

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 8, p. 706~715, 1971]

綜 説

加熱殺菌の動力学的諸問題

米 虫 節 夫

(大阪大学薬学部製薬化学科)

Problems of Heat Sterilization Kinetics

Sadao Komemushi

(Department of Pharmaceutical Engineering Chemistry, Osaka University, Toneyama, Toyonaka-shi, Osaka)

緒 言

醸酵工業、食品工業、医薬工業において「殺菌」は欠くべからざる工程である。この重要な「殺菌」方法およびそれに関連する諸問題をとりまとめた成書は意外に少なく¹⁻⁴⁾、多くは、諸単位操作（工程）の1部として扱われているにすぎない。殺菌方法にはいろいろの方法が用いられている「加熱殺菌方法」に関連する諸問題を動力学的な面から考えてみたい。

「加熱殺菌の動力学」を定義して、照井(1968)⁵⁾は、「狭義では、微生物集団の熱死滅の動力学である。しかし、殺菌というプロセスの実際の意味からして、これを広義に解し、熱殺菌対象たる微生物群+媒体の系における前者の死滅挙動と加熱過程との関係を媒体中における熱移動の問題をもかみあわせて論ずるならば、これに媒体の品質などに関する目的要素を導入すれば『熱殺菌工学』となるようなものである」と言っている。

加熱殺菌の動力学的研究は、上記の狭義の動力学より始まり、広義の動力学に至るが、その過程として2つの中間的な系が考えられる。すなわち、

- i) 熱移動時間が無視できない系
- ii) 懸垂媒体（およびそこに懸垂、溶解中の有効成分）の品質劣化が無視できない系

である。

i) は熱殺菌装置の設計との関連で、平井(1968)⁶⁾、野中、三善(1963)⁷⁾、C. R. Stumbo(1965)⁸⁾、J. W. Richards(1968)⁹⁾らの著書は缶詰などの殺菌方法を材料として熱移動を考慮に入れた研究をまとめている。またF. H. Deindoerferら¹⁰⁻¹³⁾は、醸酵培地の殺菌条件について同様の検討を行ない、殺菌条件の算出法について発表している。ii) の系に関しては、微生物の不活性化速度より求めた活性化エネルギーと、ビタミン類などのそれを比較して、高温領域における短時間の

殺菌が有効成分の品質劣化の防止に良好であること¹⁴⁾より、牛乳に対する熱処理では、Pasteurization よりもHTST (High temperature short time) 法や、UHT (Ultra high temperature) 法が有効であると言われている¹⁵⁾。牛乳の熱処理はPasteurization からHTST法をへてUHT法に至る転換を通じて、前述の広義の動力学に近い領域まで研究が進んでおり、食品工業中でも熱処理の面で最も進んだ分野であろう。

本綜説では、問題の単純化のために「加熱殺菌の動力学」を狭義の意に解したい。

「芽胞」（細菌の内生孢子）はその熱耐性の著大さにより、熱殺菌の研究においては、多くの研究者により用いられている。芽胞のみが持つ著大な熱耐性をはじめとする諸性質に関して多くの研究が行なわれている¹⁶⁻²¹⁾。合理的な加熱殺菌を行なうには、その対象物（その中で最も問題となるものが「芽胞」である）の生理的な研究を欠かすことができないが、ここでは取り扱わないこととする。

1. 微生物の対数死滅則

多くの微生物の栄養細胞や孢子を加熱処理した時、処理時間 t に対して、その時の生存菌数の対数值 $\ln N$ をプロットした生存対数曲線は直線状をなすことが多い。この挙動は化学反応における「1分子反応」の時間経過と類似しており、その示式は化学反応における未反応物質の濃度の代りに生存菌数 N を用いることにより、

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (2.1)$$

$$\text{または } N = N_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.2)$$

となる (Fig. 1 参照)。ここで N_0 は、処理時間 $t=0$ の時の生存菌数、 k はその処理温度における「死滅速度定数」で

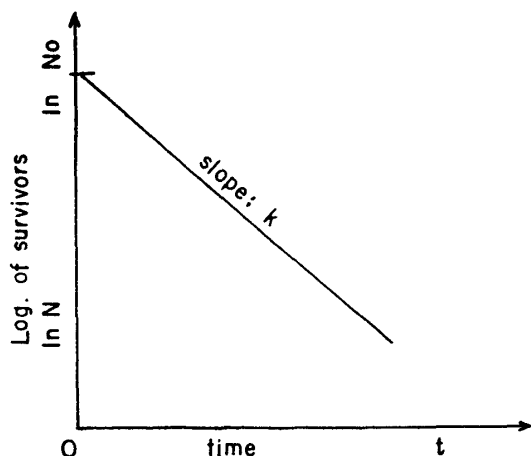


Fig. 1. Logarithmic death of microorganisms.

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{N_1}{N_2} \quad (2.3)$$

から求められる。ここで、 N_1 , N_2 は、処理時間 t_1 , t_2 における生存菌数である。

A. 対数死滅則の発見 自然発生および腐敗に関する L. Pasteur の研究にヒントを得た J. Lister は、石炭酸水の使用による消毒法を外科学に導入した。その後各方面で多くの菌株の栄養細胞や孢子について、石炭酸をはじめとする各種の消毒薬に関する殺菌係数の測定²²⁾が行なわれたが、経時的な測定はなかった。B. Krönig および T. Paul (1897)²³⁾ は、*Bacillus anthracis* の孢子を用いて、 HgCl_2 による死滅を経時的に、かつ定量的に追求した。K. Ikeda (1897)²⁴⁾ は、B. Krönig および T. Paul (1897)²³⁾ のデータを解析して、

$$\frac{N_1}{N_2} \times \frac{t_1}{t_2} = \text{constant} \quad (2.4)$$

なる実験式を提出した。これは微生物の対数的死滅に関する初めての式である。薬剤処理による微生物の対数的死滅は、その後、T. Madsen および M. Nyman (1907)²⁵⁾ や H. Chick (1908)²⁶⁾ によっても、多くの菌株の栄養細胞や孢子で確認された。

T. Madsen および M. Neyman (1907)²⁵⁾ は、*B. anthracis* 孢子を 100°C , 110°C で熱処理し、その経時変化を追求した。この孢子の熱死滅は対数死滅則にしたがうと言及しているが、実験方法の「荒さ」により、満足するデータは得られなかった。H. Chick (1910) は、熱水 ($47\sim 54^\circ\text{C}$ の温度) 中に供試菌を懸垂させて経時的に殺菌ピペットでサンプリングし、平板培養により生存菌数を測定するという、現在われわれが行なうと同様の実験方法で、*Bacillus typhosus*, *Bacillus coli commune*, *Staphylococcus pyogenes albus*, *Ba-*

cillus pestis などの栄養細胞を用い、熱処理による対数的死滅を確認している。

B. 対数死滅則の解釈 微生物の対数死滅が発見されて以後、それに対する多くの解釈が提出されている。通常、微生物の熱死滅は、その時刻に生残している菌体数に比例した速度でおこる。これはちょうど各々の菌体が単一分子のごとく振舞っているように見え、これより各々の菌体内の単一感性分子の不活性化がその菌体に死滅をもたらすものと考えられる。もっとも O. Rahn (1934)²⁸⁾ も示すごとく、菌体内の上記の条件に合う単一感性分子の実体は死滅機構との関連で現在なお各方面で研究されている問題であり、単一分子といえるものであるかどうか不明である²⁹⁾。

対数死滅則に関する既応の諸解釈をつぎの4つに分けて説明する。

(a) 反応速度論

菌体の死滅を菌体内における化学反応の結果と仮定し、菌体内の1つの分子の熱不活性化過程を考える。この時、熱死滅過程は、以下の理由により1次反応に近似できる。

- i) 熱エネルギーによる分子の直接活性化により分子結合が破壊される。化学反応論では、この種の反応は、1次反応で進行する。
- ii) 菌体内の分子と酸素との反応。乾熱殺菌の時などで酸素過剰の条件下では、酸化反応は1次反応とみなされる。
- iii) 菌体内の分子と水または水蒸気との反応。酸化反応の場合のように反応物の1つ（この場合水）が大過剰に存在すれば、その反応は2分子反応ではあるが1次で進行する。

このような時1次反応における未反応分子濃度 C の減少速度式において C の代わりに、生残菌体数 N を用いて式示されることはすでに述べた通りである。

(b) 確率過程論

死滅反応速度式 (2.2式) における死滅速度定数 k を、「菌体が加熱により単位時間に死滅する確率」と定義すれば、死滅は菌体の任意に与えられた状態の現われる確率が、その直前の状態のみに直接依存する確率過程論における1種のマルコフ過程とみなすことができる。これを推移図式で示すと Fig. 2 のようになる。

この時推移確率マトリックスは

$$M = \begin{pmatrix} \text{生より生への移行確率} & \text{生より死への移行確率} \\ \text{死より生} & \text{死より死} \end{pmatrix} \quad (2.5)$$

$$= \begin{pmatrix} 1-k & k \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

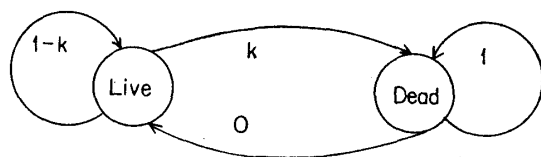


Fig. 2. Transition probability diagram of microbial death.

である。t 時間後の高次推移確率マトリックスは、

$$M^t = \begin{pmatrix} (1-k)^t & 1-(1-k)^t \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

で示せるので、初発菌数を N_0 とすると、t 時間後の生残菌数 N は

$$N = N_0 \cdot (1-k)^t \quad (2.8)$$

$$\approx N_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.9)$$

となり、対数死滅速度式が得られる。

(c) 標的理論

先に述べたごとく、各菌体内に単一感性分子（その実体としては DNA、各種の RNA、蛋白質、膜などが考えられる）を考え、それに対して放射線照射における放射線粒子のごとき致死因子が、これらの物質の化学構造上の標的に衝突し、その構造を破壊ないし変化させると死滅が起こるとする。熱処理の場合の致死因子としては、S. E. Charm (1958)³⁰⁾ が提案するような細胞内の熱エネルギーにより励起された水分子のごときものを仮想すればよい。この時の死滅模形は、単位時間内に標的と致死因子の衝突の結果、1 個の標的がその正常な機能を失う程度の変化を起こす確率を k とすれば、細胞数のかわりに標的数を考え、t 時間後の標的数は、初期の標的数を τ_0 とした時、

$$\tau = \tau_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.10)$$

となる。各細胞内には、ただ 1 個の標的が存在するものとすれば、 $N = \tau$, $N_0 = \tau_0$ なる故、(2.10) 式は、

$$N = N_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.11)$$

となる。

(d) 最確寿命分布論

合葉、戸田 (1965)³¹⁾ は、大きな数の細胞集団を考え、その構成要素としての細胞個体の耐熱寿命がみかけ上加熱を行なう前に決まっていると仮定し、最確寿命分布より、対数死滅式を導いた。

耐熱寿命を t_1 から t_i までの i 種の階級に設定し、各階級に属する細胞数を $N_1, N_2, \dots, N_i$ 個、また細胞個体が t_i の耐熱寿命を持つ先見の確率を g_i とする。この時、ある耐熱寿命分布を示す確率 $W(N_1, N_2, \dots, N_i)$ は、

$$W(N_1, N_2, \dots, N_i) = \frac{N_0!}{N_1! N_2! \dots N_i!} \cdot g_1^{N_1} \cdot g_2^{N_2} \dots g_i^{N_i} \quad (2.12)$$

となる。ここで目的とする最もあらわれやすい耐熱寿命分布のしかたを求めるために、 $W(N_1, N_2, \dots, N_i)$ を最大ならしめるような $N_1, N_2, \dots, N_i$ の組合せを求めると、

$$N_i = C_1 \cdot \exp(-\beta t_i) \quad (2.13)$$

となり、 t_i の耐熱寿命を持つ細胞数 N_i が (2.13) 式であらわされる耐熱寿命分布を示す場合に、 $W(N_1, N_2, \dots, N_i)$ は極値（最大値）となる。

(2.13) 式は、無限に大きい数の細胞集団に対しては、連続的に書くことができ、

$$-\left(\frac{dN}{dt}\right) = C_1 \cdot \exp(-\beta t) \quad (2.14)$$

積分形にし、係数の書き換えを行なうと、

$$N = N_0 \cdot \exp(-kt) \quad (2.15)$$

が得られる。この時、 k は「反応物質が反応にあずかるまでの平均寿命の逆数」と定義できる。

このように対数死滅則の解釈は、いろいろと考えられるが、ここでは、死滅速度定数 k を、「死滅なる事件の起こる時間的確率密度 [hr^{-1}]」と考えることにする。

C. 熱耐性の計量的表示 微生物の熱耐性は、研究者により異なった表示方法が用いられている。その代表的なものについて述べる。

(a) 死滅速度定数 Thermal death rate constant (k)

死滅なる事件の起こる時的確率密度を示す。H. Chick²⁷⁾ は、

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log(N_1/N_2) \quad (2.16)$$

よりこれを求めた。

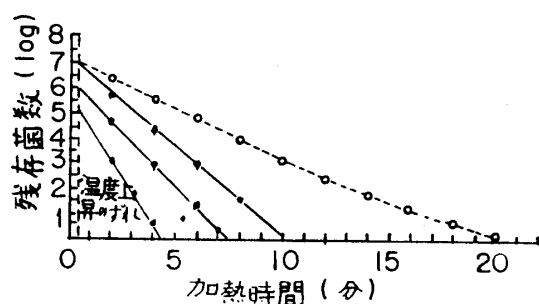
通常この値は、初発菌体濃度を変化させた一連の加熱殺菌実験では変化することはないが、天羽 (1952)³²⁾ は、*Bacillus natto* の芽胞を 100°C で加熱殺菌した時、初発芽胞濃度 (N_0) の変化により、死滅速度定数 (k) が

$$k_1 = C_2 \times \left(\frac{1}{N_0}\right)^n \times \log_{10} N_0 \quad (2.17)$$

となることを示している。その原因は明白ではないが、興味ある問題であろう (Fig. 3)。

(b) 90%死滅時間 Decimal reduction time (D)

L. I. Katzin および L. A. Sandholzer (1943)³³⁾ は、所定の温度において与えられた微生物集団の 90% を死滅させるに要する加熱処理時間を「D 値」として用いることを提案した。D 値と死滅速度定数 k との関係は

Fig. 3. Survival curve of *B. natto*.³²⁾

$$D = 2.203/k \quad (2.18)$$

である。微生物学者は死滅所要時間を決定するためだけの目的でD値を用い、技術者は主として反応速度に関心をもつため k を採用することが多い。

このD値の概念を拡大させたものに「加熱減少時間」Thermal reduction time (TRT) がある。これは与えられた微生物集団をその 10^{-n} 倍まで減少させるに要する時間 (TRT_n) をもって定義する $n=1$ の時D値と一致する。

$$TRT_1 = D \quad (2.19)$$

(c) 加熱致死時間 Thermal death time (TDT)

一定条件下で与えられた微生物集団のすべてを死滅させるに要する加熱時間 (TDT) を加熱致死時間という。D. Bigelow および J. R. Esty (1920)³⁴⁾は、小試験管を用いる方法で耐熱性菌の芽胞の加熱致死時間を測定し、供試菌体数が等しい時、TDT が温度の関数となることを示している。加熱処理温度に対して Log TDT (または Log D) をプロットして得られる図を TDT 曲線という。

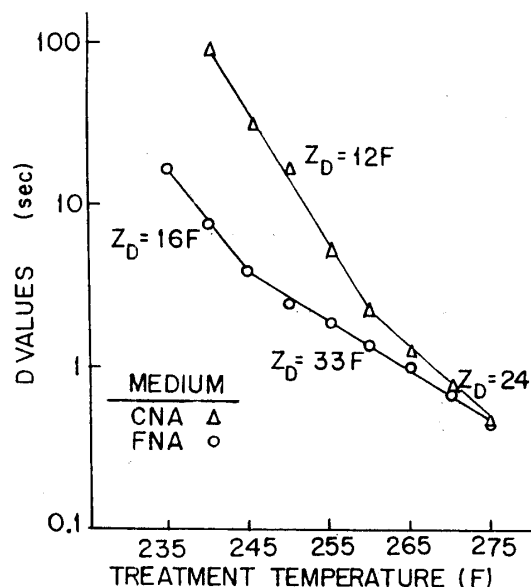
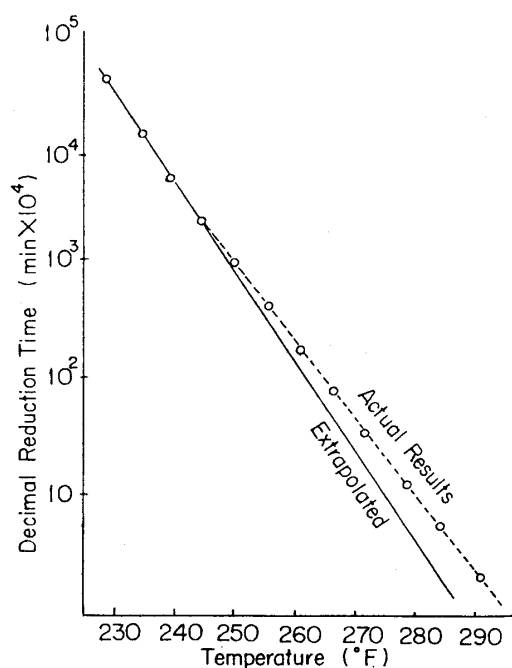
TDT 曲線の勾配をZ値といい、後で述べる温度係数 Q_{10} と

$$Z = 10 / \log Q_{10} (^{\circ}\text{C}) \quad (2.20)$$

$$\text{または } Z = 18 / \log Q_{10} (^{\circ}\text{F}) \quad (2.21)$$

なる関係があり、缶詰殺菌などでは殺菌条件算出の重要なパラメーターとなっている。また、250°F (121.11°C) における TDT をもって「F値」といい、このF, Z値により TDT 曲線の特徴づけることができる。

TDT 曲線は、湿熱殺菌^{34~36)}、乾熱殺菌^{37,38)}共に多くの菌株で直線になると言われている。しかし、J. L. Edward *et al.*³⁹⁾ は *B. subtilis* の孢子を用い、高温域では下に凸の折線状になると報告している (Fig. 4.) また D. Wang *et al.*⁴⁰⁾ は *B. stearothermophilus* の孢子の TDT 曲線は、高温域では直線状を示さないと発表している (Fig. 5).

Fig. 4. TDT curve of J. L. Edward *et al.*³⁹⁾Fig. 5. TDT curve of D. Wang *et al.*⁴⁰⁾

高温域における熱処理においては、低温域の場合とくらべて、殺菌対象の孢子等を所定の温度まで上昇させたり、冷却させたりする時間が、純粹の殺菌時間と比較した時、無視できない程大きくなる。この熱処理時間に関する誤差をうまく処理する方法がなかったことにより、TDT 曲線をかなりの高温域まで直線状であると判断していたのではなかろうか。

(d) 加熱致死温度 Thermal death point

供試菌体を10分間加熱処理して死滅させる最低温度を加熱致死温度という。これはもちろん供試菌体の

量により異なる値である。

ここに述べた熱耐性の計量的表示法のうち、RとDは供試菌体数に通常無関係であるが、TDTやTDPは供試菌体数の大小により変化する値である。故に、前2者は、熱殺菌の理論的検討に向いており、後者は、現実的な殺菌方法の設定時に便利であろう。

上記の4方法以外にも熱耐性の計量的表示は、色々考えられているが、あまり一般的には使われていない。

D. 死滅速度定数と温度との関係 S. Arrhenius⁴¹⁾ は、化学反応における反応速度定数と温度との関係式

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2} \quad (2.22)$$

を提出した。熱死滅速度定数に関してもまったく同じ関係式が成立する。上式を積分して次式を得る。

$$k = A \cdot e^{(-E/RT)} \quad (2.23)$$

ここで、Aは頻度因子、Eは反応の活性化エネルギーである。

H. Eyring⁴²⁾ らは、活性錯合体の概念を用いて絶対反応速度論より反応速度係数と温度の関係を導いた。

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot \frac{F^\ddagger}{F_A F_B} e^{(-E_0/RT)} \quad (2.24)$$

(2.23) 式と比較する時、頻度因子Aに当る部分に温度の項が入っており、広い温度範囲においては(2.23)式のAの値が変化すると考えられる。

(2.24) 式は、また

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\Delta E^\ddagger/RT} \quad (2.25)$$

$$= \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/RT} \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R} \quad (2.26)$$

とも変形される。ここに $\Delta F^\ddagger$ は活性化自由エネルギー、 $\Delta H^\ddagger$ は活性化熱、 $\Delta S^\ddagger$ は活性化エントロピーである。これら熱力学的諸量の推定は細胞の死滅の原因となる生体内反応を理解する一つの助けとなる。

死滅速度定数と温度の関係を示す最も簡単な方法は温度係数 Temperature quotient (Q_{10}) である。通常 t なる温度における k_t と、 t より 10°K 低い温度 ($t-10$) における k_{t-10} の比

$$Q_{10} = k_t/k_{t-10} \quad (2.27)$$

でもって示す。この値は温度と共に変化するが、狭い温度範囲では一定とみなしてさしつかえないのでよく使われている。Z値との関係はさきに示した通りである。一般の化学反応ではこの値は2~3であるが、微生物の死滅や蛋白の熱変性などでは10に近い値を示すことが知られている。

2. 非対数的死滅曲線

微生物の生残対数曲線は一般に対数死滅則に従うものが多いが、実際には実験誤差で説明できないような対数死滅則に従わない結果も多数報告されている。生残対数曲線をその形のみで分類すると Fig. 6 のようになる。

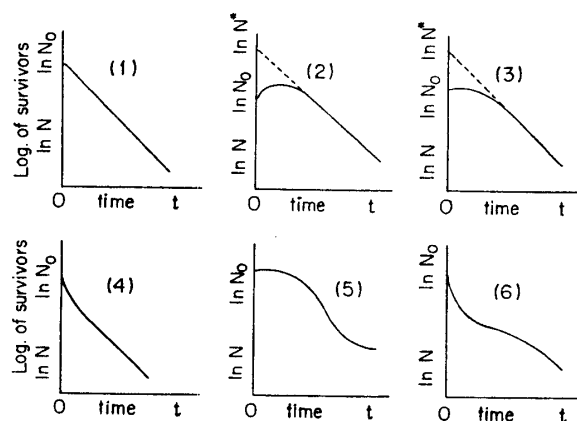


Fig. 6. Type of survival curves.

- (1) 対数的死滅型
- (2) 菌数増加型
- (3) 上に凸型
- (4) 下に凸型
- (5) (6) 複合型

これらの内1型については先に述べた。2~4型については、その理由付や動力学的な解析が若干行なわれている。

A. 非対数的死滅を示す理由 H. Chick²⁷⁾ は、*Staphylococcus pyogeneses aureus* の熱死滅を解析し、その生残対数曲線が、対数的死滅(1型)を呈したり、非対数的死滅(3または4型)を呈したりすることを報告し、この原因は使用菌の前培養歴などによるのだろうが、一般的には新しいものでは3型、古いものでは1または4型を示すとしている。O. Rahn²⁸⁾ も同様の事実を確認している。

F. H. Johnson など(1954)⁴³⁾ によれば、対数死滅則の例外は使用菌の形態や実験条件により任意の処理時間における個々の生残菌数を正確に測定できないことによるとしている。特に使用菌株が塊状をなして

いたり (Staphylococci など), 鎖状に連結している時 (Streptococci など), または他の理由で塊状になっている時には, 平板培養法では正確な生残菌数が計測できないことによる。しかしながら, 実験誤差のみがその原因ではなく, 菌体自身の死に対する感受性の差, 培養の新旧等が問題になると論じ, 結論として次の 5 因子をあげている。

- i) 生残菌数の測定精度
- ii) 生菌を死菌にする時, 細胞内で破壊されねばならない分子の数 (後でのべる多分子的模型の n)
- iii) そのような分子の細胞内での全数 (同上の m)
- iv) その破壊が死をもたらす分子の異なった種類の数
- v) 個々の菌の感受性の不均一性

C. R. Stumbo (1965)⁴⁴⁾ は別の観点からこの問題を論じ, 次のような影響因子をあげている。

- i) 細菌孢子発芽に対する加熱活性化
- ii) 熱耐性の相違する集団の混合
- iii) 塊状をなした細胞群の存在
- iv) 加熱中の細胞凝集
- v) 加熱中の解凝集
- vi) 生残菌数計測用培地の諸条件

これら諸理由の内, 操作上の原因によらず異種集団や塊状等が考えられな時に見られる非対数的熱死滅についてつぎに述べる。

B. 非対数的死滅の動力学的解析 Fig. 6 に示す 2, 3, 4 型の死滅挙動を説明する各種の死滅模型が提出されている。それらのいくつかには導かれた値と実験結果が一致しないものや, 仮定されたパラメータの生理的意味が不明瞭なものもあるが, つぎに現在までに示されている模型を示す。

(a) 多分子的模型

この模型により 2 型の死滅挙動が解析できる。すべての細胞の死が細胞内の 1 種類の分子の破壊によって起り, そのような分子は細胞内に m 個あるとし, この m 個の分子中 n 個が破壊された時, 死滅が起る系を考える。この時 p を m 個の分子中の任意の分子が任意の時間 t で破壊される確率とし q をそれがこわれないうちに残っている確率とすると, 一般的に次式が成り立つ。

$$1 = (p+q)^m = p^m + mp^{m-1}q + \frac{m(m-1)}{2}p^{m-2}q^2 + \dots + \frac{m!}{(m-n)!n!}p^nq^{m-n} + \dots + q^m \quad (3.1)$$

死滅の速度は m, n の数と分子の破壊反応の速度定数 k に依存している。分子の破壊される確率は

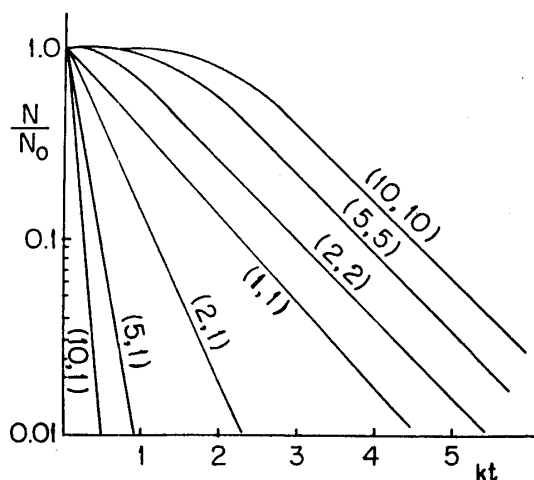


Fig. 7. Theoretical curves illustrating the rate of death on multiple hit model.

$$p = 1 - q = (1 - e^{-kt}) \quad (3.2)$$

一方, 分子の破壊されない確率は

$$q = e^{-kt} \quad (3.3)$$

である。一般に m 個の分子中 n 個の分子の破壊により死滅が起る (m, n) 系においては, ($m+1$) 項ある (3.1) 式のうち, 最後の n 項が生残確率を与える (Fig. 7)。すなわち,

$$(m, n): N/N_0 = \sum_{i=0}^{n-1} mC_i (e^{-kt})^{m-i} (1 - e^{-kt})^i \quad (3.4)$$

ここに mC_i は二項係数である。(3.4) 式の特別な場合として次式が得られる。

$$(m, m): N/N_0 = (1 - e^{-kt})^m \quad (3.5)$$

$$(m, 1): N/N_0 = e^{-mkt} \quad (3.6)$$

$$(1, 1): N/N_0 = e^{-kt} \quad (3.7)$$

W. A. Moats (1971)⁴⁵⁾ は, N 個の critical site のうち, X_L 個の不活性化によって死滅が起ると仮定し, 個々の site の不活性化がランダムに起こり, 1 次反応に従うが, critical [site は全く同一の熱耐性を持つとともに, 細菌集団が熱耐性に関して均一であるような系においてはその死滅は多分子的死滅模型に従うことを示した。またその時の諸パラメータ値 (k, N, X_L) を算出する方法を述べ, *Pseudomonas viscosa* と *Salmonella anatum* における諸パラメータ値を求めている。

この理論には先にも指摘した如く, m と n の値が, 菌の培養分によって変化したりすると, 死滅速度はたとえ死滅速度定数 k が一定値を保とうとも変化することである⁴⁶⁾。A. Anellis など (1965)⁴⁷⁾ は, *Clostridium botulinum* 孢子の放射線殺菌 (最も標的理論が当てはまると考える) において, (3.5) 式を適用し, m の値を算出しているが, その値は孢子の懸垂媒体の性状によってさえ変化している。さらに, 1 種類以上

の分子の破壊の有無が死滅に関係する時にはこの理論はさらに複雑になる。

(b) 2直線近似模型

H. Chick²⁷⁾ は3, 4型の生残対数曲線に, 2直線を近似させ, 前期と後期で異なった死滅速度定数を求めている. M. Amaha および Z. J. Ordal (1957)⁴⁸⁾ も, *Bacillus coagulans* の胞子を用い3型の生残対数曲線をえて, これを2直線に近似して前期と後期の D_1 , D_2 を求めている。

A. E. Humphrey¹⁴⁾ や J. W. Richards⁴⁰⁾ は, 初発微生物集団が純粋に均一でなく熱耐性の異なる混合集団の時, それぞれの集団が直線的に死滅しての生残対数曲線は4型になることを示している。

先の2例では完全に異なる2種の混合試料を用いているとは考えられないので, 2直線近似は簡便な方法ではあるが適切な解析法であったとは思われない。

(c) 初発菌数換算模型

胞子の発芽に熱活性化が必要な時, 2, 3型の生残曲線がよく得られる. Fig. 6の2, 3型において, 加熱殺菌後期の対数的死滅直線を $t=0$ に外挿して得られる値 N_0^* を用いて

$$N = N_0^* \cdot e^{-kt} \quad (3.8)$$

として, 生残曲線の後期対数的死滅を表示しようとする模型である。

この模型においては, $t=0$ (無加熱処理) の平板培養による生菌数 N_0 (viable) と, 顕微鏡観察による全菌数 N_0 (Total) を計測した時, 明らかに

$$N_0(\text{viable}) < N_0(\text{total})$$

である. もしも熱活性化のみが初期の非対数的挙動の原因であれば

$$N_0^* = N_0(\text{total}) \neq N_0(\text{viable})$$

とならねばならないはずであるが,

$$N_0^* > N_0(\text{total})$$

となることがしばしば起こり, N_0^* の具体的意味付けがあいまいで問題の多い模型である。

(d) 活性化胞子模型

A. E. Humphrey¹⁴⁾ は胞子の熱死滅に際し, 加熱初期におこる死滅遅延現象に関連し, 3型の生残対数曲線の解析に言及している. すなわち胞子 (N) が発芽状態にある胞子 (N^*) に至る速度定数を k_1 , さらに死滅に至る速度定数を k_2 とすれば,

$$N = f(e^{-k_1 t}, e^{-k_2 t}) \quad (3.9)$$

の関係を用いて, 3型の生残対数曲線が近似的に解析可能である。

J. J. Shull など^{50, 51)} は同様の考えをさらに詳細に

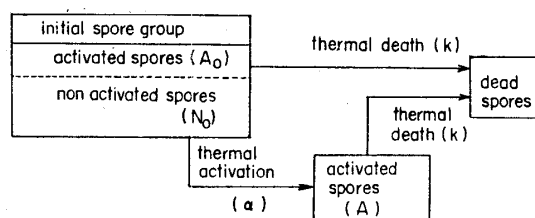


Fig. 8. Activated spores model by J. J. Shull et al.⁵¹⁾

検討している (Fig. 8). いま初発胞子集団を活性化胞子 (適当な培地でコロニー形成可能なもの) A_0 と, 非活性化胞子 (加熱により活性化状態へ可逆的に持って行けるもの) N_0 との混合集団と仮定し, 活性化胞子は加熱により速度定数 k で死滅に至るが, 非活性化胞子は一度活性化胞子状態に変化した後 (その熱活性化の速度定数を α とする), k で死滅する模型 (Fig. 8) を考える。

時間 t における生菌胞子数 L_t は

$$L_t = N_t + A_t \quad (3.10)$$

ここで, N_t は時間 t における非活性化胞子数で,

$$N_t = N_0 \cdot e^{-\alpha t} \quad (3.11)$$

で減少する. 一方 A_t は時間 t における活性化胞子数であり, この内初発集団から残存している A の量は $A_0 \cdot e^{-kt}$ である。

微小時間における A_t および L_t の変化は

$$\frac{dA_t}{dt} = -kA_t + \alpha N_0 \cdot e^{-\alpha t} \quad (3.12)$$

$$\frac{dL_t}{dt} = -kA_t \quad (3.13)$$

となる。

$\alpha \neq k$ の時 (3.12) 式の解は

$$A_t = A_0 \cdot e^{-kt} + \frac{\alpha N_0}{k - \alpha} (e^{-\alpha t} - e^{-kt}) \quad (3.14)$$

また $\alpha = k$ の時

$$L_{t_2} - L_{t_1} = -k \int_{t_1}^{t_2} A_t dt \quad (3.15)$$

で示される。

J. J. Shull ら⁵¹⁾ は, *B. stearothermophilus* による実験結果と理論式の比較を行ない, 曲線の形は類似しているが若干の差があり, この差を是正しようとすると熱活性化が1次反応に従わなくなったと報告している。

(e) 歴史系模型

照井 (1966)⁵²⁾ は細胞の熱感性が殺菌時の加熱歴によって変化するかどうかで, 熱殺菌系を

i) 非歴史性体系 Nonhistorical system (殺菌時の加熱前歴が, 生残細胞の熱感性に影響を与えないもの)

ii) 歴史性体系 Historical system (殺菌時の加熱前歴が, 生残細胞の熱感性に影響を与えるもの)

とに 2 大別し, 3, 4 型の生残対数曲線に対して加熱歴によりその k が変化する歴史性体系に属する模型 (Fig. 9) を用いて解析できることを示した。

最も簡単な歴史系 1 分子反応型で, 感性分子が加熱により低感性分子 (R) から高感性分子 (S) に変化するか, またはその逆に変化し, いずれも変性分子 (D) となり得る模型である。

Fig. 9 の模型において, 加熱条件下 3 型では $\Delta F_{R \rightarrow S}$

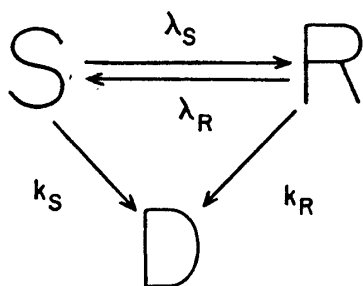


Fig. 9. Model of simple historical system.⁵²⁾

$\ll 0$, 4 型では $\Delta F_{S \rightarrow R} \ll 0$ である。 k を D に向っての速度定数, λ を S, R 間の変化の速度定数, 添字を反応の出発がそれぞれであることを示している。

この模型に従って速度論的に定式化すると次の式が得られる。

$$N/N_0 = K_S e^{-(k_S + \lambda_S)t} + (1 - K_S) e^{-k_R t} \quad (3.16)$$

$$N/N_0 = K_R e^{-(k_R + \lambda_R)t} + (1 - K_R) e^{-k_S t} \quad (3.17)$$

$$K_S = \gamma_S (k_S - k_R) / (k_S + \lambda_S - k_R) \quad (3.18)$$

$$K_R = -\gamma_R (k_S - k_R) / (k_R + \lambda_R - k_S) \quad (3.19)$$

$$\gamma_S = 1 - \gamma_R = N_S / N_0 = 1 - \frac{N_R}{N_0} \quad (3.20)$$

ただし, N_S, N_R はそれぞれ初発の S, R 胞子数, γ_S, γ_R は S, R の初発存在率とする。また, (3.16) 式は 4 型, (3.17) 式は 3 型に対応する。

本模型を用いて 3, 4 型の生残対数曲線を示す *B. subtilis* var. *niger* および *B. pumilus* の胞子の熱死滅挙動の解析が行なわれている³⁵⁻⁵⁵⁾。興味ある点は, 推定した活性化エネルギー値によれば, λ 段階の反応の性質である。 *B. pumilus* 胞子の λ_S 段階は, 熱に対して保護的反応 ($S \rightarrow R$) を起こし, その活性化エネルギーは約 25 kcal/mole である。一方 *B. subtilis* var. *niger* 胞子の場合, λ_R 段階は熱活性化反応 ($R \rightarrow S$) であり, その活性化エネルギーは約 63 kcal/mole を示しており, その大きさは蛋白質熱変性のそれに対応しており, *B. pumilus* の λ 段階と異なっている。

上記の解析では γ_S, γ_R をそれぞれ 1 とおいて解析を行なっているが, この模型では初発胞子に S, R が共存する場合にも同様の解析が行なえる。

(f) 熱損傷胞子模型

K. Toda (1970)⁵⁶⁾ は加熱処理過程において, 無損傷胞子の中間的存在として熱損傷胞子を仮定し, これら各々の状態の胞子数の変化を追求した。

熱損傷胞子模型の一般型として Fig. 10 の模型を考え, 活性化状態が “i” の胞子数の変化率を求めると,

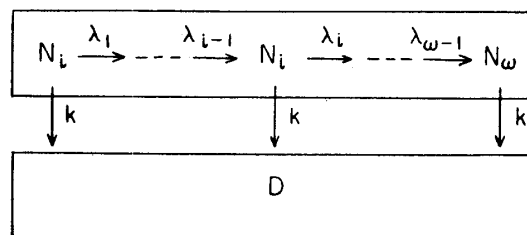


Fig. 10. Schematic diagram of thermal inactivation.⁵⁶⁾

$$dN_i/dt = -(k + \lambda_i) N_i + \lambda_{i-1} N_{i-1} \quad (3.21)$$

$$\text{ただし, } \lambda_0 = \lambda_{w+1} = 0 \quad (3.22)$$

N_i の解は

$$N_i = \sum_{j=1}^i A_j \cdot e^{-(k + \lambda_j)t} \quad (3.23)$$

ここで係数 A_j は,

$$A_j = \left(\prod_{h=j}^i \frac{\lambda_{h-1}}{\lambda_h - \lambda_j} \right) \left\{ \sum_{\beta=1}^j B_{\beta j} N_{\beta 0} \left(\prod_{r=\beta}^i \frac{\lambda_r}{\lambda_j - \lambda_r} \right) \right\} \quad (3.24)$$

また (3.24) 式中の係数 $B_{\beta j}$ は, 符号表示関数で,

$$B_{\beta j} = \frac{1}{2} \left[(-1)^{\beta+1} \{1 - (-1)^j\} + (-1)^\beta \{1 + (-1)^j\} \right] \quad (3.25)$$

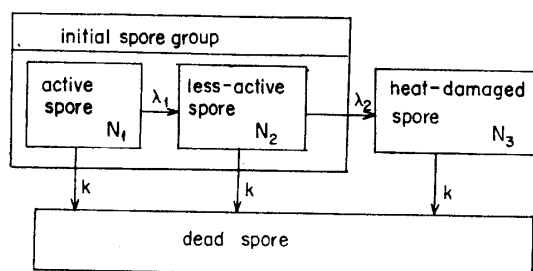
である。時間 t における全生菌数は N_i の合計であり,

$$N = \sum_{i=1}^w N_i = N_0 \cdot e^{-kt} \quad (3.26)$$

となる。

この一般論より導かれるより簡単な模型で, *B. subtilis* 胞子の熱死滅過程を説明できる模型として Fig. 11 に示すものを考える。この模型では初発胞子は N_1 と N_2 の 2 つの状態をとっているが, これは *B. subtilis* 胞子の生残胞子総数 ($N = N_1 + N_2 + N_3$) は対数的死滅を示すが, 無損傷胞子数 ($N^* = N_1 + N_2$) は, 4 型の生残対数曲線を示すのに対応する。時間 t における N および N^* の値は次式で与えられる。

$$N = N_1 + N_2 + N_3 = N_0 e^{-kt} \quad (3.27)$$

Fig. 11. Schematic diagram of simpler model.⁵⁶⁾

$$N^* = N_1 + N_2 = \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} N_{10} e^{-(\lambda_1 + k)t} + N_{20} - \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} N_{10} e^{-(\lambda_2 + k)t} \quad (3.28)$$

ここで $N_0 = N_{10} + N_{20}$, $N_{30} = 0$ である。

この模型においては、胞子の加熱処理過程は、

- i) 未熱処理胞子集団内に少なくとも2種の活性分布が存在し、
- ii) 熱損胞子を加えた3種の生胞子活性状態間の逐次不活性化反応を含み、
- iii) 各活性状態から死滅反応を伴う「複合反応」として取り扱うことができる。

(g) その他

以上現在までに発表され微生物の死滅に適用されて来た若干の模型を示したが、単に模型として考えるならば色々の模型が考えられる。

K. J. Laidler (1958)⁵⁷⁾ は蛋白の変性に関して多くの模型を示している。それらの多くは微生物熱死滅の模型としても妥当である。

Fig. 10 の模型は複合反応を仮定しているが、死滅への中間段階を考える「逐次反応模型」や、多種類の感性分子を考え、どの感性分子の破壊も死滅に至る「multisite 模型」等も考えられる。どちらにせよ今後考えねばならない事は死滅の key reaction を明白にしその反応を中心にした模型を作らねばならない。この点からも死滅の原因、熱耐性の原因等の追求の重要なことを痛感するものである。

C. 熱活性化

細菌胞子を熱殺菌実験の材料に用いる時熱活性化の現象をよく見る。細菌胞子の発芽に熱活性化が必要ないし重要な役割を演じていることは、A. Keynan および Z. Evenchick (1969)⁵⁸⁾ や R. W. Berk および W. E. Sandine (1970)⁵⁹⁾ らの綜説に詳しく示されているが、この為に生残対数曲線が真の姿を表わさず熱活性化によるコロニー形成細胞数の増加と熱死滅数との差が、初期の見かけ生残対数曲線として現われ、見

かけ生菌数の増加をみたり、あるいは上に凸型の生残対数曲線をとることがある。

死滅挙動の解析には上記のような活性化を死滅を伴わない予備加熱条件の検討により取り除く必要がある。これは凝塊やフロック形成による計数上の誤差を適当な方法で除くのと同様であり、正しい生残曲線を得ることが必要である。

発芽へ向っての熱活性化と、死滅に向っての熱活性化との関係については、将来に残された興味ある問題を含んでいる。後者は熱感受性化への反応であって k の変化に相当する。発芽の活性化エネルギーは、約 20 kcal/mole⁶⁰⁾ 程度であるが、発芽への熱活性化については蛋白質熱変性と同程度の値(約 72 kcal/mole)が、*B. megaterium* 胞子で認められている⁶¹⁾。死滅への熱活性化については、約 63 kcal/mole と報告⁵⁵⁾ されているが、これら両者の熱活性化が同一過程であるかどうかについては明白ではない。

終りに臨み、御助言いただきました 大阪大学工学部 照井堯造、芝崎勲両教授および大阪大学薬学部 三浦喜温教授に深謝します。

文 献

- 1) 芝崎：食品殺菌工学，光琳書院（1967）。
- 2) 野中，三善：缶詰殺菌の理論と実際，厚生閣（1963）。
- 3) Stumbo, C. R.: "Thermobacteriology in Food Processing," Academic Press, Inc. (1965).
- 4) Richards, J. W.: *Introduction to Industrial Sterilization*, Academic Press, Inc. (1968).
- 5) 照井：第4回生物化学工学講演討論会（大阪）予講集，13（1968）。
- 6) 平井：第4回生物化学工学講演討論会（大阪）予講集，1（1968）。
- 7) 野中，三善；缶詰殺菌の理論と実際，34，厚生閣，（1963）。
- 8) Stumbo, C. R.: *Thermobacteriology in Food Processing*, 113, Academic Press, Inc. (1965).
- 9) Richards, J. W.: *Introduction to Industrial Sterilization*, 93, Academic Press, Inc. (1968).
- 10) Deindoerfer, F. H.: *Appl. Microbiol.*, **5**, 221 (1957).
- 11) Deindoerfer, F. H., Humphrey, A. E.: *Appl. Microbiol.*, **7**, 256(1959).
- 12) Deindoerfer, F. H., Humphrey, A. E.: *Appl. Microbiol.*, **7**, 264 (1959).
- 13) Deindoerfer, F. H., Humphrey, A. E.: *Appl.*

- Microbiol.* **9**, 134 (1961).
- 14) Humphrey, A. E.: 本誌, **42**, 393 (1964).
 - 15) 岡田 : 第 4 回生物化学工学講演討論会 (大阪) 予講集, 25(1968).
 - 16) 蜂須賀 : 芽胞, 岩波書店 (1962).
 - 17) Gould, G. W., Hurst, A.: *The Bacterial Spore*, Academic Press, Inc. (1969).
 - 18) Halvorson, H. O.: *Spores*, American Institute of Biological Sciences (1957).
 - 19) Halvorson, H. O.: *Spores II*, Burgess Publishing Company (1961).
 - 20) Campbell, L. L., Halvorson, H. O.: *Spores III*, American Society for Microbiology (1965).
 - 21) Campbell, L. L.: *Spores IV*, American Society for Microbiology (1969).
 - 22) Behring, S.: *Z. F. Hyg.*, **9**, 396 (1890).
 - 23) Kröning, B., Paul, T.: *Z. F. Hyg.*, **25**, 1 (1897).
 - 24) Ikeda, K.: *Z. F. Hyg.*, **25**, 95 (1897).
 - 25) Madsen, T., Nyman, M.: *Z. F. Hyg.*, **57**, 388 (1907).
 - 26) Chick, C.: *J. Hyg.*, **8**, 92 (1908).
 - 27) Chick, C.: *J. Hyg.*, **10**, 237 (1910).
 - 28) Rahn, O.: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **2**, 70 (1934).
 - 29) Allwood, M. C., Russell, A. D.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **12**, 89 (1970).
 - 30) Charm, S. E.: *Food Technol.*, **12**, 4 (1958).
 - 31) 合葉・戸田・本誌, **43**, 527 (1965).
 - 32) 天羽幹夫 : 農化, **26**, 339 (1952).
 - 33) Katzin, L. I., Sandholzer, L. A.: *J. Bacteriol.*, **45**, 19 (1943).
 - 34) Bigelow, W. D., Esty, J. R.: *J. Infect. Disease*, **27**, 602 (1920).
 - 35) Pflug, I. J., Esselen, W. B.: *Food Technol.*, **7**, 237 (1953).
 - 36) Augustin, J. A. L., Pflug, I. J.: *Appl. Microbiol.*, **15**, 266 (1967).
 - 37) Busta, F. F.: *Appl. Microbiol.*, **15**, 640 (1967).
 - 38) Angelotti, R., Maryanski, J. H., Butler, T. F., Peeler, J. T., Campbell, J. E.: *Appl. Microbiol.*, **16**, 735 (1968).
 - 39) Edwards, J. L., Busta, F. F., Speck, M. L.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 851 (1965).
 - 40) Wang, D., Scharer, J., Humphrey, A. E.: *Appl. Microbiol.*, **12**, 451 (1964).
 - 41) Arrhenius, S.: *Z. physik. Chem.*, **3**, 226(1889).
 - 42) Glasstone, S., Laidler, K. J., Eyring, H.: *The Theory of Rate Processes* (1941)(長谷川, 平井, 後藤訳「絶対反応速度論」, 195, 吉岡書店 (1964).)
 - 43) Johnson, F. H., Eyring, H., Polissar, M. J.: *The Kinetic Basis of Molecular Biology*, 455, John Wiley & Sons, Inc., New York (1954).
 - 44) Stumbo, C. R.: *Thermobacteriology in Food Processing*, 60 Academic Press, New York (1965).
 - 45) Moats, W.: *J. Bacteriol.*, **105**, 165 (1971).
 - 46) Johnson, F. H., Eyring, H., Polissar, M. J.: *The Kinetic Basis of Molecular Biology*, 458, John Wiley & Sons, Inc., New York (1954).
 - 47) Anellis, A., Grace, N., Berkowitz, D.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 397 (1965).
 - 48) Amaha, M., Ordal, Z. J.: *J. Bacteriol.*, **74**, 596 (1957).
 - 49) Richards, J. W.: *Introduction to Industrial Sterilization*, 25, Academic Press, Inc. London (1968).
 - 50) Shull, J. J., Cargo, G. T., Ernst, R. R.: *Appl. Microbiol.*, **10**, 452 (1962).
 - 51) Shull, J. J., Cargo, G. T., Ernst, R. R.: *Appl. Microbiol.*, **11**, 485 (1963).
 - 52) 照井 : 本誌, **44**, 534 (1966).
 - 53) 米虫, 高田, 照井 : 本誌, **44**, 543 (1966).
 - 54) 米虫, 照井 ; 本誌, **45**, 764 (1967).
 - 55) Komemushi, S., Okubo, K., Terui, G.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 249 (1968).
 - 56) Toda, K.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 811 (1970).
 - 57) Laidler, K. J.: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 336, Oxford at the Calendon Press (1958).
 - 58) Keynan, A., Evenchick, Z.: *The Bacterial Spores* Gould, G. W., Hurst, A., 359, Academic Press, London (1969).
 - 59) Berg, R. W., Sandine, W. E.: *J. Milk and Food Technol.*, **33**, 435 (1970).
 - 60) Levinson, H. S., Hyatt, M. T.: *J. Bacteriol.*, **103**, 269 (1970).
 - 61) Levinson, H. S., Hyatt, M. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **37**, 909 (1969).

(昭 46.6.15 受付)