

一般論文

ガス化過酸化水素と紫外線による 包装容器の殺菌

柴内好人* 畑中耕一*

Sterilization of Packaging Containers
by Gasified Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Rays

Yoshito SHIBAUCHI, Kouichi HATANAKA

A sterilization method using hydrogen peroxide (H_2O_2) vapor and ultraviolet rays (UV) was studied for the effective and economical sterilization of preformed food containers. The containers on which *A. niger*, *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* spores were inoculated were treated by gasified H_2O_2 generated by a newly developed vaporizer, with or without simultaneous irradiation of UV. The results showed high sterilization effects of this method, especially when it was combined with the simultaneous treatment of UV, sterilizing 10^8 spores per container for all those of microorganisms under H_2O_2 concentration of 3 to 35%. The residual H_2O_2 on the container was easily reduced to 0.1ppm or less by heated-air drying of about $80^\circ C$ for 5 seconds. The mechanism of the high sterilization effect of the simultaneous treatment was discussed in terms of the interaction between UV and H_2O_2 .

Keywords : Hydrogen peroxide, Hydrogen peroxide gas, Sterilization, Ultraviolet rays, Packaging container, Vaporizer, *B. subtilis*

* 雪印乳業株式会社 技術研究所 (〒350 埼玉県川越市南台1-1-2)

要 旨

過酸化水素の微生物に対する殺菌効果の研究は古く、耐熱性菌のつくる芽胞の殺菌に関する研究^{1) 2) 3) 4) 5) 6)} や、処理後の芽胞の回復⁷⁾、過酸化水素水と紫外線を併用した場合の殺菌効果^{8) 9) 10)}、あるいは過酸化水素水の蒸気と加熱エアアの混合物による殺菌¹¹⁾ など多くの報告がある。

食品包装業界においては、過酸化水素は殺菌効果が高く、無色・無臭で取り扱いも比較的容易なことから、FDAによって包装材料の殺菌剤として認可されて以来、特にフィルム状あるいはシート状包装材料に広く応用されて来た。この場合、殺菌後の過酸化水素の包装材料への残留は、食品衛生法の厚生省令第24号により『最終製品中に過酸化水素の残留が無いこと』と定められているが、これらの包装材料においてはエアナイフやローラー等の物理的方法が有効なために、その除去は比較的容易である。

一方、成形容器の殺菌は強力紫外線による方法や、一流体ノズルや二流体ノズルによる過酸化水素水の噴霧による方法が試みられてきたが、前者は黒かび (*Aspergillus niger*) に対して殺菌効果が弱く、またテーリング現象として知られているように、照射時間を増加しても少数の微生物が残留するなど、殺菌効果が充分ではない¹²⁾。後者は、成形容器の場合、被殺菌物の表面形状が複雑で殺菌後の過酸化水素の除去が難しく、また噴霧量を少量にすると殺菌効果にばらつきが生じたり、噴霧が不安定になったりする問題があった。

そこで本研究では過酸化水素水を気化し、これを成形容器の様な複雑な表面を持つ被殺

菌物の表面に薄くフィルム状に凝縮させて一定時間保持し、あるいは同時に紫外線を照射して殺菌を行い、無菌エアアにより残留過酸化水素を除去する殺菌方法について検討したので報告する。

1. 試料および実験方法

1.1 過酸化水素濃度の測定

微量過酸化水素の定量方法としては、改良4-アミノアンチピリン法、及び酸素電極法が厚生省より通知されているが、易操作性やコスト面で研究開発における種々の濃度の多数の試料を分析する方法としては必ずしも効率的ではない。

そこで、本研究においては、高濃度過酸化水素水の濃度測定には光屈折濃度計を、また微量過酸化水素定量には紫外線吸光度法およびチオシアン酸アンモニウム法を用いて測定を効率化した。なお、検量線の作成には酸素電極法を用い、残留過酸化水素の確認にもこれを併用した。

1.1.1 光屈折率計法

1%以上の過酸化水素水の濃度を、誤差0.5%程度で測定する場合に用いた。過酸化水素水の屈折率を測定してその濃度を決定する方法で、原理的に不純物を混合しているものは測定できない。使用する屈折率計としては、糖度測定に用いられている光屈折型糖度計を用いた。

濃度1~35%程度の過酸化水素水に対する検量線では直線性が高く、一次関数による回帰で相関係数は0.999であった。

1.1.2 紫外線吸光度法

10ppm程度以上の過酸化水素濃度を、2~

3ppm 程度の精度で測定する場合に用いた。検量線を正確に求めれば、さらに精度を上げることが可能である。本法は、過酸化水素を含んだ試料を直接分光光度計により吸光度を測り、検量線により濃度を求める方法で、原理的に水と過酸化水素だけの混合物の濃度測定が可能である。

紫外線の波長は200~230nm 程度とし、その波長における吸光度あるいは吸光度の一次微分より検量線を作成した。濃度領域としては、10~3000ppm 程度の測定が可能であるが、精度を考慮し濃度領域を幾つかに分け、それぞれの領域で検量線を求めた。

1.1.3 チオシアン酸アンモニウム法

本法は、0.05ppm 以上の過酸化水素濃度を酸素電極法とほぼ同程度の精度で測定できる方法で、雪印乳業(株)により開発された手法¹⁹⁾である。この方法は、まず下記のような2種類の試薬AおよびBを調整する。

試薬A：1.2M チオシアン酸アンモニウム溶液
試薬特級チオシアン酸アンモニウム9.1gを0.5 N塩酸に溶かし100とする。

試薬B：1%硫酸第一鉄溶液
試薬特級硫酸第一鉄1gを0.5N塩酸で溶かし100とする。

試料5を取り、試薬Bを1加えてよく攪拌した後、試薬Aを5加えて攪拌する。この溶液を分光光度計を用いて、波長480nmでの吸光度を測定し、検量線から過酸化水素濃度を求める。過酸化水素濃度Cは、

$$C = (Abs - Abs_0) \times N \times F$$

の式によって求められる。

ここで、

- C [ppm] : 求める過酸化水素濃度
- Abs : 試料の吸光度
- Abs₀ : 蒸留水の吸光度
- N : 試料の希釈率
- F : 標準試料より求める係数

1.2 過酸化水素水の気化

本殺菌方法においては3~35%程度の過酸化水素水を加熱によりガス化して使用するが、過酸化水素水は条件によって熱分解したり、あるいは水の蒸発によって濃縮されたりする。そこで、気化条件を決めるために気化特性を把握する試験を行った。

Fig. 1 に加熱された平板上での、水と過酸化水素水の液滴の気化特性を示す。これは蒸発面上に液滴を静かに落した時の蒸発面温度と蒸発に要する時間(以下蒸発時間)の関係を示している。使用した過酸化水素水は濃度35%(w/w)、食品添加物規格のもの(三菱瓦斯化学(株))で液滴の重さは約0.01gとし、蒸発面は滑らかなステンレス鋼とした。

図のように、水の場合は蒸発面温度が高く

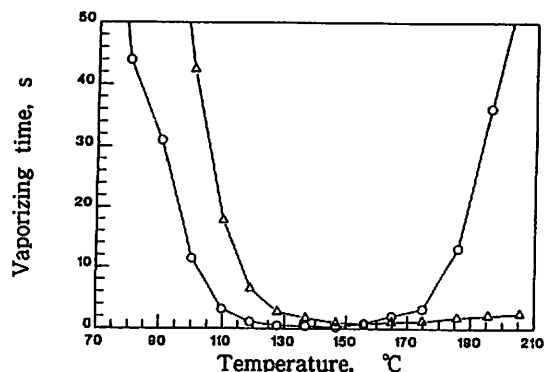


Fig. 1 Vaporizing time of water (O) and 35% hydrogen peroxide (Δ) droplets put on a heated stainless plate

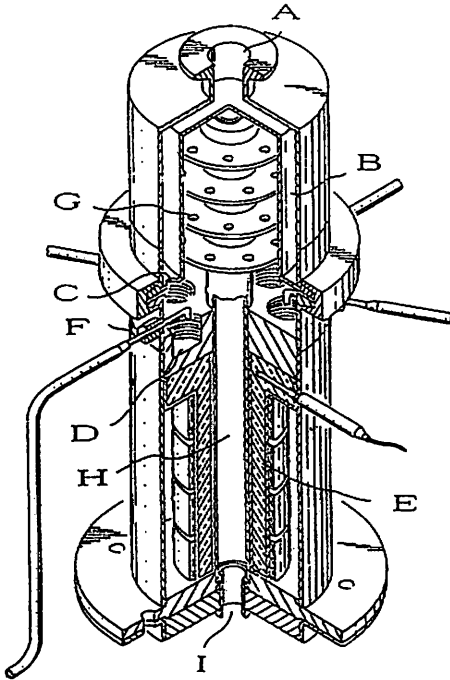


Fig. 2 Hydrogen peroxide gas generator
 A small amount of heated air entered at an inlet port (A) goes downward, heating an inner shell (B), and blows through air nozzles (C) into vaporizing cavities (D) heated by heating unit (E), then helps vaporize hydrogen peroxide droplets supplied by droplet nozzle (F).
 The generated gas rises through filtering unit (G) preventing from entrainment, then passes through inner tube (H) in which the gas heated to the set temperature and goes out of gas outlet (I).

なると蒸発時間は短くなり、140℃付近で最小となった。それ以上の温度ではスフェロイダル現象^{14) 15) 16)}のために蒸発時間が逆に長くなっている。スフェロイダル現象とは、液滴と蒸発面の間に蒸気の膜が発生して液滴粒子が蒸発面から浮上し、伝熱係数が低下して蒸発時間が長くなる現象である。

一方、過酸化水素水は水の場合とは異なり、蒸発面温度が 160~170℃のとき蒸発時間は最小値をとり、それ以上の温度でも蒸発

時間はあまり長くない。これは過酸化水素水の蒸気以外に熱分解による酸素も発生し、液滴が不安定となってバーストして飛沫化するためと考えられる。

Fig. 2 に本研究において開発し、試験に使用した過酸化水素水の気化器を示す。構造的には3重円筒になっており、外筒の天面から少量の加熱エアが入り、内筒を加熱した後ノズルを通して加熱された凹状の蒸発部へ吹き込む。ここで滴下された過酸化水素水が気化され、内筒と多孔板で構成されるフィルター部で飛沫同伴を除去する。このとき内筒は加熱されているので、再凝縮は防止される。最後に、気化された過酸化水素は最内筒に入り、加熱部を通過する間に所定の温度に到達して包装材料表面に到る。

この気化器は数種の予備的な気化器の試作・評価のもとに開発したもので、小型で易操作性が高く、ガスの温度および流量ともに安定した気化が行える特徴がある。

この気化器を使用して気化温度（蒸発面温度）を変えた場合の過酸化水素の分解率の変化をFig. 3に示す。試験は35%過酸化水素水を用い、発生したガスを表面温度を0~1℃に

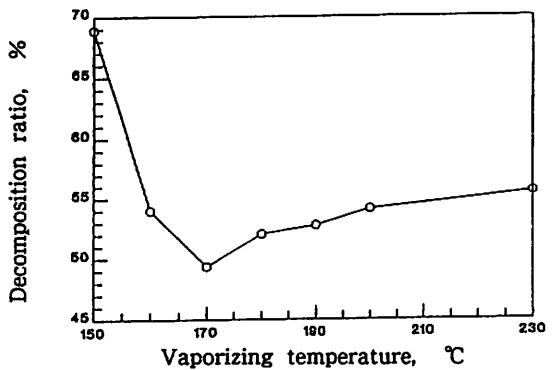


Fig. 3 Decomposition ratio of hydrogen peroxide in vaporizer

冷却した凝縮管（コンデンサー）で回収し、その濃度を測定した。このとき凝縮管の長さの制約から、液総量としての回収率は約80%であった。気化温度が150℃以下では分解率は約70%と高く、170℃付近で約50%となり、それ以上の温度では再びゆるやかに分解率が高くなった。この試験結果は気化器を用いているため、先に述べた平板上の気化とは直接比較することはできないが、蒸発時間が最小となる温度付近で分解率も最小となることが示唆された。

1.3 被殺菌物表面からの過酸化水素の除去

上記の気化器を用いて、35%過酸化水素水を蒸発面温度180℃で気化し、発生したガスを内容量100のポリスチレン容器に2秒間凝縮させた後、所定の乾燥条件下で乾燥処理し、速やかに密封して容器を取り出した。これに20mlの蒸留水を加えてよく振り、容器内の残留過酸化水素を溶解して試料とした。

1.4 殺菌試験

殺菌試料としては、紫外線耐性の高い黒かび (*Aspergillus niger*)、耐熱性の高い枯草菌 (*Bacillus subtilis*) および耐熱性の極めて高い *Bacillus stearothermophilus* の芽胞を、それぞれ所定の菌濃度で少量の界面活性剤を加えた蒸留水中に懸濁し、これを二流体ノズルで内容量100mlのポリスチレン (PS) 樹脂製容器に約80mg噴霧し、室温でよく乾燥させたものを使用した。このとき、予備殺菌試験および電子顕微鏡観察によって、菌を生理食塩水中に懸濁すると乾燥処理後菌が食塩の結晶中に取り込まれて保護され、特に紫外線処理において殺菌効果の低下が認められた。また、界面活性剤は、懸濁液を容器表面に均

一に薄膜状に付着させるために用いた。試料に植菌した菌数は、蒸留水を用いて試料内面の菌をよく洗い出し、サンプリングしてから標準寒天培地で培養し、コロニーカウント法により確認した。

このように作成した試料を無菌チャンバー内で過酸化水素ガス、あるいは過酸化水素ガスと紫外線の併用により殺菌処理した後、無菌加熱エアーにより被殺菌物表面の残留過酸化水素を除去した。過酸化水素の凝縮量は、内容量100mlの容器で約10mg程度とし、ガス下で約2秒間保持することにより凝縮させた。

紫外線併用時は、凝縮させた過酸化水素が乾燥しないうちに照射するようにした。紫外線照射器としては強力紫外線ランプ (ウシオ電気 (株)) を用い、試料容器を約80mW/cm²の照度のランプ下へ間欠的に移動し、2秒間保持することにより照射した。乾燥は80℃、0.0196m³/sec.の流量の無菌熱風で5秒間行った。このとき予備試験により殺菌、乾燥処理を終えた容器内には過酸化水素の残留が無いことを確認した。

以上の操作にて殺菌処理された容器内に、無菌的に標準寒天培地を充填し、35℃で2日間の培養の後、目視によるコロニーカウント法により生残菌数を測定した。

2. 結果および考察

2.1 残留過酸化水素

食品衛生法により、殺菌処理後の包装材料には過酸化水素は残留してはならないとされている。従って、最終製品に残留過酸化水素があってはならないことは当然であるが、試

験装置の開発段階では、過酸化水素定量法の精度やFDA基準(0.5ppm以下)などからとりあえず残留過酸化水素 0.1ppm以下を1つの研究指標として作業を進めた。もちろん、実生産機では公衆衛生性の確保の立場から、乾燥エアーの温度や風量を調整し、あるいは乾燥時間を長く取って、殺菌処理後の包装材料に過酸化水素が残留しないよう注意深く配慮している。

ところで、本殺菌方法は従来使用されてきた耐熱性の高い樹脂、ポリプロピレン (PP) はもちろん、耐熱性の低い樹脂であるポリエチレン (PE) やポリスチレン (PS) の殺菌を行なうことを目的としており、従ってこれらの耐熱性の低い被殺菌物において、その軟化点(約80℃)以下の乾燥温度で上記の低残留性を確保する必要がある。

80℃熱風により、乾燥時間を変えて乾燥処理した時の乾燥時間 (t [s]) と残留量 (y [μg]) の対数値の関係をFig. 4に示す。残留量は乾燥時間に対して直線的(指數的)に減少し、この回帰式は次式で与えられた。

$$\log_{10}y [\mu g] = -0.853 \cdot t [s] + 3.969 \quad (r = 0.9336) \quad (1)$$

この式より残留値0.1ppmの時の乾燥時間は約3.5秒と計算された。通常、乾燥時間を極端に長くすることは装置の大型化につながるが、第(2)式から判るように、残留量は時間に対し指數的に大きく変化することから、乾燥時間の設定には慎重さを要する。

次に、乾燥時間を5秒とし、乾燥エアーの温度を変化させた時の残留量をFig. 5に示す。この場合も、残留量は乾燥温度に対して直線的(指數的)に減少した。この回帰式は次式

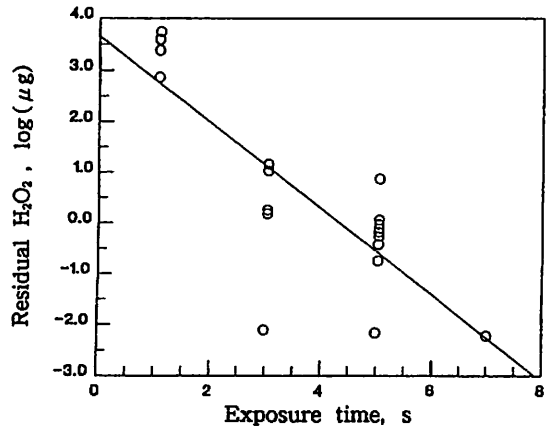


Fig. 4 H₂O₂-removal characteristics by using heated air of 80℃ as drying time was changed

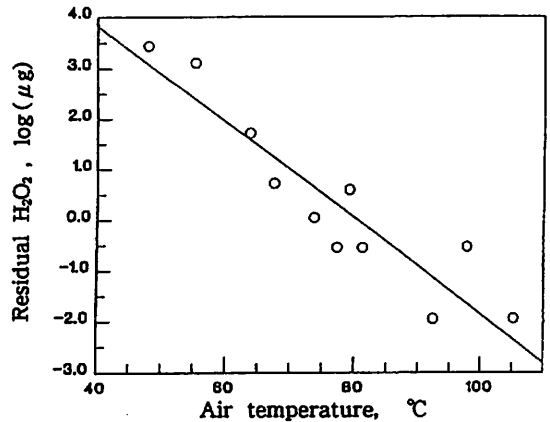


Fig. 5 H₂O₂-removal characteristics by using heated air at various temperature for five seconds

で与えられた。

$$\log_{10}y [\mu g] = -0.0948 \times T [^\circ C] + 7.621 \quad (r = 0.9277) \quad (2)$$

この式より、残留値を0.1ppm以下にするには、約71℃以上の乾燥温度が必要であると計算された。乾燥温度に対しても、残留量は指數的に大きく変化するので、生産用システ

ムにおける温度制御では注意を要する。

これらの試験結果より、本殺菌方法における乾燥条件は80℃-5秒程度で初期の目標値、0.1ppm以下を達成していると推定された。また、このとき容器の熱変形も観測されなかった。

従って、本法は耐熱性の低い樹脂であるポリスチレンやポリエチレン樹脂製容器への応用においても過酸化水素の除去が十分に可能であると考えられた。

2.2 殺菌効果

本法による *A. niger*, *B. subtilis* および *B. stearothermophilus* の芽胞に対する殺菌試験結果を Table 1 に示す。紫外線単独の処理では、*B. subtilis* に対し、SE 値 (= Log_{10} [初期菌数/殺菌処理後の菌数]) で約3~3.5、*B. stearothermophilus* に対しては2~3の殺菌効果が得られているが、よく知られているように *A. niger* に対しては1~2程度と殺菌力が小さい。

過酸化水素ガス単独による殺菌結果では、*A. niger* に対しては3%過酸化水素水でも殺菌できているが、これはガスの温度が高いことによる影響が大きいものと考えられた。*B. subtilis* に対しては35%過酸化水素水使用時にSE値で約3~4の殺菌力を、また、*B. stearothermophilus* に対しては約3程度の殺菌効果が得られている。

一方、過酸化水素ガスと紫外線照射の併用の場合は、3%過酸化水素水使用時でもこれら3種類の芽胞に対し、SE値で6以上の殺菌効果を示しており、この効果は過酸化水素水の濃度が高くなっても低下していない。実際、追試験においてもこの結果は再現性が高

く、濃度が高いほど高い殺菌効果を示す傾向にあった。

このように本殺菌方法は高い殺菌力を有しており、特に紫外線との併用において殺菌力が高く、安定していることが確認された。また、併用においては低濃度過酸化水素水でも有効なことから過酸化水素水の消費量を節約でき、本併用法は効果的そして効率的殺菌方法であると考えられた。

2.3 ガス化過酸化水素と紫外線の併用効果

過酸化水素ガスを用いた本殺菌方法では、過酸化水素ガスと紫外線との併用が極めて有効であるが、以下この理由について考察した。

過酸化水素は、可視光領域では透明であるが、紫外線領域では極めて不透明となる。この試験結果を Fig. 6 に示す。この図は、各濃度 (0~3600ppm) の過酸化水素水の紫外線の吸光度を示しており、過酸化水素水が200~250nm 付近に吸収ピークを持つことが判る。殺菌には、通常、UV-C と呼ばれる

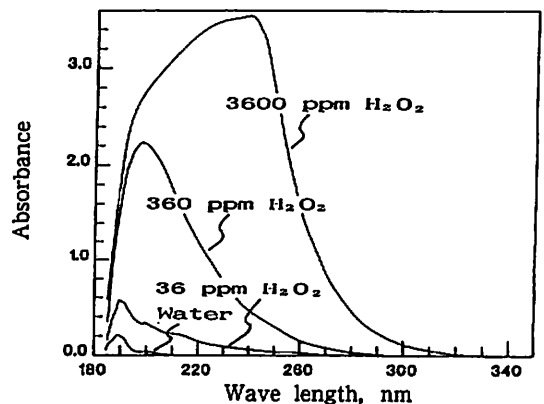


Fig. 6 Absorption of ultraviolet rays by hydrogen peroxide

過酸化水素ガスによる殺菌

Table 1 Results of sterilization experiment by H₂O₂ gas and U V

H ₂ O ₂ [%]	U V	Inocul .	<i>A. niger</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. stearoth.</i>
—	○	4	253	12	117
	○	5	793	40	88
	○	6	1700	120	172
3	—	4	0	4	16
	—	5	0	40	240
	—	6	0	2800	12000
5	—	4	0	44	24
	—	5	0	97	100
	—	6	0	1886	3920
10	—	4	0	37	88
	—	5	0	0	16
	—	6	0	87	368
35	—	4	0	0	148
	—	5	0	0	48
	—	6	0	72	4
3	○	4	0	0	0
	○	5	0	0	0
	○	6	0	0	0
5	○	4	0	0	0
	○	5	0	0	0
	○	6	0	0	0
10	○	4	0	0	0
	○	5	0	0	0
	○	6	0	0	0
35	○	4	0	0	0
	○	5	0	0	0
	○	6	0	0	0

H₂O₂ [%] : Concentration of hydrogen peroxide-water solution to be vaporized

U V : Ultraviolet rays were applied (○), not applied (—)

Inocul. : Inoculation level of spores ; 4, 5, and 6 represent inoculation levels of 10⁴, 10⁵ and 10⁶ spores per container respectively

254nm の紫外線が用いられており、従ってこの紫外線は高濃度過酸化水素水をほとんど透過しない。

Fig. 6の結果を用いて、任意の濃度および任意の厚さの過酸化水素層に対する紫外線透過率を計算することができる。透過率は次式で与えられた。

$$\frac{I}{I_0} = \exp(-1.33 \times 10^{-3} \cdot C \cdot \ell) \dots \dots \dots (3)$$

ここで、

- I_0 : 初期紫外線強度 (UV-C)
- I : 過酸化水素層透過後の紫外線強度
- C : 過酸化水素水の濃度 [%]
- ℓ : 過酸化水素層の厚さ [μm]

第(3)式を、 $C = 1, 10$ および 35% としてプロットした図を Fig. 7 に示す。この図より $50 \mu m$ 程度の過酸化水素層において濃度 1% ぐらいであれば UV-C はほとんど透過するが、 35% になると約 90% が吸収されてしまうことが判る。

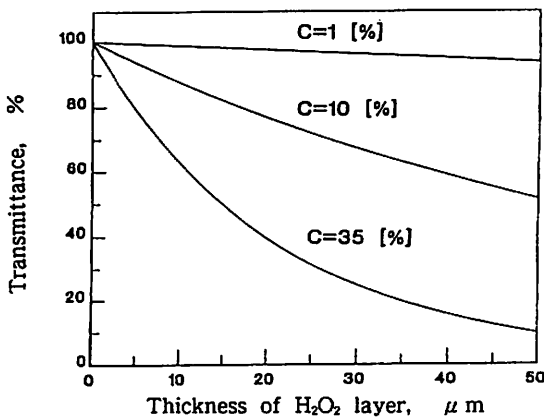


Fig. 7 Transmittance of ultraviolet rays for 1, 10 and 35% hydrogen peroxide layer

通常の二流体ノズルで噴霧した場合、粒径は $10 \sim 50 \mu m$ 程度に分布し、しかも噴霧した霧で全面を隙間なくカバーしようとする、ほとんど全面で $100 \mu m$ 以上の膜厚となるため、紫外線透過率は極度に低下する。

一方、本過酸化水素ガスの場合、凝縮量から計算して、層の厚さは約 $1 \sim 3 \mu m$ 程度 (35% 換算) と考えられるので、 35% 過酸化水素水使用時でも十分に紫外線を透過させることができる。これにより、菌体表面にまで紫外線が到達し、そこで殺菌に大きく寄与する酸素ラジカルを効果的に生成すると考えられた。

過酸化水素水と紫外線の併用については、過酸化水素水中に懸濁した微生物への紫外線の照射試験、あるいは植菌した包装材料に過酸化水素水を噴霧し、これに紫外線を照射する試験から、最大の殺菌効果は過酸化水素水濃度が $0.1 \sim 1.0\%$ の時であり、これ以上の濃度では逆に殺菌力は低下すると報告されている^{8) 9)}。この理由も上述した過酸化水素水の紫外線透過性が原因と考えられる。すなわち、過酸化水素層が厚いために紫外線が吸収されたと推測される。

また、包装材料表面に噴霧により微量の過酸化水素水を塗布した場合は過酸化水素水の液滴が離散的に分布するため、微生物が過酸化水素に触れない可能性もある。

本過酸化水素ガスと紫外線の併用の場合は、過酸化水素層が非常に薄く、濃度が高くなっても十分な紫外線が到達し、しかも包装材料の全表面を覆っている。このため濃度が高い方が殺菌効果も増加していると考察された。

要 約

包装材料表面の効果的および効率的殺菌を目的として過酸化水素水を気化し、これを包装材料表面に薄膜状に凝縮させて殺菌し、その後無菌加熱エアーにより乾燥除去する殺菌方法について検討した。その結果、本法は高い殺菌効果を示し、特に過酸化水素ガス凝縮下で紫外線を照射すると枯草菌芽胞で 10^6 〔個/内容量100ml容器〕以上の高い殺菌効果が得られることを確認した。殺菌後の過酸化水素の除去も約 80°C -5秒間程度の無菌熱風処理で容易に0.1ppm以下にできることを確認し、ポリスチレンあるいはポリエチレンのような耐熱性の低い樹脂製包装材料の殺菌が可能であった。紫外線と凝縮過酸化水素水の相互作用についてはそのメカニズムの考察も行った。

謝 辞

本研究に当たり、多大なご支援を頂いた雪印乳業(株)取締役技術研究本部長・井門和夫氏および同技術研究所主幹・牧野輝男氏に厚く御礼申し上げます。

< 文 献 >

- 1) Swartling, P. and Lindgren, B., J. Dairy Res., 35, 423 (1968)
- 2) Ito, K. A. and others, Food Tech., 11,

- 58 (1973)
- 3) Cerf, O. and Metro, F., J. Appl. Bacteriol., 42, 405 (1977)
- 4) Smith, Q. J. and Brown, K. L., J. Fd Technol., 15, 169 (1980)
- 5) Stevenson, K. E. and Shafer, B. D., Food Tech., 11, 111 (1983)
- 6) Baldry, M. G. C., J. Appl. Bacteriol., 54, 417 (1983)
- 7) Wallen, S. E. and Walker, H. W., J. Food Sci., 44 (2), 560 (1979)
- 8) Bayliss, C. E. and Waites, W. M., Appl. Bact., 47, 263 (1979)
- 9) Stannard, C. and others, J. Food Protect., 46 (12), 1060 (1983)
- 10) Waites, W. M. and others, Appl. Microbiol. 7, 139 (1988)
- 11) Wang, J. and Toledo, R. T. : Food Tech., 11, 60 (1986)
- 12) 春田三佐夫、宇田川俊一、横山理雄編：食品微生物制御システムデータ集, p430
- 13) 浅井良輝、桑平秀夫、下田幸三、佐藤勝也：食品衛生学会, 23 (6), 438 (1982)
- 14) 西尾茂文、平田賢：日本機械学会, 44 (380), 1335 (1978)
- 15) 牧野州秀：舞鶴高専紀要, 15, 1 (1980)
- 16) 牧野州秀：舞鶴高専紀要, 20, 12 (1985)

(受付 1992年4月20日)