

耐熱性 細菌에 關한 研究 (第 1 報) 好氣性 細菌의 耐熱性에 關하여

李 啓 湖 · 張 建 型

(陸軍技術研究所)

Studies on Thermal Resistance Bacteria. (Part. 1) On the Thermal Resistance of Aerobic Bacteria.

Lee, Ke Ho and Chang, Kun Hyung
(Army Research and Testing Laboratory R.O.K)

Abstract

The purpose of this paper is to study on the morphological and physiological nature generally observed for the identifications, and the four strains of thermal resistant aerobic bacteria isolated from swelled cans and the different soils collected from the wide area in Korea.

The results obtained in the light of the Bergey's Manual for the identification of the bacteria, have been shown that the four strains of bacteria are pertained to *Bacillus subtilis*. The optimum temperature, pH and the thermal resistance (2.5 min. at 121°C) of the bacteria have been measured.

緒 論

통조림제조에 있어서 耐熱性腐敗細菌의 汚染으로 인한 品質의 變化, 中毒症의 超來 및 商品價値의 喪失 現象은 周知의 事實이다.

통조림에 汚染되어 變敗시키는 耐熱性細菌으로 aerobic bacteria 로는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, anaerobic bacteria 로는 *Clostridium botulinum*, *Clostridium welchi* 등을 代表로 하고 이들 胞子의 耐熱性과 pH 에 對해서 Bigelow(1920) Sugiyama (1951). 菌胞子數와 殺菌溫度 및 殺菌時間 그리고 retort 와 통조림内部의 heat penetration 에 對하여는 Esty(1920), Stumbo(1945), 菌胞子와 통조림内容物中 여러가지 化學的인 sterilizing agent 에 依한 resistance 와 toxin 에 對하여는 Sommer(1930), unsaturated fatty acid 가 spore germination 에 미치는 영향에 對해서는 Wynne(1948), 菌胞子의 phosphate buffer solution 에서 heat penetration 과 thermal death point 에 對해서는 Heedlee(1931) food ingredients 와 菌 spore 의 thermal resistance 에 對해서는

Anderson(1949), allyl isothio cyanate 誘導體와 菌胞子의 heat resistance 에 對하여 Kosker(1951), cationic environments가 菌胞子의 thermal resistance 에 미치는 영향에 對해서는 Frank(1955), spore formation 에 對해서는 Foster, & Amaha(1956), 등 諸氏의 여러 報告가 되어 있다.

그러나 우리나라에 存在하는 耐熱性胞子를 갖는 細菌의 population 및 그들 菌의 致死溫度 致死時間에 對한 報告는 아직 入手 할 수 없는 實情인바 통조림 加熱殺菌에 있어서 熱의 高低와 加熱時間의 長短이 食品의 品質에 큰 영향을 줌으로 통조림 殺菌工程에는 加熱殺菌의 時間과 溫度를 決定함이 重要함으로 통조림品質 改善은 殺菌處理의 合理化에 있는 것으로 통조림製造 技術의 進歩는 殺菌工程에 集約된 것이라 해도 過言이 아닐 것이다.

그래서 著者들은 우리나라에 存在하는 耐熱性이 강한 細菌을 分離 同定하고 이菌들의 thermal death point 와 thermal death time 을 究明하여 통조림 最適殺菌條件을 確立케 하고져 이들 腐敗細菌이 汚染되는 來源이 통조림製造工場 近處의 土壤 및 통조림 内容物일 것이라 生覺되어 이에 關聯된 全國 52

個地域의 土壤 및 腐敗통조림관을 蒐集하여 耐熱性 孢子形成 細菌을 分離하고 thermal resistance를 screening 하여 가장 耐熱性이 강한 菌中 우선 aerobic bacteria를 選拔하여 이들에 對한 形態學的 生理學的 性質을 究明하여 同定하였기로 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材 料

(a) 土壤 및 부패통조림 : 全國 52個 地域에서 土壤과 부패관 7個를 各各 蒐集.

(b) 使用培地 : Media I: Winogradsky gluccs-peptone agar.

Media II: Tryptone-glucose-yeast extracts agar (Hayes and Wickerham 1955),

Media III: Thioglycollate fluid agar (Difco).

Composition of media

	media I	media II
Bacto glucose	0.5%	0.1%
// peptone	0.5%	—
Bacto beef extract	0.3%	—
// tryptone	—	0.5%
// yeast extract	—	0.25~0.5%
// agar	1.5%	1.5%

pH adjusted to 6.8~7.0 with N/10 HCl or NaOH solution

(C) M/15 phosphate buffer solution (pH 6.8) and mineral oil bath.

耐熱性細菌의 分離

(a) Sample 調製 : 各 sample 1g씩을 滅菌된 aluminium cap test tube에 取하고 105°C dry oven에서 30分間 前熱處理함으로써 耐熱性이 아닌 雜菌을 殺菌하여 耐熱性인 孢子形成細菌만 殘存시킨後 滅菌된 M/15 phosphate buffer solution (pH 6.8)으로서 10進法에 依한 無菌的인 方法으로 dilution하여 sample에 주었다.

(b) 菌分離操作 : 常法에 準하여 diluted sample solution 1ml를 各 media I, II가 20ml씩 分注된 petri dish에 pour plate method로 接種하고 34°C incubator에서 培養하고 培養된 petri dish에 나타나는 獨立 colony를 採菌하여 media I이 分注된 slant tube에 接種培養하고 充分히 sporulation시켜서 供試菌으로서 하였다.

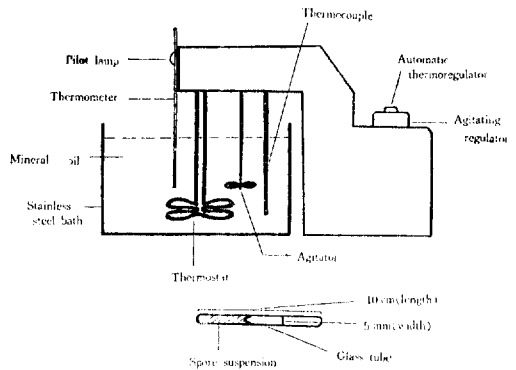
分離菌株의 thermal resistance screening

(a) Glass tube 調製 : 外徑 10 mm의 glass tube로

burner flame上에서 外徑 5 mm 길이 150~200 mm의 glass tube로 만들고 한쪽 끝을 密封하고 다른 한쪽 끝은 솜마개로 막고 乾熱滅菌해서 使用하였다.

(b) Spore suspension의 調製 : 2週間 media I의 slant culture해서 充分히 sporulation된 tube에서 白金耳를 따서 100×10의 test tube 속의 滅菌된 M/15 phosphate buffer solution 1 ml에 接種한後 suspension으로 하였다. 그리고 滅菌된 glass tube에 spore suspension 0.5 ml를 滅菌된 注射器로서 正確히 分注 綿栓 即時 burner flame上에서 glass tube (外徑 5 mm 길이 100 mm)로 다른 한 끝을 完全히 密封하여 熱處理를 하게 하였다.

(c) Thermal resistance의 screening test: 兩 끝이 密封된 glass tube를 Fig 1.에서와 같이 b.p 250°C의 mineral oil bath中에서 oil temperature를 110, 113, 116, 119, 121°C로 各各 恒溫으로 하고 加熱處理時間을 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4分間씩 一定時間 加熱處理한 即時 꺼내서 流水中에서 急冷시킨後 들어 있는 mineral oil을 뒤어서 75% ethanol로 管壁을 깨끗하게 殺菌한後 開管시킨 即時 (無菌的으로) 熱處理했던 spore suspension을 準備된 media II의



1 Apparatus of thermal resistance screening

Fig 1. Apparatus of thermal resistance screening petri dish에 pour plate method로 接種하여 34°C에서 incubation, 生殘한 spore에 依해 나타나는 colony를 collection함으로써 thermal resistance screening을 하여 강한 耐熱性細菌을 選拔하였다.

耐熱性 菌株의 特性檢討 : 選拔된 耐熱性細菌에 對한 一般培養的인 特性 그리고 形態學的 및 生理學的 特性을 常法에 依하여 追求하는데 control로

서 *Bacillus subtilis* NRRL-B-644 를 利用하여 對照로 Bergey's manual 을 基礎로 하고 各 strain 를 比較 檢討하였다.

結果 및 考察

前熱處理한 後 diluted sample 에서 總 543 株의 aerobic bacteria 를 分離하여 thermal resistance

screening 하여 121°C 에서 2 分 30 秒間 견디는 가장 耐熱性이 강한 菌株 B-345, B-501 2 個의 strain 과 119°C 에서 2 分 30 秒間 견디는 B-142, B-245 兩菌株을 各各 選拔하였다. 이들 4 株의 strain 과 *Bacillus subtilis* NRRL-B-644 를 control 로 하여 檢索해 본 結果 Table 1 에서와 같은 培養的인 諸特性 과 Table 2, 3, 4 에서와 같은 形態學的 性質 및 生理

Table 1. Culturing characteristics of isolates

Strain	Agar colony				Growing on agar slant						Growing on broth		
	Sur-face	Elev-ation	Edge	Color*	Gelatin	Glucose	Glucose nitrate	Soy-bean	Tyr-osine	Milk	NaCl 17%	Pe-llicle	Clear
B-345	Spreading	Unbo-nate	Delicate	Y-G	Hydro-lysis	Abun-dant	Abun-dant	More abundant	Abun-dant	Hydro-lysis	Growth	+	+
B-501	Rough	"	"	Thin-brown	"	"	"	"	"	"	"	+	+
B-142	Spreading	"	Lobate	"	"	"	"	"	"	"	"	+	±
B-245	"	"	"	Y-G	"	"	"	"	"	"	"	+	±
<i>B. subtilis</i> NRRL-B-644	"	"	Delicate	Y-G	"	"	"	"	"	"	"	+	+

* Y-G : Yellowish-gray

Table 2. Morphological characteristics of isolates

Strain	Gram stain	Size(μ)	Spore	Motility
B-345	+	0.8×2-2.5	Central	+
B-501	+	0.7×2-3	"	+
B-142	+	0.8×1.6-2	Subterminal	+
B-245	+	0.9×1-3	"	+
<i>B. subtilis</i> NRRL-B-644	+	0.8×2-2.4	Central	+

Table 3. Acid producibility from carbohydrates (with ammonium salts as source of nitrogen) by the isolates

Strain	Arabinose	Xylose	Glucose	Sucrose	Maltose	Mannitol	Lactose
B-345	+	+	+	+	+	+	-
B-501	+	+	+	+	+	+	--
B-142	+	+	+	+	+	±	-
B-245	+	+	+	+	+	+	--
<i>B. subtilis</i> NRRL-B-644	+	+	+	+	+	+	--

學的 特性이 거의 비슷한 點을 볼 수가 있다. 耐熱性이 가장 강한 strain B-345, B-501 兩 strain 은 形態學的인 點에서 endo spore 의 位置가 central 하고 culture broth 에서 clear 하며 gelatin stab culture 에서 crateri form 인데 B-142, B-245 兩菌株은 endo

spore 의 位置가 subterminal 하고 cultured broth 에서 clear 하지 못한點 그리고 B-142는 gelatin stab culture 에서 strati form 으로 된 點 등이 약간 다르게 보여 줌을 알 수 있었다.

이와 같은 諸性質을 綜合하여 Bergey's manual 에

Table 4. Physiological characteristics of isolates

Strain	Growing on				Test of					
	Litmus milk	Starch	Gelatin stab*	Soy bean	Catalase	V.P	Citrate	Nitrate to nitrite	Opt. temp	Opt. pH
B-345	Petonized slowly	Hydrolysis	C	Growth Y-W	+	+	Utilized	+	37°C	6.8-7.0
B-501	"	"	C	"	+	+	"	+	"	"
B-142	"	"	S	"	+	+	"	+	"	"
B-245	"	"	C	"	+	+	"	+	"	"
<i>B. subtilis</i> NRRL-B-644	"	"	C	"	+	+	"	+	"	"

* C: Crateri form
S: Strati form
Y-W: Yellowish-white.

對照해 보았더니 catalase positive, aerobic. rod shaped cell, endospore 가 central or terminal. Gram positive, liquid culture broth 에서 pellicle formation, glucose agar 또는 soy bean agar 에서 agar plate 에서 보다 잘 자라는點. 澱粉의加水分解, 7% sodium

chloride broth 에서 자라는點. nitrite formation, glucose broth 에서 anaerobic culture 時 아주 僅小하게 자라며 따라서 pH 5.2 以上の alkali 性인 경우 nitrate 에서 gas 發生이 없었으므로 *Becillus subtilis* 近緣菌이 아닌가 推測할 수 있는 것 같다.

摘 要

동조림腐敗의 原因이 되는 耐熱性인 胞子를 形成하는 好氣性細菌을 우리나라 各地 土양과 腐敗동조림관에서 分離 그들에 對한 耐熱性을 screening 하여 耐熱性이 강한 4 菌株을 選拔하고 培養上의 諸特性, 形態學的 生理學的 特性을 綜合檢討하여 *Bacillus subtilis* 近緣菌임을 同定함으로서 우리나라 好氣性細菌의 耐熱性胞子の 致死溫度 및 致死時間을 알므로서 殺菌最適條件을 合理的으로 決定함에 基礎資料를 얻었다,

(이 報文의 要旨은 1964 年 10 月 30 日 韓國微生物學會 年次學術發表大會에서 報告하였음)

References

- Anderson, E.E. & Esselen, W.B. 1949. Effect of acids, salts, sugar & other food ingredients on thermal resistance of *Bac. thermoacidurans*. Food Res. 14, 499.
- Amaha, M. 1956. Sporulation requirements of *Bac. coagulans* var. *thermoacidurans* in complex medium. J. Bact. 72, 34.
- Bigelow, W.D. & Esty, J.R. 1920. Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organism. J. Infectious Diseases 27, 602.
- Breed, R.S. Murray, E.G. & Smith, N.R. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology 7th edition William & Wilkins
- Foster, J.W. & Perry, J.J. 1954. Intracellular events occurring during endotrophic sporulation in *Bac. mycoides*. J. Bact. 67, 295
- Frank, H.A. 1955. Influence of cationic environments on the thermal resistance of *Bac. coagulans*. Food Res. 30, 315
- Hayes, W.C. & Wickerham, L.J. 1955. Maintenance of culture media of industrially important microorganisms. J. Appl. Microbiol, 3, 6
- Kosker, O & Esselen, W.B. 1951. Effect of allylthiocyanate on the thermal resistance of *Bac. thermoacidurans*. Food Res. 16, 510
- Heedlee, M.R. 1931. Thermal death point of spore of *Cl. welchii*. J. Infectious Diseases 48, 468
- Sommer, E.W. 1930. Heat resistance of spores of *Cl. botrinum*. J. Infectious Diseases 46, 85
- Sugiyama, H. 1951. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Cl. botrinum*. J. Bact. 62, 81
- Stumbo, C.R. 1945. Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats. Food Res. 10, 293
- Wynne, E.S. 1948. Physiological studies on spore formation & spore germination. J. Bact. 55, 61