



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0105046

(43) 공개일자 2015년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23B 7/05 (2006.01) A23L 3/37 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0027216

(22) 출원일자 2014년03월07일

심사청구일자 2014년03월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이민석

경기도 성남시 분당구 내정로 152, 133동 701호 (파크타운롯데아파트)

김남희

경기도 하남시 대성로 259, 101동 106호

(74) 대리인

한양특허법인

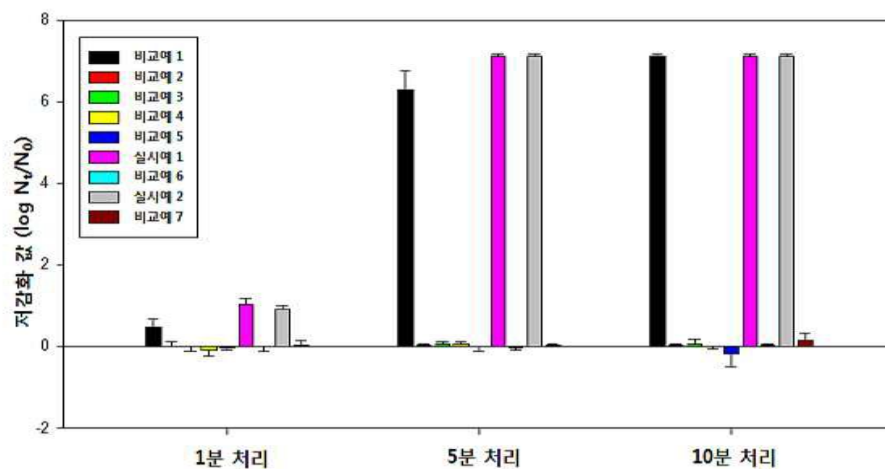
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 과채류를 살균하는 방법

(57) 요약

본 발명은 칼슘 수용액을 과채류에 처리하여 과채류를 살균하는 방법으로, 상기 칼슘 수용액은 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상을 글리세롤에 녹여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후 이를 물로 희석한 것이며, 상기 칼슘 수용액의 온도가 30 내지 70℃의 온도인 것을 특징으로 하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

칼슘 수용액을 과채류에 처리하여 과채류를 살균하는 방법으로, 상기 칼슘 수용액은 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상을 글리세롤에 녹여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후 이를 물로 희석한 것이며, 상기 칼슘 수용액의 온도가 30 내지 70℃의 온도인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 글리세롤 칼슘용액 10ml 당 상기 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상이 0.1 내지 1g 첨가되며, 상기 희석은 10배로 희석하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 살균의 목표 미생물은 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 크로노박터균(*Cronobacter* spp.), 이질균(*Shigella* spp.), 비브리오균(*Vibrio* spp.) 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7), 쥐티푸스균(*Salmonella* Typhimurium), 클로스트리디움 속균(*Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*), 바실러스균(*Bacillus* spp.) 및 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

- (i) 살균대상 과채류로의 과채류 내 미생물의 저감화 값을 설정하는 단계;
- (ii) 상기 과채류 내 미생물의 저감화 값을 하기 식 1에 적용하여, 상기 칼슘 수용액의 처리시간(x_1), 처리온도(x_2) 및 처리농도(x_3)를 결정하는 단계; 및
- (iii) 상기에서 결정된 처리시간, 처리온도 및 처리농도에 따라 칼슘 수용액을 과채류에 처리하는 단계를 포함하는, 방법;

식 1)

과채류 내 미생물의 저감화 값(log CFU/g)

$$= 44.4095 - 1.8496 \times x_2 + 0.0482 \times x_1 + 15.2289 \times x_3 + 0.0186 \times (x_2)^2 - 0.0005 \times (x_1)^2 - 3.2022 \times (x_3)^2 - 0.0022 \times (x_2) \times (x_1) - 0.0327 \times (x_1) \times (x_3) + 0.1333 \times (x_3) \times (x_2).$$

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 과채류는 과일류 및 채소류를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 칼슘 수용액을 과채류에 처리하여 과채류를 살균하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소비자의 건강지향적 생활태도에 따라 신선식품, 건강식품, 편의식품에 대한 수요가 점차 증가하고 있으며, 특히 구매 후 바로 사용할 수 있는 절단 채소, 세척 채소, 데침 채소, 가공 과일 등 다양한 형태의 가공 과채류 시장이 확대되고 있다. 가공 채소나 과일은 소비자들이 별도의 처리 없이 바로 사용하기 때문에 미생물학적 안전성에 관한 검토가 필수적이다.

[0003] 예를 들어, 시금치의 경우 최근 장출혈성대장균에 의한 대형 식중독 사고가 발생(2006년 미국 26개주, 총 205명의 환자 유발, 31명 용혈성 요독증, 3명 사망)하여 이를 효과적으로 살균·제어할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 미국 질병관리본부(CDC)와 식품의약품안전청(Food and Drug Administration, FDA)에서는 소비자의 안전한 시금치 섭취를 위하여 장출혈성대장균을 효과적으로 제어할 수 있는 소비자 권고사항으로, 71.1℃에서 15초간 데칠 것을 권고하였으며, 문헌을 통해 알려진 시금치 데침 조건은 100℃(끓는 물)에서 120초 이상 데쳐야 하는 것으로 알려져 있다. 이처럼 높은 온도에서 시금치를 장시간 데침 처리할 시 색, 조직감 등의 관능적 특성뿐만 아니라 비타민 C, 카로틴, 플라보노이드, 폴리페놀 함량 등 영양학적 특성이 변화하기 때문에 품질 변화를 최소화하기 위해 데침 온도를 최대한 낮추고 처리 시간을 최소화해야 한다.

[0004] 한편 가공 채소나 과일의 미생물 오염을 제어할 수 있는 핵심 공정은 섭취 직전의 세척 단계로 미생물 살균을 위해 다양한 화학물질들(염소계 살균제, 유기산, 과산화수소 등)이 사용되고 있다. 그러나 이러한 물질들은 처리 시 그 살균효과가 미미하거나 인체에 유해한 부산물 생성, 장비 부식, 제품의 품질(색, 향미, 영양소, 외관, 신선도 등) 변화 등 부작용을 유발하는 것으로 알려져 이를 대체할 수 있는 신기술을 개발의 필요성이 점차 커지고 있다. 한편, 대한민국 등록특허 제 10-0684357호에는, Ph 11~11.2인 알칼리 전해수에서 20~40℃에서 3~5분 동안 처리하는 단계를 포함하는 채소류 살균 또는 세정방법이 기재되어 있으나, 알칼리 전해수의 식중독세균 살균효과가 불충분하다는 한계점이 있다.

[0005] 따라서, 과채류를 품질의 변화없이 좋은 효율로 살균할 수 있는 방법의 개발이 요청되며, 특히 다양한 살균 대상 식품에 대한 산업현장에서의 신속한 도입을 위해서는 정량적 살균효과를 예상할 수 있는 예측모델식의 개발 및 효율성 극대화를 위한 최적 조건 도출이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-0684357호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상술한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 채소를 데칠 때 효과적 살균 칼슘 수용액과 글리세롤을 첨가하여 장출혈성대장균 등의 미생물 오염을 효과적으로 제어하는 동시에 데친 채소의 질량 손실 및 품질변화를 최소화할 수 있는 효과적인 과채류를 살균하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은, 칼슘 수용액을 과채류에 처리하여 과채류를 살균하는 방법으로, 상기 칼슘 수용액은 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상을 글리세롤에 녹여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후 이를 물로 희석한 것이며, 상기 칼슘 수용액의 온도가 30 내지 70℃의 온도인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따라 데침 채소 또는 과일의 질량 손실 및 품질변화는 최소화하면서도 미량의 수산화 칼슘 또는 산화 칼슘(1% 미만)과 저온 데침(70℃ 이하)의 조합처리로 과채류 내의 장출혈성대장균 등의 유해 미생물 살균효과를 극대화할 수 있는 우수한 저온 데침방법을 제시하였으며, 이와 같은 방법은 장출혈성 대장균 외 다양한 미생물에 대해서도 현저히 높은 살균 효과를 가질 뿐만 아니라 다양한 과채류에 적용할 수 있는 원리를 적용한 기술로써 광범위한 과채류 데침 공정에 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 다양한 칼슘 수용액의 시간에 따른 미생물 저감화 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 2는 다양한 칼슘 수용액의 처리 온도에 따른 미생물 저감화 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 3은 칼슘 수용액 처리에 따른 미생물 저감효과를 온도별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 4는 칼슘 수용액 처리에 따른 미생물 저감효과를 온도별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 5는 칼슘 수용액 처리에 따른 미생물 저감효과를 온도별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 6은 본 발명의 식 1을 통해 얻은 미생물 저감효과의 실험 치(저감화 값)과 예측치의 상관관계를 나타낸 그래프이다.
 도 7은 본 발명의 방법에 따라 시금치를 살균한 경우의 외관을 종래의 방법대로 살균한 비교예와 비교하여 나타낸 사진이다.
 도 8은 본 발명의 식 1에 따라, 다양한 종류의 칼슘 수용액을 이용한 시금치 살균에서의 미생물 저감효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0012] 본 발명은 칼슘 수용액을 과채류에 처리하여 과채류를 살균하는 방법에 대한 것으로, 특히 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상을 글리세롤에 녹여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후 이를 물로 희석하여 수득되는 칼슘 수용액을 30 내지 70℃의 온도로 처리하는 방법에 대한 것이다.

[0013] 특히, 본 발명의 과채류를 살균하는 방법은 하기 식 1에 따라, 과채류 내 미생물의 저감화 값(log CFU/g), 칼슘 수용액의 처리시간(x_1), 처리온도(x_2) 및 처리농도(x_3)가 결정되어, 효율성 극대화를 위한 최적 조건이 도출되며 정량적 살균효과의 예상 역시 가능하다. 이에 따라 다양한 살균 대상 과채류에 대하여 본 발명의 과채류를 살균하는 방법의 산업현장에서의 신속한 도입이 가능하게 된다.

[0014] 식 1)

[0015] 과채류 내 미생물의 저감화 값(log CFU/g)

[0016]
$$= 44.4095 - 1.8496 \times x_2 + 0.0482 \times x_1 + 15.2289 \times x_3 + 0.0186 \times (x_2)^2 - 0.0005 \times (x_1)^2 - 3.2022 \times (x_3)^2 - 0.0022 \times (x_2) \times (x_1) - 0.0327 \times (x_1) \times (x_3) + 0.1333 \times (x_3) \times (x_2).$$

[0017] 본 발명에서, 칼슘 수용액은 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상이 포함되는 수용액일 수 있으며, 특히 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상을 글리세롤에 녹여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후 이를 물로 희석한 것일 수 있다. 또한, 상기 글리세롤 칼슘용액 10ml 당 상기 수산화 칼슘 및 산화 칼슘 중 하나 이상이 0.1 내지 1g 첨가되는 것이 바람직하며, 이는 해당 농도에서 과채류에 대한 수산화 칼슘 및 산화 칼슘의 살균효과가 나타나기 때문이다. 또한, 상기 희석은 10배로 희석하는 것이 바람직한데 이는 글리세롤 용해에 의한 용액 균질화

효과가 나타나는 최소 조건이기 때문이다.

[0018] 본 발명의 칼슘 수용액은 30 내지 70℃의 온도로 처리하는 것이 바람직하며, 45 내지 70℃의 온도로 처리하는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 과채류를 살균하는 방법에 따르면, 칼슘수용액을 위와 같은 저온 처리함으로 과채류 품질을 보존하면서도 살균효과를 극대화할 수 있다.

[0019]

[0020] 본 발명에서, 살균의 목표 미생물은 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 크로노박터균(*Cronobacter* spp.), 이질균(*Shigella* spp.), 비브리오균(*Vibrio* spp.) 대장균(*Escherichia coli* 0157:H7), 쥘티푸스균(*Salmonella* Typhimurium), 클로스트리디움 속균(*Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*), 바실러스균(*Bacillus* spp.) 및 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 중 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명의 살균하는 방법을 적용 가능한 과채류는 과일류 및 채소류를 포함한다. 구체적으로 상기 과일류는 메론, 사과, 오렌지, 베리, 배, 파인애플, 레몬, 수박 등 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 채소류는 양상추, 상추, 파, 양파, 오이, 새싹채소, 당근, 토마토 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 특히, 본 발명의 과채류를 살균하는 방법은, 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다:

[0023] (i) 살균대상 과채류로의 과채류 내 미생물의 저감화 값을 설정하는 단계;

[0024] (ii) 상기 과채류 내 미생물의 저감화 값을 하기 식 1에 적용하여, 상기 칼슘 수용액의 처리시간(x_1), 처리온도(x_2) 및 처리농도(x_3)를 결정하는 단계; 및

[0025] (iii) 상기에서 결정된 처리시간, 처리온도 및 처리농도에 따라 칼슘 수용액을 과채류에 처리하는 단계.

[0026] 식 1)

[0027] 과채류 내 미생물의 저감화 값(log CFU/g)

[0028]
$$= 44.4095 - 1.8496 \times x_2 + 0.0482 \times x_1 + 15.2289 \times x_3 + 0.0186 \times (x_2)^2 - 0.0005 \times (x_1)^2 - 3.2022 \times (x_3)^2 - 0.0022 \times (x_2) \times (x_1) - 0.0327 \times (x_1) \times (x_3) + 0.1333 \times (x_3) \times (x_2).$$

[0029] 또한, 본 발명은 상기 식 1에 칼슘 수용액의 처리시간(x_1), 처리온도(x_2) 및 처리농도(x_3)를 적용하여 과채류 내 미생물의 저감화 값을 예측하는 단계를 포함하는, 칼슘 수용액 처리에 의한 미생물 사멸효과 예측 방법을 포함한다.

[0030] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기 위하여 실시예를 첨부한다. 하기 실시예는 본 발명의 이해를 보다 용이하게 하기 위하여 제공되는 것으로, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0031] 실험예 1. 수산화 칼슘과 산화 칼슘의 살균력 검증

[0032] 대상 물질인 수산화 칼슘(실시예 1)과 산화 칼슘(실시예 2)의 뛰어난 장출혈성대장균 살균력을 검증하기 위하여 그 외 다양한 칼슘 수용액(아스코르브산 칼슘, 비교예 1; 탄산 칼슘, 비교예 2; 염화 칼슘, 비교예 3; 구연산 칼슘, 비교예 4; 글루콘산 칼슘, 비교예 5; 젖산 칼슘, 비교예 6; 프로피온산 칼슘, 비교예 7)의 살균력과 비교하였으며, 각 용액 제조 방법은 다음 표 1과 같다.

[0033] 총 9종의 칼슘 물질은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 일괄 구매하였으며, 사용 직전에 2차 증류수에 혼합하여 개별 칼슘 수용액을 제조하였다. 제조된 수용액은 25℃로 설정된 항온 교반수조에 미리 20분간 정치하여 각 수용액이 설정 온도에 도달하도록 하였다. 표 1은 실시예 1-2와 비교예 1-7 칼슘수용액의 구성을 나타낸 표이다.

표 1

구 분	칼슘 종류	칼슘 수용액		
		물질 첨가량(g)	용액 부피(ml)	농도(%)
비교예 1	아스코르브산 칼슘	0.1	10	1
비교예 2	탄산 칼슘	0.1	10	1
비교예 3	염화 칼슘	0.1	10	1
비교예 4	구연산 칼슘	0.1	10	1
비교예 5	글루콘산 칼슘	0.1	10	1
실시예 1	수산화 칼슘	0.1	10	1
비교예 6	젖산 칼슘	0.1	10	1
실시예 2	산화 칼슘	0.1	10	1
비교예 7	프로피온산 칼슘	0.1	10	1

실험 대상 균주로는 식중독세균 중 살균 처리에 대한 저항성이 높은 것으로 알려져 있는 장출혈성 대장균 *Escherichia coli* 0157:H7 표준균주 3종(ATCC 43889, 43890, 43895)을 선정하였으며, 이를 증균배지 Tryptic Soy Broth (Difco, Detroit, MI, USA) 5 ml에 각각 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양된 각 균주를 50 ml 플라스틱 튜브(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 혼합한 후 3,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 따라낸 후 동량의 0.85%(w/v) 멸균 생리식염수를 첨가하여 미생물 세포를 2회 세척하여 균액 (cell suspension)을 제조하였다.

미리 정지한 수용액을 분당 교반 수 100 rpm으로 교반하였으며, 교반되는 수용액에 상기 제조된 균액을 총 9종의 1% 칼슘 수용액에 7-8 log CFU/ml 수준으로 접종한 후 1분, 5분, 10분째에 각각 균액을 따 증균배지 Tryptic Soy Agar (Difco)에 도말하였다(검출한계: 1 CFU/ml). 도말한 배지는 37℃에서 24시간 배양한 후 배지 상에 형성된 콜로니를 계수하여 각 조건별 균 농도를 log CFU/ml 값으로 산출하였다.

초기 접종균수(N_0)와 처리 후 균수(N_t)를 바탕으로 칼슘 수용액별, 처리시간별 저감화 값($\log(N_t/N_0)$)을 산출하였으며, 모든 실험은 3반복 수행되었다. 그 결과는 다음 도 1과 같다. 도 1은 다양한 칼슘 수용액의 시간에 따른 미생물 저감화 효과를 나타낸 그래프이다. 도 1을 참고하면, 실험 결과 동일 수준 처리 시 비교예 1-7에 비해 실시예 1-2의 저감화 값이 현저히 높아 살균력이 뛰어난 것을 확인할 수 있다.

실험예 2. 수산화 칼슘과 산화 칼슘의 열 조합처리 효과 검증

실험예 1에서 높은 살균효과를 보인 아스코르브산 칼슘(비교예 9), 수산화 칼슘(실시예 3), 산화 칼슘(실시예 4)을 선정하여 열수 처리(45-70℃)와의 조합처리 효과를 확인하였으며, 살균력 상승 작용을 정확히 확인하기 위해 칼슘제를 첨가하지 않은 무첨가 2차 증류수(비교예 8) 또한 실험조건에 포함하였다. 실험예 2의 조건은 다음 표 2(실시예 3-4와 비교예 8-9 칼슘수용액의 구성)와 같다.

표 2

구 분	칼슘 종류	처리 조건		
		농도(%)	온도	시간(초)
비교예 8	무첨가(2차 증류수)	1	45, 50, 55, 60, 65, 70℃	60
비교예 9	아스코르브산 칼슘	1	45, 50, 55, 60, 65, 70℃	60
실시예 3	수산화 칼슘	1	45, 50, 55, 60, 65, 70℃	60
실시예 4	산화 칼슘	1	45, 50, 55, 60, 65, 70℃	60

실험예 1에 명시한 방법과 같은 방식으로 1% 아스코르브산 칼슘, 수산화 칼슘, 산화 칼슘수용액을 제조하였으며, 45, 50, 55, 60, 65, 70℃로 설정된 항온 교반수조에서 같은 방식으로 1분간 처리하였다. 칼슘 수용액별, 온도별 저감화 값을 상기한 바와 같이 산출하였다. 모든 실험을 3반복 수행되었으며, 그 결과는 도 2에 나타났다. 도 2는 다양한 칼슘 수용액의 처리 온도에 따른 미생물 저감화 효과를 나타낸 그래프이다. 도 2의

실험결과를 통해, 실험 결과 배정기술에서 설명한 가교결합을 형성하는데 유리한 온도범위(55-65℃)에서 실시예 3-4의 결과가 비교예 8-9에 비해 저감화 값이 현저히 높아 수산화 칼슘, 산화 칼슘의 열 조합처리에 의한 살균력 상승 작용이 뛰어난 것을 확인하였다.

실험예 3. 수산화 칼슘 글리세롤 용액을 첨가한 저온 데침 방법의 시금치 내 장출혈성대장균 살균효과 및 예측 모델식 개발

실험예 2에서 뛰어난 살균력 상승 작용을 보인 수산화 칼슘, 산화 칼슘을 선정하여 실시예 2에서 조합처리 효과를 보인 수산화 칼슘, 산화 칼슘을 선정하여 시금치에 오염된 장출혈성대장균에 대한 살균력을 확인하였다. 단, 실험예 2의 결과와 같이 수산화 칼슘과 산화 칼슘의 살균력이 유사한 수준이기 때문에 비교적 적용이 용이한 수산화 칼슘을 대표적 실시예로 실험을 수행하였고 산화 칼슘에 의한 효과는 본 실험의 결과와 경향이 유사할 것으로 추정할 수 있다.

이 실험에서는 시금치에 내재된 일반세균과 접종 대상 장출혈성대장균을 구분하기 위하여 형광단백질 플라스미드(pEGFP vector, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA)를 이용하여 상기한 장출혈성대장균 표준균주의 성상을 변형시켰다. 항생제 앰피실린에 내성을 갖는 형광단백질 유전자 변이균주는 앰피실린을 첨가한 배지에서 UV 랩트(VMR Scientific, West Chester, PA, USA) 상 확인 시 녹색의 형광을 발현하는 특성을 지니기 때문에 대부분 앰피실린 내성 및 형광 발현이 없는 일반세균과의 성상 구분이 가능하다. 형광단백질 유전자 변이균주를 앰피실린(Sigma Aldrich)을 첨가한 Luria-Bertani broth (LB, Difco, Detroit, MI, USA) (농도: 50 µg/ml)에 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양된 각 균주는 실험예 1과 같은 방식으로 균액(cell suspension)을 제조하였다.

줄기를 제거한 후 잎을 가지런히 놓고 길이 3 cm로 절단한 절단 시금치를 20-30 g씩 멸균백(Stomacher bag, Seward, Worthing, UK)에 담아 동량의 형광단백질 유전자 변이 장출혈성대장균 균주를 접종하여 1분간 골고루 섞어주었다. 접종한 시금치를 물기를 빼고 화염 멸균한 호일 위에 골고루 펼친 후 시금치 표면에 균체가 부착할 수 있도록 1시간동안 건조시킨 다음 멸균백에 넣고 24시간 냉장보관하여 시료로 사용하였다.

실험 조건 중 온도 범위는 조합처리 효과를 보이면서도 시금치의 품질 저하를 최소화하는 동시에 폴리에스테르 아제를 활성화하는 45-65℃로, 칼슘 수용액의 농도 범위는 1% 미만의 0.25-0.75%로, 처리 시간 범위는 1분 이내의 20-60초로 설정하였다.

수산화 칼슘을 글리세롤에 용해하여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후에 이를 10배 희석하여 처리에 사용할 수용액을 제조하였으며, 그 구성은 다음 표 3과 같다.

표 3

농도 (%)	물질 첨가량 (g)	글리세롤 칼슘 용액 부피 (ml)	최종 처리 용액 부피 (ml)
0.25	0.25	10	100
0.5	0.5	10	100
0.75	0.75	10	100

실험예 3에서는 열수 처리와 수산화 칼슘 글리세롤 수용액의 조합처리 효과를 확인하기 위해 1) 상온수(25℃)에서 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 처리한 실험군(비교예 10-12: 칼슘수용액 단독처리군)과 2) 무첨가 2차 증류수를 이용한 열수 단독처리군(비교예 13-21: 저온 데침 단독처리군)을 대조군으로 두었으며, 3) 0.25-0.75% 수산화 칼슘 글리세롤 수용액에 열을 가한 조합처리군을(실험예 5-19: 칼슘수용액 및 저온 데침 조합처리군) 실험군으로 두었다.

특히 조합처리군의 경우 살균력에 영향을 미치는 개별 인자(처리온도, 농도, 시간)의 영향을 통계적으로 분석하고 저온 데침방법 및 칼슘 글리세롤 수용액 조합처리에 의한 시금치 내 장출혈성대장균의 저감화 값을 예측하는 모델식을 개발하기 위하여 실험 디자인 수립 시 반응표면분석법을 사용하였다.

시금치 내 장출혈성대장균의 저감화 값에 영향을 미치는 3요인(처리 온도, 수산화 칼슘 글리세롤 용액 농도, 처리 시간)의 영향을 모두 분석하기 위하여 3요인 실험에 적합한Box-Behnken 계획법을 이용하여 조합처리군의 실험

험설계를 수행하였다.

[0052] 모든 실험을 3반복 수행되었으며, 이상의 그룹 1), 2), 3)을 모두 포괄하는 실험예 3의 조건은 다음 표 4과 같다.

표 4

[0053]

그룹	구분	온도(℃)	농도(%)	시간(초)
1) 칼슘수용액 단독처리군	비교예 10	25	0.25	60
	비교예 11	25	0.5	60
	비교예 12	25	0.75	60
2) 저온 데침 단독처리군	비교예 13	45	-	20
	비교예 14	45	-	40
	비교예 15	45	-	60
	비교예 16	55	-	20
	비교예 17	55	-	40
	비교예 18	55	-	60
	비교예 19	65	-	20
	비교예 20	65	-	40
	비교예 21	65	-	60
3) 칼슘수용액 및 저온데침 조합 처리군	실시예 5	45	0.5	20
	실시예 6	45	0.5	60
	실시예 7	65	0.5	20
	실시예 8	65	0.5	60
	실시예 9	45	0.25	40
	실시예 10	45	0.75	40
	실시예 11	65	0.25	40
	실시예 12	65	0.75	40
	실시예 13	55	0.25	20
	실시예 14	55	0.75	20
	실시예 15	55	0.25	60
	실시예 16	55	0.75	60
	실시예 17	55	0.5	40
	실시예 18	55	0.5	40
	실시예 19	55	0.5	40

[0054] 표 4의 실험결과로 조건별 살균력을 비교하기 쉽게 하기 위해 같은 처리 온도 및 시간별로 구분하여 나타내면 다음 표 5 내지 표 7과 같다.

표 5

[0055]

(A) 20초 처리군	그룹	온도(℃)	농도(%)	시간(초)
비교예 13	저온 데침 단독처리군	45	-	20
실시예 5	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.5	
비교예 16	저온 데침 단독처리군		-	
실시예 13	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군	55	0.25	
실시예 14	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.75	
비교예 19	저온 데침 단독처리군		-	
실시예 7	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군	65	0.5	

표 6

[0056]

(B) 40초 처리군	그룹	온도(℃)	농도(%)	시간(초)
비교예 14	저온 데침 단독처리군	45	-	40
실시예 9	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.25	40
실시예 10	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.75	40
비교예 17	저온 데침 단독처리군	55	-	40
실시예 17	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.5	40
실시예 18	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.5	40
실시예 19	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.5	40
비교예 20	저온 데침 단독처리군	65	-	40
실시예 11	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.25	40
실시예 12	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.75	40

표 7

[0057]

(C) 60초 처리군	그룹	온도(℃)	농도(%)	시간(초)
비교예 10	칼슘수용액 단독처리군	25	0.25	60
비교예 11	칼슘수용액 단독처리군		0.5	60
비교예 12	칼슘수용액 단독처리군		0.75	60
비교예 15	저온 데침 단독처리군	45	-	60
실시예 6	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.5	60
비교예 18	저온 데침 단독처리군	55	-	60
실시예 15	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.25	60
실시예 16	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.75	60
비교예 21	저온 데침 단독처리군	65	-	60
실시예 8	칼슘수용액 및 저온 데침 조합 처리군		0.5	60

[0058]

표 5 내지 표 7에 제시한 실험 조건에 의한 실험 결과는 도 3, 4, 5와 같다.

[0059]

도 3은 장출혈성대장균 접종 시금치 20초 처리군의 결과이며, 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 첨가하지 않은 저온 데침 단독 처리군(비교예 13, 16, 19)에 비해 0.25-0.75% 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 첨가한 처리군(실시예 5, 13, 14, 7)의 살균효과가 현저히 뛰어남을 확인할 수 있다.

[0060]

도 4는 장출혈성대장균 접종 시금치 40초 처리군의 결과이며, 역시 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 첨가하지 않은 저온 데침 단독 처리군(비교예 14, 17, 20)에 비해 0.25-0.75% 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 첨가한 처리군(실시예 9, 10, 17, 18, 19, 11, 12)의 살균효과가 현저히 뛰어남을 확인할 수 있다.

[0061]

도 5는 장출혈성대장균 접종 시금치 60초 처리군의 결과이며, 특히 상온에서 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 처리한 실험군(비교예 10, 11, 12)과 본 발명의 결과(실시예 6, 16, 8)를 비교할 수 있다. 상온 처리군의 경우 저

감효과 1 log CFU/g 미만으로 살균력이 거의 없는 반면 조합 처리군은 살균효과 2 log CFU/g 이상으로 살균력이 현저히 뛰어남을 확인할 수 있다. 뿐만 아니라 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 첨가하지 않은 저온 데침 단독 처리군(비교예 15, 18, 21)에 비해서도 살균효과가 현저히 뛰어남을 확인할 수 있다.

상기 언급한 바와 같이 조합처리 실험 결과를 토대로 통계분석 프로그램(SAS version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 RSREG 분석방법을 이용하여 시금치 내 장출혈성 대장균 저감효과에 대한 예측모델식을 개발할 수 있으며, 그 결과는 다음 식과 같다.

시금치 내 장출혈성대장균 저감화 값

$$= 44.4095 - 1.8496 \times \text{처리온도} + 0.0482 \times \text{처리시간} + 15.2289 \times \text{처리농도} + 0.0186 \times (\text{처리온도})^2 - 0.0005 \times (\text{처리시간})^2 - 3.2022 \times (\text{처리농도})^2 - 0.0022 \times (\text{처리온도}) \times (\text{처리시간}) - 0.0327 \times (\text{처리시간}) \times (\text{처리농도}) + 0.1333 \times (\text{처리농도}) \times (\text{처리온도})$$

실험예 4. 예측모델식의 검증 및 최적 처리조건 산출

상기 개발한 예측모델식의 적합성을 검증하기 위하여 실험조건 범위 내에서 임의로 10개 조건을 선정하여 상기 실험예 3의 방법과 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, 모든 실험을 3반복 수행하였다. 3반복 실험의 평균과 표준편차는 다음 표 8과 같고, 실험예 4를 통해 얻은 실험 치(저감화 값)과 예측치의 상관관계를 나타낸 결과는 다음 도 8과 같다.

표 8

구분	온도(℃)	농도(%)	시간(초)	저감화 값	예측치
실시예 20	45	0.5	53	2.06±0.48	2.59
실시예 21	47	0.5	45	1.79±0.74	2.48
실시예 22	51	0.25	24	0.97±0.35	0.88
실시예 23	54	0.25	30	1.11±0.06	1.43
실시예 24	55	0.5	46	2.45±0.34	3.05
실시예 25	57	0.5	43	2.98±0.10	3.51
실시예 26	58	0.75	28	3.06±0.19	4.05
실시예 27	60	0.75	52	4.40±0.52	5.10
실시예 28	63	0.25	30	4.06±0.25	4.56
실시예 29	65	0.25	57	6.98±0.16	6.82

실험을 통해 얻은 실험치(저감화 값)과 예측치의 상관관계수(R^2)는 1에 가까울수록 높은 상관성을 보이는데, 실험예 4의 결과는 0.9612로 상호간 매우 높은 상관성을 보인다. 따라서 실험예 3에서 개발한 예측모델식은 시금치 내 장출혈성 대장균의 저감화 값을 충분히 예측할 수 있는 것으로 판단된다.

통계분석 프로그램(SAS version 8.2)을 이용하여 이 예측식의 최적조건을 산출할 시 미국 식품의약품안전청이 권고하는 살균·세척제 권고기준인 5 log CFU/g 이상의 저감효과(5.38 log CFU/g 저감화)를 획득하기 위해서는 61.8℃의 0.52% 수산화 칼슘 글리세롤 수용액에서 41.7초간 처리가 필요하다.

실험예 5. 최적 처리조건의 우수성 검증 (1)

실험예 4를 통해 산출한 최적 처리조건의 우수성을 검증하기 위해 배경기술에서 언급한 2006년 시금치 식중독 사고 발생 시 미국 질병관리본부와 식품의약품안전청이 발표한 안전한 시금치 섭취를 위한 권고사항의 조건인 71.1℃에서 15초간 처리와 살균력 및 처리 후 시금치의 질량 손실 및 외관을 비교하였다.

살균력 실험의 경우 실험예 3, 4와 같은 방법을 사용하였으며, 질량 손실을 집중하지 않은 절단 시금치(실험예 3의 방법과 동일한 방법으로 전처리)의 처리 전 무게(M_0)와 처리 후 무게(M_t)를 측정하여 각 처리에 의한 시금치의 질량손실($(M_0 - M_t)/M_0 \times 100, \%$)을 산출하였다.

이상의 목적을 달성하기 위한 실험조건 및 결과는 다음 표 9와 같고, 각 조건별 처리 후 시금치의 외관을 촬영

한 결과는 도 7과 같다.

표 9

구분	온도(℃)	농도(%)	시간(초)	저감화 값	질량 손실(%)
비교예 22	61.8	-	41.7	0.83±0.16	0.95±0.03
실시예 30	61.8	0.52	41.7	5.42±0.13	1.29±0.54
비교예 23	71.1	-	15	5.02±0.62	19.39±4.94

본 발명을 통해 개발한 수산화 칼슘 글리세롤 수용액(0.25-0.75%)을 첨가한 저온 데침 방법(45-65℃, 20-60초)을 적용할 경우(실시예 30) 저온 데침 단독처리(비교예 22)에 비해 현저히 높은 살균효과를 획득할 수 있으며, 미국 질병관리본부와 식품의약품안전청이 발표한 안전 섭취 권고사항(비교예 23)과 동등하거나 이상 수준의 살균효과를 획득할 수 있다.

뿐만 아니라 질량 손실이 1.29%로 대조군으로 실험한 저온 데침 단독처리(비교예 22)의 결과(0.95%)와 유사한 수준인 반면 미국 질병관리본부와 식품의약품안전청이 발표한 안전 섭취 권고사항(비교예 23)에 따른 결과(19.39%)에 비해서는 현저히 낮은 수준으로 대량 생산 시 공정의 경제성 확보에 기여할 것으로 판단된다.

실험예 6. 최적 처리조건의 우수성 검증 (2)

상기 산출한 최적 처리조건의 우수성을 검증하기 위해 배경기술에서 언급하고 실험예 에서 그 살균력을 비교·분석한 다양한 칼슘 수용액(아스코르브산 칼슘, 비교예 1; 탄산 칼슘, 비교예 2; 염화 칼슘, 비교예 3; 구연산 칼슘, 비교예 4; 글루콘산 칼슘, 비교예 5; 젖산 칼슘, 비교예 6; 프로피온산 칼슘, 비교예 7)의 살균력을 비교하고자 하였다.

본 발명은 수산화 칼슘을 글리세롤에 용해하여 글리세롤 칼슘용액을 제조한 후 이를 10배 희석하여 처리에 사용할 수용액을 제조하였기 때문에, 비교예에 해당하는 다른 칼슘 수용액의 경우에도 동량의 글리세롤을 첨가하여 비교 분석이 가능하도록 하였으며, 그 제조방법은 다음 표 10과 같다.

실험은 실험예 3, 4, 5와 같은 방법을 사용하였으며, 상세 조건은 다음 표 11과 같고 그 결과는 도 8과 같다.

표 10

구분	칼슘 종류	물질 첨가량(g)	글리세롤 칼슘 용액 부피(ml)	최종 용액 부피(ml)
실시예 30	수산화 칼슘	0.52	10	100
비교예 22	무첨가	-	-	100
비교예 24	아스코르브산 칼슘	0.52	10	100
비교예 25	탄산 칼슘	0.52	10	100
비교예 26	염화 칼슘	0.52	10	100
비교예 27	구연산 칼슘	0.52	10	100
비교예 28	글루콘산 칼슘	0.52	10	100
비교예 29	젖산 칼슘	0.52	10	100
비교예 30	프로피온산 칼슘	0.52	10	100

표 11

구분	칼슘 종류	온도(℃)	농도(%)	시간(초)
실시예 30	수산화 칼슘	61.8	0.52	41.7
비교예 22	무첨가	61.8	0.52	41.7
비교예 24	아스코르브산 칼슘	61.8	0.52	41.7
비교예 25	탄산 칼슘	61.8	0.52	41.7
비교예 26	염화 칼슘	61.8	0.52	41.7
비교예 27	구연산 칼슘	61.8	0.52	41.7
비교예 28	글루콘산 칼슘	61.8	0.52	41.7
비교예 29	젖산 칼슘	61.8	0.52	41.7

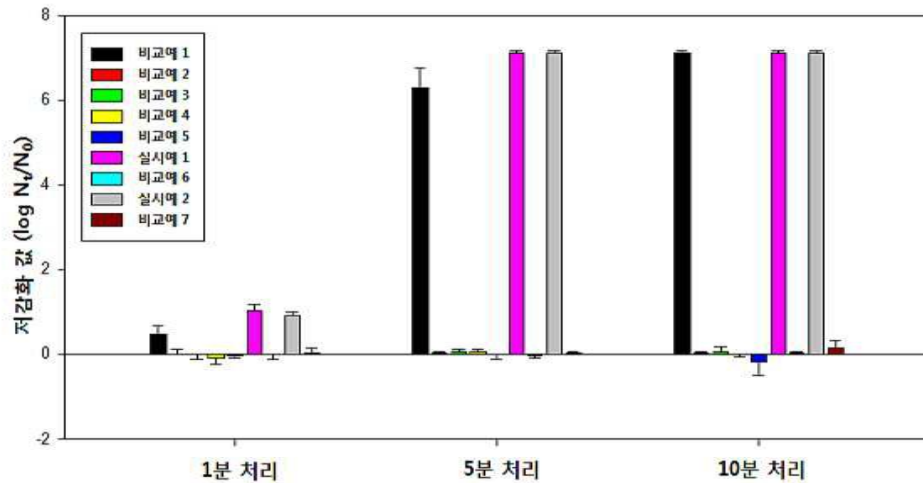
비교예 30	프로피온산 칼슘	61.8	0.52	41.7
--------	----------	------	------	------

[0083]

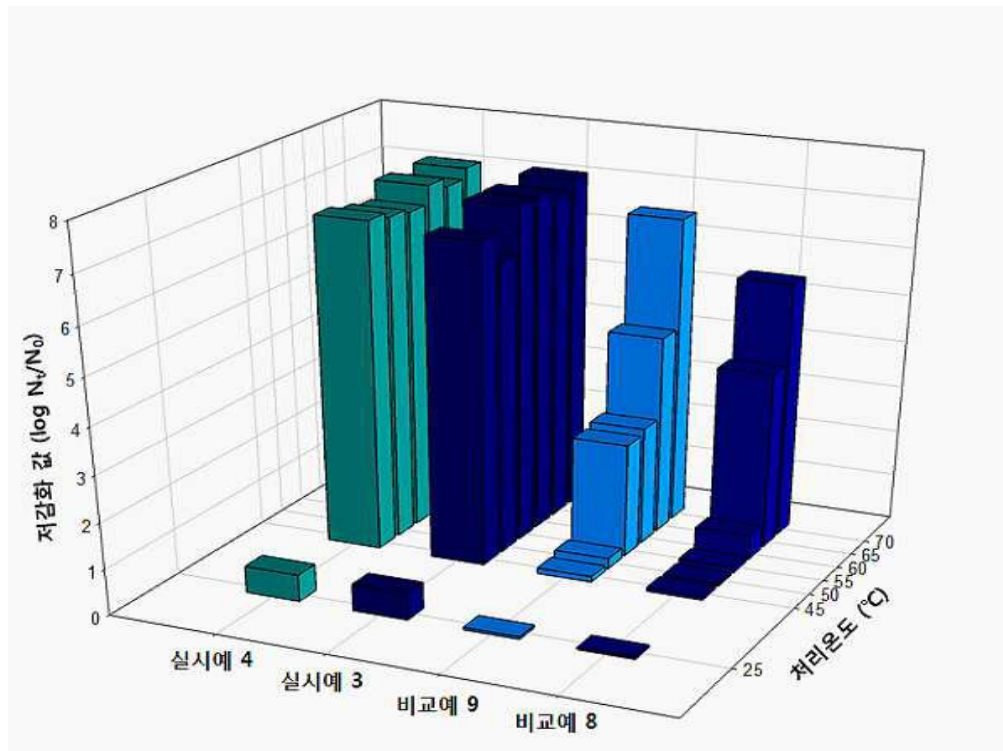
본 발명을 통해 개발한 수산화 칼슘 글리세롤 수용액을 첨가한 저온 데침 방법을 적용할 경우(실시예 30) 다른 칼슘 수용액에 비해 현저히 높은 살균효과를 획득할 수 있다.

도면

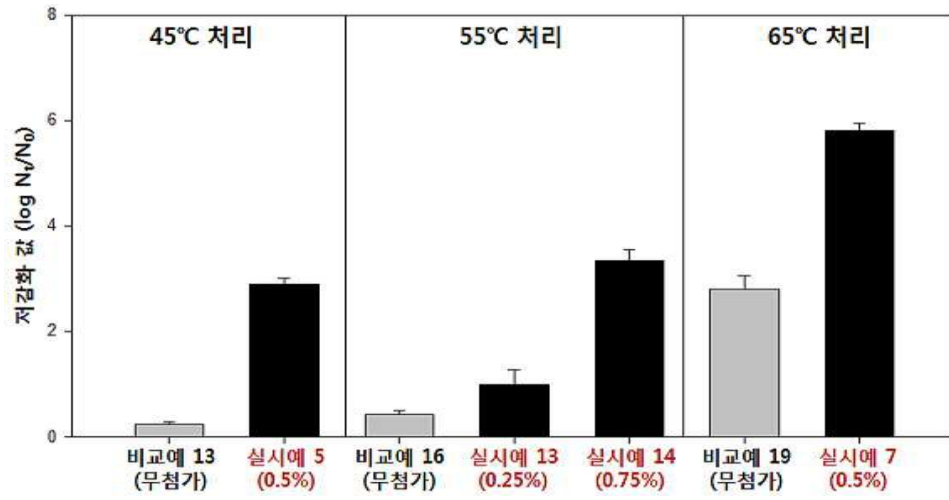
도면1



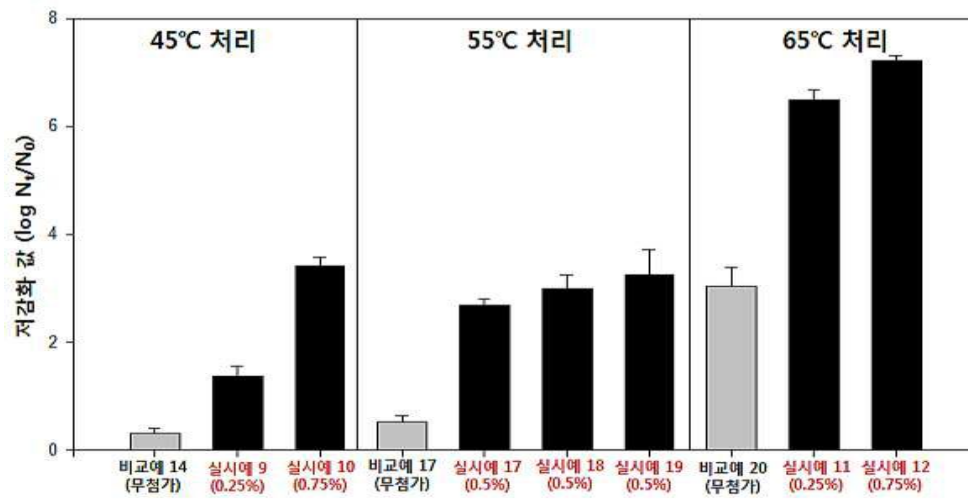
도면2



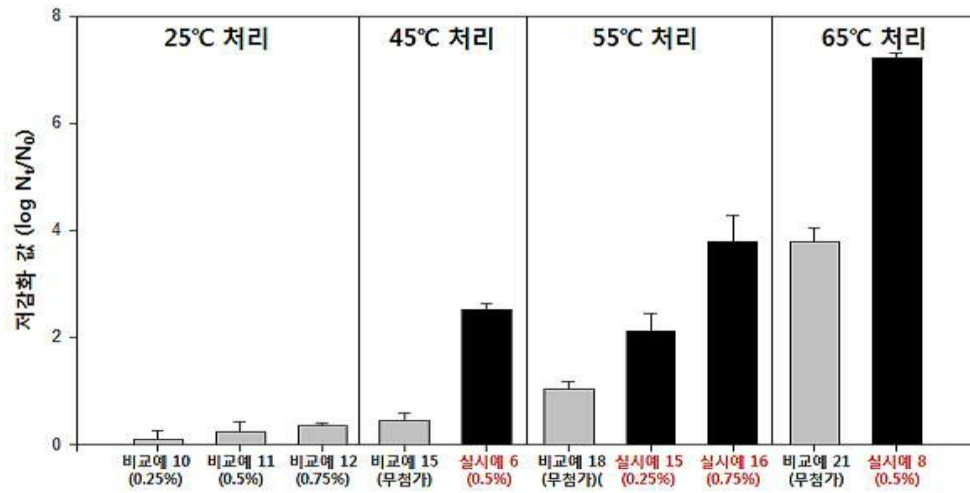
도면3



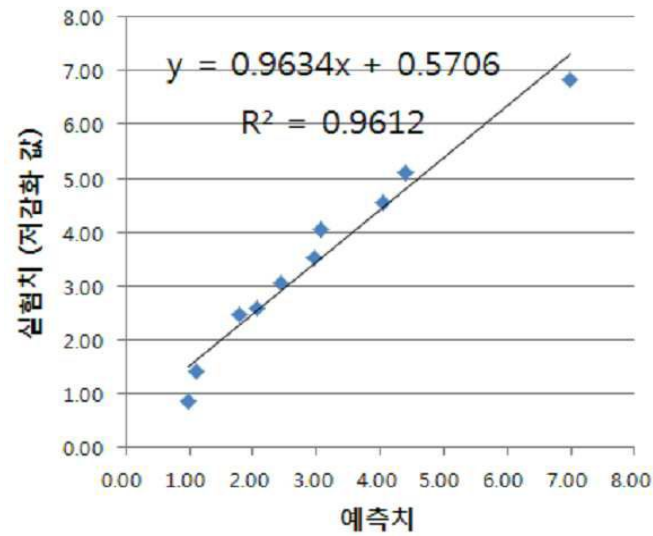
도면4



도면5



도면6



도면7



도면8

