pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 1, pp. 42~50 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.1.42

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

냉동과 해동처리가 계육 가슴살의 natural microflora, 접종된 *Listeria monocytogenes*와 *Campylobacter jejuni*에 미치는 영향

최은지 · 정영배 · 김진세[1] · 천호현*
세계김치연구소 신공정발효연구단, [1]농촌진흥청 국립농업과학원 수확후관리공학과

Effects of Freezing and Thawing Treatments on Natural Microflora, Inoculated *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* on Chicken Breast

Eun Ji Choi, Young Bae Chung, Jin Se Kim[1], and Ho Hyun Chun*
Advanced Process Technology and Fermentation Research Group, World Institute of Kimchi, Gwangju 61755, Korea
[1]Postharvest Engineering Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea
(Received November 9, 2015/Revised January 13, 2016/Accepted February 17, 2016)

ABSTRACT - The effects of freezing and thawing conditions on microbiological quality and microstructure change of inoculated (*Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni*) and non-inoculated chicken breasts were investigated. Chicken breasts were frozen with air blast freezing (–20, –70, and –150°C), ethanol (–70°C) and liquid nitrogen (–196°C) immersion freezing. There were no significant differences on the populations of *L. monocytogenes* inoculated with chicken breasts under different freezing conditions. However, air blast freezing (–20°C) resulted in significant reductions for total aerobic bacteria and *C. jejuni* compared to the control and other freezing treatments. The frozen samples were thawed with (hot or cold) air blast, water immersion, and high pressure thawing at 4°C and 25°C. the populations of total aerobic bacteria, and yeast and mold in the frozen chicken breast increased by 5.78 and 4.05 log CFU/g after water immersion thawing (25°C) treatment. After five freeze-thaw cycles, the populations of total aerobic bacteria, yeast and mold, and *C. jejuni* were reduced by 0.29~1.40 log cycles, while there were no significant differences ($P > 0.05$) in the populations of *L. monocytogenes* depending on the freeze-thaw cycles. In addition, the histological examination of chicken breasts showed an increase in spacing between the muscle fiber and torn muscle fiber bundles as the number of freeze-thaw cycles increased. These results indicate that freezing and thawing processes could affect in the levels of microbial contamination and the histological change of chicken breasts.

Key words : chicken breast, freezing, thawing, microorganism, microstructure

가금류는 저렴한 가격과 높은 영양학적 가치로 인하여 전 세계 육류 소비량의 약 30% 정도를 차지하고 있으며 국내에서도 계육의 소비가 매년 증가하고 있다[1,2]. 특히 계육 가공 산업이 발달함에 따라 산업적으로 계육을 대량생산하면서 유통되는 제품에 대한 품질뿐만 아니라 미생물학적 안전에 대한 중요성이 높아지고 있다.

도계 후 중량 규격에 의한 선별 또는 부위별로 1차 가공되어 포장된 신선 계육은 냉장과 냉동 형태로 구분되어 소비자에게 판매된다. 냉장 계육은 타 축육에 비하여 품질유지기한이 짧아 장기간 저장을 할 수 없다[3]. 이때에는 –20°C 이하의 빙결점 이하로 낮추어 동결 후 냉동 저장을 선택하게 되는데 냉동 계육은 냉장 계육에 비해 저장기간 향상과 편리한 유통성의 장점이 있다.

일반 가정에서는 –18 ~ –20°C 냉동고에서 식품을 동결시키는 완만 냉동방법을 이용하고 있다. 완만 냉동은 냉동속도가 느려 육류 내 얼음결정 형성시간이 길어지므로 얼음결정이 근섬유 내부보다 외부에 형성된다. 그 결과 얼음결정에 의한 부피 증가로 조직이 물리적 손상을 입고 파괴되어 해동 시 많은 육즙손실이 발생한다[4]. 반면 급속냉동은 최대빙결정형성대를 통과하는 시간이 매우 짧기 때문에 식품 내 형성되는 얼음결정 크기가 매우 작아 조직손상 발생을 감소시키고 품질 손상을 최소화 할 수 있는 것으로 알려져 있다[5-7].

*Correspondence to: Ho Hyun Chun, Advanced Process Technology and Fermentation Research Group, World Institute of Kimchi, 86 Kimchi-ro, Nam-gu, Gwangju 61755, Korea
Tel: 82-62-610-1761, Fax: 82-62-610-1850
E-mail: hhchun@wikim.re.kr

한편 냉동육을 이용하여 육가공식품을 제조하거나 가정에서 조리 시 해동과정이 필수적이나 냉동과 비교하여 해동의 중요성은 충분히 인식되지 못하였다[8,9]. 하지만 적절한 해동 여부는 식품의 품질에 커다란 영향을 미치며 해동시간 등 경제적인 면에도 직접적인 관계가 있으므로 중요한 의미를 지닌다[10]. 냉동육은 1~3일 장시간 자연해동 또는 20~50°C 온수해동 할 경우 미생물 생장 및 교차오염이 발생할 수 있는 우려가 있다[11]. 또한 냉동육의 유통과정에서 일정한 냉동온도를 유지하지 못할 경우 냉동-해동 반복이 발생하고 병원성 미생물이 증식하여 식품의 안전을 위협할 수 있다[12].

자연에 널리 존재하는 *L. monocytogenes*는 냉장온도에서 생육할 수 있는 식중독 세균으로 냉장보존을 요하는 육제품 등에 오염가능성이 있고 냉동육 해동 중 생존 및 증식이 가능하여 식중독을 발생시킬 수 있다[12,13,14]. *C. jejuni*는 설사, 복통 등의 증상을 일으키는 식품매개 장염의 중요한 원인균으로 가금류의 경우 보균율은 50~100% 정도로 매우 높으며 조리가 덜되거나 오염된 계육섭취와 관련된 경우가 많다[15]. Kang 등[16]은 계육에 *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *S. aureus*, *Salmonella* 4종 병원성 미생물 오염도 평가결과, 병원성 미생물 1종 이상 오염된 시료가 냉장 계육은 300검체 중 69.7%이었으며 냉동 계육은 50검체 중 76.0%을 나타냈다고 보고하였다.

한편 국내에서는 냉장방법에 따른 냉장 계육의 미생물의 증식에 미치는 영향[17], 포장방법이 냉동 계육의 미생물 증식에 미치는 영향[18] 등 연구는 수행되어 왔지만 계육의 냉동과 해동 조건에 따른 미생물 오염도 변화에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 계육 가슴살에 다양한 냉동과 해동처리 및 냉동-해동 반복에 따른 미생물학적 품질과 미세구조 변화에 미치는 영향을 분석하였다.

Materials and Methods

실험 재료

본 실험에서 사용한 시료는 도계 후 4°C에서 약 24시간 이내 냉장된 상태의 계육 중 발골 된 가슴살 부위를 광주소재의 전문 식육점에서 구입하였다. 멸균 처리한 칼을 이용하여 약 15 × 5 cm 크기(100 ± 20 g)로 절단 후 *L. monocytogenes*와 *C. jejuni* 접종 그룹과 비 접종 그룹으로 나누어 진행하였다. 비 접종 그룹은 냉장 계육 가슴살 시료를 polyethylene (PE) film bag (두께: 0.6 mm, Pack4U, Seoul, Korea)에 넣어 개별적으로 진공 포장하고 접종 그룹은 배양된 병원성 미생물을 시료에 접종한 후 비 접종 그룹과 같은 조건으로 포장하여 각각 실험에 사용하였다.

병원성 미생물 배양 및 시험 균액의 제조

본 연구에서 사용된 *L. monocytogenes* (ATCC 19111과 ATCC 15313)와 *C. jejuni* (ATCC 33560과 ATCC 33291)는 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 사용하였다. *L. monocytogenes*는 tryptic soy broth (Difco, Sparks, MD, USA)에 호기적 조건으로 35°C에서 24시간, *C. jejuni*는 brucella broth (Difco, Sparks, MD, USA)에 미호기성 가스 생성팩(CampyGen, Oxoid, Hampshire, UK)과 anaerobic jar (Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 미호기적 조건으로 42°C에서 48시간 각각 배양하였다. 배양 후 20% glycerol 용액에 현탁하고 −70°C에 동결 보관하여 stock culture로 사용하였다.

동결 보존된 표준균주를 냉장온도에서 녹인 후 *L. monocytogenes*는 tryptic soy agar (Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 형성된 균주의 단일 집락을 멸균된 loop로 취해서 25 mL의 TSB (Difco, Sparks, MD, USA)에 접종시켜 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양하여 균주를 활성화 하였다. *C. jejuni*는 5% sheep blood (MB cell, Seoul, Korea)가 첨가된 brucella agar (Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하여 미호기적 조건으로 42°C에서 48시간 배양하였다. 형성된 균주의 단일 집락을 25 mL의 5% sheep blood가 첨가된 brucella broth (Difco, Sparks, MD, USA)에 접종시켜 미호기적 조건으로 42°C에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 각 배양액을 3,000 × g 조건으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 침전된 cell pellet을 0.1% 멸균 펩톤수로 2회 세척하였다. *L. monocytogenes* 2균주와 *C. jejuni* 2균주의 cell pellet을 각각 0.1% 멸균 펩톤수로 희석하고 cocktail 형태로 혼합하여 균 접종액으로 사용하였다.

시험 균액 접종

계육 가슴살 시료 접종 전 70% 에탄올 용액에 5분간 침지하고 laminar flow biosafety hood 내 UV-C light로 30분 동안 처리하여 기존 자연적으로 부착되어 있는 미생물을 감소시켰다. 6~8 log CFU/mL 농도로 제조된 *L. monocytogenes*와 *C. jejuni* 균액 0.5 mL를 시료 표면에 각각 균일하게 접종 후 시료 표면에 균이 잘 부착될 수 있도록 laminar flow hood에서 60분 동안 방치하였다.

냉동처리

냉동은 Rodezno 등[19]과 Liang 등[20]의 방법을 참고하여 송풍식 냉동과 침지식 냉동으로 각각 나누어 진행하였다. 송풍식 냉동은 −20, −70과 −150°C freezer (송풍속도: 2.5~3.5 m/s)에서 각각 처리하였고 침지식 냉동은 deep freezer (CLN-51UW, Nihon Freezer Ltd., Tokyo, Japan) 내부에 −70°C 에탄올 용액이 담긴 stainless steel container와 −195°C liquid nitrogen이 담긴 container에 각각 침지 처리하였다.

계육 가슴살 시료의 중심부에 button temperature logger (SL52T, Signatrol Ltd., Tewkesbury, UK)를 삽입하여 중심부 온도가 −20ºC에 도달하는 때를 냉동완료 시점으로 하였다. 냉동속도는 중심부 온도가 4ºC에서 −20ºC가 될 때까지 분당 감소하는 온도(ºC/min)로 나타냈다.

해동처리

−70ºC ethanol 용액을 이용하여 급속동결 처리된 계육 가슴살 시료를 −20ºC 냉동저장고로 시료 옮겨 24시간 동안 저장하였다. 저장 후 시료의 해동은 송풍식 해동, 유수식 해동과 초고압 해동방법을 이용하였다. 송풍식 해동은 4ºC와 25ºC로 설정된 항온항습기(송풍속도: 1.2~1.5 m/s, SH-202M, Human Corporation, Seoul, Korea)에서, 유수식 해동은 수온이 4ºC와 25ºC로 유지된 water bath (VS-1205SW1, Vision Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 각각 처리하였다. 초고압 해동은 Ko 등[21]의 연구를 참고하여 초고압 장치(TFS-10L, TOYO KOATSU Co., Japan)의 압력을 100 MPa로 설정하고 vessel 내 수온을 4ºC와 25ºC로 달리하여 각각 80분과 60분 동안 처리하였다. 시료의 중심부 온도가 1ºC에 도달하는 때를 해동완료 시점으로 하였다. 해동속도는 시료 중심부 온도가 −20ºC에서 1ºC가 될 때까지 분당 증가하는 온도(ºC/min)로 나타냈다(단, 고압발생에 따른 temperature logger 파열로 초고압 해동의 해동속도는 측정할 수 없었다). 해동 처리 전 냉동 계육 가슴살을 대조구로 이용하여 비교하였다.

냉동-해동의 반복처리

냉동-해동 반복처리는 냉동과 해동 속도를 고려하여 에탄올 침지식 냉동과 유수식 해동방법을 조합하여 이용하였다. 계육 가슴살 시료를 −70ºC 에탄올 용액에 약 15분 동안 침지하여 동결 후 4ºC water bath에서 약 60분 동안 해동하였다. 동일한 냉동과 해동방법으로 시료의 냉동-해동 반복을 5회까지 처리하였다. 냉동과 해동 처리를 하지 않은 냉장 계육 가슴살을 대조구로 이용하여 비교하였다.

계육 가슴살의 미생물 수 측정

냉동과 해동처리에 따른 계육 가슴살의 미생물 수의 변화를 분석하기 위해 시료 25 g과 0.1% 멸균 펩톤수 225 mL를 멸균 bag에 넣은 후 stomacher (Bagmixer R400, Interscience Inc., Saint Nom, France)를 이용해 3분간 균질화 시켰다. 균질화 된 용액을 0.1% 멸균 펩톤수를 이용하여 10배수 연속 희석한 후 희석액 1 mL를 각각의 배지에 분주하였다. 총 호기성 세균은 3M Petrifilm™ aerobic count plate (Petrifilm AC, 3M Co., St. Paul, MN, USA)를 사용하여 37ºC에서 48시간 배양하였으며, 효모 및 곰팡이는 yeast and mold count plate (Petrifilm YM, 3M Co., St. Paul, MN, USA)를 사용하여 25ºC에서 72시간 배양하였다. 배양 후 액화 현상이 없고 배지 당 30~300개 집락을 생성한 평판을 선택하여 총 호기성 세균은 생성된 붉은 집락수를, 효모 및 곰팡이는 녹푸른색 집락수를 계수하였다.

*L. monocytogenes*는 TSA (Difco, MD, USA)를 사용하여 37ºC에서 24시간, *C. jejuni*는 5% sheep blood가 첨가된 brucella agar (Difco, MD, USA)를 사용하여 42ºC에서 미호기적 조건으로 24시간 배양 후 형성된 집략수를 계수하였다. 검출된 미생물 수는 시료 g당 colony forming unit (CFU)로 나타냈고 3회 반복하여 측정하였다.

계육 가슴살의 미세구조 분석

냉동-해동 반복처리에 따른 계육 가슴살 조직의 미세구조 변화는 Barbut 등[22]의 실험방법을 변형하여 분석하였다. 광학현미경의 표본제작을 위해 계육 가슴살을 근섬유 배열방향에 대하여 직각방향으로 10 mm × 10 mm 크기로 세절하고 10% formalin 용액에 시료를 넣어 48시간 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 4 μm로 박절하여 슬라이드에 부착 한 후 hematoxylin & eosin 자동 염색장치(Tissue-TeK Prisma E2, SAKURA Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA)을 이용하여 xylene에 탈파라핀화한 후 함수하였고 수돗물로 수세하였다. 핵을 염색하기 위해 10분간 Harris's hematoxylin 용액에 옮긴 후 흐르는 물에 수세하고 1% HCl 용액으로 3회 침적 후 충분히 수세하여 0.5% ammonium 용액으로 청색화 하였다. Eosin 용액에 6회 침적하고 ethanol을 이용한 탈수과정을 수행하여 세포질을 염색하였다. 이후 Canada balsam으로 봉입하고 광학현미경(Pannoramic MIDI, 3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary)으로 검경하였다.

냉동감량과 해동감량 측정

냉동과 해동과정에서 발생하는 계육 가슴살의 드립 손실은 냉동감량(freezing loss)과 해동감량(thawing loss)으로 AOAC (1995)[23]의 방법에 따라 측정하였다. 냉동감량은 계육 가슴살의 냉동 전 무게와 냉동 후의 무게를 측정하여 백분율(%, w/w)로 나타내었고 해동감량은 계육 가슴살의 동결 전 무게와 해동 후의 무게를 측정하여 초기중량에 대한 감량을 백분율(%, w/w)로 나타내었다.

통계처리

본 실험은 3회 반복 실시하여 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타냈다. 모든 실험 결과의 유의성 검정은 SPSS (Statistical Package for the Social Science, ver 19, SPSS Inc., USA) program을 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test 방법을 사용하여 통계처리를 실시하였다.

Results and Discussion

냉동처리에 따른 계육 가슴살의 냉동특성

냉동속도는 냉동식품의 품질에 영향을 주는 주요한 요소로 최대빙결정생성대인 −1 ~ −5°C 구간을 빠르게 통과할수록 품질 변화를 최소화할 수 있는 것으로 보고되고 있다[7,24]. 냉동처리에 따른 계육 가슴살의 냉동특성은 Table 1에 나타내었다. −20°C, −70°C와 −150°C 송풍식 냉동처리구의 냉동시간은 각각 260분, 56.5분과 31.5분으로 온도가 낮을수록 냉동이 완료되는데 소요되는 시간이 유의적($P < 0.05$)으로 감소하였다. 한편 −70°C 에탄올과 −196°C 액체질소 침지식 냉동처리구의 냉동시간은 8분과 2분으로 송풍식 냉동에 비해 침지식 냉동이 신속히 냉동이 완료되는 결과를 보였다. 특히 동일한 −70°C 온도조건이라도 송풍식과 비교하여 에탄올 침지식 냉동방법이 냉동시간이 약 7배 빠른 것으로 나타났다. 냉동속도에서도 에탄올 침지식과 액체질소 침지식 냉동처리구는 3.20°C/min과 12.00°C/min으로 송풍식 냉동처리구의 0.10~0.82°C/min와 비교하여 계육 가슴살 시료를 급속 동결시키는 효과를 나타냈다. −20°C 송풍식 냉동처리구의 냉동감량은 0.72%로 −70°C과 −150°C 송풍식 및 액체질소 침지식 냉동처리구의 0.45~0.49%와 비교하여 유의적인 차이가 있었다. 반면 에탄올 침지식 냉동처리구는 0.23%로 가장 낮은 냉동감량이 측정되었다. Kang 등[25]은 돈육을 −20°C와 −70°C 송풍식 및 액체질소 침지식 냉동방법으로 각각 처리하였을 때 시료가 2°C에서 −10°C까지 도달했을 때를 냉동완료 시점으로 각각 200분과 55분 및 9초가 소요되었다고 보고하였으며 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 Jo 등[26]은 우육을 −24°C 자연대류식, −45°C 송풍식과 −100°C 극저온 냉동방법으로 처리한 결과 온도가 낮을수록 냉동이 완료되는 소요되는 시간이 유의적로 감소한다고 보고하였다. −28°C 송풍식과 cryogenic chamber를 이용한 −70°C, −80°C, −90°C와 −100°C 극저온 냉동방법을 이용하여 새우를 냉동 처리 후 냉동감량을 분석한 결과 송풍식 냉동은 2.76%을, −70°C, −80°C, −90°C와 −100°C 극저온 냉동은 각각 1.83%, 1.81%, 1.75%와 1.75%를 나타냈다는 Boonsumrej 등[27]의 연구 보고와 시료는 다르지만 완만 냉동에서 높은 냉동감량이 측정되었다는 점이 본 연구결과와 유사하다.

해동처리에 따른 냉동 계육 가슴살의 해동특성

급속 동결된 계육 가슴살 시료의 중심온도가 1°C에 도달하였을 때를 해동완료로 하였는데 4°C 송풍식 해동처리구의 해동시간은 486분으로 25°C 송풍식 해동처리구의 99분과 비교하여 약 4.9배의 차이를 보였다(Table 2). 반면 4°C와 25°C 유수식 해동처리구는 각각 56.5분과 38.5분의 해동시간을 나타내 송풍식 해동에 비해 해동완료까지 소요되는 시간이 유의적으로 단축되었다. 4°C와 25°C 송풍식 해동 처리구의 해동속도는 0.09°C/min과 0.43°C/min으로 온도에 따라 약 4.8배의 차이를 나타냈다. 또한 4와 25°C 유수식 해동처리구는 0.75°C/min과 1.16°C/min로 해

Table 1. Freezing characteristics of chicken breast treated with different freezing conditions

Treatment	Temperature (°C)	Freezing time (min)	Freezing rate (°C/min)	Freezing loss (%)
Air blast freezing	−20	260.50 ± 84.15[1)a2)]	0.10 ± 0.03^{d}	0.72 ± 0.01^{a}
	−70	56.50 ± 4.95^{b}	0.43 ± 0.04^{cd}	0.48 ± 0.04^{b}
	−150	31.50 ± 12.02^{bc}	0.82 ± 0.31^{c}	0.49 ± 0.01^{b}
Ethanol immersion freezing	−70	8.00 ± 2.83^{bc}	3.20 ± 1.13^{b}	0.23 ± 0.06^{c}
Liquid nitrogen immersion freezing	−196	2.00 ± 0.01^{c}	12.00 ± 0.01^{a}	0.45 ± 0.01^{b}

[1)]Each value is mean ± SD.
[2)]Any means in the same column (a-d) followed by different letters are significantly ($P < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

Table 2. Thawing characteristics of frozen chicken breast treated with different thawing conditions

Treatment	Temperature (°C)	Thawing time (min)	Thawing rate (°C/min)	Thawing loss (%)
Air blast thawing	4	486.00 ± 142.84[1)a2)]	0.09 ± 0.03^{c}	0.70 ± 0.14^{a}
	25	99.00 ± 19.80^{b}	0.43 ± 0.08^{b}	0.74 ± 0.05^{a}
Water immersion thawing	4	56.50 ± 12.02^{b}	0.75 ± 0.16^{b}	0.44 ± 0.18^{b}
	25	38.50 ± 14.85^{b}	1.16 ± 0.45^{a}	0.71 ± 0.19^{a}
High pressure thawing[3)]	4	-	-	0.74 ± 0.08^{a}
	25	-	-	0.82 ± 0.06^{a}

[1)]Each value is mean ± SD.
[2)]Any means in the same column (a-c) followed by different letters are significantly ($P < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.
[3)]High pressure thawing treatment at 100 MPa for 60 min.

동방법과 온도가 해동속도에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 송풍식과 유수식 해동 시, 동일한 온도라도 해동방법에 따라 해동속도에 차이를 보이는 것은 공기보다 물이 열전도도가 높기 때문인 것으로 사료된다.

해동은 동결식품 내에 형성된 빙결정이 수분으로 변환시키는 과정으로 이때 녹은 수분이 동결 전과 같이 식품의 조직 내로 다시 흡수되지 않고 분리되어 드립이 발생한다[28,29]. 4ºC와 25ºC 송풍식 해동처리구, 25ºC 유수식 해동처리구와 4ºC와 25ºC 초고압 해동처리구의 해동감량은 0.70~0.82%을 나타내었다. 반면에 4ºC 유수식 해동처리구는 0.44%의 가장 낮은 해동감량을 보였다. Yu 등[30]은 냉동 계육 가슴살을 시료로 0ºC 송풍식 해동처리에 따른 해동감량은 1.12%인 반면 18ºC 유수식 해동은 3.49%로 해동방법에 따라 해동감량에 차이를 보인다고 보고하였다. Oliveira 등[31]은 계육 가슴살을 −30ºC에서 냉동처리 후 7ºC 송풍식, 10ºC 유수식, 17ºC 공기 정치식과 microwave 가열방법으로 해동 후 해동감량을 분석한 결과 microwave 해동은 7.65%, 공기 정치식 해동은 4.84%, 송풍식 해동은 3.60%으로 유수식 해동의 1.27%와 비교하여 높은 해동감량이 발생하였다고 보고하였는데 다른 해동처리구에 비하여 4ºC 유수식 해동이 가장 낮은 해동감량을 보인 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

냉동처리에 따른 계육 가슴살의 미생물 변화

다양한 냉동방법에 따른 총 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수의 변화를 측정한 결과는 Table 3에 나타냈다. 대조구의 총 호기성 세균 수는 4.75 log CFU/g인 반면 −20ºC 송풍식 냉동처리구는 4.06 log CFU/g으로 약 0.7 log CFU/g의 감소를 보였다. 또한 −70ºC와 −150ºC 송풍식 및 −70ºC 에탄올 침지식 냉동처리구의 총 호기성 세균 수도 약 0.3~0.5 log CFU/g이 감소하였지만 −196ºC 액체질소 침지식 냉동처리구는 대조구와 유사하였다. 서로 다른 냉동방법과 냉동온도 따라 계육 가슴살의 총 호기성 세균수의 생존율에 차이가 나타나는 것으로 판단되며, 본 연구와 유사한 연구에서는 −20ºC 완만 냉동과 −82ºC 급속 냉동 처리된 치즈의 총 호기성 세균 수가 냉동저장 3개월 후 각각 9.14 log CFU/g과 9.87 log CFU/g으로 냉동속도에 따라 차이를 보였다고 보고하였다[32]. 또한 Guo 등[33]은 −75ºC 급속냉동 처리로 새우의 총 호기성 세균과 저온성 세균수를 약 0.5 log CFU/g의 감소시켰다고 보고한 바 있다.

효모 및 곰팡이의 경우 대조구는 3.86 log CFU/g이었으며 −20ºC, −70ºC와 −150ºC 송풍식 및 에탄올 침지식 냉동처리구는 3.23~3.63 log CFU/g로 대조구와 비교하여 약 0.2~0.6 log CFU/g의 감소를 보인 반면 액체질소 침지식 냉동처리구는 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

계육 가슴살 시료에 *L. monocytogenes*와 *C. jejuni*를 접종시킨 후 냉동처리에 따른 미생물 수 변화를 측정하였다 (Table 3). 대조구의 *L. monocytogenes* 수는 7.04 log CFU/g이었고 송풍식 냉동처리구는 6.71~7.00 log CFU/g와 침지식 냉동처리구는 6.97~7.00 log CFU/g으로 처리구 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다.

C. jejuni 수 변화는 *L. monocytogenes* 결과와 차이를 보였다. −20ºC 송풍식 냉동처리구의 *C. jejuni* 수는 4.09 log CFU/g으로 대조구의 5.08 log CFU/g와 비교하여 약 1 log CFU/g 정도의 감소효과를 나타냈다. 한편, −70ºC와 −150ºC 송풍식 냉동처리구의 *C. jejuni* 수는 4.61 log CFU/g과 4.62 log CFU/g이었으며 −70ºC 에탄올 침지식과 −196ºC 액체질소 침지식 냉동처리구는 각각 4.81 log CFU/g과 4.72 log CFU/g을 나타내 −20ºC보다 낮은 온도에서 냉동처리는 *C. jejuni* 수 변화에 미치는 영향이 크지 않았다. Bhaduri[34]은 −20ºC 냉동처리로 계육의 *C. jejuni* 수가 약 0.5 log CFU/g 감소하였다고 보고하였으며 Haughton 등[35]는 다른 병원성 미생물에 비해 *C. jejuni*가 온도, 가스농도 등 환경 스트레스에 대해 민감하여 적응력이 떨어진다고 보고하였다. Nauta[36]은 아이슬란드와 노르웨이 등 유럽에서는 육계에 *Campylobacter* 오염 수준을 감소시키기 위한 효과적인 살

Table 3. Change in the populations of natural microflora and foodborne pathogens of chicken breast treated with different freezing conditions

Treatment	Freezing temperature (ºC)	Microbial count (log CFU/g)			
		Non-inoculated chicken breast		Inoculated chicken breast	
		Total aerobic bacteria	Yeast and mold	*L. monocytogenes*	*C. jejuni*
Control[3)]	-	4.75 ± 0.21[1)a2)]	3.83 ± 0.18[a]	7.04 ± 0.28[a]	5.08 ± 0.24[a]
Air blast freezing	−20	4.06 ± 0.11[c]	3.61 ± 0.11[abc]	6.99 ± 0.19[a]	4.09 ± 0.13[c]
	−70	4.56 ± 0.13[ab]	3.23 ± 0.13[d]	6.71 ± 0.10[a]	4.61 ± 0.16[b]
	−150	4.38 ± 0.15[b]	3.43 ± 0.17[cd]	7.00 ± 0.23[a]	4.62 ± 0.19[b]
Ethanol immersion freezing	−70	4.33 ± 0.21[b]	3.55 ± 0.11[bc]	6.97 ± 0.23[a]	4.81 ± 0.16[ab]
Liquid nitrogen immersion freezing	−196	4.66 ± 0.19[a]	3.79 ± 0.20[ab]	7.02 ± 0.18[a]	4.72 ± 0.11[ab]

[1)]Each value is mean ± SD.
[2)]Any means in the same column (a-e) followed by different letters are significantly ($P < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.
[3)]Fresh chicken breast before freezing.

Table 4. Change in the population of natural microflora and foodborne pathogens of chicken breast treated with different thawing conditions

Treatment	Thawing temperature (°C)	Microbial count (log CFU/g)			
		Non-inoculated chicken breast		Inoculated chicken breast	
		Total aerobic bacteria	Yeast and mold	*L. monocytogenes*	*C. jejuni*
Control[3)]	-	4.42 ± 0.01[1)bc2)]	3.44 ± 0.04[b]	6.99 ± 0.24[a]	4.65 ± 0.14[a]
Air blast thawing	4	3.70 ± 0.19[d]	3.07 ± 0.18[d]	6.80 ± 0.05[ab]	4.28 ± 0.07[b]
	25	4.02 ± 0.27[cd]	3.21 ± 0.19[cd]	7.05 ± 0.23[a]	4.68 ± 0.15[a]
Water immersion thawing	4	4.54 ± 0.60[b]	3.37 ± 0.11[bc]	6.91 ± 0.23[ab]	4.24 ± 0.20[b]
	25	5.78 ± 0.08[a]	4.05 ± 0.09[a]	6.67 ± 0.08[bc]	4.58 ± 0.09[a]
High pressure thawing[4)]	4	3.77 ± 0.07[d]	2.73 ± 0.09[e]	6.51 ± 0.08[c]	4.25 ± 0.17[b]
	25	4.28 ± 0.05[bc]	2.85 ± 0.15[e]	6.72 ± 0.06[bc]	4.50 ± 0.04[ab]

[1)]Each value is mean ± SD.
[2)]Any means in the same column (a-d) followed by different letters are significantly ($P < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.
[3)]Quick-frozen chicken breast using −70°C ethanol immersion freezing
[4)]High pressure thawing treatment at 100 MPa for 60 min.

균방법으로 냉동처리가 활용되고 있다고 보고하였다.

해동처리에 따른 냉동 계육 가슴살의 미생물 변화

송풍식, 유수식과 초고압 해동방법 및 해동온도 차이에 따른 냉동 계육 가슴살의 미생물 수 변화는 Table 4에 나타내었다. 4°C와 25°C 송풍식 해동처리구의 총 호기성 세균 수는 3.70 log CFU/g과 4.02 log CFU/g으로 측정되어 대조구와 비교하여 각각 0.72 log CFU/g과 0.40 log CFU/g 감소하였다. 또한 4°C와 25°C 초고압 해동 처리구의 총 호기성 세균 수는 3.77 log CFU/g과 4.28 log CFU/g으로 나타나 대조구의 4.42 log CFU/g 비교하여 0.6 log cycle 미만 수준에서 감소하는 경향을 보였다. 반면 25°C 유수식 해동처리구의 총 호기성 세균 수는 해동과정에서 균수가 급격히 증가하여 5.78 log CFU/g으로 관찰되었다. 효모 및 곰팡이 수의 경우, 4°C와 25°C 송풍식 해동처리구 및 4°C 유수식 해동처리구는 3.07~3.37 log CFU/g으로 대조구와 비교하여 0.5 log cycle 미만으로 감소하거나 유사한 경향을 보였다. 한편 25°C 유수식 해동처리구의 효모 및 곰팡이 수는 4.05 log CFU/g으로 4°C와 25°C 초고압 해동처리구의 2.73 log CFU/g과 2.85 log CFU/g과 비교하여 약 1.2~1.3 log CFU/g의 차이를 보였다.

*L. monocytogenes*가 접종된 냉동 계육 가슴살 시료인 대조구의 *L. monocytogenes* 수는 6.99 log CFU/g이었다. 4°C 초고압 해동처리구는 대조구와 비교하여 0.48 log CFU/g 감소한 6.51 log CFU/g인 반면에, 다른 해동 처리구는 해동방법과 해동온도에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 송풍식, 유수식과 초고압 해동방법 중 해동온도를 4°C로 설정한 처리구의 *C. jejuni* 수는 4.24~4.28 log CFU/g이었고 25°C 처리구는 4.50~4.68 log CFU/g으로 해동 중 *C. jejuni* 수 변화는 해동방법보다 해동온도에 영향을 받는 것으로 나타났다. 냉동육은 일반적으로 해동 후 조리하여 섭취하는데 불완전 가열처리 또는 10°C 이상의 온수를 이용한 해동은 병원성 미생물의 잠재적 생장 가능성이 있어 식중독의 위험에 노출 될 수 있다[9)]. Stavros 등[37)]은 소고기 패티에 *Salmonella* spp.와 *E. coli* O157:H7을 접종하여 −22°C 냉동 후 4°C 냉장해동과 마이크로웨이브로 해동한 결과 *Salmonella* spp. 수는 각각 0.3 log CFU/g과 1 log CFU/g 증가하였고 *E. coli* O157:H7 수는 각각 0.4 log CFU/g과 1 log CFU/g 증가하여 해동온도가 미생물 증식에 영향을 미친다고 보고하였다. Speck와 Ray[38)]는 해동 시 육류에 존재하는 미생물은 농축된 세포 외액에 노출되거나 삼투압차에 의해 탈수되어 세포 손상 및 사멸되지만 적절한 온도와 영양이 주어면 reactivation되어 증식된다고 보고하였다. 따라서 냉동저장이나 해동과정 중 병원성 미생물이 냉동 전 상태와 유사한 수준으로 존재하거나 증가할 수 있기 때문에 냉동처리 전 육제품에 존재하는 초기 미생물 오염도를 감소시키기 위한 노력이 필요하다고 판단된다.

냉동-해동 반복처리에 따른 계육 가슴살의 미생물과 해동 감량 변화

계육은 도계 후 신선도의 저하와 미생물의 생육을 억제하기 위해 단시간 내 소비하는 것을 제외하고 동결된 형태로 유통되는데 냉동저장이나 유통 중 냉동계육이 해동 후 재 냉동되는 경우가 발생한다[39)]. −70°C 에탄올 침지식 냉동방법과 4°C 유수식 해동방법을 조합하여 냉동-해동 반복에 따른 계육 가슴살의 미생물 수 변화를 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. 대조구의 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수는 각각 4.44 log CFU/g과 2.85 log CFU/g이었으며 냉동-해동 반복 5회 후 총 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수는 감소하여 각각 4.15 log CFU/g과 2.30 log CFU/g을 나타내었다. 한편 냉동-해동 반복이 계육 가슴살에 오염된 *L. monocytogenes* 수 변화에 유의적인 영향을 주지

Table 5. Change in the population of natural microflora and foodborne pathogens of chicken breast treated with freeze-thaw cycles

Freeze-thaw cycles	Microbial count (log CFU/g)				Thawing loss (%)
	Total aerobic bacteria	Yeast and mold	*L. monocytogenes*	*C. jejuni*	
0	4.44 ± 0.07[1)ab2)]	2.85 ± 0.03[a]	6.91 ± 0.06[a]	5.84 ± 0.17[a]	-
1	4.58 ± 0.21[a]	2.74 ± 0.15[ab]	7.03 ± 0.15[a]	5.01 ± 0.44[b]	0.29 ± 0.07[b]
3	4.34 ± 0.05[bc]	2.67 ± 0.10[b]	6.93 ± 0.04[a]	4.71 ± 0.24[cd]	0.42 ± 0.10[b]
5	4.15 ± 0.05[c]	2.30 ± 0.20[c]	6.91 ± 0.26[a]	4.44 ± 0.29[d]	0.80 ± 0.17[a]

[1)]Each value is mean ± SD.
[2)]Any means in the same column (a-d) followed by different letters are significantly ($P < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

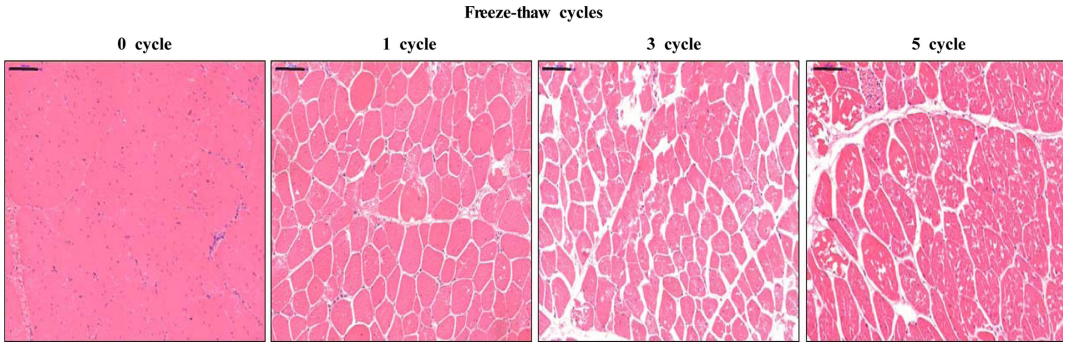

Fig. 1. Microscopic observations (cross section) of muscle fiber of chicken breast after freeze-thaw cycles (Bar = 100 μm).

않았지만 *C. jejuni* 수는 냉동-해동 반복 횟수가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 특히 냉동-해동 반복 5회 후 *C. jejuni* 수는 4.44 log CFU/g으로 대조구와 비교하여 1.4 log cycle 감소였다. 이는 *L. monocytogenes*보다 *C. jejuni*가 냉동-해동 반복에 의한 온도변화 스트레스에 민감하여 사멸이 쉬운 것으로 사료된다. Garenaux 등[40]은 chicken fillet을 −20°C freezer에서 냉동 후 4°C 해동한 결과, *C. jejuni* 수가 약 1.4 log CFU/g 감소했으며 냉동-해동 처리는 빙결정 생성과 탈수에 의해 *C. jejuni*를 사멸시키고 superoxide anion 생성을 유도한다고 보고하였다. 또한 Yamamoto 등[41]은 −20°C 냉동과 23°C 해동의 조합으로 냉동-해동을 반복한 결과 반복 횟수가 많아질수록 apple juice의 *E. coli* O157:H7 수가 감소한다고 보고하였다. 향후 병원성 미생물 종류별 냉동 및 해동처리에 따른 산화적 스트레스에 대한 민감성 차이 등 연구가 필요할 것으로 사료된다. 냉동-해동 반복에 따른 계육 가슴살의 해동감량 분석 결과, 냉동-해동 반복 1회는 0.29%, 3회는 0.42%로 나타났다. 특히 반복 5회 후에는 해동감량이 0.80%까지 증가하여 냉동-해동 반복을 거치면서 유의적으로($P < 0.05$) 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

냉동-해동 반복처리에 따른 계육 가슴살의 미세구조 분석

냉동과 해동처리 반복에 따른 계육 가슴살 시료의 미세구조를 분석한 결과는 Fig. 1과 같았다. 신선한 냉장 계육인 대조구의 경우 근섬유 사이의 공간과 얼음결정이 보이지 않았으며 조직 또한 손상되지 않은 형태로 규칙적으로 빼곡한 배열을 관찰할 수 있었다. 냉동-해동 반복처리 1회 후 세포 내의 수분이 외부로 배출되어 조직 사이에 없었던 공간이 나타났으며 반복 3회 후에는 얼음결정이 커져서 빙결 덩어리상의 형태를 구성하였던 조직 사이의 간격이 커지는 것을 관찰되었다. 또한 냉동-해동 반복 5회 후에는 세포 외부뿐만 아니라 내부에서도 공간이 발생하였으며 불균일하게 찢어진 세포가 관찰되어 냉동-해동 반복으로 근섬유의 손상 및 조직이 파괴될 수 있음을 보여주는 증거로 생각된다. Song 등[39]이 냉동-해동이 반복됨에 따라 조직의 손상에 의해 녹아있는 수용액이 뭉쳐서 재빙결되어 덩어리상의 형태를 구성하거나 조직 내 안정하지 않은 상태에 있는 작은 결정들이 성장 또는 융합되어 더 큰 결정을 만들어 냉동 계육 가슴살의 해동감량 증가와 보수성 저하 등에 영향에 큰 영향을 미친다고 보고하였다. Jeong 등[42]은 우육을 −65°C 냉동 후 4°C에서 해동한 결과, 신선 우육에 비해 근원섬유의 심각한 손상을 보였으며 Boonsumrej 등[27]은 −20°C 냉동과 5°C 해동조건을 조합하여 새우에 냉동-해동을 반복한 결과 근원섬유 사이의 간격이 증가하고 반복횟수가 증가할수록 근섬유속 배열의 규칙성이 현저히 흐트러지고 불규칙한 균일이 발생한다고 보고하였다. 따라서 고품질의 냉동 계육 생산 및 유통을 위하여 급속 동결시킨 계육의 냉동저장과 유통 중 온도상승에 의한 해동 후 재 냉동 현상에 노출되지 않도록 유의해야할 것이다.

Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(PJ0108362016)에 의해 수행된 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 다양한 냉동과 해동처리에 따른 계육 가슴살에 natural microflora, 접종된 *L. monocytogenes*와 *C. jejuni* 수와 미세구조 변화 구명을 위하여 연구를 수행하였다. –20ºC 송풍식 냉동처리구의 총 호기성 세균과 *C. jejuni* 수는 4.06 log CFU/g과 4.09 log CFU/g으로 대조구와 비교하여 각각 약 0.7 log CFU/g과 1.0 log CFU/g의 감소를 보였다. 한편, 계육 가슴살 접종된 *L. monocytogenes* 수는 냉동방법과 냉동온도에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다. 4ºC와 25ºC 송풍식 해동처리구의 총 호기성 세균 수는 3.70 log CFU/g과 4.02 log CFU/g으로 측정되어 대조구와 비교하여 각각 0.72 log CFU/g과 0.40 log CFU/g 감소한 반면 25ºC 유수식 해동처리구의 총 호기성 세균 수는 해동과정에서 균수가 급격히 증가하여 5.78 log CFU/g으로 관찰되었다. 해동 중 *C. jejuni* 수 변화는 해동방법보다 해동온도에 영향을 받는 것으로 나타났다. 냉동-해동 반복 5회 후 총 호기성 세균과 효모 및 곰팡이 수는 감소하여 각각 4.15 log CFU/g과 2.30 log CFU/g을 보였다. 계육 가슴살에 접종된 *L. monocytogenes* 수는 냉동-해동 반복처리에 유의적인 영향이 없었지만 *C. jejuni* 수는 냉동-해동 반복 횟수가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 냉동-해동 반복이 증가함에 따라 근섬유 조직을 재 손상시켰으며 특히 냉동-해동 반복 5회 후에는 계육 가슴살 시료의 조직세포 외부뿐만 아니라 내부에서도 공간이 발생하였으며 불균일하게 찢어진 세포가 관찰되었다.

References

1. Oh J.H., Yoon S., Choi Y.: The effect of superheated steam cooking condition on physico-chemical and sensory characteristics of chicken breast fillets. *Korean J. Food Cook. Sci.,* **30**, 317-324 (2014).
2. Chae H.S., Cho S.H., Park B.Y., Yoo Y.M., Kim J.H., Ahn C.N., Lee J.M., Kim Y.K., Yun S.G., Choi Y.I.: Comparison of chemical composition in different portions of domestic broiler meat. *Korean J. Poult. Sci.*, **29**, 51-57 (2002).
3. Shim K.B., Hong G.P., Choi M.J., Min S.G.: Effect of high pressure freezing and thawing process on the physical properties of pork. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **29**, 736-742 (2009).
4. Leygonie C., Britz T.J. and Hoffman L.C.: Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Sci.,* **91**: 93-98 (2012).
5. Xanthakis E., Le-Bail A., Ramaswamy H.: Development of an innovative microwave assisted food freezing process. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **26**, 176-181 (2014).
6. Anese M., Manzocco L., Panozzo A., Beraldo P., Foschia M., Nicoli MC.: Effect of radiofrequency assisted freezing on meat microstructure and quality. *Food Res. Int.*, **46**, 50-54 (2012).
7. Kim Y.B., Woo S.M., Jeong J.Y., Ku S.K., Jeong J.W., Kum J.S., Kim E.M.: Temperature changes during freezing and effect of physicochemical properties after thawing on meat by air blast and magnetic resonance quick freezing. *Korean J. Food Sci. An.*, **33**, 763-771 (2013).
8. Park M.H., Kwon J.E., Kim S.R., Won J.H., Ji J.Y., Hwang I.K., Kim M.R.: Physicochemical and microbiological properties of pork by various thawing methods. *J. East Asian Soc. Dietary Life*, **22**, 298-304 (2012).
9. Lee J.K., Park J.Y.: Rapid thawing of frozen pork by 915 MHz microwave. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**, 54-61 (1999).
10. Yun C.G., Lee D.H., Park J.: Ohmic thawing of a frozen meat chunk. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 842-847 (1998).
11. Shibiny A.E., Connerton P., Connerton I.: Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *Int. J. Food Microbiol.*, **131**, 197-202 (2009).
12. Choi M.S., Choi J.A., Kim M.H., Park G.J.: The comparison and distribution of temperatures established in display stands and food surfaces for cold and frozen foods in large discount stores in Korea. *J. Fd Hyg. Safety*, **26**, 308-314 (2011).
13. Tiganitasa A., Zeakia N., Gounadakib A.S., Drosinosa E.H., Skandamis P.N.: Study of the effect of lethal and sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *Food microbiol.*, **134**, 104-112 (2009).
14. Boziaris I.S., Skandamis P.N., Anastasiadi M., Nychas G.J.: Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations, J. *Appl. Microbiol.*, **102**, 796-805 (2007).
15. Chun H.H., Kim J.Y., Lee B.D., Yu D.J., Song K.B.: Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. *Food Control,* **21**, 276-280 (2010).
16. Kang H.J., Kim Y.H., Son W.G.: Contamination level of retail meat and chickens by quantitative test of food poisoning bacteria. *J. Fd Hyg. Safety*, **15**, 204-208 (2000).
17. Park G.B., Ha J.K., Jin S.K., Park T.S., Shin T.S., Lee J.I.: Effects of chilling and packing methods on physico-chemical properties of cold-stored chicken breast and thigh meats. *Korean J. Poult. Sci.*, **24**, 17-28 (1997).
18. Park G.B., Ha J.K., Lee S.K., Chung S.K., Kim H.K., Cho K.S., Shin T.S., Park T.S., Lee J.I.: Effect of packing method on shelf-life and microbiology of frozen chicken. *Korean J. Poult. Sci.*, **23**, 203-207 (1996).
19. Espinoza Rodezno L.A., Sundararajan S., Solval K.M., Chotiko A., Li J., Zhang J., Alfaro L., Bankston J.D., Sathivel S.:

Cryogenic and air blast freezing techniques and their effect on the quality of catfish fillets. *LWT-Food Sci. Technol*., **54**, 377-382 (2013).
20. Liang D., Lin F., Yang G., Yue X., Zhang Q., Zhang Z., Chen H.: Advantages of immersion freezing for quality preservation of litchi fruit during frozen storage. *LWT-Food Sci. Technol*., **60**, 948-956 (2015).
21. Ko S.H., Hong G.P., Park S.H., Choi M.J., Min S.G.: Studies on physical properties of pork frozen by various high pressure freezing process. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.,* **26**, 464-470 (2006).
22. Barbut S., Zhang L., Marcone M.: Effect of pale, normal, and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. *J. Appl Poult Resl.,* **84**, 797-802 (2005).
23. AOAC: Official methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA (1995).
24. Hwang I.G., Jeong H.J., Lee J.S., Kim H.Y., Yoo S.M.: Influences of freezing and thawing temperature on the quality characteristics of mashed red pepper. *Korean J. Food Nutr.*, **25**, 691-696 (2012).
25. Kang B.S., Kim D.H., Lee O.S.: A study on the changes of pork quality by freezing and thawing methods. *Korean J. Culinary Res.*, **14**, 286-292 (2008).
26. Jo Y.J., Jang M.Y., Jung Y.K., Kim J.H., Sim J.B., Chun J.Y., Yoo S.M., Han G.J., Min S.G.: Effect of novel quick freezing techniques combined with different thawing processes on beef quality. *Korean J. Food Sci. An*., **34**, 777-783 (2014).
27. Boonsumrej S., Chaiwanichsiri S., Tantratian S., Suzuki T., Takai R.: Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. *J. Food Eng.*, 80, 292-299 (2007).
28. Alizadeh E., Chapleau N., De Lamballerie M., Lebail A.: Effects of freezing and thawing processes on the quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *J. Food Sci*., **72**, E279-E284 (2007).
29. Xia X., Kong B., Liu J., Diao X., Liu Q.: Influence of different thawing methods on physicochemical changes and protein oxidation of porcine longissimus muscle. *LWT-Food Sci. Technol*., **46**, 280-286 (2012).
30. Yu L.H., Lee E.S., Jeong J.Y., Paik H.D., Choi J.H., Kim C.J.: Effects of thawing temperature on the physicochemical properties of pre-rigor frozen chicken breast and leg muscles. *Meat Sci.*, **71**, 375-382 (2005).
31. Oliveira M.R., Gubert G., Roman S.S., Kempka A.P., Prestes R.C.: Meat quality of chicken breast subjected to different thawing methods. *Braz. J. Poult. Sci.*, **17**, 165-172 (2015).
32. Tejada L., Sánchez E., Gómez R., Vioque M., Fernández-salguero J.: Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. *J. Food Sci.*, **67**, 126-129 (2002).
33. Guo M., Jin T.Z., Yang R., Antenucci R., Mills B., Cassidy J., Scullen O.J., Sites J.E., Rajkowski K.T., Sommers C.H.: Inactivation of natural microflora and inoculated *Listeria innocua* on whole raw shrimp by ozonated water, antimicrobial coatings, and cryogenic freezing. *Food Control*, **34**, 24-30 (2013).
34. Bhaduri S., Cottrell B.: Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7103-7109 (2004).
35. Haughton P.N., Lyng J., Cronin D., Fanning S., Whyte P.: Effect of crust freezing applied alone and in combination with ultraviolet light on the survival of *Campylobacter* on raw chicken. *Food Microbiol.*, **32**, 147-151 (2012).
36. Nauta M., Hill A., Rosenquist H., Brynestad S., Fetsch A., van der Logt P., Fazil A., Christensen B., Katsma E., Borck B., Havelaar A.: A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. *Int. J. Food Microbiol*., **129**, 107-123 (2009).
37. Stavros G.M., Skandamis P.N.: Effect of frozen storage, different thawing methods and cooking processes on the survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in commercially shaped beef patties. *Meat Sci.*, **101**, 25-32 (2015).
38. Speck M.L., Ray b.: Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: A review. *J. Food Prot.,* **5**, 333-336 (1977).
39. Song M.S., Lee S.J.: Effect of freezing/thawing cycles on physical properties of beef. *Food Eng. Prog.*, **6**, 101-108 (2002).
40. Garénaux A., Ritz M., Jugiau F., Rama F., Federighi M., de Jonge R.: Role of oxidative stress in *C. jejuni* inactivation during freeze-thaw treatment. *Curr. Microbiol*., **58**, 134-138 (2009).
41. Yamamoto S.A., Harris L.J.: The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.,* **67**, 89-96 (2001).
42. Jeong J.Y., Kim G.D., Yang H.S., Joo S.T.: Effect of freeze-thaw cycles on physicochemical properties and color stability of beef *semimembranosus* muscle. *Food Res. Int.*, **44**, 3222-3228 (2011).