 plot 하면 Fig. 1, 2, 3, 4 와 같으며 모두 直線이 됨으로 一次反應임을 알 수 있으며 最小自乘法으로 求한 各 滅菌速度定數는 다음과 같다.

$K_{273+45} \text{ E. Coli} = 1.97 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$

$K_{273+55} \text{ E. Coli} = 4.77 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$

$K_{273+50} \text{ E. Coli} = 9.53 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$

$K_{273+60} \text{ E. Coli} = 1.858 \text{ min}^{-1}$

TABLE III.—Number of Survivors of E.Coli. (at 55°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	1210	
3	287	4.79×10^{-1}
5	106	4.83×10^{-1}
7	42	4.80×10^{-1}
10	10	4.80×10^{-1}
12	4	4.76×10^{-1}
$K_{273+55} \text{ E. Coli} = 4.80 \times 10^{-1}$		

TABLE IV.— Number of Survivors of E. Coli. (at 60°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	3240	
2	88	1.799
3	10	1.927
4	2	1.848
5	0	
$K_{273+60} \text{ E. Coli} = 1.858$		

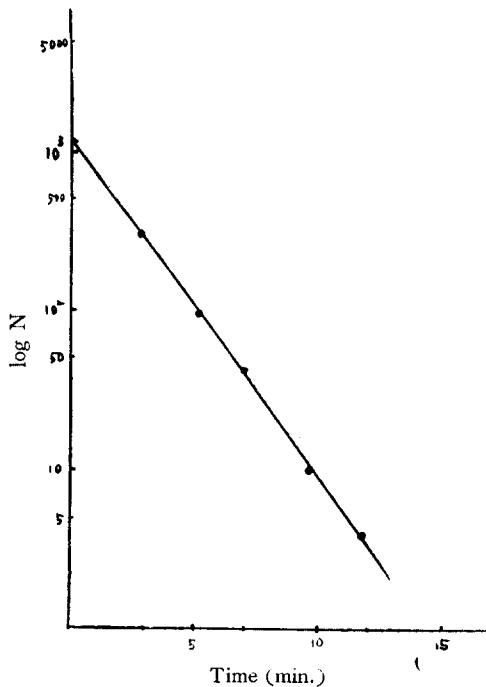


Fig. 3.—Number of Survivors of E. Coli.(at 55°C)

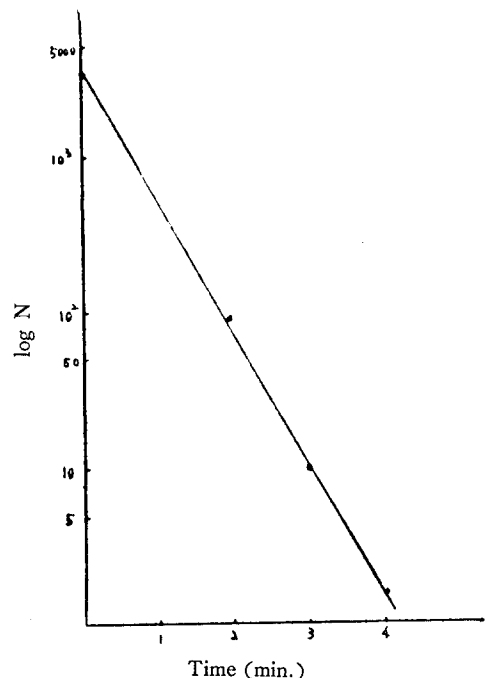


Fig. 4.—Number of Survivors of E. Coli.(at 60°C)

各 溫度條件의 log k 値와 溫度와를 plot 하면 Fig. 5 와 같고, 直線關係가 成立됨으로 滅菌速度 定數와 溫度와의 函數關係는 Arrhenius Type 임을 確認하였고 이로부터 活性化 energy EA 및 Q_{10} 을 求하면 다음과 같다.

EA E. Coli = 62.0×10^3 cal, mole⁻¹ = 62.0 Cal mole⁻¹

Q_{10} E. Coli. = 19.5

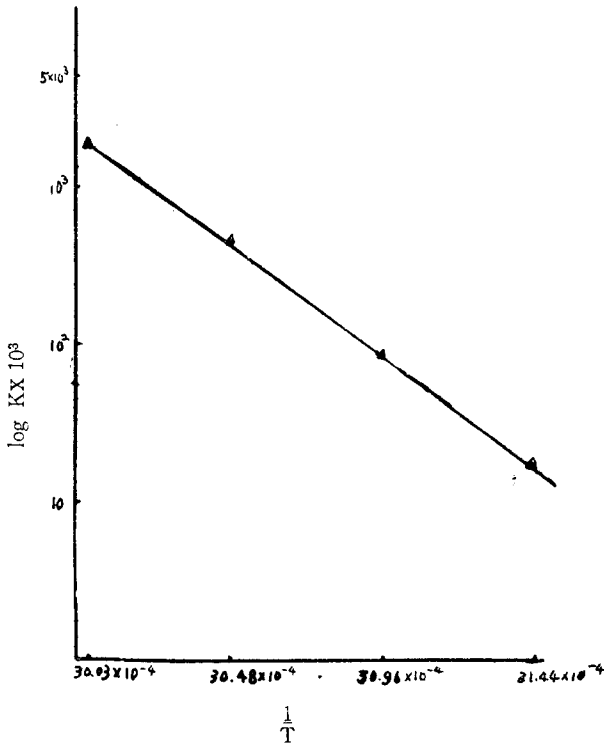


Fig. 5.—Sterilization Velocity Constants of E. Coli (at 45—60°C)

TABLE V.—Number of Survivors of B. Subtilis. (at 60°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	995	
5	965	6.12×10^{-3}
10	933	6.43×10^{-3}
15	910	6.69×10^{-3}
20	881	6.08×10^{-3}
25	849	6.32×10^{-3}

$K_{273} + 60$ B. Subtilis = 6.33×10^{-3}

B. Subtilis.—各 溫度條件에 있어서의 加熱時間과 生殘菌數와 關係는 Table V, VI, VII, VIII, IX, X, XI 과 같다. 이 結果를 semilog graph 로 plot 하면 Fig. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 과 같으며 모두 直線이됨으로 一次反應임을 알 수 있으며 最小自乘法으로 求한 各 滅菌速度定數는 다음과 같다.

$K_{273} + 60$ B. Subtilis = 6.33×10^{-3} min⁻¹

$K_{273} + 70$ B. Subtilis = 1.41×10^{-2} min⁻¹

$K_{273} + 80$ B. Subtilis = 2.89×10^{-2} min⁻¹

$K_{273} + 90$ B. Subtilis = 1.32×10^{-1} min⁻¹

$K_{273} + 95$ B. Subtilis = 2.87×10^{-1} min⁻¹

$K_{273} + 100$ B. Subtilis = 7.91×10^{-1} min⁻¹

$K_{273} + 105$ B. Subtilis = 1.777 min⁻¹

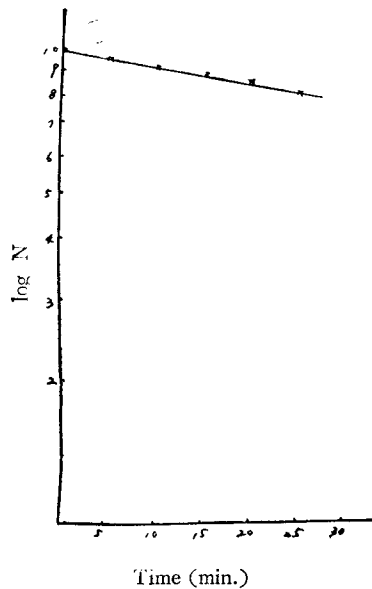
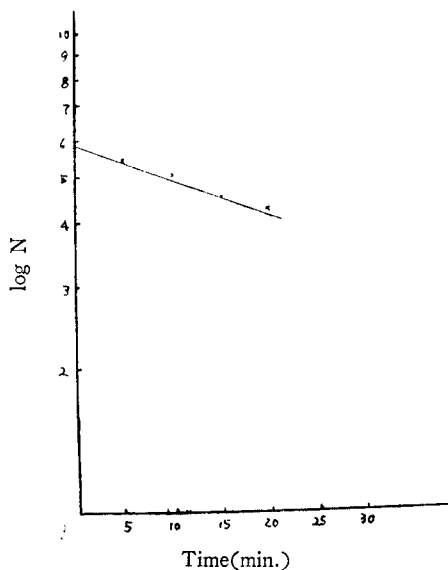


Fig. 6.—Number of Survivors of B. Subtilis. (at 60°C)

TABLE VI.—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 70°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	584	
5	544	1.42×10^{-2}
10	509	1.38×10^{-2}
15	466	1.51×10^{-2}
20	447	1.34×10^{-2}
K ₂₇₃ +70 <i>B. Subtilis</i> = 1.41×10^{-2}		

**Fig. 7.**—Number of Survivors of *Subtilis*.
(at 70°C)**TABLE VII.**—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 90°C)

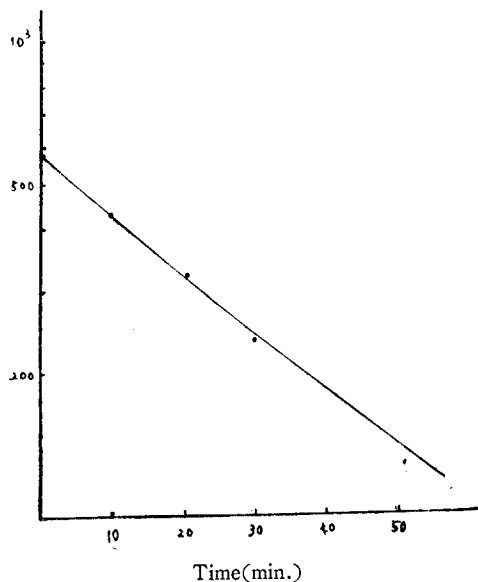
Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	1275	
10	475	1.29×10^{-1}
20	127	1.30×10^{-1}
30	31	1.34×10^{-1}
40	9	1.31×10^{-1}
50	2	1.35×10^{-1}
K ₂₇₃ +90 <i>B. Subtilis</i> = 1.32×10^{-1}		

TABLE X.—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 100°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	2400	
5	45	7.93×10^{-1}
8	4	7.99×10^{-1}
10	1	7.78×10^{-1}
K ₂₇₃ +100 <i>B. Subtilis</i> = 7.79×10^{-1}		

TABLE VIII.—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 80°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	584	
10	436	2.92×10^{-2}
20	334	2.79×10^{-2}
30	243	2.93×10^{-2}
40	207	2.69×10^{-2}
50	124	3.14×10^{-2}
K ₂₇₃ +80 <i>B. Subtilis</i> = 2.89×10^{-2}		

**Fig. 8.**—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 80°C)**TABLE IX.**—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 95°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	3185	
5	665	3.11×10^{-1}
10	191	2.81×10^{-1}
15	45	2.84×10^{-1}
20	12	2.79×10^{-1}
25	3	2.79×10^{-1}
K ₂₇₃ +95 <i>B. Subtilis</i> = 2.87×10^{-1}		

TABLE XI.—Number of Survivors of *B. Subtilis*.
(at 105°C)

Time(min.)	生殘菌數	k min. ⁻¹
0	5500	
2	153	1.793
3	26	1.785
4	4	1.807
5	1	1.724
K ₂₇₃ +105 <i>B. Subtilis</i> =1.777		

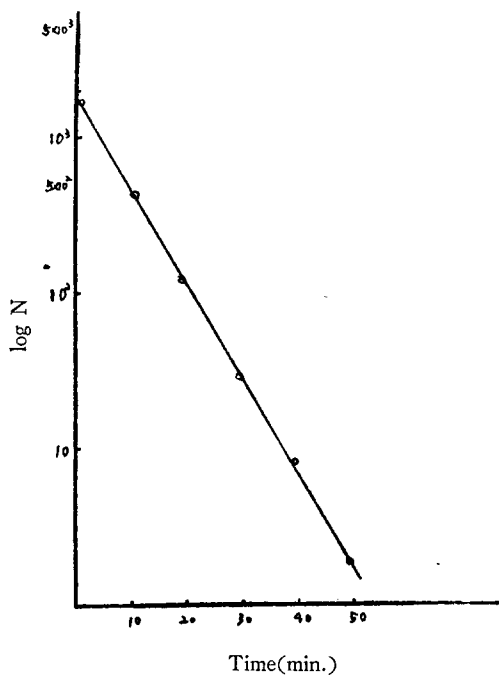


Fig. 9.—Number of Survivors of B. Subtilis.
(at 90°C)

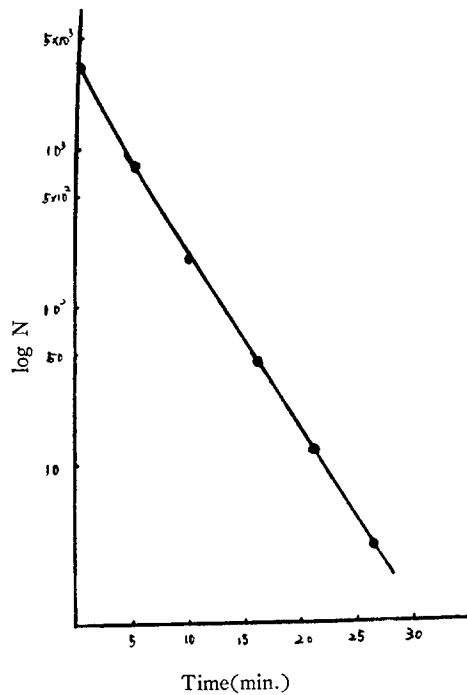


Fig. 10.—Number of Survivors of B. Subtilis.
(at 95°C)

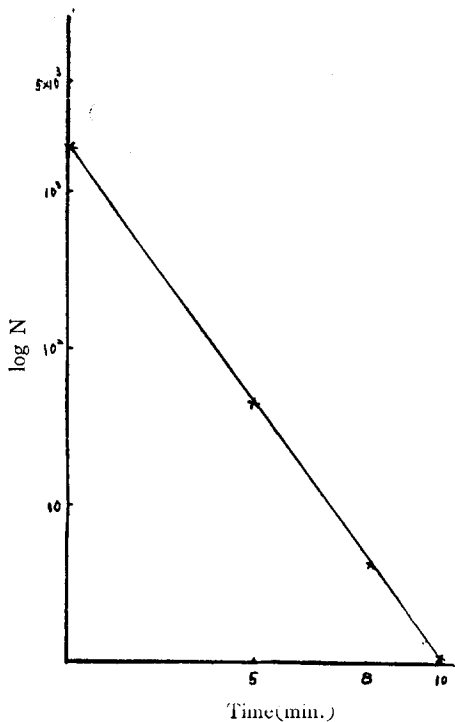


Fig. 11.—Number of Survivors of B. Subtilis.
(at 100°C)

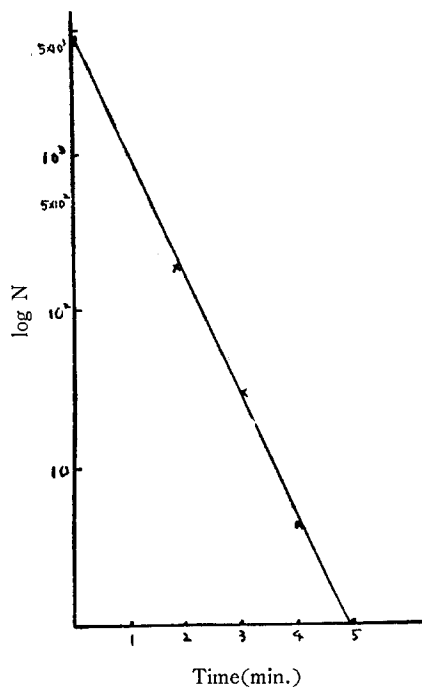


Fig. 12.—Number of Survivors of B. Subtilis.
(at 105°C)

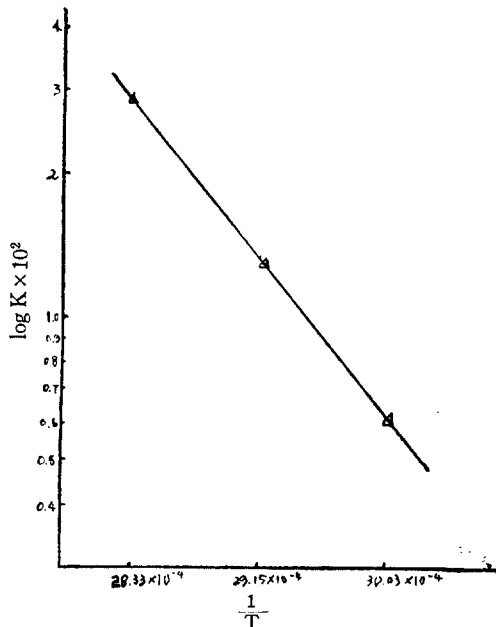


Fig. 13.—Sterilization Velocity constants of B. Subtilis (at 60~80°C)

a) 比較的低温에서 K 値와 温度와의 關係
 60°C, 70°C, 80°C의 各温度條件의 있어서의 log K 値와 温度와를 plot 하면 Fig. 13 과 같고 直線關係가 成立됨으로 滅菌速度定數와 温度와의 函數關係는 Arrhenius Type 임을 確認하였고 이로부터 活性化 energy EA 및 Q₁₀ 을 求하면 다음과 같다.

$$EA \text{ B. Subtilis} = 17.8 \times 10^3 \text{ cal, mole}^{-1} \\ = 17.8 \text{ Cal mole}^{-1}$$

$$Q_{10} \text{ B. Subtilis} = 2.13$$

b) 比較的高温에서의 K 値와 温度와의 關係
 各 温度條件에 있어서의 log K 値와 温度와를 plot 하면 Fig. 14 에서와 같이 直線關係가 成立됨으로 滅菌 速度定數와 温度와의 函數關係는 Arrhenius Type 임을 確認하였고 이로부터 活性化 energy EA, Q₁₀ 을 求하면 다음과 같다.

$$EA \text{ B. Subtilis} = 47.1 \times 10^3 \text{ cal, mole}^{-1} \\ = 47.1 \text{ Cal, mole}^{-1}$$

$$Q_{10} \text{ B. Subtilis} = 9$$

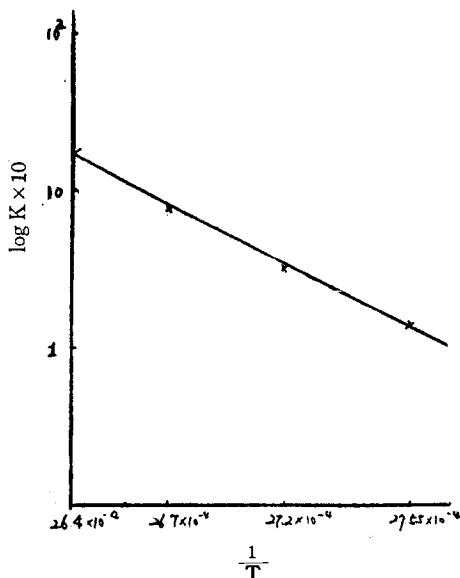


Fig. 14.—Sterilization Velocity Constants of B. Subtilis (at 90~105°C)

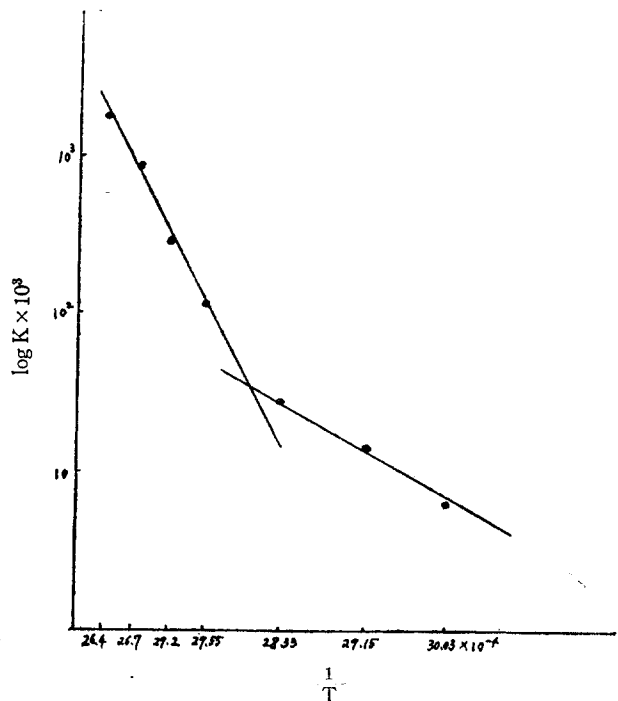


Fig. 15.—Sterilization Velocity Constnnts of B. Subtilis (at 60~105°C)

c) 比較的低温度에서의 log K 値와 温度와의 關係가 成立된 直線과 比較的高温에서 log K 値와 温度와의 關係로서 成立된 直線과는 相互直結直線이 되지 아니하고 交叉된다. 이를 表示하면 Fig. 15 와 같으며 轉移되는 温度는 85°C 附近이다.

考 察

1) E. Coli 가 蒸留水中에서의 加熱滅菌反應이 一次反應임을 確認하였으며 이의 活性化 energy 는 62 Cal 인으로 Higuchi 等の 說에 따라 高熱短時間加熱菌이 더 有利할 것이나 Table IV에서와 같이 60°C 에서 10 分以內에 死滅함으로 加熱滅菌에서는 重大한 問題가 아니 될 것이다.

2) B. Subtilis 가 蒸留水中에서의 加熱滅菌反應이 一次反應임을 確認하였으나 滅菌域에 따라 相異한 두개의 活性化 energy 가 나타난다.

이와같이 高低 兩溫度域에서 各各 相異한 二種의 活性化 energy 值를 나타냄은 B. Subtilis 菌液이 芽胞 및 小部分의 增殖型의 混合體로 되어 있으며 比較的 低溫部에서는 主로 小部分의 增殖型의 死滅이 이어나고 比較的 高溫部에서는 芽胞 및 增殖型의 區別없이 熱에 依하여 破壞되기 때문이라고 推測된다.

低溫部の 작은 活性化 energy 만 考慮에 넣는다면 藥品分解 反應의 活性化 energy 와 大差없음으로 高熱短時間 加熱滅菌이 適用되지 않을것 같이 보이나 85°C 附近을 變曲點으로 하여 47 Cal 의 큰 活性化 energy 를 갖게 됨으로 Higuchi 等の 說에 따라 高熱短時間 加熱滅菌이 適用될 것이다

3) 菌의 加熱滅菌反應의 動力學的 態度가 一般化學反應의 그것에 準하여 取扱될 것이나 菌의 死滅의 機構가 化學反應의 그것과 全然 同一하지 않을 것이며 또 藥液의 加熱滅菌에 있어서는 藥液의 複雜한 性質들이 關與되는 것임으로 앞으로 여러가지 藥品 個個에 對하여 追究하여야 할 것이며 現藥典의 加熱滅菌法 規定을 曰可曰否하기에는 時期尙早일 것이다.

結 論

1) E. Coli 의 蒸留水中 45°C, 50°C, 55°C, 60°C 에서의 滅菌速度定數는 各各

$$K_{273+45} \text{ E. Coli} = 1.97 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+50} \text{ E. Coli} = 9.53 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+55} \text{ E. Coli} = 4.77 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+60} \text{ E. Coli} = 1.858 \text{ min}^{-1} \text{ 이다.}$$

2) B. Subtilis 의 蒸留水中 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C 에서의 滅菌速度定數는 各各

$$K_{273+60} \text{ B. Subtilis} = 6.33 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+70} \text{ B. Subtilis} = 1.41 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+80} \text{ B. Subtilis} = 2.89 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+90} \text{ B. Subtilis} = 1.32 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+95} \text{ B. Subtilis} = 2.87 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+100} \text{ B. Subtilis} = 7.91 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$K_{273+105} \text{ B. Subtilis} = 1.77 \text{ min}^{-1} \text{ 이다.}$$

3) 比較的 熱에 弱한 E. Coli 의 45~60°C 에서의 活性化 energy $E_A \text{ E. Coli} = 62.0 \text{ Cal mole}^{-1}$ 이며 $Q_{10} \text{ E. Coli} = 19.5$ 이다.

4) 比較的 熱에 耐性이 있는 B. Subtilis 의 60~80°C 에서의 活性化 energy $E_A \text{ B. Subtilis} = 17.8 \text{ Cal mole}^{-1}$ 이며 $Q_{10} \text{ B. Subtilis} = 2.13$ 이고 90~105°C 에서의 活性化 energy $E_A \text{ B. Subtilis} = 47.1 \text{ Cal mole}^{-1}$ 이며 $Q_{10} \text{ B. Subtilis} = 9$ 이다. 卽 溫度域에 따라 相異한 두개의 活性化 energy 를 나타내며 轉移溫度는 85°C 附近이다.

5) E. Coli 는 高熱短時間 加熱滅菌이 有利할 것이나 Table. IV로 보아 加熱滅菌에 있어서는 重

大할 問題點은 아니된다.

6) *B. Subtilis* 는 比較的 低溫에서의 活性化 energy 로 보아 一見 高熱短時間 加熱滅菌이 適用 되지 않을것 같이 보이나 85°C 附近인 轉移溫度를 지나서는 47 Cal 이라는 큰 活性化 energy 의 값을 갖이게 됨으로 또한 高熱短時間 加熱滅菌이 適當하다.

REFERENCES

- 1) H. Eyring, Frank H. Johnson and M.J. Polossar; "*The Kinetic Basis of Molecula Biology*" 1954, P. 453-463
- 2) Porter, J.A.; "*Bacterial Chemistry and Physiology*" John Wiky and Sons, New York, 1946, P. 127-192.
- 3) Higuchi T, Hakinga A.C. and Buses L.W., *J. Am. Pharma. Assoc.* **39**, 405 (1950).
- 4) Higuchi T. abd L.W. Busse, *J. Am. Pharma. Assoc.* **39**, 411 (1950).
- 5) C. Olin Ball and F.C.W. Olson "*Sterilization in Food Technology*" McGraw-Hill Book Co. Inc. N.Y. 1957, P. 157-192, P. 291-312.