

**초고압처리기술(High Pressure Processing :
HPP)을 이용한 생굴의 유해 미생물과 바이러스 제거
기술개발 및 제품개발**

Product Development and Inactivation of Contaminated
Bacteria and Norovirus in Live Oyster by High Pressure
Processing (HPP)

해진물산주식회사

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “초고압처리기술(High Pressure Processing : HPP)을 이용한 생굴의 유해 미생물과 바이러스 제거 기술개발 및 제품개발”에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 월 일

주관연구기관명	해진물산(주)
주관연구책임자	손 석 민
연 구 원	김 종 일
연 구 원	노 재 민
연 구 원	황 덕 용
연 구 원	이 선 화
연 구 원	정 영 주
보 조 연 구 원	주 진 용
위탁연구기관명	부경대학교
위탁연구책임자	이 명 숙
연 구 원	김 아 름
연 구 원	최 유 리

요 약 문

I. 제 목

초고압처리기술(High Pressure Processing : HPP)을 이용한 생굴의 유해 미생물과 바이러스 제거 기술개발 및 제품개발

Product Development and Inactivation of Contaminated Bacteria and Norovirus in Live Oyster by High Pressure Processing (HPP)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

굴은 쉽게 변질되며, 유해미생물이나 바이러스에 쉽게 오염되는 특성을 가지고 있어 가공, 유통 중 부적절한 온도 조건으로 인하여 품질저하가 빨리 일어나는 단점으로 생물 상태로는 유통이 매우 취약한 수산식품이다.

이 같은 굴을 가열 살균하면 안전한 제품을 공급할 수 있으나 가열처리에 따른 생굴 본래의 독특한 풍미와 조직감의 변질 때문에 바람직하지 않으므로, 굴의 원래품질을 유지하면서 유해 미생물이나 바이러스를 효과적으로 살균할 수 있는 새로운 가공 방법의 개발이 필요하다.

특히 식중독을 일으키는 노로바이러스의 경우 국내에서도 알렸지만 미국과 유럽 등에서는 식중독을 유행시키는 주요 원인으로 부각되며 이슈가 된 바이러스로 가열하지 않은 수산물, 채소 등이 오염원으로 보고 되고 있다.

생굴의 수입국인 일본에서도 생굴에 노로바이러스가 검출되고 있고 노로바이러스로 인해 식중독 환자수가 급격하게 증가하여 한국산 생식용 굴에 대해 수입 금지 조치 등이 이루어진 점 등을 볼 때 수출 확대와 국민건강을 위해서 바이러스 및 미생물의 살균이 가능한 신개념의 기술개발이 반드시 요구된다.

초고압기술은 물을 압력매체로 높은 정수압을 이용한 신개념의 식품가공기술로서 기존의 열처리와 화학첨가물을 이용한 식품가공기술과 달리 열처리를 하지 않고 천연으로 식품고유의 맛, 영양소, 향 등의 파괴가 거의 없이 보다 안전하게 소비자에게 제공할 수 있는 비열 식품가공기술이다.

현재 해진물산(주)에서 보유중인 초고압처리(high pressure processing ; HPP) 장비를 활용하여 유해미생물 및 바이러스를 안전한 수준까지 감소시킬 수 있는 최적 가공조건(압력, 시간, 온도)과 살균공정 확립을 통하여 국민이 안심하게 섭취할 수 있고 수출에 기여할 수 있는 제품을 개발하여 식품발전에 이바지하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 목표와 내용

- 유해 미생물 및 노로바이러스의 생굴 내 잔존유무를 객관적으로 증명할 수 있는 검사법 연구
 - 유해 미생물 진단법 개발
 - 노로바이러스 대체 바이러스 진단법 개발
 - HPP의 적용에 따른 생굴의 가공적성 분석
 - HPP 처리후 발생하는 관능적 변화분석

- HPP 기술을 활용하여 유해 미생물 및 바이러스를 사멸할 수 있는 최적 가공조건 연구
 - 유해 미생물 및 바이러스 사멸 조건
 - 관능적 변화를 최소화한 최적 가공 조건 및 탈각조건

- HPP 기술을 이용한 유해 미생물 및 노로바이러스를 사멸하는 살균공정 확립
 - 생굴제품 포장조건에 따른 최적 가공조건 개발
 - 유해 미생물 및 바이러스 사멸을 위한 생산 공정시스템 개발

- 최적화된 초고압 공정을 이용한 안전한 생굴의 제품개발 및 상업화
 - 비열처리 생굴의 시장성 조사 및 홀셀, 하프셀 시제품 생산
 - 보존기간 연장 확인 및 설정
 - 유통을 위한 포장디자인 개발
 - 생굴제품 생산 및 사업화 계획 수립
 - 생굴제품의 처리/판매 후 품질 관리

2. 연차별 연구 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용
1차년도	유해미생물 및 노로바이러스의 생굴 내 잔존유무를 객관적으로 증명할 수 있는 검사법 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 유해 미생물 진단법 개발 • 노로바이러스 대체 바이러스 진단법 개발 • HPP의 적용에 따른 생굴의 가공적성 분석 • HPP 처리후 발생하는 관능적 변화 분석
2차년도	HPP 기술을 활용하여 유해 미생물 및 바이러스를 사멸할 수 있는 최적 가공조건 연구 및 1차 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> • 유해 미생물 및 바이러스 사멸 조건 • 관능적 변화를 최소화한 최적 가공 조건 및 탈각조건 • 비열처리 생굴의 시장성 조사 • 보존기간 연장 확인 및 설정 • 기존 포장디자인 renewal
3차년도	HPP 기술을 이용한 유해미생물 및 노로바이러스를 사멸하는 살균공정 확립 및 2차 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> • 생굴제품 포장조건에 따른 최적 가공조건 개발 • 유해 미생물 및 바이러스 사멸을 위한 생산 공정시스템 개발 • 보존기간 연장 확인 및 설정 • 최종제품 포장디자인 개발 • 생굴제품 생산 및 사업화 계획 수립 • 생굴제품의 처리/판매 후 품질 관리

IV. 연구개발결과

1. 초고압처리기

초고압처리기는 당사(해진물산주식회사)에 설치된 Avure 사(QFP215L-600AT/미국)의 초고압기(High Pressure Processing : HPP)를 사용하였으며, 구성은 다음과 같다.

- HPP는 주압력장치와 압력강화장치, 물 공급장치, 공기 공급장치로 구성되며, 주압력장치 내부의 고압실에 초고수압이 형성
- 초고압력 물을 물공급라인을 통하여 주압력장치에 공급되도록 구성
- 공기공급장치에서 발생하는 공기를 공기공급라인을 지나 주압력장치에 연결되도록 구성
- 압력강화장치에서 주압력장치의 작동을 위해 기름을 공급하는 라인을 통하여 기름이 공급
- 주압력장치는 밀폐 가능함은 물론 초고수압에 견딜 수 있도록 구성되어 있을 뿐 아니라 가공 및 살균하고자 하는 원료와 가공물을 외부에서 용이하게 넣고 빼낼 수 있도록 구성
- 모든 작동과정은 프로그램 조작 컴퓨터를 이용하여 사전에 입력한 자료에 의하여 작동스 크린을 통하여 자동으로 작동가능하게 구성되어있음.

2. 유해미생물 진단법 개발

HPP 처리를 이용한 생굴의 유해 미생물 살균 조건을 검토하기 위하여, HPP 처리 시간과 압력, 수온 등을 달리하여 세균수 변화를 비교하고, 굴의 보존성 및 병원성 미생물 검사를 실시하였다.

먼저 HPP 처리시간(holding time)을 동일압력조건에서 60, 180, 360sec로 하였을 때 세균수의 변화는 거의 없는 것으로 확인되었고 처리수온을 5, 15, 30℃로 하였을 때 온도가 높을수록 세균은 감소하였지만 차이가 크지 않았다.

하지만 HPP 처리 압력에 따른 살균력은 처리시간 90sec에서 수온15℃, HPP 처리압력 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000bar로 각각 처리한 후 미생물을 측정된 결과, 세균수 기준으로 대조군에서 39,000 cfu/g, 1000bar 일 때 32,000 cfu/g, 2000bar 일 때 9,600 cfu/g, 3000bar 일 때 900 cfu/g, 4000bar이상에서는 모두 <100 cfu/g 로 확인되었다.

이 같은 결과로 이전의 실험에서 확인된 처리시간이나 가압온도(수온)에 비해 압력의 정도에 따른 살균력이 훨씬 큰 것으로 확인되었으며, 특히 4000bar 이상에서는 세균의 살균정도가 99.7% 이상으로 매우 우수한 것으로 확인되었다.

HPP 처리압력에 따른 보존성 비교는 HPP 조건을 처리시간 90sec, 수온15℃, 압력은 총 6가지(1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000bar)로 각각 처리한 후 2일 간격으로 총 10일간 세균 수 변화를 확인한 결과, 대조군과 비교할 때 1000bar 에서는 차이를 보이지 않았으나 2000bar부터는 초기미생물의 감소와 HPP 처리 후 injured cell의 재 증식이 억제되었음을 알 수 있었다.

3. 노로바이러스 대체바이러스 진단법 개발

노로바이러스(Norovirus)는 인간의 장을 숙주로 증식하는 바이러스로 보통의 바이러스 배양 방법으로는 배양 시킬 수가 없다. 이러한 이유로 노로바이러스의 검출 및 배양에 많은 어려움을 겪고 있다.

이에 본 연구과제에서는 노로바이러스와 Calicivirus 과에 속하면서 단일가닥의 RNA를 가지는 유전학적, 생화학적, 물리화학적인 특성이 유사한 Feline calicivirus(FCV)와 Murine norovirus(MNV)를 노로바이러스의 대체 모델로 이용하여 연구하였다.

바이러스의 배양조건 연구 결과 feline calicivirus는 CrFK, Murine norovirus는 Raw 264.7 murine macrophage에 감염을 일으키며 각 숙주세포에 cytopathic effect를 일으켜 숙주로부터 분리할 수 있다.

바이러스를 정량적으로 검토하기 위한 방법으로는 plaque assay를 이용하여, 세포단층에 바이러스를 감염시켜 plaque 생성 개수에 의해 바이러스를 정량적으로 검출했으며, 감염의 유무의 판단으로 통계학적으로 감염가를 측정하는 TCID₅₀ 방법으로도 바이러스를 정량적으로 검출하는 방법을 검토하였다.

4. HPP처리 후 발생하는 관능적 변화분석

탈각하지 않은 굴을 HPP 처리하여 외관(색상), 향, 맛, 조직감, 기호도를 확인한 결과 압력과 수온에 따라 변화가 있었다. 압력과 수온이 낮을수록 관능적인 변화는 적은 것으로 평가되었으며, 특히 수온이 높을 경우 관능상태(특히 외관)가 비 처리 대조군에 비해 많이 떨어지는 것으로 평가되었다.

외관평가결과에서 보면 5점 만점기준 3000bar에서 수온이 15℃일때 3.6점, 30℃일때 1.4점으로 결과의 차이가 큰 것이 확인되었고, 압력정도에 따라서도 15℃ 수온기준으로 2000, 3000, 4000bar에서도 4.4, 4.1, 3.5 로 압력이 높아질수록 관능적 변화가 큰 것으로 평가 되었다. 탈각한 굴의 경우에도 탈각하지 않은 굴에 비해 관능 종합평가 점수가 “2000bar 4.4 : 4.3, 3000bar 4.1 : 3.8 , 4000bar 3.5 : 3.3” 으로 관능적 변화가 더 큰 것으로 평가되었다.

색도변화는 무처리구와 비교하였을 때, HPP 처리 시 Lightness(명도)는 무처리 51.07±0.53에서 2000bar일 때 54.24±0.74, 4000 bar일때 59.88±0.66로 압력이 높아질수록 증가하는 경향을 보였고, redness(적색도)는 무처리-1.38±0.05에서 4000bar 일때 -1.17±0.031으로 큰 차이는 보이지 않았으나 약간 감소하였다.

물성변화는 굴에 HPP 처리를 하여도 깨짐성(Fracturability), 부착성(Adhesiveness), 탄력성(Springiness), 응집성(Cohesiveness)에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 복원성(Resilience)은 압력 증가에 따라 다소 증가하였다. 특히 단단함(Hardness), 겹성(Gumminess), 씹힘성(Chewiness), 전단력(Share Force)은 2000 bar에서는 무처리구에 비해 감소하였으나, 3000 bar와 4000 bar에서 압력이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 즉, 전반적으로 단단해지는 경향을 나타냈다.

5. 유해미생물 사멸조건

HPP 처리압력 조건에 따른 유해미생물 변화를 확인해본 결과 이전 실험결과와 아래 표에서 나타나는 것과 같이 압력이 높을수록 살균력이 높아지며, 처리시간이 길어질수록 살균효과가 좋아지는 것을 재확인할 수 있었다.

특히 HPP 압력조건이 동일하더라도 “대장균, 황색포도상구균, 리스테리아모노사이토제네스, 살모넬라, 비브리오” 5종 유해미생물의 종류에 따라 감소율에 차이가 있었으며, 낮은 압력 조건에서는 황색포도상구균과 살모넬라의 감소율이 가장 낮았고, 3,000bar에서 120sec 이상 처리할 경우 실험대상 모든 미생물의 감소율이 95% 이상으로 확인되었다.

이 같은 실험결과 볼 때 5종의 위해미생물에 대한 HPP 처리 최소 조건은 3,000bar에서 120sec 이상으로 판단된다.

구 분	대조군	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
	초기균수	120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
<i>Escherichia coli</i>	2.6x10 ⁵	6.2x10 ⁴	1.0x10 ⁴	7.8x10 ³	3.8x10 ³	2.4x10 ³	4.2x10 ³	2.8x10 ³	1.1x10 ³	8.0x10 ²
감소율(%)		76.15%	96.15%	97.00%	98.54%	99.08%	98.38%	98.92%	99.58%	99.69%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4x10 ⁵	1.1x10 ⁵	6.4x10 ⁴	2.4x10 ⁴	4.2x10 ³	2.2x10 ³	3.8x10 ³	2.3x10 ³	1.2x10 ³	4.0x10 ²
감소율(%)		52.17%	73.33%	90.00%	98.25%	99.08%	98.42%	99.04%	99.50%	99.83%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.6x10 ⁵	1.2x10 ⁴	1.0x10 ⁴	8.6x10 ³	5.4x10 ³	3.8x10 ³	2.8x10 ³	2.2x10 ³	1.6x10 ³	1.4x10 ³
감소율(%)		92.50%	93.75%	94.63%	96.63%	97.63%	98.25%	98.63%	99.00%	99.13%
<i>Salmonell typhimurium</i>	4.8x10 ⁵	1.4x10 ⁵	5.1x10 ⁴	1.8x10 ⁴	1.2x10 ⁴	7.0x10 ³	5.7x10 ³	2.0x10 ³	1.4x10 ³	1.0x10 ³
감소율(%)		70.83%	89.38%	96.25%	97.50%	98.54%	98.81%	99.58%	99.70%	99.79%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.9x10 ⁵	2.7x10 ⁴	1.5x10 ⁴	7.5x10 ³	4.6x10 ³	3.4x10 ³	2.2x10 ³	1.2x10 ³	9.0x10 ²	6.0x10 ²
감소율(%)		85.79%	92.11%	96.05%	97.58%	98.21%	98.84%	99.37%	99.53%	99.68%

6. 대체바이러스 사멸조건

압력 및 처리 시간에 따른 FCV 사멸정도를 측정한 결과 Holding time 180sec 동안 4.8 log TCID₅₀/ml 농도의 FCV 시료를 6가지 압력 (1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000 bar) 으로 pretest 한 결과 1,000 bar에서는 차이를 보이지 않았으나, 2,000 bar 부터 50.79 % 감소되기 시작하여 4,000 bar에서는 바이러스가 100% 사멸되는 것으로 확인되었다.

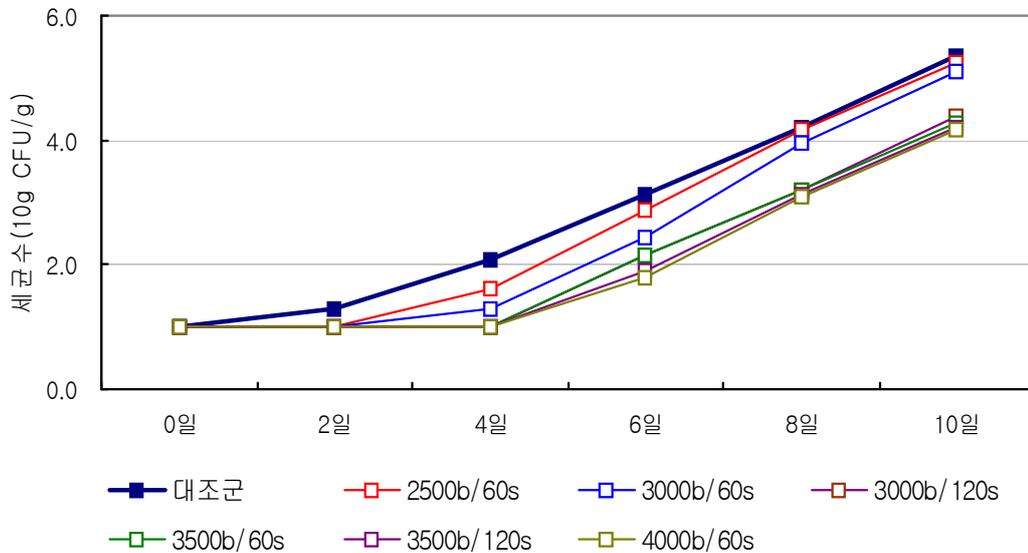
Pretest 결과를 바탕으로 FCV가 감소되기 시작하는 압력인 2,000 bar 부터 모두 사멸되는 4,000 bar 사이의 압력과 시간을 세분화 시켜 Plaque assay와 TCID₅₀을 통해 변화를 관찰하였으며 그 결과 pretest와 마찬가지로 HPP 처리 압력이 높아짐에 따라 FCV 감소율 또한 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 3,500 bar 부터 99 % 이상의 감소율을 나타내었고 4,000 bar에서 100 % 의 감소율을 보였다. HPP 처리시간에 따른 감소율을 비교해보면 같은 압력 내에서 60 초 간격으로 처리시간을 두었을 때, 처리시간 연장에 따른 FCV 감소율은 크지 않은 것을 볼 수 있었다.

따라서, 종합적인 결과 처리 시간의 연장보다 압력의 증가에 FCV가 더 큰 영향이 받는 것으로 판단되며, 이와 같은 결과로 볼 때 낮은 압력에서 긴 시간 holding time을 두는 것 보다 높은 압력에서 단시간 holding time을 두는 것이 노로바이러스 감소에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

7. 관능적 변화를 최소화한 최적 가공.탈각조건 및 보존성 연장확인 연구

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴의 탈각율 변화를 확인한 결과 2,500bar에서 2분 처리하였을 때 50개중 46개(92%)가 탈각되었으며, 3분 처리하였을 때는 48개(96%)가 탈각되었다. 3,000bar이상에서는 모두 손으로 쉽게 탈각되는 것으로 확인되었다.

보존성은 HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴을 2일 간격으로 총 10일간 세균수 변화를 확인한 결과 아래그림 에서 나타난 결과와 같이 압력과 시간이 증가할수록 미생물의 증식이 억제되었음을 알 수 있었다. 특히 8일 경과시점에서 3,000bar 1분 이하 압력조건에서 처리한 것과 2분 이상 처리한 것의 차이가 뚜렷하게 나타났다.



이 같은 결과로 3,000bar 1분 이상 압력조건에서 2분 이상 처리하면 보존성이 대조군과 비교할 때 2일 이상 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

8. 비열처리 생굴의 포장디자인 개발 및 시장성 조사

1) 포장디자인 개발

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴을 원래의 형태(홀셀) 그대로 마켓에서 판매하기 위해서는 HPP 후 굴이 쉽게 탈각되는 문제를 해결하기 위한 새로운 포장방법이 필요하므로, 아래 그림과 같이 탈각하지 않은 굴에 수축필름을 씌운 후 수축시킨 다음 HPP로 압력 처리한 결과 수축비닐을 벗기면 껍질과 굴이 쉽게 분리되었지만 벗기지 않은 상태에서는 분리되는 문제가 없도록 포장방법을 개발하였다.



2) 시제품 생산을 위한 HPP 조건 설정

시제품 생산을 위한 HPP 압력처리 조건은 그동안의 연구한 결과를 토대로 유해미생물 및 노로바이러스의 감소율이 높으면서 탈각이 용이하고, 관능변화는 적고, 보존성 또한 안전하게 섭취할 수 있는 상태를 확인하여 최적의 HPP 처리조건을 아래표와 같이 도출하였다.

구 분	적정기준	압력조건(수온 15℃)	최적 처리조건
관능상태	종합평가 4.5점 이상	3,000bar 2분 이하	압력: 3,000bar 시간: 2분 수온: 15℃
영양성분	-	4,000bar 1분 이하	
유해미생물	95%이상 살균	3,000bar 2분 이상	
FCV	95%이상 감소(TCID ₅₀)	3,000bar 1분 이상	
탈 각	100% 탈각	3,000bar 1분 이상	
보존성	8일경과 세균수 10*10 ⁴ 이하	3,000bar 1분 이상	
	8일경과 관능상태 4.5점 이상	3,000bar 2분 이하	

3) 최종소비자를 대상으로 한 기호도 분석

탈각하지 않은 원료 굴을 최적 처리조건(3,000bar, 2분, 15℃)으로 초고압 처리한 후 포장용기에 500g 씩 포장한 다음 맛, 신선도, 가격, 구매의사에 대해 조사를 실시하였다.

조사결과 5점 만점기준 종합점수가 맛과 신선도는 각각 4.3점, 4.5점으로 높게 나타나 상품성은 좋은 것으로 평가되었으나, 제시된 소비자 가격이 비교적 높은 것으로 평가되어 보통 점수인 3.0점으로 나왔고 구매의사 또한 3.4점으로 보통 수준보다 약간 높은 것으로 확인되었다.

연령대별 조사결과를 보면 맛의 경우 30대가 4.1점인데 비해 40대와 50대는 4.4점, 4.5점으로 상대적으로 높게 나타났으며, 소비자 가격에 대한 평가는 30대 3.3점, 40대 3.1점, 50대 2.6점으로 연령이 높을수록 가격에 대한 점수가 낮게 평가되었다. 가장 중요한 구매의사에서는 40대3.5점, 30대3.4점, 50대3.3점 순으로 큰 차이 없이 비교적 낮게 나타났다. 이 같은 평가결과는 맛과 신선도는 좋으나 가격이 높아 구매의사를 떨어뜨리는 결과가 나타났음을 알 수 있었으므로, 소비자가 인하를 위한 원가절감 방안마련이 필요할 것으로 파악된다.

9. 굴의 포장/가공 조건에 따른 최적 가공조건 및 유해미생물과 바이러스 사멸을 위한 생산공정 시스템 개발

굴은 해양오염에 취약하며, 쉽게 변질되는 특성을 가지고 있어 양식, 가공, 유통 중 부적절한 관리로 인하여 품질저하가 빨리 일어나는 단점으로 생물 상태로는 유통이 매우 취약한 수산식품이다.

본 연구를 통해 굴의 원래의 품질을 유지하면서 병원성 미생물이나 바이러스를 효과적으로 살균할 수 있도록 양식단계서부터 최종 소비자가지의 전 단계에 걸쳐 관리 가능한 최적의 가공조건을 수립하였으며, 특히 해양오염으로 인한 식중독균이나 노로바이러스 등의 경우에는 양식장에서 오염되었을 경우 가열하지 않고 이를 제거할 수 있는 방법이 현재까지는 사실상 없었는데 초고압처리기술을 이용해 이 같은 문제를 해결하였다.

주요관리지표로는 양식장관리, HPP처리조건 관리, 작업자 및 작업도구 위생관리, 이물질관리, 작업장 및 보관시설온도관리 등이며 제품의 가공방법에 따라 탈각굴, 홀셀등 별도의 관리계획을 수립하였다.

공정	관리항목	기준	방법	주기	기록관리
굴입하	병원성미생물 해양생물독소 화학오염물질	FDA지정해역에서 수확한 패류만 입고	패류채취증명서 확인	매입고시	지정해역증명서 , 굴원료 인수기록서
용수	가공용수	세균수: <50/100ml 대장균군: 음성 병원성균: 음성	미생물검사	월 1회	미생물 검사성적서
		먹는물기준에 적합(단, 해수의 경우 소금함량 제외)	국가공인기관 검사의뢰	년 1회	먹는물 검사성적서
HPP처리	압력	3000BAR	HPP 압력확인	매 가동시	HPP작업일지
	가압시간	120초	HPP 가압시간 확인		
	가압수온	15±1℃	HPP 가압수온 확인		

위 표는 원료 및 가공용수에 대한 관리기준과 HPP처리 기준을 설명한 것으로 모든 공정에 같은 방식으로 관리기준을 마련하였다.

10. 초고압처리 시제품의 품질관리

초고압 처리기술 HPP(High-Press processing) 처리 최적공정 확립에 따른 시제품 안전성을 검토하기 위하여 시제품을 대상으로 유해미생물 5종(*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*)의 주기적인 위생검사를 실시하였다.

각 시료샘플은 탈각된 굴을 HPP 처리 최적화 조건 (3,000bar/2분)으로 처리하여 생굴내 일반세균수 검사 및 유해미생물 검출 여부를 비교분석하였다. 모든 실험의 대조구는 HPP 처리를 하지 않은 시료를 이용하였으며, 8회 반복 실험하여 결과를 비교하였다.

먼저 HPP 처리 유무에 따른 굴의 일반세균수를 확인한 결과 압력 처리 전(대조구)보다 처리 후(시험구)의 세균수가 약 1log 적게 검출되어 HPP처리를 함으로써 평균 88.15% 세균 감소 효과를 얻을 수 있다.

HPP 처리 유무에 따른 대장균 변화는 동일한 압력 처리 조건으로 처리된 시료로 8회 시험하였으며 압력처리를 하지 않은 굴 (대조구)에서 대장균이 3회 검출되었으나 압력처리를 한 굴 (시험구)은 모두 불검출 되었다. 이에 따라 압력처리가 대장균 사멸에 영향을 미치는 것으로 확인되었으며 유해미생물 사멸에 압력처리가 유효한 것으로 판단된다.

황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스, 살모넬라, 장염비브리오 등 다른 유해미생물은 처리 전 시료와 처리 후 시료 모두 불검출이었으며 압력처리 유무에 관계없이 굴에 존재하지 않았음을 확인하였다.

11. 생굴제품 생산 및 사업화

굴은 해양오염에 취약하며, 쉽게 변질되는 특성을 가지고 있어 양식, 가공, 유통 중 부적절한 관리로 인하여 품질저하가 빨리 일어나는 단점으로 생물 상태로는 유통이 매우 취약한 수산식품이다.

굴을 가열살균하면 저장기간은 연장시킬 수 있으나 가열처리에 따른 생굴 본래의 독특한 풍미와 조직감의 변질 때문에 바람직하지 않다.

“9 생굴의 포장/가공 조건에 따른 최적 가공조건 및 유해미생물과 바이러스 사멸을 위한 생산공정 시스템 개발” 연구결과에서와 같이 굴의 원래품질을 유지하면서 병원성 미생물이나 바이러스를 효과적으로 살균할 수 있도록 양식단계서부터 최종 소비자가치의 전 단계에 걸쳐 관리 가능한 최적의 가공조건을 수립하였다.

이 같은 연구결과를 토대로 굴 제품을 안전하게 생산할 수 있는 시스템이 만들어졌으며, 해외 영업을 통해 기존 거래중인 일본 바이어로부터 1차로 40pt 컨테이너 1대 분량을 주문받아 수출을 위한 본 제품 생산을 할 수 있었다.

HPP 살균처리된 냉동 I.Q.F굴을 지난 2011년 5월에 일본 TW TRADING CO., LTD 사에 처음 수출하였다. 수출량은 19ton 이며, 금액은 USD120,600 이다.

용도는 일본인들이 냉동굴을 샴샤브해서 먹을 때나 굴튀김으로 먹을 때 완전 익힐 경우 맛이 없고 튀김의 경우 빵가루가 검게 타는 문제로 표면만 익혀 섭취하다보니 굴의 내장에 있던 노로바이러스나 유해세균으로 발생하는 식중독 사고가 매년 적지 않았으며, 사망하는 사례까지 발생되었다.

기존 거래중이던 현지 바이어에게 HPP 살균처리된 I.Q.F 냉동굴을 제안하였으며, 제안이 긍정적으로 받아들여 수출할 수 있게 되었다.

향후 판매계획은 I.Q.F냉동굴, 홀셀, 탈각굴 등 제품을 국내 CVS, 중.소형마켓, 일식당유통전문기업과 일본, 홍콩 등 냉동굴 또는 하프셀 유통전문 기업 등에 적극적 홍보로 판매를 확대해나갈 계획이며, 2011년 겨울부터 2012년 봄까지 450백만원을 1차 목표로 해서 2013년 겨울부터는 년 1,600백만원을 목표로 영업을 전개해나갈 계획이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획

굴이나 식품 등에 잔존해 있는 위해미생물이나 바이러스 등을 제거하거나 유통 중 생육을 억제하는 방법으로 그동안 전통적으로 가열 등의 물리적 방법이나 식품 소독제나 방부제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔음

이에 따라 세계적으로 여러 가지 비열처리 기술(non-thermal process)에 대한 연구와 실용화가 이루어지고 있으며, 비열처리 가공기술 중 초고압처리기술(high pressure processing ; HPP)은 UV살균 등 기존 비열처리 살균방법에 비해 월등히 높은 살균력을 가지는 것으로 이번 연구결과 확인되었음.

본 연구를 통해 HPP 초고압 처리기술을 도입함으로써 수산식품 뿐만 아니라 식품산업 전반에 보다 안전한 제품 공급을 위한 연구를 진행 할 수 있는 계기가 마련되었으며, 이 같은 결과가 식품 유통망 확대에 실질적으로 기여될 수 있을 것으로 보여짐.

2. 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

본 과제를 통해 획득된 HPP초고압 처리기술과 이 기술로 생산된 굴 제품에 대한 홍보를 관련업체에 기술개발 결과에 대한 전단을 제작하여 배포할 계획이며, 국내 유통·판매 시 판매대에 HPP 초고압 처리기술에 대한 POP등을 제작하여 홍보할 계획임..

추가로 본 과제 종료 후 6개월 이내에 HPP초고압 처리기술을 알리기 위한 홍보를 개시할 계획이며, HPP초고압 처리기술을 이용한 살균기술의 특성 및 기준을 수산식품과 관련된 식품공전에 기재될 수 있도록 하여 이 기술을 관련업체에서 합법적으로 사용하도록 할 예정임.

3. 특허·논문 등 지식 재산권 확보계획

특허출원

초고수압처리기술을 이용하여 생굴의 유해미생물과 노로바이러스를 제거하는 방법(출원 번호: 10-2010-0089329)

□ 논문게재

- Feline calicivirus에서 항바이러스 활성을 가지는 천연식물자원 탐색 / 2009. Journal of Life Science. 19(7)
- Antiviral Activity of Seaweed Extracts against Feline Calicivirus / 2010. Fish Aqua Sci. 13(2)

4. 추가연구 및 타 연구에 활용계획

앞서 언급한 바와 같이 비가열 신선식품의 소비량이 점차 증가하고 있는 현시점에 이러한 식품으로 인한 식중독의 위험은 증가할 수밖에 없고 소비자들에게 미치는 영향 또한 지대한 것으로 여겨짐.

그러나 비가열 식품이라는 특성을 지닌 어류, 육류, 채소, 과일, 생식 등 여러 신선식품은 최소한의 가열 공정만을 거치게 되므로 식품원료 내에 존재하는 미생물 또한 그대로 유지될 수밖에 없는 문제점을 내포하고 있음.

따라서 현재의 가열살균 기술로는 적용하기 힘든 각종 개별식품에 대해 HPP초고압처리 기술을 적용하여 연구를 진행할 계획이며, 대표적으로는 해외에서 현재 판매되고 있는 육류제품, 비가열 음료, 즉석섭취식품 등이 이에 해당됨.

5. 연구기획사업

본 과제의 종료 후 1년 이내에 HPP초고압처리 기술을 이용한 위해 세균살균 기술을 워크샵 등을 통하여 업계를 대상으로 발표하고자 하며, 특히 국내 식품업계의 관련분야 비가열 전문가 양성을 위한 사업 등에 적극적으로 활용할 계획임.

SUMMARY

(영문 요약문)

1. High Pressure Processing (HPP)

The High Pressure Processing (HPP) by Avure (QFP215L-600AT/U.S.A), which was installed by HAEJIN CO., LTD., was used, and its composition is as follows.

- HPP is composed of Main Pressure Device, Pressure Intensive Device, Water Supply Price and Air Supply Device, and High Pressure Part inside Main Pressure Device forms high pressure.
- High Pressure Water is supplied to Main Pressure Device through the water supply line.
- Air created at Air Supply Device is supplied to Main Pressure Device through the air supply line.
- Pressure Intensive Device supplies oil which makes Main Pressure Device to operate through an oil-supplying line.
- Main Pressure Device keeps airtight and resists to high pressure, and materials or processed products which need to be sterilized can be easily inserted into it and taken out of it.
- All operation processes are programmed through computers, and it can be automatically operated through a screen according to data put in advance.

2. Development of Detection Method for Harmful Bacteria

To review sterilization conditions of harmful bacteria in fresh oyster through HPP, changes in numbers of bacteria according to different HPP holding time, pressure and water temperature were observed and compared, and storage period and viral organisms were checked.

First of all, numbers of bacteria showed almost no change when HPP holding times was varied among 60, 180 and 360sec under the same pressure. When the temperature of

processing water was made to be 5, 15 and 30°C, numbers of bacteria got decreased as temperature went up, though the change was not significant.

And, sterilization performance of HPP according to different pressures such as HPP pressure 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 and 6000bar was checked at the holding time of 90sec and at the temperature of 15°C. As a result of checking of number of bacteria at each pressure, number of bacteria was 39000 cfu/g in control group, 32000 cfu/g at 1000bar, 9600 cfu/g at 2000bar, 900 cfu/g at 3000bar and <100 cfu/g at 4000bar or higher.

With this result, it was confirmed that sterilization performance was affected and increased more by changes in pressure than holding time or temperature of water. Especially, at the pressure of 4000bar or higher, sterilization rate was 99.7% or higher, and this is an outstanding performance.

In comparison of storage time of HPP according to different pressures, pressure of 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 and 6000bar, were given under the same HPP condition of holding time 90sec and temperature 15°C, number of bacteria was checked once in two days over total ten days. When compared to the counter group, it didn't show any significant change at 1000bar.

However, it showed a decrease in number of bacteria and restrain in re-proliferation of injured cell after HPP at 2000bar or higher.

3. Development of Detection Method of Alternative Virus of Norovirus

Norovirus is a kind of virus, which makes the intestines of human body as its host, and it can't be cultivated under the usual cultivation method of other virus. For this reason, there are many difficulties in detecting and cultivating Norovirus.

Thus, this research was carried out by using Feline calicivirus (FCV) and Murine norovirus (MNV) since they belong to the family of Norovirus and Calicivirus and they has one strand of RNA and similar hereditary, biochemical, physical and chemical characteristics to Norovirus.

As a result of research into cultivation conditions of virus, one can know that feline calicivirus provokes infection on CrFK and murine norovirus on Raw 264.7 murine macrophage, and, by giving cytopathic effect to each host cell, one can get them to be separated from their host cell.

To perform a quantitative analysis on virus, the plaque assay was used, in which virus was infected into cell monolayer, and virus was quantitatively detected according to number of plaques created. Also, another detection method of virus, TCID₅₀, was reviewed, in which a statistical evaluation method on the infectivities is used to decide whether or not being infected.

4. Analysis on Changes in Sensory Characteristics after HPP

As a result of checking of appearance (color), scent, flavor, texture and taste of fresh oyster with its shell after HPP, we found that there were some changes according to different pressure and temperature. As pressure and temperature got down, sensory changes were small, and, especially, when temperature was high, sensory change (especially, its appearance) got deteriorated significantly compared to the counter group that didn't undergo processing.

In evaluation on appearance with the evaluation scale of which highest point is 5, the scale was 3.6 when the temperature was 15°C and 1.4 when the temperature was 30°C at the same pressure of 3000bar, and it was a significant difference. Also, according to different pressures, with the standard water temperature of 15°C, the scale was 4.4 at 2000bar, 4.1 at 3000bar and 3.5 at 4000bar, and, that is, as pressure got higher, it was found that sensory change was more significant.

The evaluation scale regarding comprehensive appearance and sensory deterioration of oyster without its shell and oyster with its shell was 4.4 and 4.3 under 2000bar, 4.1 : 3.8 under 3000bar, 3.5 : 3.3 under 4000bar, and, that is, oyster without its shell showed larger sensory change and deterioration.

In relation to color deterioration, in comparison between the unprocessed counter group and the processed group with HPP, Lightness of the unprocessed group was 51.07±0.53,

and is was increased to be 54.24 ± 0.74 at 2000bar and 59.88 ± 0.66 at 4000 bar, and, that is, it increased as pressure got higher. While the redness was -1.38 ± 0.05 in the counter group and -1.17 ± 0.031 at 4000bar, and it didn't show significant difference, but a little decrease.

In relation to physical characteristics, even after oyster underwent HPP, its fracturability, adhesiveness, springiness and cohesiveness showed little change, while its resilience increased according to an increase in pressure. Especially, hardness, gumminess, chewiness and share force was decreased at 2000 bar compared to the counter group, and, though, they were increased at higher pressure like 3000 bar or 4000 bar. That is, there was an overall tendency of hardening.

5. Conditions for Extinction of Harmful Bacteria

As a result of observing changes in numbers of harmful bacteria according to different pressure conditions of HPP, it was confirmed one more time that, as pressure went up, and holding time was increased, the sterilization performance got stronger, and you can see this result by checking the result of a former experiment and table as follows.

Especially, even if HPP pressure condition was the same, rate of decrease in number of harmful bacteria showed difference among five different bacteria, say, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus*. Under a low pressure condition, the decrease rate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* was the smallest. And, when processing was done at 3000bar for 120sec or longer, the decrease rate of bacteria in every experiment object was 95% or larger.

With this experiment result, it is concluded that the minimum HPP processing time for above five harmful bacteria is 120sec under 3000bar.

Bacteria	Counter Group	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
	Number of Bacteria at the beginning	120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
<i>Escherichia coli</i>	2.6x10 ⁵	6.2x10 ⁴	1.0x10 ⁴	7.8x10 ³	3.8x10 ³	2.4x10 ³	4.2x10 ³	2.8x10 ³	1.1x10 ³	8.0x10 ²
Decrease Rate (%)		76.15%	96.15%	97.00%	98.54%	99.08%	98.38%	98.92%	99.58%	99.69%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4x10 ⁵	1.1x10 ⁵	6.4x10 ⁴	2.4x10 ⁴	4.2x10 ³	2.2x10 ³	3.8x10 ³	2.3x10 ³	1.2x10 ³	4.0x10 ²
Decrease Rate(%)		52.17%	73.33%	90.00%	98.25%	99.08%	98.42%	99.04%	99.50%	99.83%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.6x10 ⁵	1.2x10 ⁴	1.0x10 ⁴	8.6x10 ³	5.4x10 ³	3.8x10 ³	2.8x10 ³	2.2x10 ³	1.6x10 ³	1.4x10 ³
Decrease Rate(%)		92.50%	93.75%	94.63%	96.63%	97.63%	98.25%	98.63%	99.00%	99.13%
<i>Salmonell typhimurium</i>	4.8x10 ⁵	1.4x10 ⁵	5.1x10 ⁴	1.8x10 ⁴	1.2x10 ⁴	7.0x10 ³	5.7x10 ³	2.0x10 ³	1.4x10 ³	1.0x10 ³
Decrease Rate(%)		70.83%	89.38%	96.25%	97.50%	98.54%	98.81%	99.58%	99.70%	99.79%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.9x10 ⁵	2.7x10 ⁴	1.5x10 ⁴	7.5x10 ³	4.6x10 ³	3.4x10 ³	2.2x10 ³	1.2x10 ³	9.0x10 ²	6.0x10 ²
Decrease Rate(%)		85.79%	92.11%	96.05%	97.58%	98.21%	98.84%	99.37%	99.53%	99.68%

6. Conditions for Extinction of Alternative Virus

To take measurement on FCV extinction rate according to different pressure condition and holding time, a pretest was carried out, in which FCV sample in a concentration rate of 4.8 log TCID₅₀/ml was checked under 6 different pressure conditions like 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 and 6000 bar. As a result, any significant difference or change was not seen at 1000 bar, but, number of virus decreased significantly by 50.79% at 2000 bar, and it become extinct by 100% at 4000 bar.

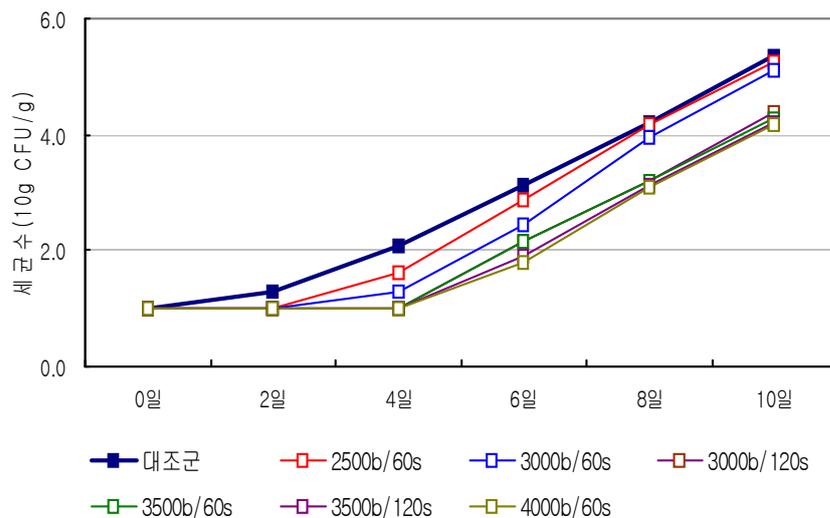
Based on the pretest result, pressure and holding time was segmented between the pressure of 2000 bar at which FCV started to decrease and the pressure of 4000 bar at which it became totally extinct, and changes were observed through plaque assay and TCID₅₀. The result was the same with that of the pretest, and one could see that, as processing pressure of HPP was increased, the decrease rate of FCV got larger. The decrease rate was 99% or larger at 3500bar, and it was 100% at 4000 bar or higher. Then, changes in the decrease rate according to different HPP holding times were observed, and it was found that, even though holding time was extended by 60 seconds under the same pressure, the decrease rate of FCV wasn't got larger significantly.

Thus, as a comprehensive conclusion, it can be said that number of FCV is more affected by increase of pressure than an extension of holding time, and that Norovirus is decreased by a larger rate when giving high pressure for a short period of holding time than giving low pressure for a long period of holding time.

7. Conditions for Optimal Processing & Shelling Method which Minimizes Sensory Deterioration & Research on Extension of Storage

As a result of checking the shelling rate of oyster after High Pressure Processing, when 50 pieces of oyster was processed for 2 minutes under 2500bar, 46 pieces (92%) were shelled. When the same are processed for 3 minutes, 48 pieces (96%) were shelled, and, when processed under 3000 bar, all of them were easily shelled with the hand.

To evaluate storage rate of oyster that was processed with HPP, changes in number of bacteria was checked once in two days for overall ten days. As a result, it was found that, as pressure increased, proliferation of bacteria got restrained, and you can check this result from following picture. Especially, there was a significant difference at the time of the 8th day between the one that was processed for 1 minute of time at 3000 bar and another that was processed for 2 minutes of time or longer.



From this result, we can see that, if processing is done for 2 minutes of time at 3000 bar, storage time can be extended for two days when compared to the counter group.

8. Development of Packaging Design of Fresh Oyster & Research on Its Marketability

1) Development of Packaging Design

In order to market oyster as it is after HPP processing, a new packaging method was needed, which could solve the problem of frequent shelling of oyster after HPP.

Thus, a new packing method was developed, and, for this method, the contraction vinyl is used. As you can see from the picture below, the contraction vinyl is wrapped over oyster with its shell attached to be contracted, and then, the oyster is processed with HPP processing. With this method, when the contraction vinyl is taken off, flesh of oyster is easily separated from its shell. Though, if the vinyl isn't taken off, the oyster would maintain its form and appearance with its outer shell attached.



2) Set-up of HPP Conditions for Manufacturing of Prototype Products

Based on research results so far, HPP pressure conditions for manufacturing of prototype products are reviewed. Such conditions should make possible to reduce harmful bacteria and Norovirus, to shell oyster easily, to reduce sensory deterioration, to extend storage period and to consume oyster in a safe way, and, by considering these factors, the optimized HPP processing conditions are described in the following table.

Category	Standards	Pressure Condition (Water Temperature 15°C)	Optimal Processing Condition
Sensory Characteristics	Comprehensive Evaluation Scale 4.5 or Higher	3,000bar below 2 minutes	Pressure: 3,000bar Holding time: 2 minutes Water Temperature: 15°C
Nutritions	-	4,000bar below 1 minute	
Harmful bacteria	Sterilization over 95%	3,000bar above 2 minutes	
FCV	Decrease over 95% (TCID ₅₀)	3,000bar above 1 minute	
Shelling	100% Shelling	3,000bar above 1 minute	
Storage	Number of Bacteria at the 8th Day: below 10*10 ⁴	3,000bar above 1 minute	
	Sensory Status Scale at the 8th Day: above 4.5	3,000bar below 2 minutes	

3) Analysis on Taste of End Consumers

Fresh oyster with its shell was processed with HPP at the optimal processing condition (3,000bar, 2minutes, 15°C) and then packed into each 500g package. Then, a research was carried out to check evaluation by customers on its flavor, freshness, price and whether or not they have intention to re-purchase it. As a result, with the evaluation scale of which highest point is 5, flavor and freshness received 4.3 and 4.5 point respectively, relatively high points that represent high quality products. Though, customers evaluated that the price suggested was relatively high and gave 3.0 point, an average point, to evaluate it, and gave 3.4 point, a slightly high grade point, to evaluate their intention to re-purchase.

A research was also performed for each age group, and, in case of the evaluation on flavor, those in their 30s gave 4.1 point and those in their 40s and 50s gave 4.4 and 4.5 respectively, relatively higher points. In evaluation on the suggested retail price, those in their 30s gave 3.3 point and those in their 40s and 50s gave 3.1 and 2.6 respectively, and this shows that, as customers became older, their evaluation point on the price got lower. In evaluation on their intention to re-purchase, the most important matter to be evaluated, those in their 30s, 40s and 50s gave 3.4, 3.5 and 3.3 point respectively, and all of them gave similar point and showed relatively low intention. This tells us

that customers were attracted to the flavor and the degree of freshness, but, they were not willing to re-purchase due to the high price. Thus, it is understood that ways to cut down cost of production, and thus, to decrease the retail price have to be suggested.

9. Conditions of Optimal Processing Method according to Characteristics of Packaging/Processing of Fresh Oyster & Development of Manufacturing System to Kill Harmful Bacteria & Virus

Oyster is vulnerable to marine pollution and deteriorates easily. It has the shortcoming of easy deterioration of quality in the process of farming, processing and circulation due to inappropriate handling, and it is very hard to market and circulate fresh oyster.

Through this research, the optimal processing conditions were established, by which it is possible to sterilize bacteria or virus of oyster effectively and to control its quality from its farming stage through its consumption stage by end consumers while maintaining its quality. Also, so far, there have been no other solution in case of that oyster is contracted with salmonella or Norovirus in the process of farming due to marine pollution than to heat the contracted oyster to kill such virus. Though, when HPP technology is used, such problem can be solved effectively.

Principal Standards for Management were established, including management on farming ground, HPP processing conditions, hygiene of workers and work tools, foreign substance and temperature of work places and storage facilities. Also, separate management standards were established according to different processing methods of oyster such as shelled oyster or whole-shell.

Processing	Management Category	Standards	Method	Cycle	Management of Record
Arrival of Oyster	* Bacteria & Virus * Toxicity from Marine Organisms * Chemical Toxic Substances	Warehousing of only such shell that was caught in waters designated by FDA	Check of Certificate on Catch of Shell	at every warehousing time	Certificate of Designated Waters, Record on Acceptance of Oyster Material
Supply of Water	Processing Water	* Number of Bacteria: <50/100ml * Number of Colon Bacillus: Negative * Number of Virus: Negative	Check-up on microorganism	once a month	Examination Result on Microorganism
		Meet the standards of drinking water (But, in case of sea water, content of salt is excluded.)	Test request to Nationally Acknowledged Test Facility	once a year	Examination Result on Drinking Water
HPP	Pressure	3000BAR	Check of HPP Pressure	at each operation time	HPP Work Record
	Holding Time	120SEC	Check of HPP holding time		
	Pressure Water Temperature	15±1℃	Check of HPP Pressure Water Temperature		

Above table is to explain the management standards for raw materials and processing water and the standards for HPP processing, and those standards are established in the same way for all the processing stages.

10. Quality Control on HPP Prototype Product

To review safety of prototype products produced by the optimal HPP process system, a periodic sanitary examination was carried on prototype products to check five harmful bacteria including *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*.

Samples of shelled oyster was processed with the optimal HPP process condition (3,000bar/2min), and then, number of germs and harmful bacteria in fresh oyster was examined and analyzed. The sample of all the counter groups weren't processed with HPP, and 8 times of experiments were carried out to compare result of each experiment.

First of all, as a result of checking of usual germs in oyster in case of undergoing HPP

processing and in case of not undergoing it, the number of normal germs after Pressure Processing was smaller by approximately 1log than the number before Pressure Processing, and this shows that the number of germs can be decreased by 88.15% at an average with the help of HPP processing.

In relation to changes in number of *Escherichia coli*, samples that were processed with the same pressure condition were tested 8 times. Among samples that weren't pressure-processed, *Escherichia coli* was detected three times, but, among those which were pressure-processed, *Escherichia coli* was detected from none of them, and this proves that Pressure Processing helps to kill *Escherichia coli* and harmful bacteria.

Other harmful bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* weren't detected from samples before and after Pressure Processing, and it is confirmed that such bacteria don't live on oyster regardless of undergoing Pressure Processing.

11. Manufacturing of Fresh Oyster Products & Commercialization

Oyster is vulnerable to marine pollution and deteriorates easily. It has the shortcoming of easy deterioration of quality in the process of farming, processing and circulation due to inappropriate handling, and it is very hard to market and circulate fresh oyster.

When oyster is heated and sterilized, its storage time can be extended, but, the unique scent and taste of fresh oyster is ruined, and its texture is also changed, and thus, it can't be considered as a good way of processing.

As you can see from the above Clause 9. Conditions of Optimal Processing Method according to Characteristics of Packaging/Processing of Fresh Oyster & Development of Manufacturing System to Kill Harmful Bacteria & Virus, through this research, an optimal processing conditions were established, by which it is possible to sterilize bacteria or virus of oyster effectively and to control its quality from its farming stage through its consumption stage by end consumers while maintaining its unique quality.

Based on these research results, it was possible to create a safe manufacturing system for oyster products, and then, we took the first order for oyster products in the quantity of one 40ft container from one of our Japanese customers through overseas marketing activity and commenced to manufacture products to be sold to the overseas market.

We exported refrigerated I.Q.F Oyster that was sterilized with HPP to TW TRADING CO., LTD., a Japanese company, for the first time in 2011 May. The export quantity was 19tons, and the export amount was USD120,600.

Each year in Japan, there are frequent outbreaks of food poisoning accidents from Norovirus or other harmful bacteria that might exist in intestines of oyster, since Japanese people like eating oyster by heating its surface only when making Shabu-shabu dishes or fries with refrigerated oyster to avoid deterioration in taste or burning on bread crumb, and there were several cases in which those contracted with food poisoning from oyster died.

Then, we suggested I.Q.F Oyster with HPP sterilization processing to the local buyer in Japan, and the buyer accepted our suggestion, and then, we could export our products to that buyer.

In the future to come, we plan to sell oyster products including I.Q.F Refrigerated Oyster, Whole-shell and Shelled Oyster to domestic CVS stores, medium and small-scale markets, Japanese Restaurants and Specialized Food Companies and various Specialized Companies of Refrigerated & Half-shell in Japan and Hong Kong by doing active promotion activities. And, our first sales goal is 450 million won starting from 2011 winter to 2012 spring, and we will keep doing our active marketing activities with the sales goal of 1.6 billion won per year starting from 2013 winter.

CONTENTS

(영문목차)

Summary

Chapter 1. Outline of Task of Research & Development

Clause 1. Purpose & Range of Research & Development

1. Final Objectives of Research & Development

2. Needs of Research & Development

Chapter 2. Current Conditions of Domestic & Overseas Technical Development

Clause 1. Current Conditions of Domestic & Overseas Technical Development

Clause 2. Status at Current Conditions of Domestic & Overseas Technical Development

Chapter 3. Accomplishment & Result in Research & Development

Clause 1. High Pressure Processing (HPP)

Clause 2. Development of Detection Method for Harmful Bacteria

Clause 3. Development of Detection Method of Alternative Virus of
Norovirus

Clause 4. Analysis on Changes in Sensory Characteristics after HPP

Clause 5. Conditions for Extinction of Harmful Bacteria

Clause 6. Conditions for Extinction of Alternative Virus

Clause 7. Conditions for Optimal Processing & Shelling Method which Minimizes Sensory
Deterioration & Research on Extension of Storage

Clause 8. Development of Packaging Design of Fresh Oyster & Research on
Its Marketability

Clause 9. Conditions of Optimal Processing Method according to Characteristics of
Packaging/Processing of Fresh Oyster & Development of Manufacturing System
to Kill Harmful Bacteria & Virus

Clause 10. Quality Control on HPP Prototype Product

Clause 11. Manufacturing of Fresh Oyster Products & Commercialization

Chapter 4. Accomplishment of Purpose & Contribution to Relevant Fields

Clause 1. Purpose of Research & Development & Accomplishment

Clause 2. Contribution to Technical Development of Relevant Fields

Chapter 5. Result of Research & Development & Plan for Application

Clause 1. Plan for Practical Use & Industrialization

Clause 2. Plan for Diffusion of Technology including Education, Instruction & Promotion

Clause 3. Plan for Reservation of Intellectual Property Rights including Patent & Thesis

Clause 4. Plan for Additional Research & Application to Other Researches

Clause 5. Research & Project Business

Chapter 6. Overseas Scientific Technology & Information Collected through Research & Development Process

Chapter 7. Reference

목 차

요약문

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 최종목표
2. 연구개발의 필요성

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

제 2 절 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 초고압처리기

제 2 절 유해미생물진단법 개발

제 3 절 노로바이러스 대체 바이러스 진단법 개발

제 4 절 HPP처리후 발생하는 관능적 변화분석

제 5 절 유해미생물 사멸조건

제 6 절 대체바이러스 사멸조건

제 7 절 관능적 변화를 최소화한 최적 가공.탈각조건 및 보존성 연장확인 연구

제 8 절 비열처리 생굴의 포장디자인 개발 및 시장성 조사

제 9 절 생굴의 포장/가공 조건에 따른 최적 가공조건 및 유해미생물과 바이러스 사멸을 위한 생산공정 시스템 개발

제 10 절 초고압처리 시제품의 품질관리

제 11 절 생굴제품 생산 및 사업화

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 달성도

제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화·산업화 계획

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

제 3 절 특허·논문 등 지식 재산권 확보계획

제 4 절 추가연구 및 타 연구에 활용계획

제 5 절 연구기획사업

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

생굴내에 잔존해 있는 유해 미생물 및 노로바이러스 등을 신가공기술인 비열처리 초고압기술을 이용하여 안전한 수산제품을 생산하기 위한 효과적인 살균법 개발과 식품산업에 대한 적용성 검토 및 유통 가능한 생굴의 제품개발을 통해 국내시장 및 해외수출 확대에 기여

- feline calicivirus (FCV) 또는 murine calicivirus (MCV)를 이용하여 노로바이러스의 대체 모델 바이러스 이용 및 검출법 개발
- 유해미생물 및 바이러스(노로바이러스)의 생굴내 잔존 유무를 객관적으로 증명할 수 있는 검사법 연구
- 초고압(high pressure processing, HPP) 장비를 활용하여 유해미생물 및 바이러스를 사멸할 수 있는 최적 가공조건(압력, 시간, 온도) 연구
- 초고압 공정을 이용한 유해미생물 및 바이러스(노로바이러스)를 사멸하는 살균공정 확립
- 굴의 관능적 변화를 최소화한 최적 가공조건 확립
- 최적화된 초고압 공정을 이용한 안전한 생굴의 제품개발 및 상업화

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

(1) 기술적 측면

□ 수산가공·유통 기술

- 굴은 쉽게 변질되는 특성을 가지고 있어 가공, 유통 중 부적절한 온도 조건으로 인하여 품질저하가 빨리 일어나는 단점으로 생물 상태로는 유통이 매우 취약하여 가공기술의 개발이 필수적임.
- 다른 가공품에 비하여 유통 중에 미생물 오염, 영양성분 파괴 뿐 만 아니라, 효소활성으로 인하여 맛, 색, 향 등의 손실이 초래되어 보존기간이 짧고 유통조건이 까다로워 소비자의

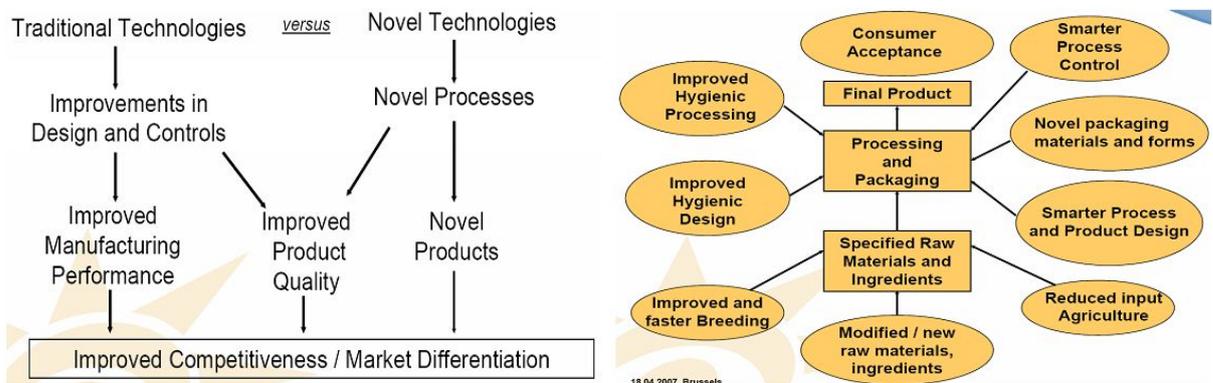
불만이 높음.

- 우리나라에서는 생굴의 유통기간에 대한 법적 규제가 없으나, 일본에서는 생굴의 유통기간을 10℃에서 4일로 규정함.
- 굴을 가열살균하면 저장기간을 연장시킬 수 있으나 가열처리에 따른 생굴 본래의 독특한 풍미와 조직감의 변질 때문에 바람직하지 않음.
- 굴의 원래품질을 유지하면서 병원성 미생물이나 부패성 미생물을 효과적으로 살균할 수 있는 새로운 가공 방법의 개발이 필요함.
- 편의지향, 맛지향, 건강지향성을 유지하는 식품가공기술이 발달함에 따라 기존의 가열살균을 대체할 수 있는 기술, 즉 가열에 의한 영양성분 파괴, 기호성 저하, 가열취 생성 및 조직감 상실 방지를 위한 가공기술이 각광을 받음.
- Hurdle technology를 활용한 최소 가공기술 및 초고압, 전기장, 자기장, 초음파 등을 활용한 비열처리 가공기술 및 박테리오신 등 항균성 펩타이드를 이용한 보존기술의 보편화가 이루어질 것으로 전망되며 신선식품에 대한 욕구가 증가하므로 천연의 신선함을 보존하는 기술인 첨단 CA 저장 기술, 냉각저장기술, 고압, 전기장 및 자기장을 이용한 보존 기술의 발전이 예상됨.
- HPP는 부패를 일으키는 미생물을 불활성화시켜 식품산업의 경제적 이점을 가져다 줄 수 있는 식품의 보존기한을 연장시킬 수 있는 기술임.
- 하지만 HPP를 통과한 굴의 표면 검은 테두리가 쉽게 벗겨지고 외관으로 볼 때 육이 약간 흐물거리는 등 관능적인 문제가 있음.
- 한국 및 일본 소비자의 경우 이 같은 관능적 변화에 대해 긍정적이지 못하므로 개선을 위한 기술개발이 필요함.
- HPP 기술개발은 수출 확대와 국민건강을 위해서 가열 등 현재까지 미생물 및 바이러스를 제어하는 방식과 차별화될 수 있는 방법으로, 빠른 시일내에 연구개발이 이루어져야 할 것으로 판단됨.

• 비열가공기술의 응용분야

Demonstrated Effects	HPP	PEF	HIL	US
Quality and flavour improvements over thermally processed products	✓	✓	✓	✓
Equivalent level of food safety to thermal pasteurisation	✓	✓	✓	
Improved nutrient retention	✓	✓		✓
Shelf-life extension	✓	✓	✓	
Can create 'new' product textures	✓			
Uniform treatment of food, regardless of shape or size	✓			
Can be used as a continuous process	✓	✓	✓	✓
Can be used for in-pack foods	✓		✓	
May be useful for uniform freezing to improve quality of frozen foods due to the immediate formation of tiny ice crystals	✓			
May assist in avoiding production peaks and lags via potential to hold stock	✓	✓		
Can be used for solid foods	✓		✓	
Can be used for liquid foods	✓	✓	✓	
Has the potential to reduce energy consumption (in comparison to pasteurisation)	✓	✓		
Suitable for decontamination of food contact materials like process surfaces, bottles, trays and other equipment			✓	
Suitable for washing systems				✓
Can be coupled with other processes	✓	✓	✓	✓
Process efficiency improvements			✓	

• 미래 식품생산 및 가공기술 트렌드



□ 비세균성 식중독 원인균(노로바이러스)

- 최근에 노로바이러스로 명명된 Norwalk-viruses(NLV)는 전 세계적으로 널리 분포되어 있는 가장 일반적인 장염 발생의 원인 바이러스로 알려져 있으며, 비세균성 장염의 약 60% 이상의 발병 원인균임.
- 미국과 같은 선진국에서도 급성 설사 및 구토 등의 질병을 유발시키는 일반적인 바이러스로 보고되고 있으며 2001년 미국 질병관리본부(Center for Disease Control and Prevention (CDC))의 조사에 의하면 미국에서 발생하는 수질관련 장염환자의 약 70% 이상, 식품관련 장염환자의 50% 이상이 노로바이러스에 의해 발병되는 것으로 밝혀짐.
- 노로바이러스의 보건 및 위생의 중요성으로 인하여 미국 환경부(Environmental Protection

- Agency (EPA))의 중요한 수인성 미생물 (Contaminant Candidate List,CCL)로 지정됨.
- 식중독을 일으키는 노로바이러스는 국내에서는 최근 알려지기 시작했지만 미국과 유럽 등에서는 식중독을 유행시키는 주요 원인으로 부각되며 이슈가 된 바이러스임.
 - 장염 원인 바이러스의 주된 오염원으로는 어패류로 보고되고 있으며, 특히 국내에서도 여름철 생굴에 의한 바이러스식중독 사례가 보고되고 있음.
 - 노로바이러스는 분변 등과 같은 오염에 의해 전파되어지는데, 식품과 물의 오염, 사람과 사람에 의한 오염이 주된 오염경로 알려짐.
 - 1-100 입자만으로도 발병이 가능하고 2차 감염으로 인해 대형 식중독을 유발할 가능성이 높지만 면역이 형성되지 않아 반복적 감염 발생하며 원인 바이러스는 약제, 열 등에 내성이 있어 제어가 어려움.
 - 정부당국의 노력에도 불구하고 집단 식중독 발생은 증가추세에 있고 바이러스에 의한 식중독 환자의 숫자도 계속 증가하고 있으며 이는 실제로 환자가 증가했을 수고 있지만 검출기술의 발달과 함께 과거에는 밝혀지지 않고 미확인으로 분류되던 것이 확인되고 있기 때문인 것으로 추측됨.

표. 우리나라의 노로바이러스 식중독 발생 현황

구분	'03	'04	'05	'06	'07
전체 발생건	135	165건	109건	259건	510건
노로바이러스 식중독건	11건(8.1%)	14건(8.5%)	7건(6.4%)	51건(19.7%)	97건(19.0%)

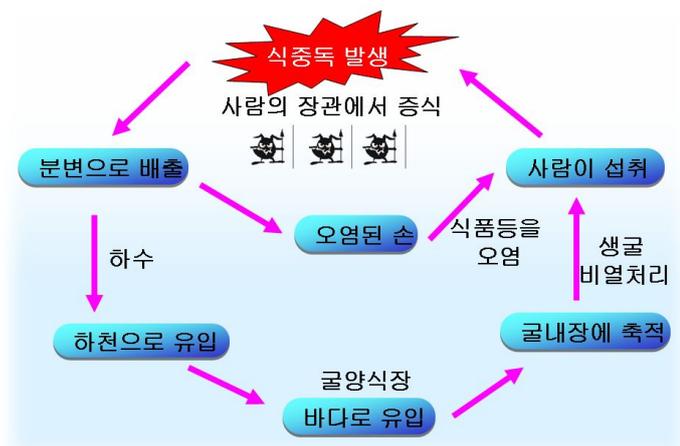


그림. 우리나라의 노로바이러스 식중독 발생 현황

□ 노로바이러스의 검출방법

- 노로바이러스는 식품 및 환경에 의한 식중독 문제를 야기하여 해산물로부터 노로바이러스를 검출하는 연구가 약 10년 전부터 진행되어 왔으며 해산물 중에도 패류 특히 굴에 대한 연구가 집중되고 있음.

- 인체 노로바이러스(human norovirus)는 1990년대 중반 이후 보건학적 중요성이 크게 부각되었으나, 현재까지 배양방법이 개발되어 있지 않아 국내외에서 분자생물학적 연구가 많이 진행되지 못함.
- 노로바이러스 검출방법
 - ① 식중독 바이러스를 검출하는 가장 일반적인 방법은 조직배양을 이용하여 바이러스를 분리해내거나 전자현미경을 이용해서 관찰
 - ② 노로바이러스는 사람에게 감염을 일으키는 노로바이러스는 사람 장관내에서만 증식이 가능하며, 동물이나 세포에서는 증식할 수 없으므로 이를 이용하여 바이러스를 배양할 수 없음
 - ③ 전자현미경(EM) 및 면역전자현미경(IEM)의 경우, 검출한계가 환자분변 1ml 당 약 100만 입자는 되어야 관찰이 가능하므로 식품에 적용이 불가능함. (10^6 particles/ml)
 - ④ enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법은 로타바이러스와 아데노바이러스의 경우 임상시료에 한하여 사용되고 있음. ($10^5 \sim 10^6$ particles/ml)
 - ⑤ 노로바이러스와 아스트로바이러스의 경우, 최근 ELISA법이 개발되었으나 검출 가능한 노로바이러스 변이주가 한정되고 검출한계가 낮아 일반적인 검출에 사용되기 어려움.
 - ⑥ 인체항체 등을 이용한 RIA, EIA 등의 면역학적 방법의 경우는 민감도가 떨어져서 RT-PCR 등을 이용한 분자생물학적 방법이 가장 흔하게 사용되고 있고 있으나 PCR 검출법으로 바이러스가 가지고 있는 유전자 검사만 가능하며, 바이러스의 감염력 유·무를 측정할 수는 없음. (20~100 molecules/reaction)
- RT-PCR을 이용한 식품내의 노로바이러스 검출의 단점
 - ⑦ 식품 중에는 오염된 바이러스의 양이 극미량이므로 많은 양의 식품을 사용해서 분석할 수 있는 식품 추출물의 농축기술이 요구됨.(항체를 이용한 immunomagnetic separation (IMS) 방법 등)
 - ⑧ 식품 중에는 다양한 물질이 존재하고 이들 중 일부는 RT-PCR을 위한 중합효소의 발해물질로 작용하므로 RT-PCR을 하기 전에 식품 중의 방해물질을 제거해야 하지만 이들의 제거가 용이하지 않음.
 - ⑨ 노로바이러스의 경우, 염기서열의 변이가 심하여 모든 노로바이러스를 증폭할 수 있는 일반적인 primer가 개발되어 있지 않음.
- 현재까지 공인된 노로바이러스 검사법으로 굴, 식품용수에 적용 (식품의약품안전청 고시 제 2007-10호, 식품 등 기준 및 규격이 설정되지 아니한 물질의 시험법을 제정 고시, 굴 중 노로바이러스)

□ 첨단기술로서의 고압처리기술

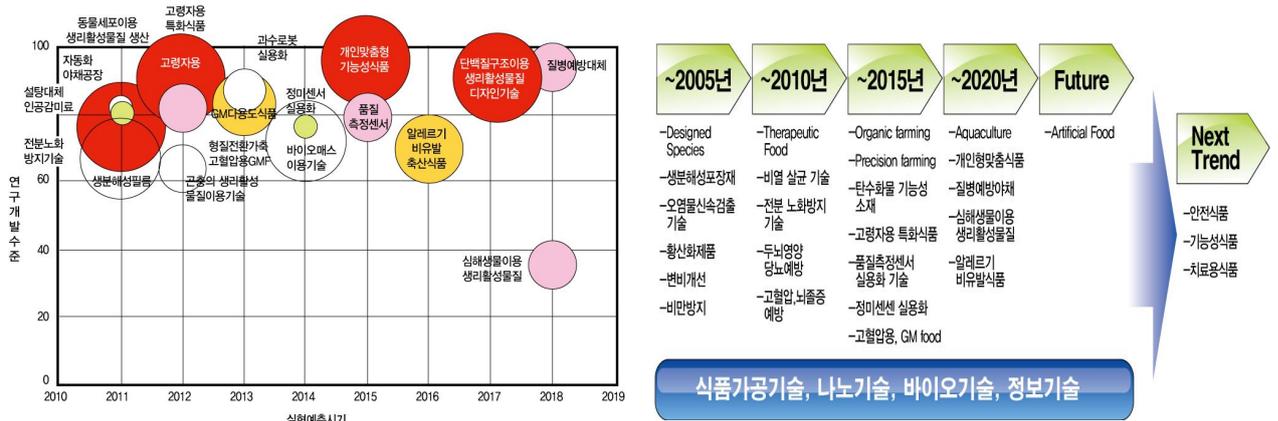


그림. 식품산업의 기술흐름.

- 대부분의 식품은 가열처리에 의해 저장성을 확보하게 되는데 가열처리에 의한 살균 및 가공과정은 식품의 조직감 및 풍미를 저하시키며 신선식품의 경우 그 이용이 제한적임.
- 비가열 처리는 식품의 품질에는 영향을 미치지 않으면서 살균, 가공, 조리가 가능한 새로운 식품가공 기술로 주목받고 있음.
- High Pressure Processing 처리 기술
 - ① 초고압기술은 물을 압력매체로 높은 정수압을 이용한 신개념의 식품가공기술로서 기존의 열처리와 화학첨가물을 이용한 식품가공기술과 달리 열처리를 하지 않고 천연으로 식품고유의 맛, 영양소, 향 등의 파괴가 없이 보다 안전하게 소비자에게 제공할 수 있는 비열 식품가공기술임.
 - ② 상온에서 미생물을 살균하고 효소를 불활성화 시키면서도 풍미, 조직감, 영양 성분의 변화를 최소화하여 원래 제품의 품질을 유지할 수 있기 때문에 고품질·고기능성 제품에 대해 고압을 이용한 비열처리 가공방법의 활용도가 높아져 주목을 받고 있음.
 - ③ HPP 기술은 식품의 조직감, 외형 및 향을 유지하면서 식품의 안전성을 보장해줄 수 있는 첨단기술 및 최소가공기술임.
 - ④ HPP는 부패를 일으키는 미생물을 불활성화시켜 식품산업의 경제적 이점을 가져다 줄 수 있는 식품의 보존기한을 연장시킬 수 있는 기술임.
 - ⑤ 다양한 식품을 HPP 기술에 적용 시킬 때 발생하는 민감한 문제 등은 원칙적으로 미생물 오염을 줄이기 위해 요구되는 압력이나 식품 효소의 잔여 압력에 대한 저항 때문에 발생하는 단백질 변성 때문이고 이러한 문제는 앞으로 해결해야할 것임.
- 초고압 처리가 갖는 주요 장점
 - ① 열처리가공에 비해 현저히 적은 열에너지를 소비하여, 상온 또는 저온에서 실행 가능함
 - ② 고압살균 처리된 식품은 천연의 맛과 향미, 색, 신선도를 유지할 수 있음
 - ③ 모든 방향에서 압력이 균일하게 작용하므로, 처리 정도의 차이가 존재하지 않음
 - ④ 미생물 사멸 되에도 단백질의 변성 또는 변형, 효소활성화 또는 불활성화, 효소기질

특이성 변화, 탄수화물과 지방의 특성변화 등을 유도할 수 있음

- ⑤ 공유결합이나 수소결합에 영향을 주지 않음
- ⑥ 초고압 가공처리는 플라스틱 필름과 같은 파우치 형태의 bag을 이용할 수 있어 실험을 용이하게 할 수 있음

(2) 경제·산업적 측면

□ 국내 굴 양식산업 현황

- 우리나라의 굴은 미국 식품의약품안전청(FDA)에서 그 우수성을 인정받고 있음. (식품의약품(FDA) 지정해역: 2만5,799 ha)
- 굴은 양식을 통해 대량생산이 가능하고 천해양식 수산물 중에서 2005년 기준으로 생산량과 수출량 모두 2위를 차지할 만큼 우리나라 수산물 중에서 대표적인 비교우위 품목임.
- 해안(특히 남해안) 어민들의 중요한 수익원으로 많은 지역민이 굴양식, 가공 등으로 생계를 유지하고 있음.
- 냉동굴의 경우 2001년 수산물로서는 처음으로 산업자원부로부터 세계 일류 상품으로 선정 되었음.
- 우리나라 우수한 굴의 수출 및 내수증진을 통해 어민이 소득을 증대시키기 위해서는 가열 처리 하지 않은 상태의 굴을 안전하게 먹을 수 있는 기술개발이 절실히 요구됨.
- 하지만 생굴의 일본 수출동향(주요 수출국)을 보면 급격하게 감소하고 있음.

년도	수출량(수출금액)
2000년	5,796ton(\$40,761,000)
2001년	6,649ton(\$46,906,000)
2002년	3,129ton(\$16,303,000)
2003년	2,795ton(\$14,120,000)
2004년	2,138ton(\$12,397,000)
2005년	1,798ton(\$11,545,000)
2006년	1,144ton(\$ 7,978,000)
2007년	460ton(\$ 2,683,000)

(자료출처 : 한국무역협회)

□ 초고압처리 기술의 적용

- 국가간 어업협정, WTO 체제의 출범, FTA 등은 국내 수산물시장의 위축을 야기시키고, 자원감소와 생산원가 상승, 인력난 등으로 수산업 전체의 부가가치는 바닥에 처해있는 실정임.
- 주요 수입국인 일본에서 생굴에 노로바이러스가 검출되고 있고 노로바이러스로 인해 식중독 환자수가 급격하게 증가하여 일본 정부에서도 한국산 생식용 굴에 대해 수입 금지 조치

등이 이루어짐.

- 국내에서도 노로바이러스에 대한 식중독의 발생건수가 해마다 증가하고 있는 실정임 (2000년도 245건에서 2005년도 274건 발생)
- 최근 선진국에서 초고압기술이 개발되어 생물소재로부터 기능성 소재의 추출과 안정성에 대한 연구가 진행되어 획기적인 결과를 얻고 있으며, 특히 유럽과 일본을 포함한 선진국에서는 상업적으로 기술을 활용하는 초기 단계에 접어들고 있음.
- 수출 확대와 국민건강을 위해서 가열 등 현재까지 미생물을 제어하는 방식과 차별화될 수 있는 바이러스 및 미생물의 살균이 가능한 신개념의 HPP 기술개발이 빠른 시일내에 수산 가공 식품에 적용되는 것이 요구됨.

□ 수산가공산업

- 수산물 가공 식품의 수요는 국민 소득향상과 식생활의 개선에 따라 단순 가공품에서 편의 위주의 소포장, 간편, 즉석 식품과 건강지향의 기능성 중심으로 고차 가공품으로 증가 추세.
- 국산원료를 사용하는 수산가공산업의 경우 원료의 생산여건을 감안할 때 비교적 생산량이 많은 어패류를 대상으로 한 산업에 집중적 노력해야 함
- 어류 다음으로 가장 큰 생산 비중을 점하고 있으며 인공 양식생산 비중이 높아 식품 산업 소재로서의 부가가치 증대에 대한 기대가 매우 큰 수산자원인 만큼 향후 다각적인 연구개발이 지속될 전망이다.
- 건강을 중시하는 웰빙 추세에 따라 소재를 고급화·다양화해 제품을 출시하고 있으며 품질 뿐 아니라 위생과 편리성을 강조한 포장기술을 도입하는 등 새로운 제품을 선보이고자 노력하고 있음.
- 수산자원은 대규모 자원이지만 가공 및 이용률이 매우 낮으므로 수산자원을 중간 소재화하여 다양한 산업에 활용이 필요함.

(3) 사회·문화적 측면(공공성 포함)

- 현대 소비자의 생활 패턴이 웰빙, 로하스로 변화하면서 지속가능한 삶의 질을 추구하면서 가공하지 않은 신선한 수산물에 대한 소비요구가 증가하고 있음.
- 국민소득의 증대에 따라 식습관이 변화하면서 고혈압, 동맥경화 등 순환기 계통의 질병 및 암의 발생률이 증가하고 있음.
- 따라서 국민보건의 차원에서 이에 대한 대책이 시급히 요망되며, 의료분야의 대응책 이외에 식생활 개선을 통한 접근이 필요하다고 사료됨.
- 현재 국내에서는 고소득사회에 따른 건강 요구형 식품의 수요가 날로 급증할 것으로 예상되며, 이에 대한 식품산업의 대비가 필요한 실정임.
- 웰빙 식품의 원조, 바다의 우유라고 할 수 있는 굴을 안전한 먹거리로 만들 수 있는 기술개발이 절실히 필요함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

□ 시스템 및 장치 개발 분야

- 초고압은 기계적 또는 화학 등에 의한 충격적 방법에 의해 얻어지며, 일반적으로는 2~3 GPa을 초과하는 높은 압력으로 정의하고 있으나, 현재 일반 공업 및 산업에서 실용화된 압력은 기계장치에서의 에너지 전달을 포함하여 100~400 MPa 정도로 하고 있음. 초고압 발생법에는 유체를 전달매체로 이상적인 정수압을 얻는 방법, 부드러운 고체 물질을 매체로 하는 준정수압을 얻는 방법, 화학의 폭발로 인한 충동파를 이용하는 방법 등이 있음.
- 초고압과 관련된 국내의 기업은 보람 IFT, 한국유수압, 어드밴스테크 등이 있으며, 안전성, 작동의 간편성, 내열성 및 내구성을 고려한 기기를 연구, 제작, 판매하고 있으며 식품가공 분야에서 응용하고 있는 고압관련 시스템 제작업체는 일신, U-Max, 디마퓨어텍 등이 있음
- 그러나 비열살균기술에 이용되는 정수압으로 압력범위인 300 MPa 이상의 압력을 발생하는 장치 및 시스템을 제작하는 업체는 전무하지만 100 MPa 발생할 수 있는 시스템을 디마퓨어텍에서 일본 동양공업의 OEM으로 생산하고 있으며 고압액화반응기라 함.
- 최근에 국내에서도 HPP에 대한 관심이 많아지고 기술개발에 대한 연구가 진행되어 몇몇 논문 및 특허가 발표되고 있으나, 대부분 국내에서 제작된 장비 또는 실험실규모의 장비를 사용하였는데 국내 장비의 경우에는 아직까지 장비에 대한 객관적인 검증기술이 확보되지 않은 상태임.
- 또한 소규모 장비(30L 이하)로 실험한 경우, 실험결과가 해진물산에서 보유하고 있는 상업적인 생산이 가능한 장비(215L)로 적용한 결과와 많은 차이를 보임.

□ 식품에 대한 초고압처리 가공분야

- 국내에서는 90년대 말부터 lab 규모의 장치를 이용하여 비열살균에 의한 저장기간 연장, 단백질, 전분 등 생체 고분자성분의 변성, 가압에 의한 반조리, 기능성 식품개발 분야 등에 응용연구를 시작하여 다양한 연구가 시도 되었으나 상업적 규모의 생산이 가능한 장치 및 시스템의 부재로 상용화가 이루어지지 못함
- 2006년에 상업적 규모의 시스템이 해진물산(주)에 도입되어 굴가공에 적용, 일본 수출 및 국내 시장에 제품 출시를 준비하고 있으며, 2007년에는 동원 F&B에 일본 미쓰비시사 초고압기가 도입되어 썬쿱이라는 즉석밥을 생산/판매하고 있음.
- 2009년에는 풀무원에서 스웨덴 NC사의 기계를 도입하여 냉장음료 제품을 생산하고 있음.

- 또한 전남생물산업지원센터에 pilot 규모의 장비로서 미국의 Avure사의 35 L급 장비가 도입되어 태평양의 인삼가공 제품에 활용되다가 규모의 문제로 2008년 1월부터 해진물산(주)에서 OEM을 하고 있음.
- 위에 밝힌 상용화 제품은 비열살균기술로서의 적용이라기보다는 신규 가공기술로서의 활용으로 상업화를 이룸

□ 노로바이러스 검사방법 관련 기술

- 바이오포커스는 1,500만엔의 연구비를 지원받고 다이니폰-스미토모 바이오메디칼이 일본 내 임상시험과 후생성 승인 등의 절차를 맡는다는 조건으로 노로바이러스 신속진단키트의 일본 판권 계약을 체결
- 정확도가 80~90% 이상으로 높고 검사 결과도 20분 이내에 얻을 수 있어 식중독 현장이나 병원 등에서 쉽게 활용 가능
- 서린바이오사이언스는 자사가 투자한 미국 회사 Kim Laboratories가 노로바이러스 신속검출 분석기법을 발표하고 밸리드체크, 노로체크 엘리사 키트, 노로체크 IMS 키트 등 신제품을 소개.

2. 국외 기술개발 현황

□ 고압을 이용한 기술

- 압력의 범위에 따라 아임계(~10 MPa), 초임계(10~40 MPa), 고압(40~100 MPa), High Pressure Homogenization(150~250 MPa) 및 초고압(100~900 MPa)으로 나누어 응용기술들이 개발되고 있으며 아임계는 주로 분석시 전처리 기술로 활용되고 있으나 현재는 천연물로부터 천연 색소나 향을 추출하는 장치나 공정개발에 집중되고 초임계는 추출 또는 분리에 상용화가 이루어 졌으며, 이를 이용한 nano입자 제조 및 NDS(nutrient delivery system) 연구에 초점이 맞추어 있음.
- 일본 및 벨기에 등에서는 고압(~100 MPa), 고온(~50℃) 조건 하에서 효소를 활용하여 가수분해를 촉진하는 기술이 개발되어 상용화 시점에 있고 나노에멀전 및 분산분야에 high pressure homogenization 기술이 실용화 되었고 초고압 기술은 식품가공의 전처리, 비열살균, 보존 및 신규한 가공기술로 활용되고 있음.
- 비열 가공 기술을 이용한 shelf-life 연장 및 응용 연구(Pulsed electric field(PEF) as a pasteurization technology, High hydrostatic pressure(HPP) for pasteurization and sterilization of food, and extraction, Pulsed light as a surface-disinfecting method 등)
- 에너지 효율이 향상되고 친환경적인 가열대체기술의 개발(Ohmic heating, Microwave, Radio-frequency, Induction heating, Infrared techniques 등)

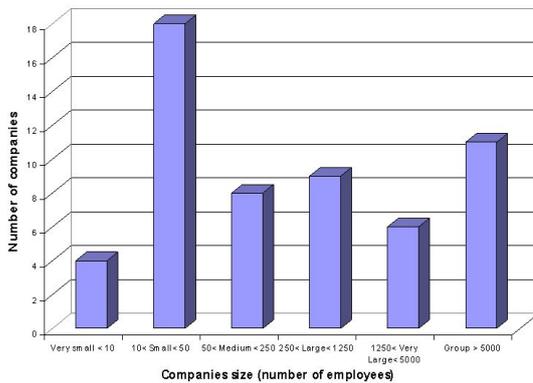
□ 식품가공 분야에 활용되는 초고압 시스템 및 장치 개발 분야

- 회분식 및 액체와 슬러리 상태의 제품을 처리하기 위한 연속식 처리장치가 개발되어 있음
- 미국, 일본 및 유럽이 주도하고 있으며 Avure(미국), Elmhurst Systems(미국), Engineered Pressure systems, Inc.(미국), Stansted Fluid Power(영국), NC Hyperbaric(스페인), 고베제강소(일본), 미쓰비시(일본) 등에서 상업적 규모의 장치를 생산하고 있음.

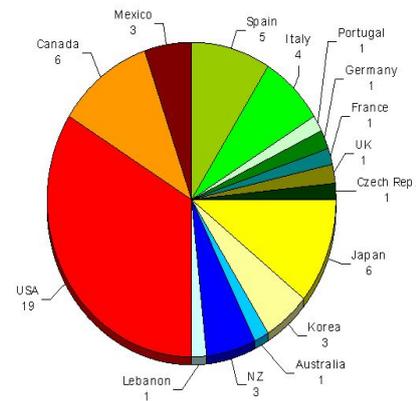
□ 식품에 대한 초고압처리 가공분야

- 고압 하에서의 생물학적/생화학적 변화를 살펴보면, 100 MPa - 단백질 해리, 세포막의 파괴, 효소반응속도의 변화 : 200 MPa - 효소의 가역적 불활성화 : 300 MPa - 미생물 사멸, 바이러스 사멸 : 400 MPa - 전분의 호화, 단백질 변성 및 침전 : 500 MPa - 효소의 비가역적 불활성화 : 600 MPa - 내열성 포자의 사멸
- 세계적으로 56개(한국 3개) 기업이 상업적 규모의 장치를 갖추고 있으며, 종업원 50명 이하의 기술 집약형 중소기업이 37%를 차지함.

■ 56 different HPP users companies known all over the world



■ Number of companies per country



□ HPP를 이용한 살균 및 가공기술

- 1990년대 일본에서 개발되기 시작 된 이후, 미국, 유럽 등 여러 국가에서 실제 식품 산업에 이용되어 2004년에는 약 100,000 톤의 식품이 HPP 기술로 가공되었음.
- 100MPa 이하의 압력 범위에서는 효소와 병합처리를 하여 채소류를 액화(일본) 또는 허브로부터 유효물질 추출을 위한 전처리(중국, 일본 등)로 활용되어 주로 소스 및 천연조미료를 만드는 친환경적인 최소가공기술로서 사용되고 있음.
- 300~700 MPa의 압력 범위에서는 친환경적인 최소가공기술의 하나인 비열살균 공정으로 일본, 유럽 및 미국 등에서 상업적으로 활용되어 제품이 생산되고 있음
- HPP 기술이 제품화되어 판매된 예는, 과일, 샐러드 드레싱, 요거트, 주스, 쌀을 이용한 가공품, 과카몰리, 햄, 즉석조리육제품 등을 들 수 있으며, 패류(굴, 랍스타, 킹크랩 등)의 탈각에도 사용되고 있음.



- HPP 기술을 이용한 살균 등 식품 가공에 다양한 연구가 진행되고 있음.
- 식품 분야별 장비를 갖추고 있는 곳과 규모를 살펴보면 육가공에 대형장치가 가동되고 있음.
- 식품 가공 분야별로 초고압 기술을 이용하는 장점은 첨부한 그림과 같음.

<육류 가공>

- Destruction of pathogens : *Listeria*, *Samonella*, coliforms...
- Shelf life increase
- Stabilisation of preservative-free or low salt content products

Country	Year	Products
Spain	1998	Sliced cooked ham and "apas"
USA	2001	Sliced cooked products and prosciutto ham
USA	2001	Poultry products
USA	2002	Pre-cooked chicken and beef strips
Spain	2002	Sliced cooked chicken, ham and turkey products, Serrano cured ham
Italy	2003	Prosciutto ham, salami & pancetta
Germany	2004	Cured and smoked sliced and diced ham
Japan	2004	Nitrites-free bacon, sausages and sliced meat
USA	2005	Ready-to-eat meat based products
Spain	2005	Cured meat products & Serrano ham
USA	2006	Cured meat products
USA	2006	Whole roasted chicken
USA	2006	Sliced cooked turkey and chicken



<채소류 가공>

- Sanitisation and shelf life increase.
- Preservation of colour, flavour and vitamins.
- Reduction of the starch retrogradation of the rice.
- Reduction of PPO activity in avocado.

Country	Year	Products
Japan	1990	Fruit jams and fruit and vegetable sauces
Japan	1994	Pre-cooked & hypoallergenic rice
USA	1997	Avocado products : guacamole, sauces
Italy	2001	Fruit jams
USA	2002	Avocado products
Mexico	2003	Avocado products
Mexico	2003	Avocado products
Mexico	2003	Avocado products
USA	2003	Sliced onions
Canada	2003	Apple products : jam and sauce
USA	2004	Tofu
Spain	2006	RTE vegetable meals
USA	2006	Tomato sauces



<해산물 가공>

- Shelf life increase
- Opening seafood shell
- Easy shellfish meat extraction
- Sanitization (inactivation of *Vibrio*)

Country	Year	Products
USA	1999	Oysters
USA	2001	Oysters
USA	2001	Oysters
USA	2001	Oysters
Canada	2004	Seafood
Canada	2004	Lobsters
N. Zealand	2004	Mussels shucking for meds
Italy	2004	Desalted cod
Spain	2004	Ready-to-eat salmon, hake & tuna
USA	2005	Lobsters
Korea	2006	Shellfish
Canada	2006	Seafood



<음료류 가공>

- Sanitisation and shelf life increase
- Destruction of pathogens microorganisms
- Preservation of colour, flavour & vitamins of freshly squeezed fruits

Country	Year	Product
Japan	1991	Grapfruit juice
Japan	1992	Mandarin juice
France	1994	Citrus juices
Mexico	2000	Citrus juices and smoothies
Lebanon	2001	Fruit juices
USA	2001	Apple juice
Portugal	2001	Apple & citrus blended apple juice
Italy	2001	Fruit and vegetable juices
USA	2002	Orange juice, lemonade and smoothies
Czech Republic	2004	Broccoli & apple, beetroot, carrot juices
Northern Ireland	2006	Smoothies



<유제품 가공-1>

■ Dairy products

- ✓ Destruction of pathogens : *Listeria*, *Samonella*, coliforms...
- ✓ Shelf life increase
- ✓ No modification of emulsion properties

■ Rodilla

- ✓ Wave 6000/120

To process cheese spreads with ingredients

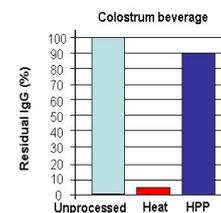


Rodilla

<유제품 가공-2>

■ HPP products under development

- ✓ Retaining bioactivity of functional components :
 - Functional foods with thermosensitive components like immunoglobulins, growth factors, lactoferrin...
 - Drinkable colostrum



□ 노로바이러스 검사방법 관련 기술

- 일본이나 독일 회사에서 수시간내 결과를 확인할 수 있는 효소면역법 진단키트를 판매하고 있으나 정확도가 60%에도 미치지 못함

제2절. 국내·외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

1. 외국의 기술수준 분석

□ HPP 초고압처리 관련기술

- 700 MPa까지 압력을 가할 수 있으며, 연속 및 상업적 규모의 장치가 개발되어 있을 뿐만 아니라 이를 활용하는 기술도 다양하게 개발되어 상용화되어 있음.
- 여러 국가에서 실제 식품 산업에 이용되어 2004년에는 약 100,000 톤의 식품이 HPP 기술로 가공됨.
- 미국 FDA에서 HPP 가공기술을 비열가공기술로 인정되어 있으며, 특히 해진물산(주)에서 보유하고 있는 Avure사의 HPP 기기의 안정성을 확인함.
- 미국, 유럽 등에서는 HPP를 활용한 연구로 1999년경부터 본격적인 상업화가 진행되어 현재 과일, 샐러드 드레싱, 요거트, 주스, 패류(굴, 랍스타, 킹크랩 등)의 탈각 등 다양하게 활용되고 있음.
- 주요제품은 보존료를 섞지 않은 햄, 비열처리 과일주스 살균, 패류 및 갑각류의 탈각 등
- 일본의 경우 굴 산업에서는 200L 이상 대형 HPP를 한국보다 늦게 도입하여 현재 기술개발이 연구되고 있는 과정으로 파악되며, 일부 가동되고 있음.

□ 노로바이러스 검사기술

- 일본이나 독일 회사에서 수시간내 결과를 확인할 수 있는 효소면역법 진단키트를 판매하고 있으나 정확도가 60%에도 미치지 못함
- feline calicivirus는 노로바이러스와 매우 유사한 바이러스로 가 발견되어 feline kidney 세포에서 신속하게 잘 배양되어 노로바이러스의 대체모델로 이용
- 폴리오마리어스의 형태가 노로바이러스와 유사하고 비슷한 크기와 구조의 RNA를 유전체로 하며 종래의 조직배양법에 의해 배양이 가능하고 RT-PCR법의 민감도가 다른 방법들보다 월등하기 때문에 폴리오마리어스 등을 모델로 이용

2. 국내 기술수준 분석

□ 초고압 관련 기술

- 장치 개발 기술은 개발되어 있지 않으며, 응용연구를 살균에 적용
- 국내에는 215L 용 1대, 150L용 1대, 30L 용 1대 및 500mL 및 1L 이하 실험실 규모 초고압

장치가 여러 대수입되어 있음

- 300~600 MPa의 압력 범위에서 국내에서는 살균보다는 전처리 공정으로 활용되어 인삼 및 쌀가공, 음료살균으로 제품이 출시되고 있음.
- 해진물산(주)의 경우 600 MPa 이상까지 압력을 올릴 수 있는 대용량(204리터) 설비를 국내에서 유일하게 보유하고 있으며, HPP 설비와 가공기술에 대한 특허 기 확보
- 고압처리를 통해 생굴의 총세균수 증식을 억제하는 방법에 대한 연구가 진행되고 있으나 상업적 방법으로 접근하지 못하고 있음

□ 노로바이러스 검사기술

- 바이오포커스는 다이니폰-스미토모 바이오메디칼이 일본 내 임상시험과 후생성 승인 등의 절차를 맡는다는 조건으로 노로바이러스 신속진단키트의 일본 판권 계약을 체결
- 정확도가 80~90% 이상으로 높고 검사 결과도 20분 이내에 얻을 수 있어 식중독 현장이나 병원 등에서 쉽게 활용 가능
- 서린바이오사이언스는 자사가 투자한 미국 회사 Kim Laboratories가 노로바이러스 신검출 분석기법을 발표하고 벨리드체크, 노로체크 엘리사 키트, 노로체크 IMS 키트 등 신제품을 소개
- 주식회사 코젠바이오텍은 multiplex-RT PCR을 이용하여 국내에서 감염성 설사질환을 유발하는 대표적인 3종의 RNA 바이러스인 아스트로바이러스, 로타바이러스, 노로바이러스 (genogroup I, II)를 신속 정확하게 검출해 내는 병원성 RNA 검출방법, 및 검출키트를 개발
- 삼성전자주식회사는 노로바이러스의 표적 서열을 증폭하기 위한 프라이머 세트, 노로바이러스의 표적 서열에 특이적으로 혼성화하는 프로브 세트, 상기 프로브 세트가 고정화되어 있는 마이크로어레이 및 상기 프로브 세트를 이용하여 노로바이러스의 존재를 검출하는 방법을 개발

3. 국내 · 외 기술수준 비교표

공정단위별 주요기술	국내 (국내수준, %)	국외 (최고수준 국가)
원료의 전처리 기술	100	미국
HPP(초고압)기술	40	미국, 유럽, 일본
노로바이러스 검사기술	60	미국, 일본
굴의 관능평가 기술	80	일본
품질관리 및 인증 체계	40	미국, 유럽, 일본
공정개발 및 검증기술	40	미국, 유럽, 일본

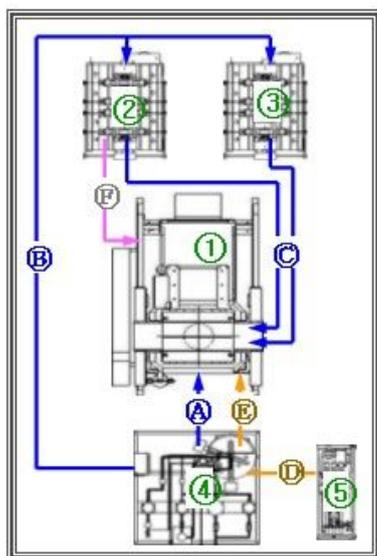
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 초고압처리기

초고압처리기는 당사(해진물산주식회사)에 설치된 Avure 사(QFP215L-600AT/미국)의 초고압기(High Pressure Processing : HPP)를 사용하였으며, 구성은 다음과 같다.

- HPP는 주압력장치(1)와 압력강화장치(2)(3), 물 공급장치(4), 공기 공급장치(5)로 구성되며, 주압력장치(1) 내부의 고압실에 초고수압이 형성
- 초고압력 물을 물공급라인(C)을 통하여 주압력장치(1)에 공급되도록 구성
- 공기공급장치(5)에서 발생하는 공기를 공기공급라인(D, E)를 지나 주압력장치(1)에 연결되도록 구성
- 압력강화장치(2)에서 주압력장치(1)의 작동을 위해 기름을 공급하는 라인(F)을 통하여 기름이 공급
- 주압력장치(1)는 밀폐 가능함은 물론 초고수압에 견딜 수 있도록 구성되어 있을 뿐 아니라 가공 및 살균하고자 하는 원료와 가공물을 외부에서 용이하게 넣고 빼낼 수 있도록 구성
- 모든 작동과정은 프로그램 조작 컴퓨터를 이용하여 사전에 입력한 자료에 의하여 작동스크린을 통하여 자동으로 작동가능하게 구성되어있음.

- ① Main Press : 제품을 넣고 압력을 가하는 메인 설비
- ② PUMP1(30XQ) : 고압력의 물을 발생시키는 장치(압력강화장치 1)
- ③ PUMP2(30XQ) : 고압력의 물을 발생시키는 장치(압력강화장치 2)
- ④ Water Module : 물을 공급하는 장치
- ⑤ Air Compressor : 에어 공급장치



제 2 절 유해미생물진단법 개발

1. 연구수행방법 및 이론

1) HPP(초고압) 처리

HPP 처리를 이용한 생굴의 유해 미생물 살균 조건을 검토하기 위하여, HPP 처리 시간과 압력, 수온 등을 달리하여 세균수 변화를 비교하고, 굴의 보존성 및 병원성 미생물 검사를 실시하였다. 각 시료샘플은 탈각된 굴을 HPP 처리 압력, 온도, holding time 및 검사시점 단위별로 각각 별도로 밀봉 포장하여 사용하였다.

① HPP 처리시간에 따른 세균수 변화

밀봉된 굴을 HPP(초고압기)에 넣어 수온 15 °C의 일정한 온도에서 3000, 6000 bar의 압력으로 시간별로 0, 60, 180, 360sec 동안 처리한 후 5 °C 냉장 보관하였다. 이를 보관일수(4일, 8일)에 따라 미생물 증식의 변화를 표준평판균수 측정법으로 검사하였다. 이 방법은 검체와 표준한천배지를 페트리접시에 혼합 응고 시켜 배양 후 발생한 세균의 집락수로부터 검체중의 세균수를 산출하였다. 시험용액 1 mL와 각 단계 희석액을 1 mL 씩 멸균된 페트리접시에 무균적으로 취하여 표준한천배지 약 15 mL를 분주하여 검체와 배지를 잘 섞고 냉장시킨 후 35 °C incubator에서 24~48시간 배양하여 검체 중에 존재하는 세균을 CFU/g로 표시하였다.

② HPP 처리온도(수온)에 따른 세균수 변화

밀봉된 굴을 HPP에 넣어 수온을 달리하여 5 °C, 15 °C, 30 °C에서 3000, 6000 bar의 압력으로 각각 90 sec 동안 처리한 후 5 °C 냉장 보관하였고 4일, 8일 경과 후 미생물 증식의 변화를 표준평판균수 측정법으로 검사하였다.

③ HPP 처리 압력에 따른 살균력 비교

HPP 처리 압력에 대한 굴의 미생물 살균력을 비교하기 위하여 탈각된 굴을 5°C 냉장상태로 7일간 보관 하여 굴의 초기 미생물수를 증가시켰다. 이를 밀봉포장한 후 15 °C의 일정한 수온에서 HPP를 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 bar의 압력으로 각각 90sec 동안 처리한 후, 미생물 수의 변화를 표준평판균수 측정법으로 검사하였다.

④ HPP 처리압력에 따른 보존성 비교

HPP 처리 압력에 대한 굴의 보존성을 비교하기 위하여 탈각된 굴을 밀봉 포장 후 15 °C의 일정한 수온에서 HPP를 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 bar의 압력으로 각각 90 sec 동안 처리한 후, 5°C 냉장보관 하면서 2일 간격으로 총 10일간의 세균수 변화를 표준평판균수 측정법으로 검사하였다.

2) 병원성미생물의 검사

① 대장균 (*Escherichia coli*)

시험할 검체 25 g을 희석수 225 ml에 넣어 homogenizer로 균질화 시켰다. 균질화 시킨 시료 10 ml를 2배 농축시킨 EC 배지 10 ml에 접종한 후 44.5±0.2 °C에서 48시간 배양하였다. EC 배지의 발효관에 가스가 생성 유·무를 확인 후 가스가 생성되었으면 대장균 양성 가스 생성이 없으면 음성으로 판정하였다.

② 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*)

시험 검체 10 g을 90 ml LEB (*Listeria enrichment broth*)에 접종시켜 30°C에서 24시간 증균배양하고 이 증균액 0.1 ml을 Fraser broth 10 ml에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 2차 증균배양을 실시하였다. 2차 증균배양액 색깔이 흑색이나 갈색으로 변화하였을때는 VIDAS 실험을 하며, 배양액의 색깔에 변화가 없을 때에는 리스테리아 음성으로 판정하고 배양액 색깔이 변화했을 경우엔 VIDAS LMO Kitt를 이용하며 75분 후에 음성·양성 유무를 확인하였다.

③ 살모넬라 (*Salmonell spp.*)

시험 검체 25 g 에 225 ml의 BPW (*Buffer peptone water*)를 첨가하여 35°C에서 18시간 배양한 후 이 배양액을 2종류의 증균 배지, 즉 10 ml RV (*Rappaport-Vassiliadine*) broth에 0.1 ml 배양액을 첨가함과 동시에 SC (*Selenite cystine*) broth 10 ml에 1ml 배양액을 첨가하여 35°C에서 6시간 배양하였다. 각각의 증균 배양액을 M broth에 1ml접종하여 42°C, 6시간 배양하였다. 이 배양액을 0.5 ml씩 E-tube에 접종하여 끓는 물에서 15분간 끓인 다음 VIDAS SLM Kit를 사용하며 45분 후 음성·양성의 유무를 확인하였다.

④ 황색포도상구균

시험 검체 10g 을 TSB (*Tryptic Soy Broth*) 90 ml에 첨가하여 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균 배양액을 1백금이 취하여 Baird-parker agar에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 분리배양한 배지에 황색포도상구균 의심집락이 자랐을 경우엔 확인시험을 하며, 확인실험은 BHI (*Brain Heart Infusion*) 0.5 ml가 든 소형시험관에 coagulase plasma

EDTA 0.5 ml를 첨가한 후 의심집락을 접종하여 37℃에서 배양하였다. 배양 후 3,6,24시간 간격으로 응고의 유무를 확인하여 응고가 된 것은 황색포도상구균 양성으로 판정하였다.

⑤ 비브리오균

시험 검체 10 g을 peptone water 90 ml에 첨가하여 35℃에서 18~24시간 증균배양하여 증균 배양액을 1백금이 취하여 TCBS배지에 도말한 후 35℃에서 18~24시간 배양하였다. 분리 배양한 배지에 비브리오균 의심집락이 자랐을 경우엔 API20E kit를 이용하여 확인시험을 하였다.

2. 연구결과

1) 병원성미생물 및 세균수의 측정

① HPP 처리시간에 따른 변화

HPP 처리압력 3000과 6000bar, 수온 15℃에서 holding time을 60, 180, 360sec 로 각각 처리한 후 5℃±0.1 인큐베이터에 8일간 보관하면서 미생물 증식을 측정한 결과, 3000bar 압력에서 대조군 400 cfu/g과 비교할 때 HPP 처리직후 60, 180, 360sec 모두 <100 cfu/g 확인되었다(표1). 3000bar 8일 경과시점에서 holding time 60sec일 때 21,000 cfu/g, 180sec 일 때 19,000 cfu/g, 360sec 18,000 cfu/g 으로 약간의 차이만 보일 뿐 크지 않음을 알 수 있다. 따라서 HPP holding time이 살균 및 세균의 증식억제에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 판단된다.

표 1. HPP holding time 에 따른 세균수의 변화

압력(bar)	시간(sec)	수온(℃)	세균수 결과		
			D-0	D+4	D+8
	대 조 군		400	6,000	750,000
3,000	60	15	<100	1,700	21,000
	180	15	<100	2,100	19,000
	360	15	<100	1,900	18,000
6,000	60	15	<100	100	900
	180	15	<100	200	800
	360	15	<100	100	800

② HPP 처리온도(수온)에 따른 변화

HPP 처리압력 3000과 6000bar, holding time 90sec에서 수온을 5, 15, 30℃로 각각 처리한 후 5℃±0.1 인큐베이터에 8일간 보관하면서 미생물 증식을 측정된 결과, 8일경과 시점에서 3000bar, 90sec 처리기준으로 수온 5℃일 때 33,000 cfu/g, 15℃ 일 때 26,000 cfu/g, 30℃ 일 때 16,000 cfu/g 으로 5℃ 와 30℃를 비교하면 2배정도 세균의 증식을 억제시키는 것으로 확인되었다(표2). 6000bar 90sec 처리에서도 4일 경과시점에서는 큰 차이를 확인하기 어려웠으나 8일경과 시점에서는 5℃일 때 1,600 cfu/g, 15℃ 일 때 1,100 cfu/g, 30℃ 일 때 800 cfu/g 으로 3000bar 와 마찬가지로 세균증식을 억제시키는 것으로 확인되었다. 이 같은 결과로 볼 때 HPP 가압 과정에서 수온을 높일 경우 동일 압력과 시간에서도 미생물 살균에 더 효과적인 것을 알 수 있다. 하지만 HPP 가압과정에서 1000bar 당 3℃온도가 상승함을 감안할 때 굴과 같이 생식용으로 섭취하는 수산물을 높은 온도에서 HPP 처리할 경우 상품성이 떨어지므로 종합적인 검토를 통해 적절한 온도기준을 마련할 필요가 있을 것으로 판단된다.

표 2. HPP 처리수온에 따른 세균수의 변화

압력(bar)	시간(sec)	수온(℃)	세균수 결과		
			D-0	D+4	D+8
		대 조 균	700	5,500	940,000
3,000	90	5	<100	2,200	33,000
		15	<100	1,900	26,000
		30	<100	1,400	16,000
6,000	90	5	<100	300	1,600
		15	<100	300	1,100
		30	<100	<100	800

③ HPP 처리 압력에 따른 살균력

Holding time 90sec에서 수온15℃, HPP 처리압력 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000bar로 각각 처리한 후 미생물을 측정된 결과, 세균수 기준으로 대조군에서 39,000 cfu/g, 1000bar 일 때 32,000 cfu/g, 2000bar 일 때 9,600 cfu/g, 3000bar 일 때 900 cfu/g, 4000bar이상에서는 모두 <100 cfu/g 로 확인되었다. 이 같은 결과로 이전의 실험에서 확인된 holding time 이나 가압온도(수온)에 비해 압력의 정도에 따른 살균력이 훨씬 큰 것으로 확인되었으며, 특히 4000bar 이상에서는 그림1 및 표3과 같이 세균의 살균정도가 99.7% 이상으로 매우 우

수한 것으로 확인되었다. 실험에서 대조군과 가압처리된 sample 모두 대장균 및 비브리오균, 리스테리아모노사이토제네스, 살모넬라, 황색포도상구균과 같은 병원성 미생물은 검출되지 않았다.

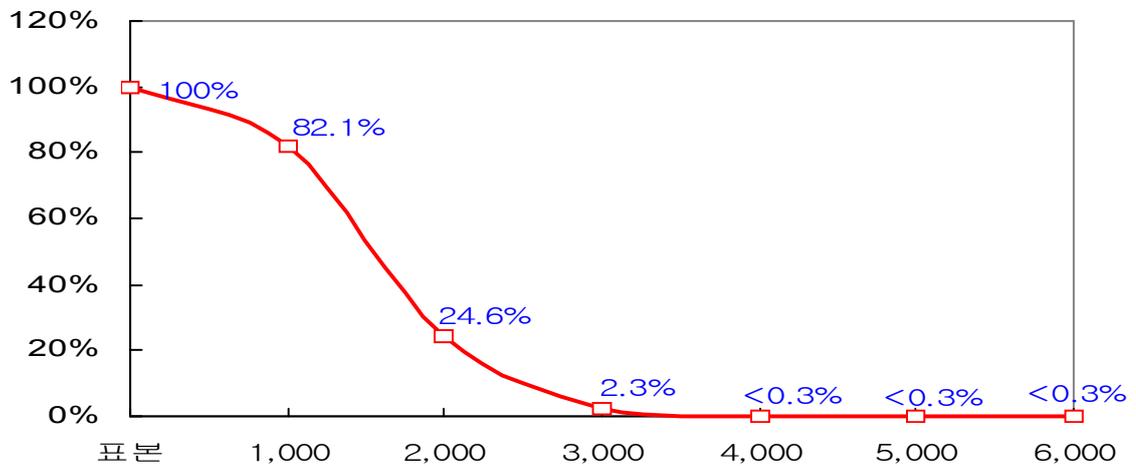


그림 1. 굴의 미생물 HPP 처리압력에 따른 미생물 감소율.

표 3. 굴의 미생물 HPP 처리압력에 따른 변화

압력(bar)	시간(sec)	수온(°C)	미생물 검사결과						
			세균수	E-coli	vib.	lis.	sal.	sta.	
			대 조 군	39,000	ND	ND	ND	ND	ND
1,000	90	15	32,000	ND	ND	ND	ND	ND	
2,000	90	15	9,600	ND	ND	ND	ND	ND	
3,000	90	15	900	ND	ND	ND	ND	ND	
4,000	90	15	<100	ND	ND	ND	ND	ND	
5,000	90	15	<100	ND	ND	ND	ND	ND	
6,000	90	15	<100	ND	ND	ND	ND	ND	

④ HPP 처리압력에 따른 보존성 비교

HPP 조건을 holding time 90sec, 수온15°C, 압력은 총 6가지(1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000bar)로 각각 처리한 후 2일 간격으로 총 10일간 세균수 변화를 확인한 결과, 대조군과 비교할 때 1000bar 에서는 차이를 보이지 않았으나 그림 2에서 나타난 결과와 같이 2000bar부터는 초기미생물의 감소와 HPP 처리 후 injured cell의 재 증식이 억제되었음을 알 수 있었다(표4).

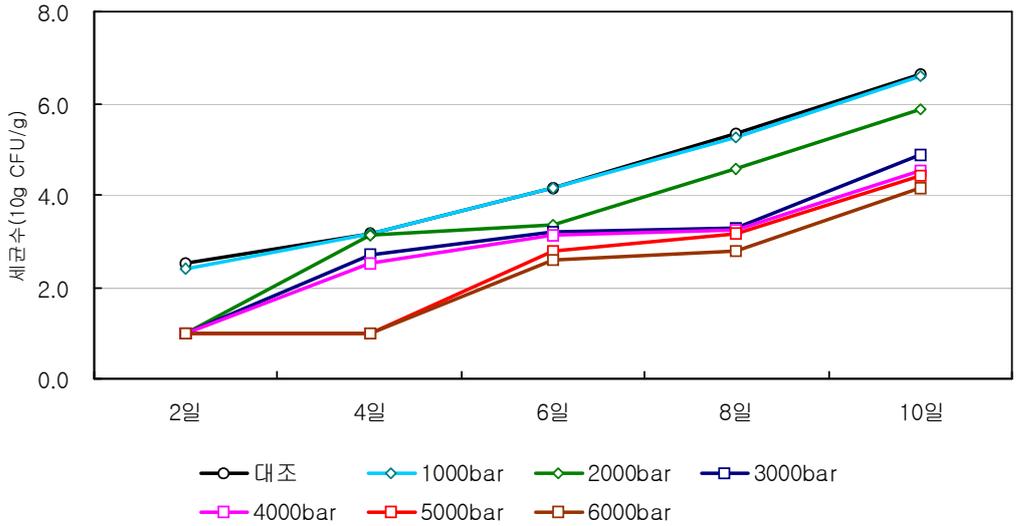


그림 2. 굴의 HPP 처리압력에 따른 세균 성장의 변화.

구체적인 세균수의 변화를 살펴보면 표4와 같이 5°C ± 0.1 인큐베이터에서 10일간 보관한 결과, 대조군의 세균수가 6,100,000 cfu/g 일 때 2000bar 880,000 cfu/g, 3000bar 89,000 cfu/g, 4000bar 55,000 cfu/g, 5000bar 41,000 cfu/g, 6000bar 16,000 cfu/g 으로 압력단위별로 처리 후 injured cell의 재증식률의 감소가 뚜렷하게 나타났다. 식품공전 「비가열섭취냉동식품의 성분규격」에 따를 경우 세균수가 100,000 cfu/g 이하 일 때 그냥 섭취할 수 있는 조건임을 감안하면 굴의 경우 3000bar 이상의 압력으로 살균하는 것을 검토해볼 필요가 있을 것으로 판단된다.

표 4. 굴의 HPP 처리압력에 따른 세균 성장의 변화

압력 (bar)	시간 (sec)	수온 (°C)	보관 조건	D-0	D+2	D+4	D+6	D+8	D+10
대 조 군			-	200	500	1,800	16,000	320,000	6,100,000
1,000	90	15	5°C	200	400	1,800	15,000	270,000	5,800,000
2,000	90	15	5°C	<100	<100	1,300	3,500	59,000	880,000
3,000	90	15	5°C	<100	<100	700	1,900	2,600	89,000
4,000	90	15	5°C	<100	<100	500	1,200	2,200	55,000
5,000	90	15	5°C	<100	<100	<100	800	1,700	41,000
6,000	90	15	5°C	<100	<100	<100	600	800	16,000

제 3 절 노로바이러스 대체 바이러스 진단법 개발

1. 연구수행방법 및 이론

노로바이러스(Norovirus)는 인간의 장을 숙주로 증식하는 바이러스로 보통의 바이러스 배양 방법으로는 배양 시킬 수가 없다. 이러한 이유로 노로바이러스의 검출 및 배양에 많은 어려움이 있어 노로바이러스의 연구에 많은 어려움을 겪고 있다. 이에 본 연구과제에서는 노로바이러스와 Calicivirus 과에 속하면서 단일가닥의 RNA를 가지는 유전학적, 생화학적, 물리화학적 특성이 유사한 Feline calicivirus(FCV)와 Murine norovirus(MNV)를 노로바이러스의 대체 모델로 이용하여 연구하였다.

1) 노로바이러스 대체 바이러스의 배양조건 연구

본 연구에 사용한 FCV VR-782와 FCV의 숙주세포인 Crandell-reese feiline kidney (CrFK) CCL-94는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였으며, MNV1은 Washington University School of Medicine (St. Louis, MO)의 Hervert W. Virgin으로부터 분양받아 사용하였다. 또한 MNV1의 숙주세포는 Raw 264.7 murine macrophages를 사용하였다.

숙주세포인 CrFK와 Raw 264.7 세포는 75 cm² tissue culture flask (Corning, USA)에서 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO/BRL, USA), 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO/BRL, USA)을 사용하여 배양하였다.

바이러스의 배양은 monolayer로 형성된 CrFK 또는 Raw 264.7 세포에 분양받은 FCV, MNV1 현탁액을 흡착, 감염시킨 후 세포병변 효과(cytopathic effects; CPE)가 일어나 부착된 세포들이 떨어지면 바이러스가 감염된 것으로 판단하였다. 바이러스가 감염된 cell의 debris는 제거하고 세포를 파쇄시킨 후 바이러스를 함유하고 있는 상등액은 cryogenic vial (Nalgene, USA)에 0.5 ml 분주한 후 사용할 때 까지 -80℃에 보관하였다.

2) Feline calicivirus 및 murine norovirus를 이용한 정량적 검출법 검토

① Plaque assay 법

한 개의 감염성이 있는 바이러스 입자는 하나의 plaque를 생성한다는 이론 하에 CPE를 나타내는 바이러스 정량에 사용되는 plaque assay 방법은 바이러스 titer의 측정 시 실험대상 바이러스 용액을 배수 희석하여 세포단층에 접종하여 바이러스의 감염능을 측정한다. 본 연구에서는 먼저 CrFK cell과 Raw 264.7 cell를 6 well plate에 각각 분주하고 37℃, 5 % CO₂

조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻었다. 각각의 well의 growth medium을 제거하고, 세포단층을 PBS로 세척한 뒤 바이러스 현탁액을 2% FBS가 포함된 maintenance medium으로 십진법으로 단계희석한 후, 각 well에 바이러스 용액을 0.5 ml 접종하여 90분 동안 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 바이러스가 숙주세포에 흡착될 수 있도록 하였다. 그리고 1.5% agar(junsei, Tokyo, Japan)를 함유한 2x MEM(GIBCO/BRL, USA)을 가하였다. 바이러스 감염에 의하여 plaque가 형성될 때까지 배양하여, plaque가 형성되면 agar overlay medium을 떼어내고 3.4 % formalin으로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 3분 염색하여 생성된 plaque수를 계수하여 PFU/ml (plaque forming unit/ml)로 나타내었다.

② TCID₅₀ (50% Tissue culture infection dose) assay 법

바이러스를 정량적으로 평가하기 위한 2번째 방법으로 end point dilution assay 방법인 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀)으로 바이러스 감염가를 측정하였다. 이는 일정량의 세포배양액에 50%를 감염시키는데 필요한 바이러스 희석배수를 나타내는 것이다.

먼저 96 well plate에 CrFK cell과 Raw 264.7 cell을 1.8×10^4 cell/well 되도록 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하여 monolayer을 얻었다. 숙주세포가 monolayer로 형성된 96 well plate에 growth medium을 aspirate를 이용하여 제거한 후, 바이러스 현탁액을 maintenance medium에 10 진법으로 희석하였다. 희석된 바이러스를 25 µl씩 8개의 well에 접종하고 37°C, 5% CO₂의 incubator 90분 동안 방치하여 FCV 및 MNV1 을 각 cell에 감염시키고, 이를 다시 회수한 뒤 각 well에 100 µl의 maintenance medium을 첨가하였다. 바이러스 감염 후 배양 4일째에 바이러스에 의해 lysis된 세포를 3.4 % formalin으로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 용액으로 3분 염색하여 가시화하고 50%이상 CPE가 나타난 well의 희석단계를 Reed-Muench method로 산정하고 log TCID₅₀/ml로 표시하였다.

3) RT-PCR 을 이용한 Surrogate virus의 검출

바이러스 RNA 추출 및 농축은 식품의약품안전청공고 제 2008-82호의 식품 등 중 기준규격 미설정물질의 시험방법(안) 입안예고의 4. 굴중 노로바이러스 검출방법을 변형하여 실험하였다. 굴로부터 suffogate virus의 RNA를 추출하기 위하여, 굴의 소화기관인 중장선을 분리하였다. 바이러스 현탁액을 희석하여 굴의 중장선 약 10g 에 10^5 TCID₅₀/mL 이 되도록 인위적으로 접종한 후, 20분 동안 37 °C에서 바이러스가 흡착될 수 있도록 하였다. 이에 0.25M glycine-0.14M Nacl 완충액(pH7.5) 75ml를 첨가하여 균질화 시키고 10,000 xg로 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 1차 상층액을 얻어 멸균된 tube에 옮긴 다음, 침전물은 0.25M threonine-0.14M Nacl 완충액(pH7.5)를 첨가하여 진탕한 후, 10,000 xg로 4°C에서 30분간 원심분리하여 2차 상층액을 얻어 1차상층액과 합하여 바이러스 농축시험을 실시하였다.

상층액에 40% PEG 8000을 66ml 첨가하고, 3M Nacl 24ml를 가한 후, 4°C에서 3시간 진탕하

며 1차 침전을 실시하였다. 이를 원심분리(10,000xg, 4°C, 30분)한 후, 침전물을 0.2 % Tween 80-50mM Tris-Hcl 2ml와 증류수 8ml에 녹여 chloroform: isoamylalcohol 10ml를 가하여 바이러스를 추출 하였다. 상층액을 취한 다음 증류수와 chloroform : isoamylalcohol 을 각각 10ml 가하여 혼합한 후 원심분리 과정을 한번 더 반복하였다. 상층액을 합하여 40 % PEG 10ml와 3M Nacl 3ml를 가하여 4°C에서 3시간동안 방치하여 2차 침전 후, 원심분리 (10,000xg, 4°C, 30분)하여 상층액을 완전히 제거하고 침전물을 DEPC로 처리된 증류수 500 μ l에 현탁시켰다.

농축 시킨 바이러스의 RNA 추출은 QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hillden, Germany)를 사용하였으며, 추출된 RNA를 RT-PCR을 수행하기 위한 template로 사용하였다. Reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하고 증폭시키기 위하여 RT-PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, 각 바이러스의 primer는 표 5에 나타내었다.

표 5. Primer set used to detect Feline calicivirus and Murine norovirus by RT-PCR

Virus type	Primers	Sequences(5'→3')	polarity
Feline calicivirus	CalcapF	TTCGGCCTTTTGTGTTCC	sense
	CalcapR	TTGAG AATTGAACACATCA ATAGATC	antisense
Murine norovirus	MNVF	TCTTCGCAAGACACGCCAATTTTCAG	sense
	MNVR	GCATCACAATGTCAGGGTCAACTC	antisense

반응조건은 각 바이러스에 대한 primer 10pmol 과 추출된 RNA를 template 2 μ l를 첨가하고 증류수를 넣어 최종부피가 20 μ l가 되도록 하였다.

이를 70°C에서 5분간 반응시킨 뒤, FCV의 경우 revers transcription 반응을 위하여 42°C에서 60분 반응시킨다. 합성된 cDNA를 94°C에서 5분, 다시 95°C에서 5분 반응시키고 증폭시키기 위한 cycle로 91°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분의 과정을 40회 반복하고 72°C에서 10분동안 연장 반응 후 반응을 종료하였다. 그리고 MNV1의 경우 revers transcription 반응을 위하여 50°C에서 30분 반응시킨다. 합성된 cDNA를 95°C에서 15분동안 반응시킨 후, 증폭시키기 위한 cycle로 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분의 과정을 40회 반복하고 72°C에서 10분 동안 연장 반응 후 반응을 종료하였다. 각 PCR 반응 종료 후 PCR 산물 6 μ L를 2.0% agarose (Bioneer, Daejeon, Korea) gel 상에서 100V로 전기영동한 후, EtBr(0.5 μ g/mL) 염색액에서 30sec 염색 후 증류수에서 2분간 탈색하고 UV 하에서 DNA 밴드를 관찰 하였다.

2. 연구결과

1) 노로바이러스 대체 바이러스의 배양조건 연구

본 연구에 사용한 FCV의 숙주세포인 CrKF 세포와 MNV1의 숙주세포인 Raw 264.7 세포는 75 cm² tissue culture flask (Corning, USA)에서 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO/BRL, USA), 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO/BRL, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2~3일 배양하였으며, 세포가 90% 이상 monolayer을 형성하면 계대 배양하여 사용하였다. 숙주세포인 CrFK cell이 75 cm² tissue culture flask에 monolayer의 형태로 형성한 것과 FCV가 감염되어 cell의 cytopathic effects 가 일어난 것을 그림 3에 나타내었으며, MNV1의 숙주세포와 virus가 감염된 형태를 그림 4에 나타내었다.

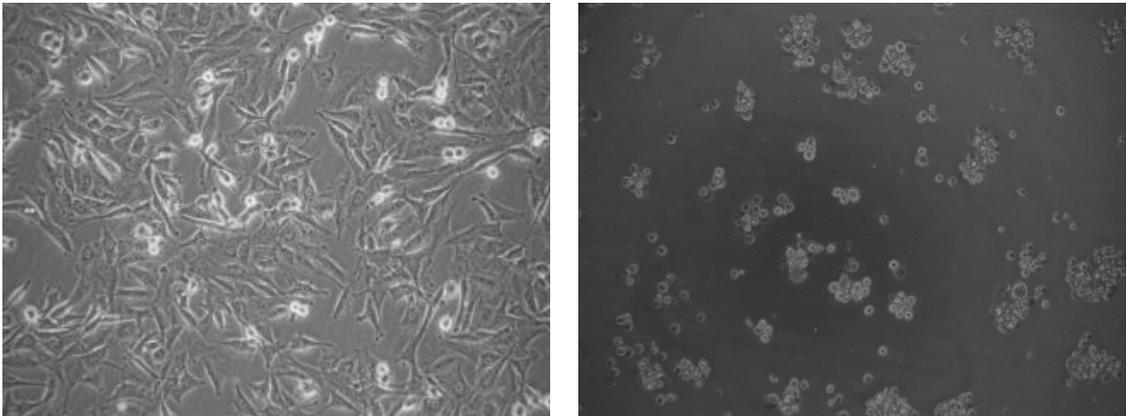


그림 3. Inverted microscopic photograph of normal Crandell-reese feline kidney (CrFK) CCL-94 cells (left) and CrFK cells infected by feline calicivirus (right) after 24 hr.

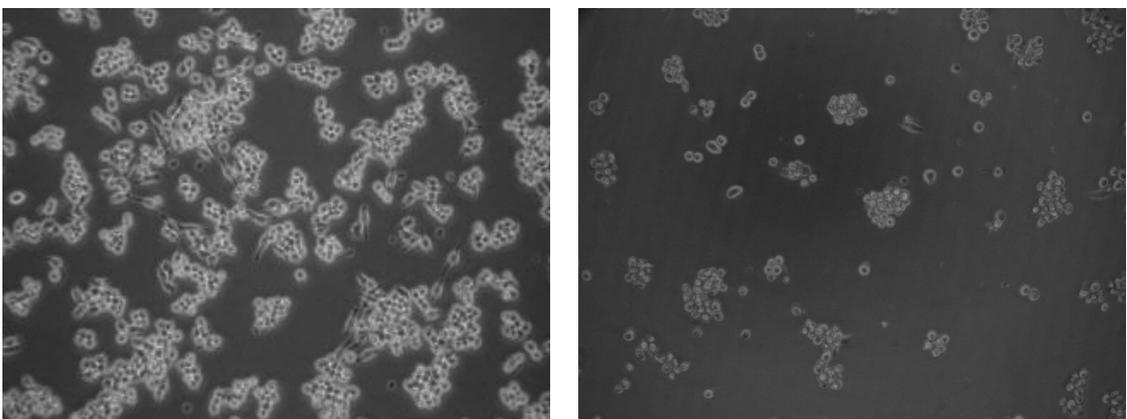


그림 4. Inverted microscopic photograph of normal raw 264.7 murine macrophages (left) and raw 264.7 cells infected by murine norovirus (right) after 24 hr.

바이러스의 배양은 monolayer로 형성된 CrFK 또는 Raw 264.7 세포에 FCV, MNV1 배양액을 90분 동안 흡착시켜 바이러스가 감염될 수 있도록 한 후, maintenance medium (DMEM, 2% FBS)를 넣어준 뒤 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 24~48간 후 세포병변효과 (cytopathic effects; CPE)가 일어나 부착된 세포들이 떨어지면 바이러스가 감염되었다고 판단하여 cell-debris는 제거하고 세포를 파쇄시킨 후 바이러스현탁액을 이용하여 정량화 하거나 RT-PCR을 통하여 각각의 검출하는 방법을 검토하였다.

2) Feline calicivirus 및 murine norovirus를 이용한 정량적 검출법 검토

한 개의 감염성이 있는 바이러스 입자는 하나의 plaque를 생성한다는 이론 하에 바이러스 정량을 하는 방법인 plaque assay는 바이러스 현탁액을 10진법으로 연속희석하여 각 바이러스가 감염되도록 세포단층에 감염시켰다. 이를 0.1 % crystal violet으로 염색하면 바이러스에 감염되지 않은 세포는 crystal violet에 염색이되고 바이러스에 감염된 부위는 염색이 되지 않아 plaque 모양을 확인할 수 있다. Plaque의 수를 계수하여 PFU/mL (plaque forming unit/mL) 로 나타낸 결과 분양받은 바이러스를 감염시켜 만든 바이러스 stock은 1ml에 대하여 FCV는 약 2.3×10^8 PFU/mL, MNV1은 약 1.6×10^8 PFU/mL의 바이러스가 있음을 확인하였다(그림 5, 표 6). 그리고 감염-비감염으로 표현하여 통계학적인 방법으로 바이러스 감염가를 측정하는 TCID₅₀ 방법은 10진법으로 희석시킨 바이러스 현탁액을 각 희석단 별로 8개의 well에 접종시켜 CPE 유무를 판정하였으며 50 %를 감염시키는 바이러스의 희석배수를 crystal violet 용액으로 염색하여 가시화 한 후 log 값으로 표시하였다. 그 결과 바이러스의 stock은 1ml에 대하여 FCV는 약 7.83 TCID₅₀/mL, MNV1은 약 7.50 TCID₅₀/mL의 바이러스가 있음을 확인하였다(그림 5, 표 6). 이는 plaque assay와 TCID₅₀ assay의 수치 상관관계는 1 TCID₅₀ = 0.7 PFU로 알려져 있으나, 시험 결과 이러한 상관관계가 일치하는것은 아니었으며, TCID₅₀ 방법은 통계학적인 수치로써, HPP를 사용하여 바이러스의 감소율을 알아보하고자 할 경우에는 정량적인 방법으로 많이 이용되는 plaque assay가 더 유효할 것으로 판단된다.

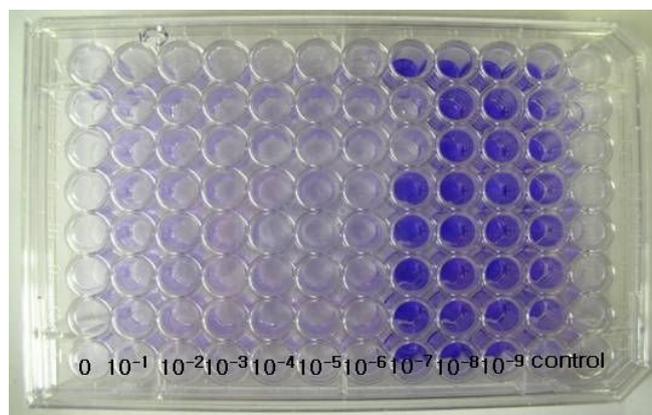
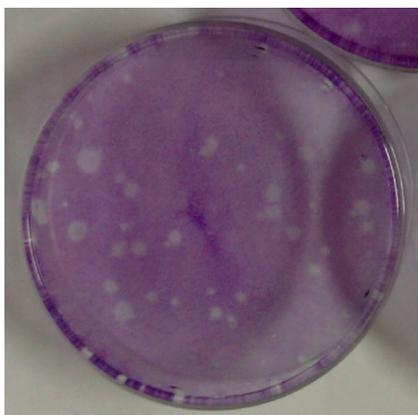


그림 5. Plaque assay and 50% tissue culture infection dose images cell culture plate. (a) Plaques produce by feline calicivirus in monolayers stain with crystal violet and seen as clear areas. (b) The virus titers were an all-or-nothing assay 50 % infectious doses stain with crystal violet.

표 6. Comparison of plaque assay and TCID₅₀ titrations

Virus dilution	Plaque assay	TCID ₅₀
10 ⁻²	TNTC	+ + + + + + + +
10 ⁻³	TNTC	+ + + + + + + +
10 ⁻⁴	TNTC	+ + + + + + + +
10 ⁻⁵	TNTC	+ + + + + + + +
10 ⁻⁶	152, 158, 164	+ + + + + + + +
10 ⁻⁷	10, 13, 18	+ + - - - - - -
10 ⁻⁸	0, 0, 0	- - - - - - - -
10 ⁻⁹	0, 0, 0	- - - - - - - -

3) RT-PCR 을 이용한 Surrogate virus의 검출

현재, 식품중의 바이러스 존재 유무를 확인하기 위해 유전자를 RT-PCR로 증폭시켜 확인하는 방법이 많이 이용되고 있다. 따라서 Norovirus의 대체바이러스인 feline calicivirus와 murine norovirus는 RNA virus로써 분자생물학적인 방법으로 revers transcriptase-PCR을 이용하여 바이러스를 검출하는 방법을 검토하였다. Plaque assay로 바이러스를 정량화 한 후, 각 바이러스의 현탁액을 QIAamp viral RNA minikit(Qiagen, Kilden, Germany)를 이용하여 RNA를 추출하였고, 이를 주형으로 하여 1 step RT-PCR을 수행한 조건은 표7에 나타내었다. 이의 최종산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 확인한 결과 feline calicivirus의 경우 673 bp에서 band가 확인되었으며, murine norovirus의 경우 318 bp에서 밴드가 나타날 경우 양성으로 판정하였다(그림 6). 이는 norovirus의 G1, G2 type이 310 pb인 것을 고려하면 murine norovirus가 norovirus와 분자생물학적으로 더 비슷한 양상을 나타내는 것으로 판단된다.

표 7. Detection of the feline calicivirus and murine norovirus for RT-PCR step

	Feline calicivirus	Murine norovirus
Revers transcription	42 °C, 60 min	50 °C, 30 min
DNA polymerase activation	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min
Denaturation	94 °C, 1 min	91 °C, 1 min
Annealing	63 °C, 1 min	59 °C, 1 min
Extention	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
Cycle	x 40	x 40
Final extention	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min

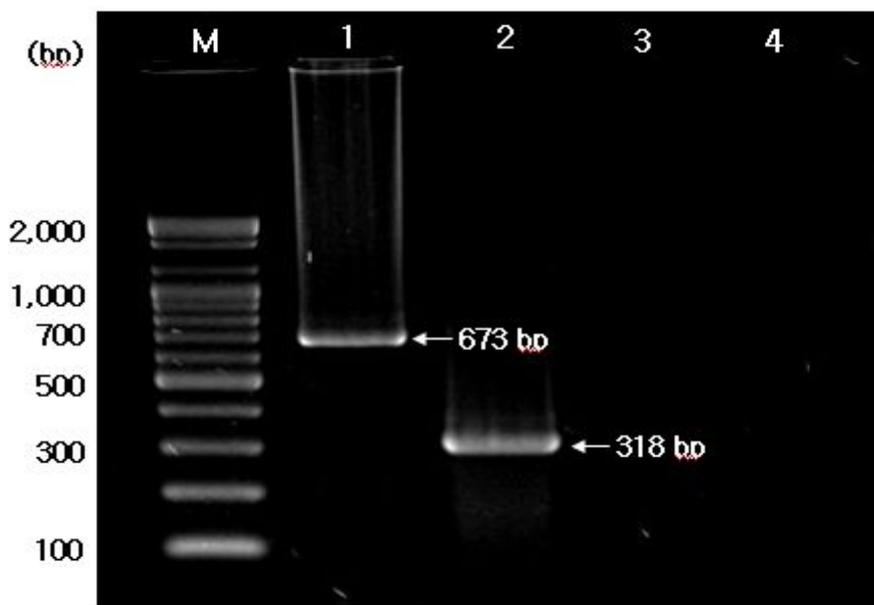


그림 6. Detection of feline calicivirus and murine norovirus 1 by reverstranscriptase PCR. M: 100-pb DNA size ladder(Bioneer, Daejeon, Korea), lane 1: Feline calicivirus detection from intestinal glands of oyster, lane 2: MNV-1 detection from intestinal glands of oyster, lane 3: FCV negative control, lane 4: MNV negative control.

제 4 절 HPP처리후 발생하는 관능적 변화분석

1. 연구수행방법 및 이론

1) HPP(초고압) 처리

① 단백질, 색차, 물성

탈각된 굴을 밀봉포장한 후 HPP(초고압기)에 넣어 25℃에서 2000, 3000, 4000 bar의 압력으로 각각 90sec 간 처리한 후 패주를 채취하여 단백질, 색차, 물성 변화를 확인하였다.

② 관능변화

탈각하지 않은 굴을 HPP(초고압기)에 넣어 5℃, 15℃, 30℃에서 2000, 3000, 4000 bar의 압력으로 각각 90sec 간 처리한 후 탈각하여 관능변화를 확인하였다.

탈각한 굴을 500g 단위로 밀봉 포장 후 HPP(초고압기)에 넣어 15℃에서 2000, 3000, 4000 bar의 압력으로 각각 90sec 간 처리한 후 관능변화를 확인하였다.

2) 단백질 변화 - SDS-PAGE

HPP 처리한 굴의 단백질 변화를 알아보기 위해 4℃냉장 후 Laemmli(1970)의 방법을 사용하여 SDS-PAGE (15% 및 20% separating gel, 4.5% stacking gel)를 실시하였다. 전기영동 후 gel은 CBB 용액(50% methanol, 10% acetic acid, 0.1% coomassie brilliant blue R-250)으로 1시간 동안 염색하고, 탈색액(5% methanol, 7% acetic acid)을 이용하여 탈색하였다. 표준분자량 marker (Protein marker, BioLab, USA)의 분자량별 standard는 insulin B and A chain (2.3 kDa and 3.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa), lysozyme (14 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), triosephosphate isomerase (26 kDa), lactate dehydrogenase (36kDa), MBP2 (42 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa), serum albumin (66 kDa), phosphorylase b (97 kDa), β -galactosidase (116 kDa), MBP- β -galactosidase (158 kDa), myosin (212 kDa)을 이용하였다.

3) 색차의 변화

HPP 처리 한 굴의 색도 측정은 색차계(JC 801, Color technosystem Co., Japan)를 사용하였다. 샘플은 분체 cell에 넣어 색차를 측정하여, 명도(L^* , lightness), 적색도(a^* , redness), 황색도(b^* , yellowness)로 나타내었다. 이때 사용한 표준백판의 값은 $L^*=93.73$, $a^*=-0.12$, $b^*=0.11$ 이었다.

4) 물성의 변화

HPP 처리 한 굴의 물성은 texture meter (T1-AT2, SMS Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 시료는 pre-test speed 5 mm/s, test speed 3 mm/s, post test speed 5 mm/s, test distance 2 mm의 조건으로, 단단함(Hardness), 깨짐성(Fracturability), 부착성(Adhesiveness), 탄성(Springiness), 응집성(Cohesiveness), 겹성(Gumminess), 씹힘성(Chewiness), 복원성(Resilience), 전단력(Share Force)을 측정하였다.

5) 관능의 변화

탈각된 굴과 탈각하지 않은 굴을 각각 HPP(초고압기) 처리한 후 50세 이하 11명(男7명, 女4명)으로 구성된 관능평가 요원을 선별하여 평가를 실시하였다. 먼저 관능검사를 실시하기 전에 대조군을 제시하여 시식케 한 후 3개의 샘플씩 처리조건을 비밀로 하여 굴의 향, 외관, 맛, 조직감, 전반적인 기호도 등 5가지 항목에 대하여 평가토록 하였으며 모두 3번 실시하였다.

평가배점은 대조군을 5점 기준으로 “대조군과 차이없다 5점, 대조군보다 조금 미흡하지만 싫지 않다 3점, 대조군에 비해 품질이 현저히 떨어지며 싫다 1점”으로 평가하였다.

2. 연구결과

1) 단백질 변화 - 전기영동

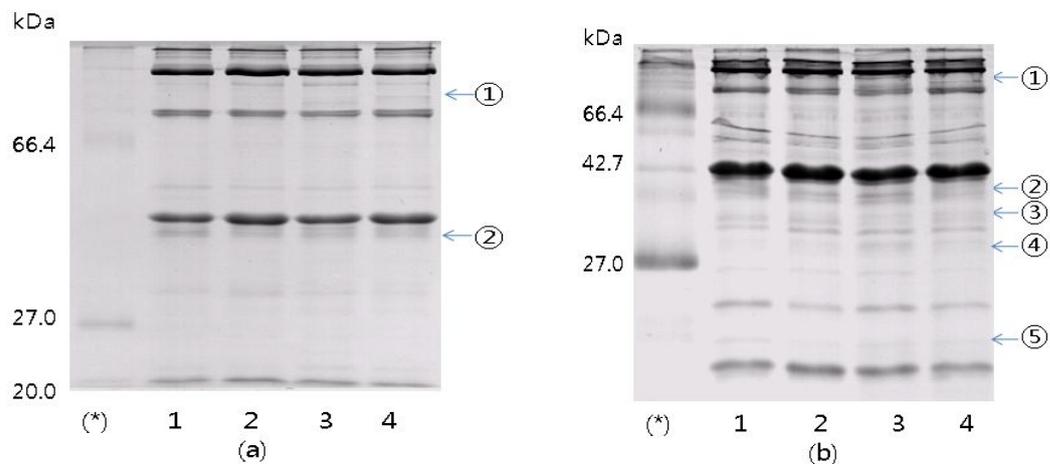


그림7. 전기영동 (a) 15% gel, (b) 20% gel.

(*) 표준분자량, (1) 무처리, (2) 2000 bar, (3) 3000 bar, (4) 4000 bar.

HPP 처리한 굴의 단백질 변화를 SDS-PAGE로 알아보았다. (a)와 (b)는 separating gel의 농도가 다른 것으로 고분자량의 단백질 변화를 그림7(a)를 통해서 살펴보면, 화살표 ①의 band(분자량 약 90 kDa전후)가 무처리구에서는 나타나지 않던 것이 4000 bar 처리구에서 단백질 band의 강도가 크게 나타났다. 이는 보다 큰 분자량의 단백질이 분해된 분해산물로도 보이나 저분자 단백질이 중합한 중합물로도 생각될 수 있다. 또한 3000 bar(lane 3) 및 4000 bar (lane 4)에서 화살표 ① 밑의 band를 보면 새로운 band가 생성된 것으로 이는 HPP 처리에 의해 고분자 단백질의 분해에 의한 분해산물로 보인다. 즉, 약 90만 kDa보다 큰 분자량의 단백질이 분해되어 나타난 분해산물로 보인다. 저분자량의 단백질 변화를 그림 7 (b)를 통해서 살펴보면, 그림7 (a)와 (b)의 화살표 ②는 같은 band 위치로서, 3000 bar와 4000 bar의 경우 42.7 kDa band 아래에 다른 실험구와 비교시 여러 peptide band가 보인다. 이것도 그 이상의 고분자 단백질의 분해된 분해산물로 보인다. 그림7 (b)의 화살표 ③ 및 ④에서도 3000 bar와 4000 bar에서 더 많은 band들이 나타나 고분자 단백질이 분해되어 peptide가 생성된 것으로 확인된다. 화살표 ⑤의 band는 HPP처리 강도에 따라 band의 강도가 약해져 HPP 처리에 의해 분해되어 소실되고 있음을 보여주고 있다. Band ①의 경우 ⑤의 band가 중합되어 이루어 졌을 수도 있을 것으로 사료된다.

종합적으로 HPP 처리에 의해 굴의 구성 단백질의 근본적인 커다란 변화는 보이지 않으나 3000 bar와 4000 bar의 고압처리에서는 고분자 단백질이 약간의 분해 현상을 보이고 있음이 드러났다. 이와 같은 변화가 굴의 색차나 물성의 변화에도 영향을 끼쳤을 것으로 사료된다.

2) 색차의 변화

굴의 색도를 무처리구와 비교하였을 때, 표 8에서와 같이 HPP 처리 시 Lightness(명도)는 압력이 높아질수록 증가하는 경향을 보였고, redness(적색도) 역시 큰 차이는 보이지 않았으나 약간 감소하였다. Yellowness(황색도)는 압력이 높아질수록 약간 감소하였다.

표 8. HPP 처리한 굴 색차

	Untreated	2000 bar	3000 bar	4000 bar
Lightness	51.07±0.53	54.24±0.74	57.54±0.73	59.88±0.66
Redness	-1.38±0.05	-1.26±0.11	-1.18±0.16	-1.17±0.031
Yellowness	4.45±0.3	3.32±0.66	3.82±0.13	2.3±0.46

3) 물성변화

굴에 HPP 처리를 하여도 깨짐성(Fracturability), 부착성(Adhesiveness), 탄력성(Springiness), 응집성(Cohesiveness)에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 복원성(Resilience)은 압력 증가에 따라 다소 증가하였다. 특히 단단함(Hardness), 겹성(Gumminess), 씹힘성(Chewiness), 전단력(Share Force)은 2000 bar에서는 무처리구에 비해 감소하였으나, 3000 bar와 4000 bar에서 압력이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 즉, 전반적으로 단단해지는 경향을 나타냈다. (표 9)

표 9. HPP 처리한 굴 물성

	Untreated	2000 bar	3000 bar	4000 bar
Hardness	114.81±1.36	109.28±3.77	132.79±1.57	155.77±5.91
Fracturability	9.15±0.59	9.29±0.72	9.10±0.00	8.66±0.51
Adhesiveness	0.51±0.06	0.40±0.31	0.62±0.28	0.42±0.16
Springiness	1.59±0.14	1.62±0.32	1.51±0.25	1.43±0.03
Cohesiveness	1.21±0.29	1.06±0.17	1.11±0.19	1.18±0.22
Gumminess	138.99±35.35	116.37±22.83	147.92±26.64	184.59±40.77
Chewiness	224.11±76.30	184.91±0.25	220.21±3.61	263.94±62.95
Resilience	0.27±0.07	0.28±0.01	0.35±0.06	0.38±0.02
Share Force	65.80±6.65	53.05±0.49	73.00±2.26	111.85±2.05

4) 관능변화

탈각하지 않은 굴을 HPP 처리하여 외관(색상), 향, 맛, 조직감, 기호도를 확인한 결과 압력과 수온에 따라 변화가 있었다. 압력과 수온이 낮을수록 관능적인 변화는 적은 것으로 평가되었으며, 특히 수온이 높을 경우 관능상태(특히 외관)가 비 처리 대조군에 비해 많이 떨어지는 것으로 평가되었다. 표10의 3000bar에서 수온이 15℃(3.6점)일 때와 30℃(1.4점)일 때 외관평가 결과의 차이를 보면 쉽게 알 수 있다. 압력정도에 따라서도 15℃ 수온기준으로 2000, 3000, 4000bar에서도 표10의 종합평가 결과에서 나타나는 것과 같이 4.4, 4.1, 3.5 로 압력이 높아질수록 관능적 변화가 큰 것으로 평가 되었다. 탈각한 굴의 경우에도 탈각하지 않은 굴에 비해 종합평가 점수가 “2000bar 4.4 : 4.3, 3000bar 4.1 : 3.8 , 4000bar 3.5 : 3.3” 으로 관능적 변화가 더 큰 것으로 평가되었다.(표 11)

표10. 탈각하지 않은 굴의 관능적 변화

압력 (bar)	시간 (sec)	수온 (°C)	외관	향	맛	조직감	기호도	종합평가
2,000	90	5	4.3	4.1	5.0	4.6	4.5	4.5
		15	4.2	4.3	5.0	4.1	4.6	4.4
		30	2.2	3.6	4.3	4.3	2.2	3.3
3,000	90	5	3.9	4.1	4.8	3.8	4.1	4.1
		15	3.6	4.2	4.8	3.8	4.0	4.1
		30	1.4	3.5	3.2	3.4	2.0	2.7
4,000	90	5	2.9	4.0	4.6	2.9	3.4	3.7
		15	2.9	4.0	4.2	3.0	3.3	3.5
		30	1.5	3.1	2.6	2.2	1.6	2.2

[평가기준] 대조군과 차이없다 5점, 대조군보다 조금 미흡하지만 싫지 않다 3점,
대조군에 비해 품질이 현저히 떨어지며 싫다 1점

표11. 탈각한 굴의 관능적 변화

압력 (bar)	시간 (sec)	수온 (°C)	외관	향	맛	조직감	기호도	종합평가
2,000			3.9	4.6	4.5	4.3	4.2	4.3
3,000	90	15	3.1	4.1	4.4	3.3	4.1	3.8
4,000			2.7	4.1	3.7	3.1	3.1	3.3

[평가기준] 대조군과 차이없다 5점, 대조군보다 조금 미흡하지만 싫지 않다 3점,
대조군에 비해 품질이 현저히 떨어지며 싫다 1점

제 5 절 유해미생물 사멸조건

1. 연구수행 방법 및 이론

1) 관능변화

탈각하지 않은 원료 굴을 수온 15℃ HPP(초고압기)에 넣어 2,500bar에서 2분 3분, 3,000bar에서 1분 2분 3분, 3,500bar에서 1분 2분 3분, 4,000bar 1분의 압력과 시간으로 각각 처리한 후 50세 이하 16명(男 8명, 女 8명)으로 구성된 관능평가 요원을 선별하여 평가를 실시하였다. 먼저 관능검사를 실시하기 전에 대조군을 제시하여 시식케 한 후 3개의 샘플씩 처리조건을 비밀로 하여 굴의 향, 외관, 맛, 전반적인 기호도 등 4가지 항목에 대하여 평가토록 하였다.

평가배점은 대조군을 5점 기준으로 “대조군과 차이없다 5점, 대조군보다 조금 미흡하지만 싫지 않다 3점, 대조군에 비해 품질이 현저히 떨어지며 싫다 1점”으로 평가하였다.

2) 성분변화

탈각된 굴을 밀봉포장한 후 수온 15℃ HPP(초고압기)에 넣어 2,500bar에서 2분 3분, 3,000bar에서 60sec 2분 3분, 3,500bar에서 60sec 2분 3분, 4,000bar 1분의 압력과 시간으로 각각 처리한 후 “탄수화물, 단백질, 수분, 회분, 지방, 나트륨, 당류, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤”등 영양성분을 국가공인기관에 검사의뢰 하였다.

3) 유해미생물 검사

① 표준균주 배양

대장균(*Escherichia coli* KCTC 1116), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus* KCTC 3881), 살모넬라(*Salmonella typhimurium* KCTC 2421), 리스테리아(*Listeria monocytogenes* KCTC 3569), 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471) 5종의 유해미생물 표준균주는 KCTC(Korean Collection for Type Culture)에서 분양받아 사용하였다.

표준균주들 중 *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* 은 NB(Nutrient broth), *L. monocytogenes* 는 BHI(Brain heart infusion broth), *V. parahaemolyticus* 는 *marine broth* 에 각각 접종하여 *V. parahaemolyticus* (30℃)를 제외한 표준균주들은 35℃에서 24시간 배양하였다. 배양된 각각의 표준균주는 agar slant에 streak하고 4℃ 이하에 보관하며 계대하여 사용하였다.

② HPP(초고압기) 처리

탈각된 굴 900g을 멸균된 blender로 1분간 균질화 시킨 다음 10^5 으로 희석된 각각의 표준균주 100ml을 넣고 30초간 다시 균질화시킨 후 일정모양의 ice-rack에 10g 씩 채운 다음 -20°C 에서 하루 동안 시료를 얼린 후, 1개 단위로 진공 포장하여 실험에 사용하였다.

진공 포장된 시료를 수온 15°C HPP(초고압기)에 넣어 2,500bar 60, 180sec, 3,000bar 60, 120, 180sec, 3,500bar 60, 120, 180sec, 4,000bar 60sec의 압력과 시간으로 각각 처리하였다.

③ 유해미생물 검사

HPP(초고압기)로 압력 처리된 시료 25g을 멸균생리식염수(0.85% NaCl) 225ml에 넣어 stomacher로 균질화 시켰다(10^{-1}). 10배 희석된 시료 1ml를 멸균생리식염수 9ml에 넣어 십진법으로 희석시키고 동일한 방법으로 10^{-5} 까지 희석된 시험검체를 각각 2개의 petri-dish에 각 1ml씩 취하고 위생미생물에 따라 Nutrient agar, BHI agar, marin agar를 분주하여 24시간 배양하였다. 각 표준균주별 대조군으로는 압력을 처리하지 않은 시료를 사용하였다.

실험대상균 각각의 표준균주를 굴에 접종시켰으므로 각 시료에서 증식한 일반세균수를 실험대상의 병원성 미생물로 간주하여 한천배지에 나타난 집락수를 계수, 기록하였고, 집락수는 30~300개의 집락으로 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하는 것을 원칙으로 하였으며 전 평판에 300개 이상의 집락이 발생한 경우는 1cm^2 내의 평균집락 수에 65를 곱하여 계수하였다. 또한 상기 시험분석에 대하여 내부 검증실험도 병행 실시하였다.

④ 유해미생물 검사 검증

각각의 실험 대상균이 접종된 시료 25g을 멸균생리식염수(0.85% NaCl) 또는 미생물별 해당 배지 225ml에 넣어 시험 분석하는 것을 기본으로 하여 아래와 같이 병원성미생물에 대한 검증실험을 실시하였다.

- 대장균(*Escherichia coli*)

시료 25g을 멸균생리식염수 225ml에 넣어 stomacher로 균질화 시켜 1ml을 3개의 EC 배지에 접종하고 $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 2 시간 배양 후 가스가 발생된 발효관을 양성으로 추정하였다. 양성에 해당되는 발효관으로부터 EMB 배지에 접종하여 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 2 시간 배양한 후 전형적인 집락을 유당배지 및 보통한천배지에 각각 접종하였다. 유당배지에 접종한 것은 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 에서 48 ± 3 시간 배양하고 보통한천배지에 접종한 것은 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 2 시간 배양하였다. 유당배지에서 가스가 발생하였을 때는 이에 해당하는 보통한천배지에서 배양된 집락을 취하여 그람염색을 실시하여 그람음성, 무아포성 간균을 확인한 후 생화학 시험을 실시하여 대장균 양성으로 판정하였다.

- 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)

시료 25g을 225ml의 10% NaCl을 첨가한 TSB(Tryptic soy broth)배지에 가하고 stomacher

로 균질화 시키고 36±1℃에서 18~24시간 증균배양 하였다. 이 증균배양액을 BPA(Baird Parker agar)배지에 1백금이 streak하여 36±1℃에서 24시간 배양 후 BPA배지에 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검은색 집락이 나타날 경우 양성으로 추정하였다. 양성 추정 의심집락을 1백금이 취하여 BHI 1ml이 들어있는 소형시험관에 coagulase plasma EDTA 0.5ml을 첨가한 용액과 혼합하여 36± 1℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 3, 6, 24 시간 간격으로 응고유무를 확인하여 응고가 된 것은 황색포도상구균(*S. aureus*)양성으로 판정하였다.

- 리스테리아모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)

시료 25g을 225ml LEB(*Listeria enrichment broth*)배지에 첨가하고 stomacher를 이용하여 균질화 시킨 시료를 30℃에서 24시간 1차 증균배양하고, 이 증균액 0.1ml을 Fraser broth 10ml에 분주하여 30℃에서 24시간 2차 증균배양을 실시하였다. 이를 VIDAS용 LMO2 kit를 이용하여 확인실험을 실시하였다.(70분 후 음성, 양성 확인판정)

- 살모넬라(*Salmonella typhimurium*)

시료검체(HPP 굴) 25g을 225ml BPW(Buffer peptone water)배지에 첨가하고 stomacher로 균질화시킨 시료를 35℃에서 24±2시간 1차배양하였다. 이 배양액을 2종류의 증균배지에 분주하였다 (①RV-broth에 0.1ml 넣어 42℃에서 6~8시간 배양, ②Muller kauffmann broth에 1ml 넣어 35℃에서 6~8시간 배양). ①,②를 각각 1ml씩 M broth에 첨가하고 42℃에서 16~20시간 배양하였다. 이 배양액을 각각 0.5ml씩 취하여 e-tube에 넣고 15분정도 끓는물에 두었다. 이를 VIDAS용 SLM kit를 이용하여 45분후에 음성, 양성 유무를 확인하였다.

- 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)

시료 25g을 225ml APW(Alkaline peptone water)배지에 첨가하고 stomacher를 이용하여 균질화시켜 35℃에서 24시간 증균배양하고 이 증균배양액을 TCBS배지에 1백금이 streak하여 35℃에서 24시간 배양 후 TCBS배지에 2~4mm 청록색의 서당 비분해 집락이 형성되면 양성추정하고 API20E kit를 이용하여 확인실험을 실시하였다.

2. 연구결과

1) 관능변화

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴의 향, 외관, 맛, 전반적인 기호도를 확인한 결과 압력과 시간에 따라 변화가 있었다. 압력이 낮고 시간이 짧을수록 관능적인 변화는 적었으며, 반대로 압력이 높고 시간이 길 경우 대조군에 비해 관능적 변화가 큰 것으로 평가되었다. (그림 8. 참조)

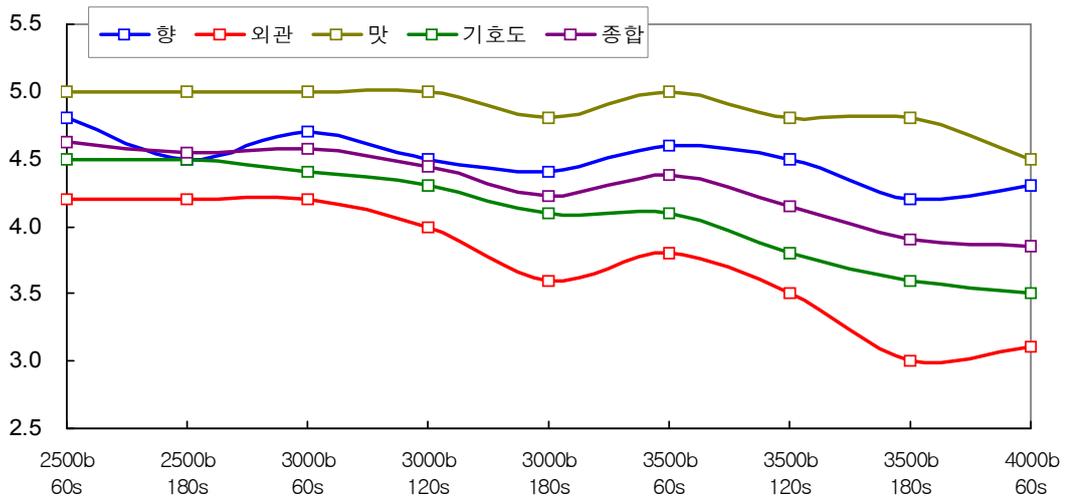


그림 8. 압력조건별 관능평가 점수(5점 만점)

표 12의 종합평가 결과를 보면 3,000bar에서 60초 일 때 4.6점이지만 4,000bar 60초일 때는 3.9점으로 압력단위에 따라 분명한 차이가 있는 것을 쉽게 알 수 있다. 압력시간에 따라서도 3,000bar에서 60초 일 때와 180초 일 때의 종합평가 점수가 4.6점 대 4.2점으로 적지 않은 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

높은 압력조건에서 처리하여 유해미생물과 바이러스를 최대한 감소시키는 것이 안전성에는 좋겠으나, 관능적 변화가 크면 상품성이 떨어지므로 관능 종합평가 점수가 4.5점 이상 수준을 유지하는 조건에서 HPP 살균처리를 해야 될 것으로 판단되었다.

표12. 압력조건별 굴의 관능적 변화

구 분	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
	120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
향	4.8	4.5	4.7	4.5	4.4	4.6	4.5	4.2	4.3
외관	4.2	4.2	4.2	4.0	3.6	3.8	3.5	3.0	3.1
맛	5.0	5.0	5.0	5.0	4.8	5.0	4.8	4.8	4.5
기호도	4.5	4.5	4.4	4.3	4.1	4.1	3.8	3.6	3.5
종합평가	4.6	4.6	4.6	4.5	4.2	4.4	4.2	3.9	3.9

2) 성분 변화

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴의 영양성분 변화를 확인한 결과 표 13 와 같이 4,000bar 60초 이하압력에서는“탄수화물, 단백질, 수분, 회분, 지방, 나트륨, 당류, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤”등 에서 큰 변화는 없는 것으로 확인되었다. 이에 따라 압력조건을 설정할 때 4,000bar 60초 이하일 경우 영양성분의 변화는 고려하지 않더라도 특별한 문제는 없을 것으로 판단된다.

표13. 압력조건별 영양성분 변화

구 분	대조군	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
		120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
열량(kcal)	101	98	97	97	98	98	99	98	98	102
탄수화물(g/100g)	9.97	9.46	8.72	10.47	9.12	8.93	8.93	8.94	8.96	9.03
단백질(g/100g)	10.14	10.15	11.11	9.32	10.51	10.90	10.47	10.99	9.66	10.83
수분(g/100g)	75.98	76.34	76.59	76.41	76.79	76.47	76.46	76.40	77.25	76.09
회분(g/100g)	1.64	1.70	1.73	1.53	1.56	1.66	1.65	1.63	1.70	1.64
지방(g/100g)	2.27	2.35	1.85	2.27	2.02	2.04	2.49	2.04	2.43	2.41
나트륨(mg/100g)	364.04	415.28	443.82	401.22	412.93	389.29	390.02	387.39	435.88	429.83
당류(g/100g)	1.80	1.93	2.03	2.14	1.91	1.75	2.02	2.05	1.90	1.94
포화지방(g/100g)	0.25	0.25	0.21	0.25	0.21	0.23	0.26	0.21	0.27	0.26
트랜스지방(g/100g)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
콜레스테롤(mg/100g)	19.94	16.85	13.65	16.45	15.40	15.48	17.17	17.07	17.41	17.09
Ph	5.77	5.88	5.79	5.83	5.92	5.86	6.15	6.01	6.11	6.16

검사기관: 엔텍분석연구원

3) 유해미생물 변화

① 대장균(*Escherichia coli*)

HPP(초고압기) 압력조건에 따른 대장균 변화를 확인해본 결과를 표 14 과 같이 나타내었다. 초기균수가 2.6×10^5 CFU/g 일 때, 2,500bar에서 120sec 간 HPP 처리하였을 경우 6.2×10^4 (76.15%)으로 낮은 감소율을 보였으나, 같은 압력에서 180sec 처리하였을 때는 1.0×10^4 (96.15%)의 높은 감소율을 보이기 시작하여, 3,000bar 이상의 압력과 시간에서는 모두 98% 이상의 감소율을 보였다.

② 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)

HPP(초고압기) 압력조건에 따른 황색포도상구균 변화를 확인해본 결과 표 14 과 같이 나타내었다. 초기균수가 2.4×10^5 CFU/g 일 때, 2,500bar에서 120, 180sec 간 HPP 처리하였을 때의 감소율이 각각 1.1×10^5 (52.49%), 6.4×10^4 (73.44%)로 낮은 압력에서는 다른 위해미생물에 비해 감소율이 떨어지는 것으로 확인되었으나, 3,000 bar 의 경우 60sec에서 2.4×10^4 (90.12%) 의 감소율을 보이기 시작하여, 120sec 이상에서는 98 % 이상의 감소율을 나타내어 다른 위해미생물과 비슷한 감소율을 보였다. 따라서 황색포도상구균의 경우 3,000 bar 이상의 조건에서 높은 감소율을 보이는 것으로 생각된다.

③ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)

HPP(초고압기) 압력조건에 따른 리스테리아 모노사이토제네스 변화를 확인해본 결과를 표 14 과 같이 나타내었다. 초기균수가 1.6×10^5 CFU/g 일 때, 2,500bar에서 120, 180sec 간 HPP 처리하였을 때 각각 1.2×10^4 (92.50%), 1.0×10^4 (93.75%)로 다른 위해미생물에 비해 낮은 압력에서 높은 감소율을 나타내었으나, 3,000bar 이상의 압력과 시간에서는 다른 위해미생물과 비슷한 감소 경향을 보였고, 3,000bar 180sec 이상의 조건에서 95% 이상의 감소율을 나타내었다.

④ 살모넬라(*Salmonella typhimurium*)

HPP(초고압기) 압력조건에 따른 살모넬라 변화를 확인해본 결과 표 14 과 같이 나타내었다. 초기균수가 4.8×10^5 CFU/g 일 때, 2,500bar에서 120sec 간 HPP 처리하였을 경우 1.4×10^5 (70.83%)의 감소율을 보였으며, 180sec 처리하였을 때는 5.1×10^4 (89.38%)로 감소율이 점차 증가하다가 3,000bar 이상의 압력과 시간에서는 모두 96% 이상의 감소율을 보였다. 따라서 다른 위해미생물과 마찬가지로 3,000bar 이상의 조건에서 높은 감소율을 보이는 것으로 생각된다.

⑤ 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)

HPP(초고압기) 압력조건에 따른 장염비브리오 변화를 확인해본 결과 표 14 과 같이 나타내었다. 초기균수가 1.9×10^5 일 때, 2,500bar에서 120sec 간 HPP 처리하였을 경우 2.7×10^4 (85.79%)의 감소율을 보였으며, 180sec 처리하였을 때는 1.5×10^4 (92.11%)로 감소율이 점차 증가하다가 3,000bar 이상의 압력과 시간에서는 모두 96% 이상의 감소율을 보였다. 따라서 3,000 bar 이상의 조건에서 높은 감소율을 보이는 것으로 판단된다.

⑥ 유해미생물 변화에 따른 HPP 처리조건(표 14. 그림 9 참조)

위 결과에서와 같이 HPP(초고압기) 압력조건이 동일하더라도 “대장균, 황색포도상구균, 리스테리아모노사이토제네스, 살모넬라, 비브리오” 5종 유해미생물의 종류에 따라 감소율에 차이가 있었으며, 낮은 압력조건에서는 황색포도상구균과 살모넬라의 감소율이 가장 낮았고, 3,000bar에서 120sec 이상 처리할 경우 실험대상 모든 미생물의 감소율이 95% 이상으로

확인되었다. 이 같은 실험결과 볼 때 5종의 위해미생물에 대한 HPP 처리 최소 조건은 3,000bar에서 120sec 이상으로 판단된다.

표 14. 압력조건별 위해 미생물 변화

구 분	대조군	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
	초기균수	120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
<i>Escherichia coli</i>	2.6x10 ⁵	6.2x10 ⁴	1.0x10 ⁴	7.8x10 ³	3.8x10 ³	2.4x10 ³	4.2x10 ³	2.8x10 ³	1.1x10 ³	8.0x10 ²
감소율(%)		76.15%	96.15%	97.00%	98.54%	99.08%	98.38%	98.92%	99.58%	99.69%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4x10 ⁵	1.1x10 ⁵	6.4x10 ⁴	2.4x10 ⁴	4.2x10 ³	2.2x10 ³	3.8x10 ³	2.3x10 ³	1.2x10 ³	4.0x10 ²
감소율(%)		52.17%	73.33%	90.00%	98.25%	99.08%	98.42%	99.04%	99.50%	99.83%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.6x10 ⁵	1.2x10 ⁴	1.0x10 ⁴	8.6x10 ³	5.4x10 ³	3.8x10 ³	2.8x10 ³	2.2x10 ³	1.6x10 ³	1.4x10 ³
감소율(%)		92.50%	93.75%	94.63%	96.63%	97.63%	98.25%	98.63%	99.00%	99.13%
<i>Salmonell typhimurium</i>	4.8x10 ⁵	1.4x10 ⁵	5.1x10 ⁴	1.8x10 ⁴	1.2x10 ⁴	7.0x10 ³	5.7x10 ³	2.0x10 ³	1.4x10 ³	1.0x10 ³
감소율(%)		70.83%	89.38%	96.25%	97.50%	98.54%	98.81%	99.58%	99.70%	99.79%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.9x10 ⁵	2.7x10 ⁴	1.5x10 ⁴	7.5x10 ³	4.6x10 ³	3.4x10 ³	2.2x10 ³	1.2x10 ³	9.0x10 ²	6.0x10 ²
감소율(%)		85.79%	92.11%	96.05%	97.58%	98.21%	98.84%	99.37%	99.53%	99.68%

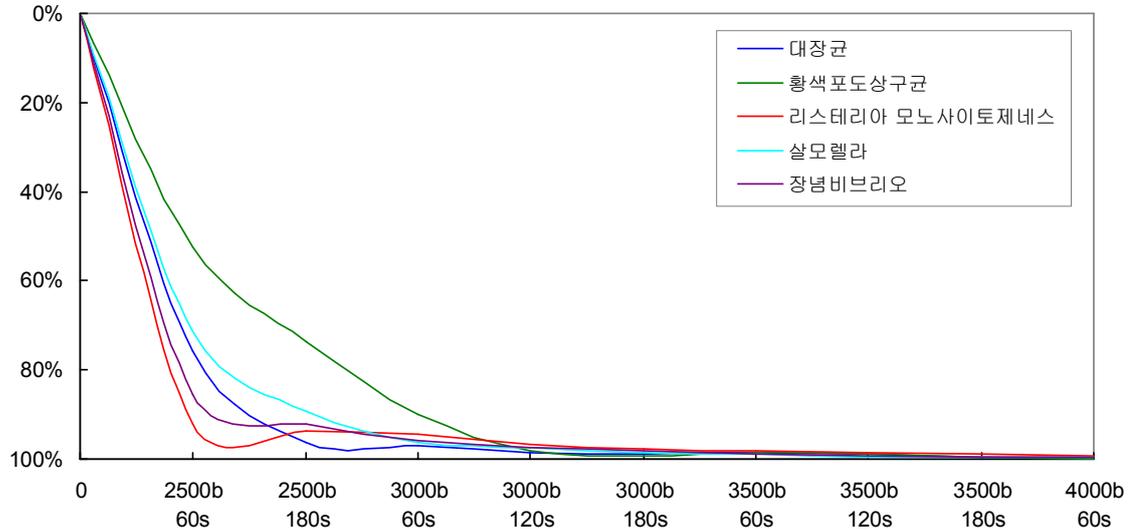


그림 9. 압력조건별 미생물 감소현황

제 6 절 대체바이러스 사멸조건

1. 연구수행방법 및 이론

비열처리 신가공기술인 초고압 처리기술 HPP(High-Press processing) 처리에 따른 노로바이러스 사멸조건을 설정하기 위하여 압력, 시간, 바이러스 초기 농도별 사멸정도를 확인하였다. 노로바이러스는 현재까지 인간의 장세포를 숙주로만 이용하여 증식하기 때문에 배양이 불가능하며 따라서 노로바이러스와 같은 *Caliciviridae* family에 속하면서 단일가닥 RNA를 지니고 유전학적, 생화학적, 물리화학적 특성이 유사한 대체 모델인 *Feline calicivirus*(FCV)를 노로바이러스 대체모델로 이용하여 Plaque assay 와 TCID₅₀ 두 검출방법에 따른 HPP 조건별 바이러스의 사멸도를 대조구와 비교 분석하였다. 모든 실험의 대조구는 HPP 처리를 하지 않은 시료를 이용하였으며, 3회 반복 실험하여 결과를 비교하였다.

1) 실험 전처리 방법 확립

굴에 바이러스를 접종시키기 위한 시료 처리 방법 및 바이러스 실험을 위한 전처리 방법을 확립하였다. 실험에 사용한 굴은 남해안 패류 청정구역의 양식장에서 채취하였으며, 탈각하여 실험 전까지 -70℃에서 보관하였다.

① 굴에 바이러스 접종 방법

굴 450g을 멸균한 blender를 이용하여 1분간 grinding한 후에 FCV 희석액 50ml 첨가하여 30sec간 다시 mixing 하였다. 일정모양의 ice-rack에 10g 씩 기포가 생기지 않도록 채운 다음 -20℃에서 하루 동안 시료를 얼린 후, 1개 단위로 진공 포장하여 실험 전까지 -70℃에서 보관하였다.

② 바이러스 실험을 위한 처리 방법

진공 포장된 굴을 각각의 사멸조건에 맞게 HPP 처리 후, 굴 육을 제외한 바이러스만을 취하기 위하여 신속하게 시료 3g 에 1x Phosphate buffer(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x, sigma) 3ml 를 동량으로 넣고 충분히 vortexing 해준 다음 3,000rpm 에서 15분간 원심분리하여 상등액만을 실험에 사용하였으며, 상등액은 1.5ml effendorf tube에 분주하여 실험 전까지 -70℃ 에 보관하였다.

2) 압력 및 처리 시간에 따른 FCV 사멸정도 측정

HPP 처리 압력 및 시간에 따른 FCV 사멸정도를 대략적으로 확인하기 위하여 FCV 최종농도가 4.8 log·TCID₅₀/ml 으로 처리된 시료를 각각 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000 bar의 압력으로 180sec 동안 처리 후, TCID₅₀ 을 이용하여 pretest 하였다.

pretest 결과를 바탕으로 FCV가 사멸되는 압력 및 시간을 세부적으로 알아보기 위하여 FCV 최종농도가 6.4×10^4 PFU/ml(4.3 log TCID₅₀/ml)으로 처리된 시료를 2,500, 3,000, 3,500, 4,000 bar의 압력으로 60, 120, 180sec 동안 처리하였으며, FCV 변화는 Plaque assay와 TCID₅₀을 이용하여 확인하였다.

또한, 높은 압력에서의 단시간 처리 효과를 보기 위하여 FCV 최종농도가 4.8 log·TCID₅₀/ml 으로 처리된 시료(대조군)를 4,000 bar의 압력에서 10, 30, 60sec 동안의 처리 후, TCID₅₀을 이용하여 그 결과를 확인하였다.

3) FCV 초기 농도별 사멸도 측정

굴 중의 FCV 초기농도에 따른 사멸정도를 확인하기 위하여 FCV 최종농도가 10², 10³, 10⁴, 10⁶ PFU/ml (2.3, 3.3, 4.3, 6.6 log TCID₅₀)으로 처리된 시료를 2,500, 3,000, 3,500, 4,000 bar의 압력으로 60, 120, 180sec 동안 HPP 처리하고, 그 결과를 Plaque assay와 TCID₅₀ 을 이용하여 확인하고 대조구와 비교하였다.

4) Plaque assay / TCID₅₀ 에 의한 FCV 사멸도 측정

HPP 처리 압력, 시간, 초기 FCV 농도에 따른 FCV의 사멸도를 측정하기 위하여 바이러스의 감염력을 이용하여 정량적으로 검출할 수 있는 Plaque assay 와 TCID₅₀ assay 두 방법을 이용하였다.

본 연구에 사용한 FCV의 숙주세포인 Crandell-reese feiline kidney(CrFK) CCL-94는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 75 cm² tissue culture flask (Corning, USA)에서 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO/BRL, USA), 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO/BRL, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2~3일 배양하였으며, 세포가 90% 이상 monolayer을 형성하면 계대 배양하여 사용하였다.

바이러스의 배양은 monolayer로 형성된 CrFK 세포에 FCV 배양액을 90분 동안 흡착시켜 바이러스가 감염될 수 있도록 한 후, maintenance medium (DMEM, 2% FBS)를 넣어준 뒤 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 24~48간 후 세포병변효과(cytopathic effects; CPE)가 일어나 부착된 세포들이 떨어지면 바이러스가 감염되었다고 판단하여 cell-debris는 제거하고 세

포를 파쇄시킨 후 바이러스현탁액을 이용하여 정량화하여 사용하였다.

① Plaque assay

CrFK cell을 10^4 cell/well이 되도록 6well plate에 분주하여 37°C, 5 % CO₂ 조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻었다. HPP 후처리된 sample 1ml 를 2% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagled's Medium (2% FBS DMEM; maintenance medium)을 이용하여 십진법으로 단계 희석하였다. 각 well 의 growth medium을 제거하고 PBS로 세척한 뒤, 단계 희석한 sample을 0.5ml 접종하여 90분 동안 37°C, 5 % CO₂ incubator 에서 infection 시켜 바이러스가 숙주세포에 흡착할 수 있도록 하였다. 그 후, 1.5 % agar와 2% FBS DMEM을 동량으로 섞은 overlay medium(0.75 % soft agar)를 2ml 분주하여 굳힌 후 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 plaque가 형성될 때 까지 배양한다. plaque가 형성되면 overlay medium을 떼어내고 3.7% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후, 0.1% crystal violet 으로 염색하여 생성된 plaque 수를 계수하여 PFU/ml (Plaque Forming Unit/ml)로 나타내었다.

② TCID₅₀ (50% Tissue culture infection dose)

96well plate 에 10^4 cell/well 이 되도록 분주하여 37°C, 5 % CO₂ 조건에서 48시간 배양하여 monolayer을 얻었다. 각 well 의 growth medium을 제거하고 HPP 후처리된 sample을 2% FBS DMEM을 이용하여 십진법으로 희석시킨 후, 50ul 씩 8개 well 에 분주하여 90분 동안 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 infection 시켜 바이러스가 숙주세포에 흡착할 수 있도록 하였다. 90분 뒤에 이를 다시 회수하고 각 well에 100ul의 maintenance medium 첨가하여 5일간 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 5일째에 maintenance medium을 제거하고 3.7% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후, 0.1 % crystal violet으로 염색하여 가시화하여 50%이상 CPE가 나타난 well의 희석단계를 그림 10 와 같이 Reed-Muench method로 산정하고 log TCID₅₀/ml로 표시하였다.

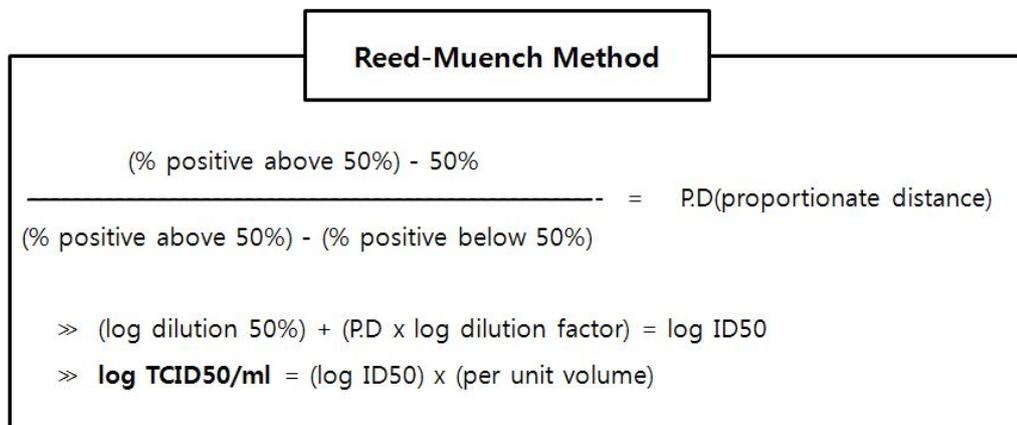


그림 10. TCID₅₀ 의 Reed-Muench Method

2. 연구결과

1) 실험 전처리 방법 확립

노로바이러스 대체바이러스인 FCV에 대한 HPP 처리 효과를 비교하기 위하여 굴에 FCV를 접종시키는 방법과 HPP 후 사멸 정도를 측정하기 위하여 점성이 있는 굴을 제외한 바이러스만을 취하기 위한 전처리 방법을 알아보았다.

① 굴에 바이러스 접종 방법

생 굴 자체에는 바이러스를 접종시키기 어려우므로, 그림 11 와 같이 생 굴을 grinding 하여 바이러스를 접종시키는 방법을 이용하였다. 굴 450g을 먼저 grinding 에 예상 최종 FCV 농도보다 1log 높은 바이러스를 50ml 첨가하여 최종 농도를 맞추었다. HPP 처리는 수중에서 이루어지기 때문에 grinding 한 굴을 일정모양의 ice-rack을 이용하여 10g 씩 일정하게 담아서 -20℃에서 하루 동안 얼린 후에 날개로 하나씩 진공 포장하여 수중에서도 압력을 견딜 수 있게 하였다.

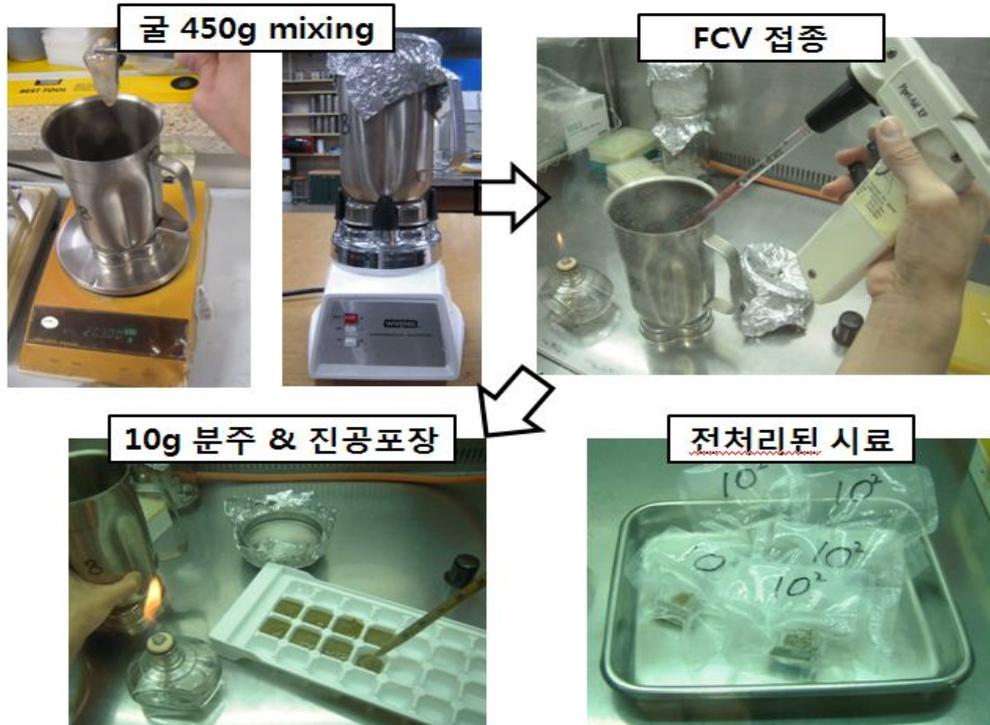


그림 11. 굴에 FCV를 접종시키는 방법.

② 바이러스 실험을 위한 처리 방법

시료는 굴 육에 의한 점성이 있으므로, HPP 처리 후 그 자체로 바로 cell에 감염시킬 수 없으며 pipetting 하기도 어렵기 때문에 그림 12 와 같이 시료를 희석시켜 이용하였다. HPP 처리 시료 10g을 15ml tube에 3g 넣고, 1x phosphate buffer를 3ml 넣어 충분히 vortexing 하여, 3,000rpm 15분간 centrifuge 하였다. 바이러스는 매우 작고 가볍기 때문에 낮은 rpm에서는 가라앉지 않고 상등액 중에 존재하므로 상등액만을 취하여 실험에 이용하였으며, 전처리된 시료 중에 FCV는 1/2 로 희석된 상태로 사멸 정도를 측정하게 되므로, 최종적으로 나온 값에 두 배를 해주게 된다.

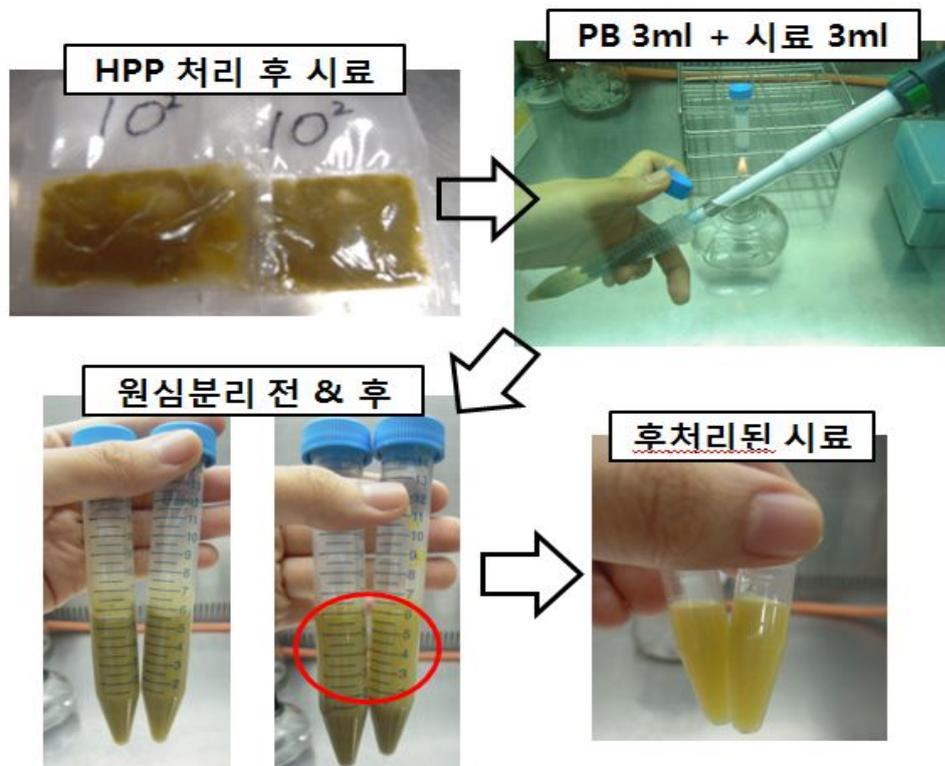


그림 12. HPP 후 바이러스 실험을 위한 전처리 방법.

2) 압력 및 처리 시간에 따른 FCV 사멸정도 측정

Holding time 180sec 동안 4.8 log TCID₅₀/ml 농도의 FCV 시료를 6가지 압력 (1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000 bar) 으로 pretest 한 결과를 표 15 와 그림 13 에 나타내었다. 대조군 과 비교한 결과, 1,000 bar에서는 차이를 보이지 않았으나, 2,000 bar 부터 50.79 % 감소되기 시작하여 4,000 bar에서는 바이러스가 100 % 사멸되는 것으로 확인되었다.

표 15. HPP 처리 압력에 따른 FCV 의 변화 (Pretest)

(단위 : log TCID/ml)

180sec 압력 조건 (bar)						
대조군	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000
4.8	4.8	4.5	2.1	ND	ND	ND
감소율(%)	0 %	50.79	99.79 %	100 %	100 %	100 %

* 3회 반복실험 후 평균값

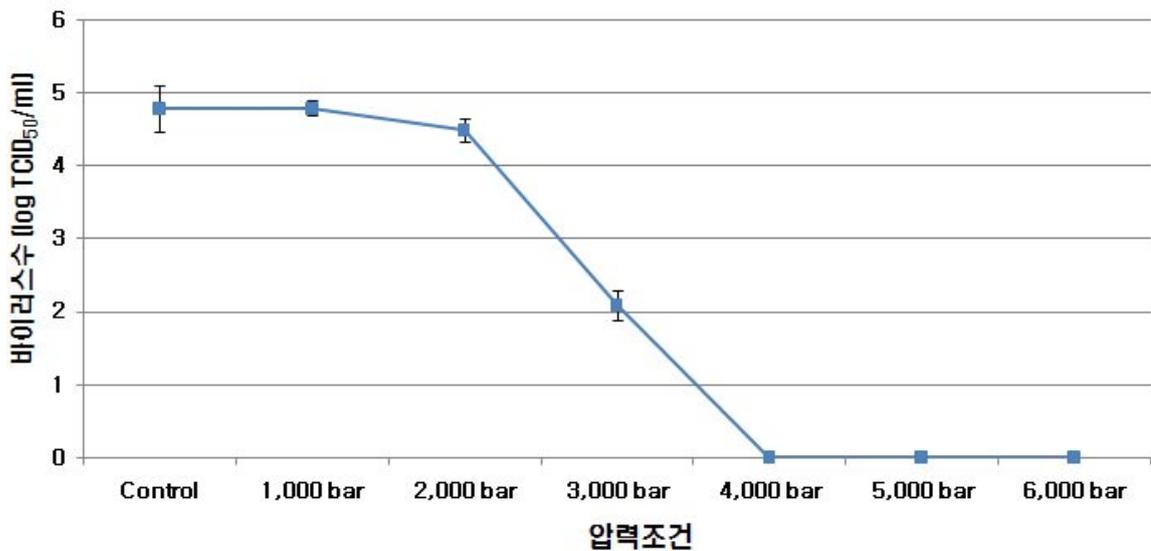


그림 13. HPP 처리 압력에 따른 FCV 의 변화 (Pretest).

pretest 결과를 바탕으로 FCV가 감소되기 시작하는 압력인 2,000 bar 부터 모두 사멸되는 4,000 bar 사이의 압력과 시간을 세분화 시켜 Plaque assay와 TCID₅₀을 통해 변화를 관찰하였으며 그 결과를 대조군과 비교하여 표 16 과 그림 14 에 나타내었다.

pretest와 마찬가지로 HPP 처리 압력이 높아짐에 따라 FCV 감소율 또한 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 3,500 bar 부터 99 % 이상의 감소율을 나타내었고 4,000 bar에서 100 % 의 감소율을 보였다. HPP 처리시간에 따른 감소율을 비교해보면 같은 압력 내에서 60초 간격으로 처리시간을 두었을 때, 처리시간 연장에 따른 FCV 감소율은 크지 않은 것을 볼 수 있었다.

표 16. HPP 처리 압력과 시간 세분화에 따른 FCV 변화

압력(bar)	시간(sec)	실험 방법			
		Plaque assay (PFU/ml)	감소율(%)	TCID ₅₀ (log TCID ₅₀ /ml)	감소율(%)
대 조 균		6.4 x 10 ⁴		4.3	
2,500	120	1.6 x 10 ⁴	75.00 %	3.5	84.00 %
	180	1.2 x 10 ⁴	81.25 %	3.3	90.00 %
3,000	60	4.0 x 10 ³	93.75 %	3.0	95.00 %
	120	3.6 x 10 ³	94.38 %	2.5	98.40 %
	180	4.8 x 10 ²	99.25 %	1.6	99.80 %
3,500	60	1.2 x 10 ²	99.81 %	1.6	99.80 %
	120	4.0 x 10 ¹	99.93 %	1.5	99.84 %
	180	2.0 x 10 ⁰	99.99 %	1	99.95 %
4,000	60	ND	100 %	ND	100 %

* 3회 반복실험 후 평균값

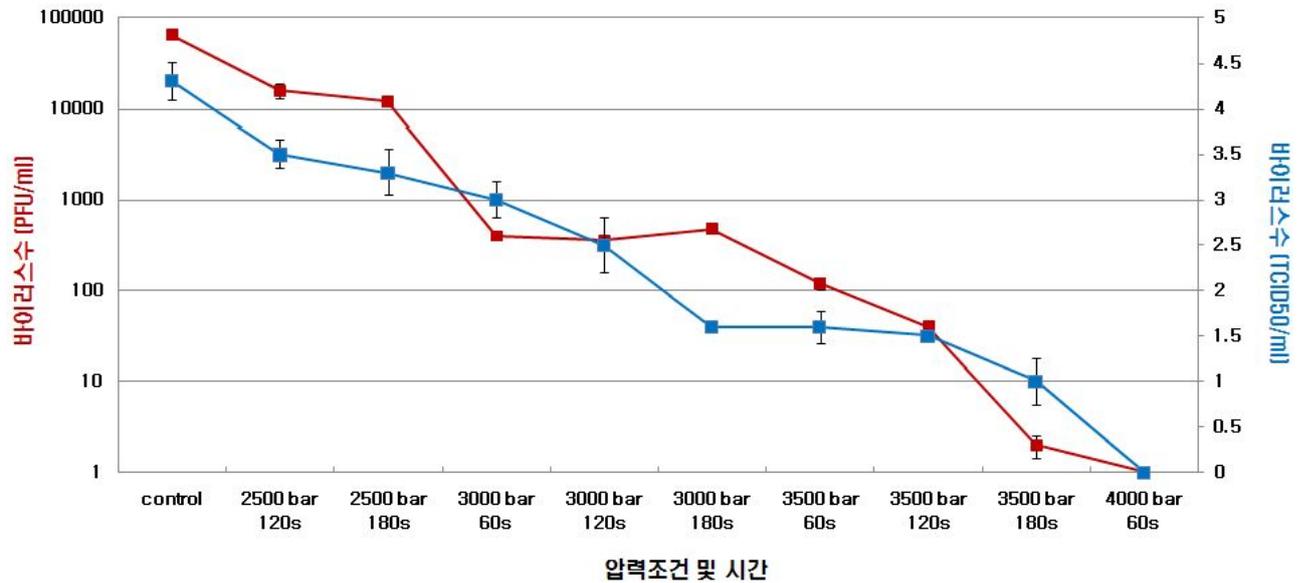


그림 14. HPP 처리 압력과 시간 세분화에 따른 FCV 변화.

위 실험에 추가적으로 4,000 bar에서 holding time을 줄이기 위하여 10, 30, 60sec 로 좀 더 세분화시켜 TCID₅₀을 이용하여 FCV 사멸도를 확인하고 대조구와 비교하여, 표 17 와 그림 15 에 나타내었다. 10, 30sec 모두 99.9 % 이상의 높은 감소율을 보였으나 60초에서 100% 감소율을 보였다.

표 17. 시간에 따른 FCV 변화 (4,000bar)

압력 (bar)	시간 (sec)	TCID ₅₀ (log TCID ₅₀ /ml)	감소율(%)
대 조 군		4.5	
	10	1.5	99.90 %
4,000	30	0.5	99.99 %
	60	ND	100 %

* 3회 반복실험 후 평균값

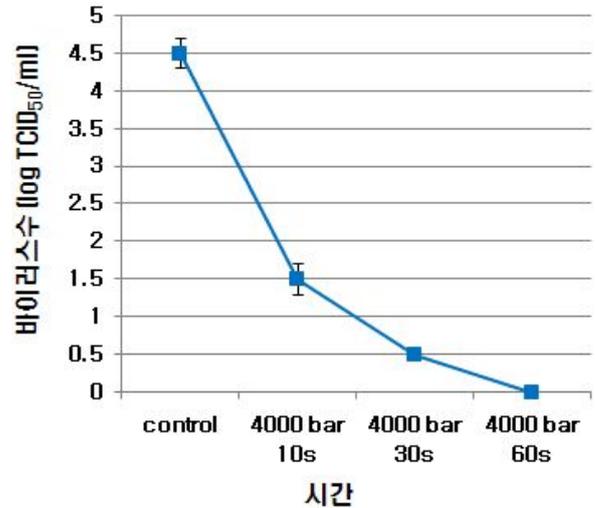


그림 15. 시간에 따른 FCV 변화 (4,000bar).

따라서, 종합적인 결과 처리 시간의 연장보다 압력의 증가에 FCV가 더 큰 영향이 받는 것으로 판단되며, 이와 같은 결과로 볼 때 낮은 압력에서 긴 시간 holding time을 두는 것 보다 높은 압력에서 단시간 holding time을 두는 것이 노로바이러스 감소에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

HPP 처리 압력과 시간을 종합하여 볼 때 4,000 bar에서 60sec 동안 처리했을 경우 굴 중에 노로바이러스를 완전히 불활성화 시킬 것으로 예상된다.

3) FCV 초기 농도별 사멸정도 측정

굴 중에 FCV 초기 농도를 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 PFU/ml (2.0, 3.0, 4.0, 6.0 log TCID₅₀/ml)으로 처리된 시료를 4가지 압력(2,500, 3,000, 3,500, 4,000 bar)으로 60, 120, 180sec 동안 HPP 처리한 결과를 표 18 과 그림 16, 17 에 나타내었다. 검출 방법에 따라 차이를 보이기는 하지만 대체적으로 FCV 초기농도가 낮을수록 낮은 압력에서 적은 시간에 사멸하는 것을 볼 수 있었다.

4) Plaque assay / TCID₅₀ 에 의한 FCV 사멸도 측정

바이러스의 감염력을 이용하여 정량적으로 검출할 수 있는 Plaque assay 와 TCID₅₀ 두 방법을 이용하여 HPP 처리 압력, 시간, 초기 FCV 농도에 따른 FCV의 사멸도를 측정하고 그 결과를 표 18 과 그림 16, 17 에 나타내었다. FCV 초기 농도 10^4 , 10^6 PFU/ml (4.0, 6.0 log TCID₅₀/ml)의 경우 비슷한 감소 경향을 나타내었으나, 초기 농도가 10^2 , 10^3 PFU/ml (2.0, 3.0 log TCID₅₀/ml)으로 낮을 경우에는 방법에 따른 감소율의 차이를 보였다.

Plaque assay의 경우 초기 FCV가 10^2 일 때 3,000 bar 120 sec, 10^3 일 때는 3,500 bar 180sec 만에 100%, 감소율을 보였으나, 같은 시료를 사용하여 TCID₅₀으로 실험하였을 경우 2,500

bar 120sec, 2,500 bar 180sec에 100 % 감소율을 나타내었다. 이러한 방법에 따른 감소율 차이가 나타나는 이유는 detection sensitivity 에 의한 것으로 판단되어진다. Plaque assay 에 비하여 TCID₅₀은 통계학적인 수치를 이용한 방법이기 때문에 상대적으로 검출율이 Plaque assay 에 비하여 부정확하다고 할 수 있으며, 따라서 FCV 감소율을 보기 위해서는 Plaque assay 가 유효할 것으로 판단된다.

표 18. 굴 중에 FCV 초기 농도 및 검출 방법에 따른 HPP 처리 후 변화

압력(bar)	시간(sec)	실험 방법			
		Plaque assay (PFU/ml)	감소율(%)	TCID ₅₀ (log TCID ₅₀ /ml)	감소율(%)
초기 FCV 농도		2.4 x 10 ²		2.3	
2,500	120	4.0 x 10 ¹	83.33 %	ND	100 %
	180	1.0 x 10 ¹	95.86 %	ND	100 %
3,000	60	2.0 x 10 ⁰	99.16 %	ND	100 %
	120	ND	100 %	ND	100 %
	180	ND	100 %	ND	100 %
3,500	60	ND	100 %	ND	100 %
	120	ND	100 %	ND	100 %
	180	ND	100 %	ND	100 %
4,000	60	ND	100 %	ND	100 %
초기 FCV 농도		2.0 x 10 ³		3.3	
2,500	120	3.6 x 10 ²	82.00 %	2.3	90.00 %
	180	2.0 x 10 ²	90.00 %	ND	100 %
3,000	60	1.2 x 10 ²	94.00 %	ND	100 %
	120	8.2 x 10 ¹	95.90 %	ND	100 %
	180	4.4 x 10 ¹	97.80 %	ND	100 %
3,500	60	2.4 x 10 ¹	98.90 %	ND	100 %
	120	1.0 x 10 ⁰	99.95 %	ND	100 %
	180	ND	100 %	ND	100 %
4,000	60	ND	100 %	ND	100 %
초기 FCV 농도		6.4 x 10 ⁴		4.3	
2,500	120	1.6 x 10 ⁴	75.00 %	3.5	84.00 %
	180	1.2 x 10 ⁴	81.25 %	3.3	90.00 %
3,000	60	4.0 x 10 ³	93.75 %	3.0	95.00 %
	120	3.6 x 10 ³	94.38 %	2.5	98.40 %
	180	4.8 x 10 ²	99.25 %	1.6	99.80 %
3,500	60	1.2 x 10 ²	99.81 %	1.6	99.80 %
	120	4.0 x 10 ¹	99.93 %	1.5	99.84 %
	180	2.0 x 10 ⁰	99.99 %	1	99.95 %
4,000	60	ND	100 %	ND	100 %
초기 FCV 농도		1.5 x 10 ⁶		6.6	
2,500	120	1.8 x 10 ⁵	88.00 %	5.8	84.25 %
	180	1.3 x 10 ⁵	91.33 %	5.3	95.00 %
3,000	60	8.4 x 10 ⁴	94.40 %	5.3	95.00 %
	120	1.4 x 10 ⁴	99.06 %	4.8	98.43 %
	180	1.0 x 10 ⁴	99.33 %	4.3	99.50 %
3,500	60	4.8 x 10 ³	99.68 %	3.3	99.95 %
	120	4.4 x 10 ²	99.97 %	2.8	99.98 %
	180	1.2 x 10 ²	99.99 %	2.6	99.99 %
4,000	60	4.0 x 10 ¹	99.99 %	2.3	99.99 %

* 3회 반복실험 후 평균값

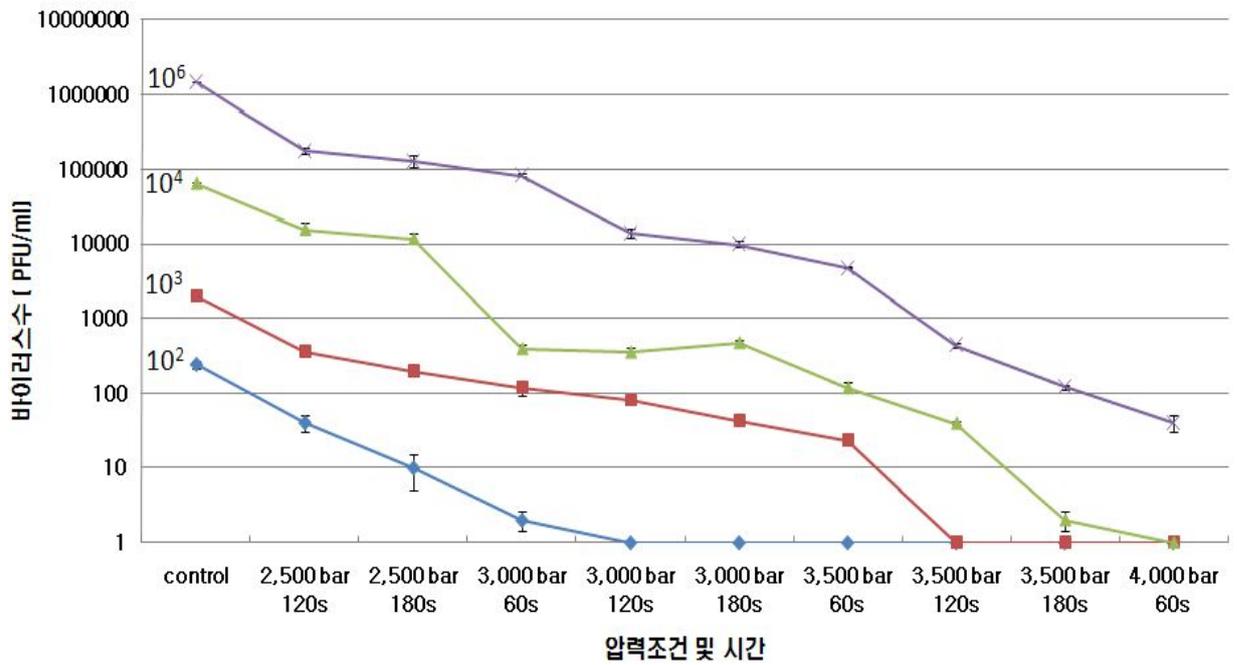


그림 16. 글 중에 FCV 초기 농도 및 Plaque assay 에 따른 변화.

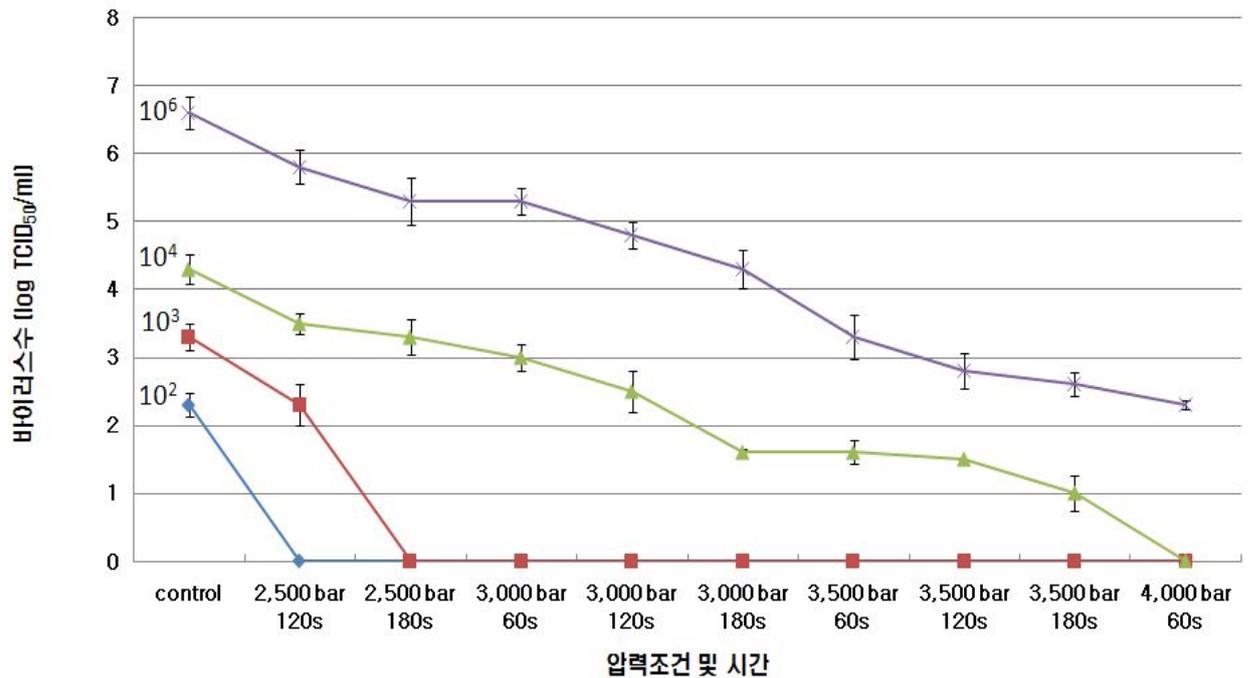


그림 17. 글 중에 FCV 초기 농도 및 TCID₅₀ 에 따른 변화.

제 7 절 관능적 변화를 최소화한 최적 가공.탈각조건 및 보존성 연장확인 연구

1. 연구수행 방법 및 이론

1) 탈각

탈각하지 않은 원료 굴을 수온 15℃ HPP(초고압기)에 넣어 2,500bar에서 2분 3분, 3,000bar에서 1분 2분 3분, 3,500bar에서 1분 2분 3분, 4,000bar 1분의 압력과 시간으로 각각 처리한 후 도구 없이 손으로 탈각 가능유무를 확인하였으며, 압력조건별로 50개씩 각각 확인하였다.

2) 보존성 검사

탈각하지 않은 원료 굴을 수온 15℃ HPP(초고압기)에 넣어 2,500bar에서 2분 3분, 3,000bar에서 1분 2분 3분, 3,500bar에서 1분 2분 3분, 4,000bar 1분의 압력과 시간으로 각각 처리한 후 빙장(0~2℃) 보관하면서 압력처리하지 않은 대조군과 비교확인 하였다. 보존성 검사는 2일, 4일, 6일, 8일, 10일 경과시점의 세균수를 각각 확인하였으며, 세균수 검사는 “II-I. 유해미생물 사멸조건 의 1. 연구수행 방법 및 이론 의 3) 유해미생물 검사” 와 동일한 방법으로 진행하였다.

3) 보관기간 경과에 따른 관능검사

탈각하지 않은 원료 굴을 수온 15℃ HPP(초고압기)에 넣어 2,500bar에서 2분 3분, 3,000bar에서 1분 2분 3분, 3,500bar에서 1분 2분 3분, 4,000bar 1분의 압력과 시간으로 각각 처리한 후 빙장(0~2℃) 보관하면서 관능검사를 실시하였다. 50세 이하 16명(男 8명, 女 8명)으로 구성된 관능평가 요원을 선별하여 HPP직후, 5일, 8일 경과시점에서 검사를 실시하였으며, 관능검사를 실시하기 전에 대조군을 제시하여 시식케 한 후 3개의 샘플씩 처리조건을 비밀로 하여 굴의 향, 외관, 맛, 전반적인 기호도 4가지 항목에 대하여 평가토록 하였다.

평가배점은 대조군을 5점 기준으로 “대조군과 차이없다 5점, 대조군보다 조금 미흡하지만 싫지 않다 3점, 대조군에 비해 품질이 현저히 떨어지며 싫다 1점”으로 평가하였고 향, 외관, 맛, 전반적인 기호도 4가지 항목의 평균값을 종합평가 점수로 환산하였다.

2. 연구결과

1) 탈각

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴의 탈각율 변화를 확인한 결과 표 19 에서와 같이 2,500bar에서 2분 처리하였을 때 50개중 46개(92%)가 탈각되었으며, 3분 처리하였을 때는 48개(96%)가 탈각되었다. 3,000bar이상에서는 모두 손으로 쉽게 탈각되는 것으로 확인되었다.

표19. 압력조건별 탈각율

구 분	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
	120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
탈각수	46	48	50	50	50	50	50	50	50
탈각율	92%	96%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

2) 보존성

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴을 2일 간격으로 총 10일간 세균수 변화를 확인한 결과 그림 18 에서 나타난 결과와 같이 압력과 시간이 증가할수록 미생물의 증식이 억제되었음을 알 수 있었다. 특히 8일 경과시점에서 3,000bar 1분 이하 압력조건에서 처리한 것과 2분 이상 처리한 것의 차이가 뚜렷하게 나타남을 확인할 수 있었다.

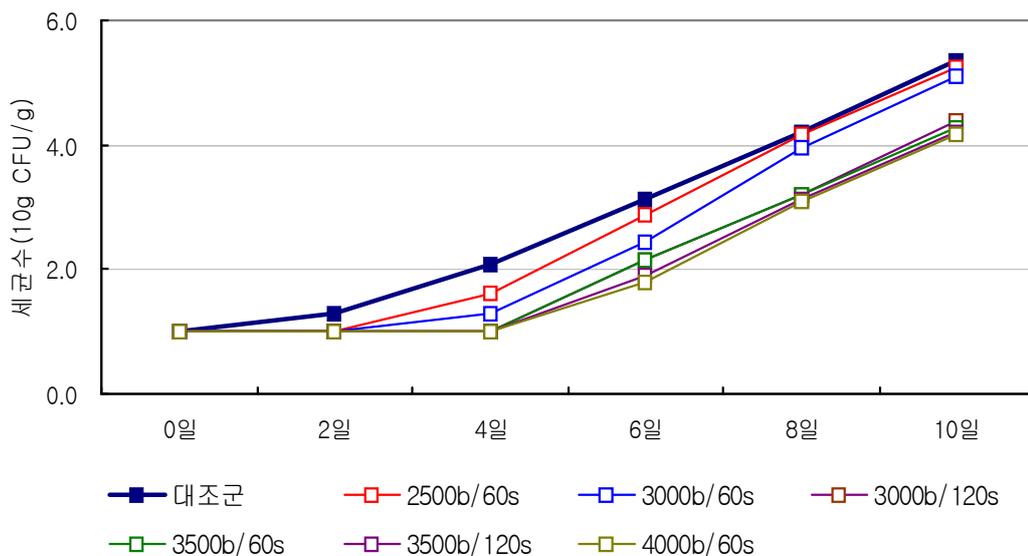


그림18. HPP 처리조건에 따른 세균증식 변화

미생물변화를 자세히 살펴보면 표 20 에서와 같이 10일 경과시점에서 대조군의 세균수가 3.7×10^6 CFU/g 일 때 2,000bar에서 2분 처리한 것은 2.4×10^6 CFU/g, 3,000bar에서 2분 처리한 것은 3.9×10^5 CFU/g, 3,500bar에서 2분 처리한 것은 1.9×10^5 CFU/g 으로 압력이 증가할수록 세균의 증식을 감소가 나타났다. 처리시간에 따른 세균수도 10일 경과시점에서 3,000bar 압력에서 1분일 때 1.1×10^5 CFU/g, 2분일 때 3.9×10^4 CFU/g, 3분일 때 28×10^4 CFU/g 으로 시간증가에 따라 세균의 증식감소가 뚜렷하게 확인되었다.

식품공전 「비가열섭취냉동식품의 성분규격」에 따른 경우 세균수가 1.0×10^5 CFU/g 이하일 때 그냥 섭취할 수 있는 조건임을 감안해서, 현재까지의 연구결과를 토대로 설정할 수 있는 적정유통기한은 8일 정도로 판단되며 압력조건은 최소 3,000bar에서 1분 이상 처리해야 될 것으로 생각된다.

표20. HPP처리 조건별 보관기간에 따른 세균 증식변화

구분	대조군	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
		120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
D-0	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
D+2	3.0×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
D+4	1.1×10^3	6.0×10^2	4.0×10^2	3.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
D+6	1.2×10^4	8.6×10^3	6.1×10^3	4.6×10^3	1.6×10^3	1.4×10^3	1.4×10^3	9.0×10^2	7.0×10^2	8.0×10^2
D+8	2.2×10^5	1.6×10^5	1.3×10^5	9.7×10^4	2.1×10^4	1.7×10^4	1.8×10^4	1.3×10^4	1.0×10^4	1.1×10^4
D+10	3.7×10^6	2.4×10^6	1.9×10^6	1.1×10^6	3.9×10^5	2.8×10^5	2.6×10^5	1.9×10^5	1.4×10^5	1.6×10^5

3) 보관기간 경과에 따른 관능검사

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴의 관능상태를 0일, 5일, 8일 경과시점에서 대조군과 비교해본 결과 표 21 에서와 같이 압력과 처리시간이 증가할수록 종합평가 점수가 낮은 것으로 확인되었다. 경과시점별로 차이를 살펴보면 3,000bar에서 2분 기준 0일 일 때 4.5점, 5일 경과시점 4.1점으로 낮아졌지만 8일 경과시점에서는 4.5점으로 대조군과 비교했을 때 5일 경과시점 보다 관능변화가 오히려 더 적은 것으로 확인되었다. 이 같은 결과는 다른 압력조건에서도 비슷한 양상을 보이는 것으로 나타났다. HPP(초고압기)처리하는 8일 경과시점에서 관능상태가 일정수준(4.5점)이상 유지할 수 있는 압력조건을 정하여 처리하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

표21. HPP처리 조건별 보관기간에 따른 관능상태 변화

구분	2,500bar		3,000bar			3,500bar			4,000bar
	120s	180s	60s	120s	180s	60s	120s	180s	60s
D-0	4.6	4.6	4.6	4.5	4.2	4.4	4.2	3.9	3.9
D+5	4.4	4.2	4.2	4.1	4.1	4.2	4.0	3.8	3.8
D+8	4.6	4.6	4.7	4.5	4.4	4.3	4.1	3.9	4.0

제 8 절 비열처리 생굴의 포장디자인 개발 및 시장성 조사

1. 포장디자인 개발

1) 연구목표

HPP(초고압기)로 압력 처리한 굴을 원래의 형태(홀셀) 그대로 마켓에서 판매하기 위해서는 HPP 후 굴이 쉽게 탈각되는 문제를 해결하기 위한 새로운 포장방법의 개발이 선행되어야 한다. “Ⅲ. 관능적 변화를 최소화한 최적 가공 조건 및 탈각조건 의 2.연구결과의 1)탈각”에서와 같이 HPP로 압력처리하면 대부분의 굴이 탈각되므로 이를 해결할 수 있는 포장이어야 하며, 추가로 진열.판매가 용이하고 소비자가 쉽게 운반할 수 있는 형태의 포장개발이 필요하다.

2) 연구결과

그림 19 에서와 같이 탈각하지 않은 굴에 수축필름을 씌운 후 수축시킨 다음 HPP로 압력 처리한 결과 수축비닐을 벗기면 껍질과 굴이 쉽게 분리되었지만 벗기지 않은 상태에서는 분리되는 문제는 없었다.



그림19. 홀셀 탈각방지 포장

마켓에 판매 하기위한 포장은 그림 20 과 같이 제품을 위생적으로 보관할 수 있고 진열이 용이하며 소비자가 부담 없이 구매할 수 있는 500g 정도의 포장단위로 개발하였다. 또한 운반이 용이하도록 손잡이가 부착된 포장용기를 사용하였다.



그림20. 홀셀 포장디자인 샘플

2. 시제품 생산을 위한 HPP 조건 설정

시제품 생산을 위한 HPP 압력처리 조건은 “II. 유해미생물 및 노로바이러스 사멸조건과 III. 관능적 변화를 최소화한 최적 가공 조건 및 탈각조건”에서 연구한 결과를 토대로 유해미생물 및 노로바이러스의 감소율이 높으면서 탈각이 용이하고, 관능변화는 적고, 보존성 또한 안전하게 섭취할 수 있는 상태를 확인하여 최적의 HPP 처리조건을 표 22 와 같이 도출하였다.

표22. HPP최적의 처리조건

구 분	적정기준	압력조건(수온 15℃)	최적 처리조건
관능상태	종합평가 4.5점 이상	3,000bar 2분 이하	압력: 3,000bar 시간: 2분 수온: 15℃
영양성분	-	4,000bar 1분 이하	
유해미생물	95%이상 살균	3,000bar 2분 이상	
FCV	95%이상 감소(TCID ₅₀)	3,000bar 1분 이상	
탈 각	100% 탈각	3,000bar 1분 이상	
보존성	8일경과 세균수 10*10 ⁴ 이하	3,000bar 1분 이상	
	8일경과 관능상태 4.5점 이상	3,000bar 2분 이하	

3. 최종소비자를 대상으로 한 기호도 분석

1) 기호도 분석방법

탈각하지 않은 원료 굴을 깨끗하게 세척하여 수축필름으로 씌운 다음 수축 시켜 표22의 최적 처리조건(3,000bar, 2분, 15℃)으로 초고압 처리한 후 그림20 의 포장용기에 500g 씩 포장하였다.

ICE박스에 얼음을 채운 후 3~4pack 씩 포장된 제품을 52곳 가정에 각각 배달하여 주부들을 대상으로 평가토록 하였으며, 평가는 맛, 신선도, 가격, 구매의사 4가지 항목으로 평가하였고 소비자 가격은 500g pack당 5,800원을 제시하였다. 평가배점은 “매우좋음 5점, 좋음 4점, 보통 3점, 나쁨 2점, 매우나쁨 1점”으로 채점토록 하였다.

2) 기호도 분석결과

기호도조사결과 표23 와 같이 종합점수가 맛과 신선도는 각각 4.3점, 4.5점으로 높게 나타나 상품성은 좋은 것으로 평가되었으나, 제시된 소비자 가격이 비교적 높은 것으로 평가되어 보통점수인 3.0점으로 나왔고 구매의사 또한 3.4점으로 보통 수준보다 약간 높은 것으로 확인되었다.

표23. 기호도 분석결과

대상연령	맛	신선도	가격	구매의사
30대	4.1	4.4	3.3	3.4
40대	4.4	4.6	3.1	3.5
50대	4.5	4.5	2.6	3.3
종합점수	4.3	4.5	3.0	3.4

연령대별 조사결과를 보면 맛의 경우 30대가 4.1점인데 비해 40대와 50대는 4.4점, 4.5점으로 상대적으로 높게 나타났으며, 소비자 가격에 대한 평가는 30대 3.3점, 40대 3.1점, 50대 2.6점으로 연령이 높을수록 가격에 대한 점수가 낮게 평가되었다. 가장 중요한 구매의사에서는 40대3.5점, 30대3.4점, 50대3.3점 순으로 큰 차이 없이 비교적 낮게 나타났다. 이 같은 평가결과는 그림21에서 쉽게 파악할 수 있듯 맛과 신선도는 좋으나 가격이 높아 구매의사를 떨어뜨리는 결과가 나타났음을 알 수 있었으므로, 소비자가 인하를 위한 원가절감 방안 마련이 필요할 것으로 파악된다.

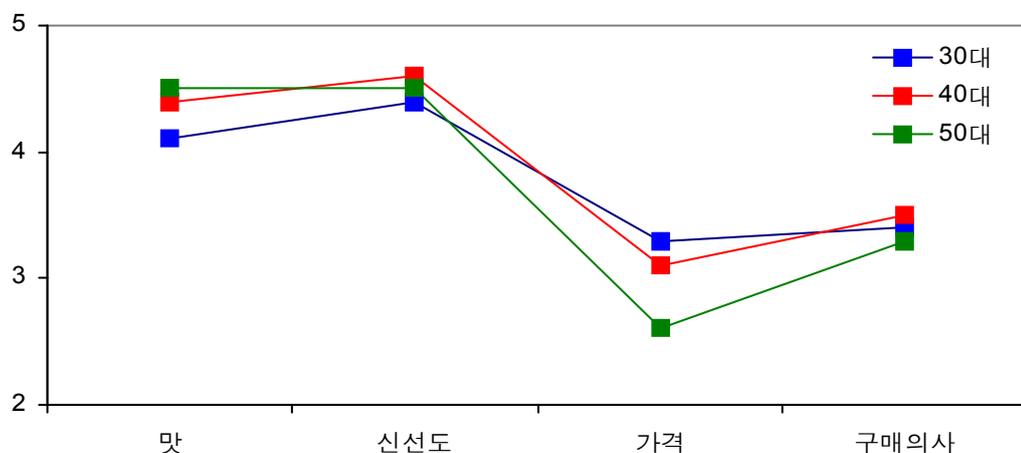


그림21. 기호도 분석결과표

제 9 절 생굴의 포장/가공 조건에 따른 최적 가공조건 및 유해미생물과 바이러스 사멸을 위한 생산공정 시스템 개발

1. 연구목표

위 연구결과와 선진 식품안전 시스템을 도입하여 양식장에서부터 최종제품 출하 후 유통 단계까지 공정의 전 단계를 대상으로 관리기준을 수립하여 생굴에서 발생될 수 있는 식품안전 사고를 예방하고, 최적의 가공조건으로 효율적인 생산이 이루어질 수 있는 공정을 개발하는 것이다.

2. 포장/가공 조건에 따른 최적가공조건 및 유해미생물과 바이러스 사멸을 위한 생산공정 시스템 개발

1) 양식

① 채묘(씨앗)

- 굴의 껍질을 해수에 담궈서 유생을 굴껍질에 자연 부착시킴.
- 시기: 6~8월(평균수온: 23.8℃)
- 방법
 - 생굴박신(굴까기 작업)후 굴껍질의 좌각을 4~5월 굴껍질에 구멍을 뚫어 구슬을 꿰듯 50~60개씩 꿰어 놓음.(1)
 - 멧목에 적재하였다가 해당지역으로 이동.(2)
 - 굴껍질을 수중에 투입(수중채묘) (3, 4)
- ※ 해수의 흐름과 햇볕 노출에 따라 자연적으로 부착시키는 방법



그림 1



그림 2



그림 3



그림 4

② 단련

- 굴껍질에 부착된 굴유생(씨앗)을 일정시간 햇볕노출을 통하여 성장을 억제시켜가며 건강한 굴만을 얻기 위하여 단련시킴.
- 시기: 9월 ~ 익년4월(평균수온: 14.6℃(8~24℃))
 - 채묘연. 유생이 다닥다닥 붙어있음.(1)
 - 한개의 껍질당 40~50여개의 치패중에 20~30개만이 단련과정에서 살아 남음.(2)

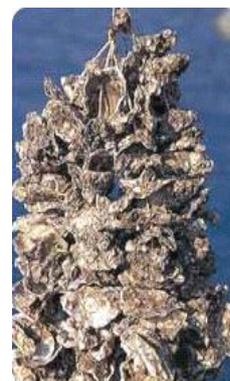


그림 1



그림 2

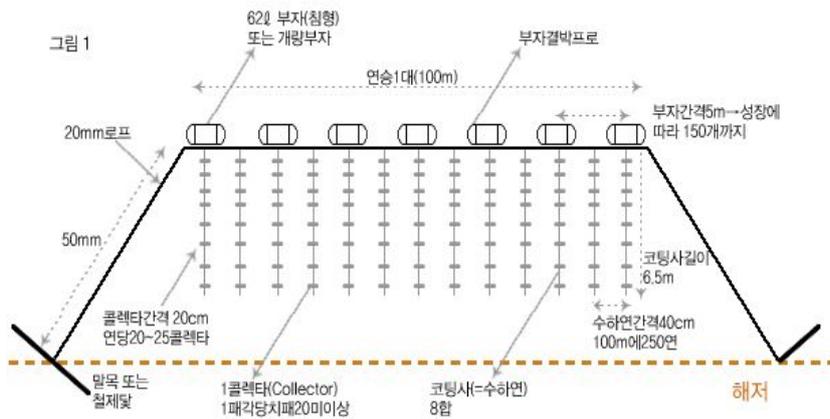


그림 3

- 단련상의 모습. 적절한 장소, 설치 간격과 적당한 시간에 맞춰 굴을 단련 (3)

③ 수하

- 종묘 중 우량한 것을 선별 후 20~25개씩(밀집도를 떨어뜨려 굴의 섭취양분을 증식코저) 조립하여 어장으로 이동한 다음 수면에 연승 수하식으로 시설함.
- 시기: 5월(평균수온: 14.6℃)



④ 양성

- 수하를 한 후 자연해수에서 일정기간 동안 성장시킴
- 여기에서 해수와 적정영양분 밀도 및 굴의 발육상태, 크기가 형성됨. ○ 시기: 6~8월(평균수온: 23.8℃)



그림 2

⑤ 채취

- 시기: 9월~익년 5월(평균수온: 14.8℃(8~24℃))
- 방법
 - 성장된 굴은 동력 굴 채취기를 이용하여 채취
 - 1차 세척 후 박스에 담아 가공공장으로 이송



그림 1



그림 2



그림 3

2) 탈각굴 제조과정

□ 전처리

① 입하



선박을 이용하여 살아있는 생굴을 공장까지 입하



② 세척 - 보관



고압해수세척기를 이용하여 굴 껍질에 부착된 이물질 제거 후 0~5℃ 냉장실에 보관



③ 바스켓담기



착각굴(탈각하지않은 굴원료)을 컨베어를 이용하여 바스켓에 담기



④ HPP처리



HPP 에 착각굴이 담긴 바스켓을 넣고 가동



⑤ 탈각



HPP통과 후 껍질과 분리된 굴을 용기에 담기

□ 냉장굴가공

⑥ 세척



굴을 해수와 Air를 이용하여 표면을 세척



⑦ 선별



컨베어를 이용하여 굴을 이송시키면서 이물질이나 파손된 굴 등을 제거



⑧ 냉각



굴의 신선도 유지를 위해 0~5℃ 냉각수에 급속냉각



⑨ 이물질 제거



포장 전 전수검사를 실시하여 잔존 가능성이 있는 굴 껍질 조각 등 이물질 제거



⑩ 계량/포장



굴을 5~10kg 단위로 비닐에 넣어 묶은 후 얼음이 채워져 있는 ICE 박스에 포장



⑪ 보관/출하



ICE 박스를 테이프와 밴딩끈으로 묶은 후 0~5℃ 냉장차량을 이용하여 출하

□ I.Q.F 냉동굴가공

⑥ 세척



굴을 해수와 Air를 이용하여 표면을 세척

⑦ 선별



수작업으로 전수검사를 실시하여 잔존 가능성이 있는 굴 껍질 조각 등 이물질 제거

⑧ 팬닝



동결용 Tray에 굴 Size별로 나열

⑪ 글레이징



글레이징 컨베어를 이용하여 5℃이하 냉각수에 굴을 넣어 빙의를 입힘

⑩ 탈판



Tray를 비틀어 동결된 굴을 Tray에서 분리시킴

⑨ 급속동결



-35℃이하 연속식 Belt Freezer 로 급속동결

⑫ X-Ray 통과



X-Ray에 통과시켜 이물질 혼입유무를 검사

⑬ 포장



일정중량 단위별로 포장

⑭ 냉동보관 - 출하



-18℃ 이하 냉동실에 보관 후 출하

3) 냉동 홉셀 제조과정

① 입하



선박을 이용하여 살아있는 생굴을 공장까지 입하

② 1차 세척



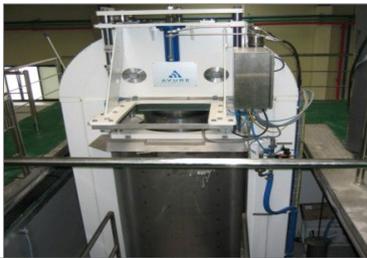
고압해수세척기를 이용하여 굴 껍질에 부착된 이물질 제거

③ 2차 세척 및 선별



술을 이용하여 굴 표면을 깨끗하게 세척하면서 파손된 것 등 불량원료 선별 후 0~5℃ 냉장실에 보관

⑥ HPP 처리



HPP에 착각굴이 담긴 바스켓을 넣고 가동

⑤ 바스켓 담기



탈각하지않은 굴(착각굴)을 컨베어를 이용하여 바스켓에 담기

④ 벤딩



HPP통과 후 굴이 껍각과 분리되어 빠지는 것을 막기 위해 벤딩처리

⑦ Tray 나열



동결용 Tray에 기울어지지 않도록 나열

⑧ 급속동결



-35℃이하 연속식 Belt Freezer 로 급속동결

⑨ X-Ray 투과



X-Ray 에 통과시켜 이물질 혼입유무를 검사

⑪ 냉동보관 - 출하



-18℃ 이하 냉동실에 보관 후 출하

⑩ 포장



일정수량 또는 중량 단위별로 Tray에 담아 포장한 후 박스 포장

4) 제조공정별 관리방법

□ 탈각굴

① 전처리

공정	관리항목	기준	방법	주기	기록관리
굴입하	병원성미생물 해양생물독소 화학오염물질	FDA지정해역에서 수확한 패류만 입고	패류채취증명서 확인	매입고시	지정해역증명서 , 굴원료 인수기록서
용수	가공용수	세균수: <50/100ml 대장균군: 음성 병원성균: 음성	미생물검사	월 1회	미생물 검사성적서
		먹는물기준에 적합(단, 해수의 경우 소금함량 제외)	국가공인기관 검사의뢰	년 1회	먹는물 검사성적서
세척 보관	세척 후 이물질	세척 후 이물질 제거상태가 양호	세척상태 점검표에 따라 확인	세척 후	세척상태 점검표
	보관온도	0~5℃	냉장실 온도확인	20분 1회	자동온도 기록지
바스켓 담기	작업장온도	15℃ 이하	작업장 온도확인	일 2회	온도점검표
	대기 시간	대기시간: 1시간 이내	작업장 입고시간부터 HPP투입까지 시간확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
HPP처리	압력	3000BAR	HPP 압력확인	매 가동시	HPP작업일지
	가압시간	120초	HPP 가압시간 확인		
	가압수온	15±1℃	HPP 가압수온 확인		
탈각	굴담는 용기	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
	작업자 손	대장균군: 음성	표면오염도 검사		

② 냉장굴 가공

공정	관리항목	기준	방법	주기	기록관리
세척	세척수조	이물질없이 청결	청결상태 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	Air작동상태	정상작동	작동상태 확인		
	세척수 유기물 및 미생물	유기물없이 청결	유기물 유무 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
		대장균군: 음성 세균수: <20/g	세척수 미생물검사	일 1회	미생물 검사성적서
선별	이물질	이물질 없이 없어야함	이물질 잔류유무 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	작업자 손	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
냉각	냉각수 온도	0~5℃	냉각수 온도확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	냉각시간	30분이내	냉각시간 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	냉각수 오염	대장균군: 음성 세균수: <20/g	냉각수 미생물검사	일 1회	미생물 검사성적서
이물질 제거	이물질	이물질이 없어야함	이물질 잔류유무 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	작업자 손	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
계량/포장	작업자 손 및 포 장/계량 용기	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
		이물질이 없어야함	이물질 잔류유무 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
보관/출하	보관온도	0~5℃	냉장실 온도확인	20분 1회	자동온도 기록지
	표시문안	보관온도, 유통기한 등 표시	표시문안 확인	포장 시	제품출하 관리일지
	출하온도	0~5℃	차량온도기록지 점검	출하 시	온도기록지

③ IQ.F 냉동굴 가공

공정	관리항목	기 준	방 법	주 기	기록관리
세척	세척수조	이물질없이 청결	청결상태 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	Air작동상태	정상작동	작동상태 확인		
	세척 수 유기물 및 미생물	유기물없이 청결	유기물 유무 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
		대장균균: 음성 세균수: <20/g	세척수 미생물검사	일 1회	미생물 검사성적서
선별	이물질	이물질 없이 없어야함	이물질 잔류유무 확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	작업자 손	대장균균: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
팬닝	팬닝시간	30분 이내	팬닝전 대기시간부터 급속동결 투입직전까지 시간확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	작업자 손, TRAY	대장균균: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
	작업장온도	15℃ 이하	작업장 온도확인	일 2회	온도점검표
급속동결	동결온도	-35℃ 이하	동결	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	동결상태	품온 -18℃ 이하	절단 후 품온측정	일 2회	
탈팬	작업자 손	대장균균: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
글레이징	글레이징수 온도	5℃ 이하	글레이징수 온도확인	일 2회	탈각굴 공정관리일지
	글레이징수 미생 물	대장균균: 음성 세균수: <20/g	글레이징수 미생물검사	일 1회	미생물 검사성적서

공정	관리항목	기 준	방 법	주 기	기록관리
X-Ray 통과	이물질	이물질 없음	X-Ray 통과시 이물질 확인	작업시 전수검사	X-Ray 운영일지
	벨트 청결상태	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
포장	작업자 손	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
	포장육기	이물질이 없어야함	이물질 잔류유무 확인	일 2회	탈각술 공정관리일지
보관/출하	보관온도	-18℃ 이하	냉장실 온도확인	20분 1회	자동온도 기록지
	표시문안	보관온도, 유통기한 등 표시	표시문안 확인	포장 시	제품출하 관리일지
	출하온도	-18℃ 이하	차량온도기록지 점검	출하 시	온도기록지

□ 냉동홀셀

공정	관리항목	기준	방법	주기	기록관리
굴입하	병원성미생물 해양생물독소 화학오염물질	FDA지정해역에서 수확한 패류만 입고	패류채취증명서 확인	매입고시	지정해역증명서 , 굴원료 인수기록서
용수	가공용수	세균수: <50/100ml 대장균군: 음성 병원성균: 음성	미생물검사	월 1회	미생물 검사성적서
		먹는물기준에 적합(단, 해수의 경우 소금함량 제외)	국가공인기관 검사의뢰	년 1회	먹는물 검사성적서
1,2차 세척	세척 후 이물질	세척 후 이물질 제거상태가 양호	세척상태 점검표에 따라 확인	세척 후	세척상태 점검표
	보관온도	0~5℃	냉장실 온도확인	20분 1회	자동온도 기록지
밴딩	밴딩유무	밴딩불량 없음	밴딩상태 확인	일 2회	홀셀 공정관리일지
바스켓 담기	작업장온도	15℃ 이하	작업장 온도확인	일 2회	온도점검표
	대기 시간	대기시간: 1시간 이내	작업장 입고시간부터 HPP투입까지 시간확인	일 2회	홀셀 공정관리일지
HPP처리	압력	3000BAR	HPP 압력확인	매 가동시	HPP작업일지
	가압시간	120초	HPP 가압시간 확인		
	가압수온	15±1℃	HPP 가압수온 확인		
TRAY 나열	TRAY 청결상태	이물질없어야함	이물질 잔존유무 확인	일 2회	홀셀 공정관리일지
급속동결	동결온도	-35℃ 이하	동결	일 2회	홀셀 공정관리일지
	동결상태	품온 -18℃ 이하	절단 후 품온측정	일 2회	

공정	관리항목	기준	방법	주기	기록관리
X-Ray 통과	이물질	이물질 없음	X-Ray 통과시 이물질 확인	작업시 전수검사	X-Ray 운영일지
	벨트 청결상태	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
포장	작업자 손	대장균군: 음성	표면오염도 검사	일 1회	표면오염도 검사일지
	포장비닐	이물질이 없어야함	이물질 잔류유무 확인	일 2회	홀셀 공정관리일지
보관/출하	보관온도	-18℃ 이하	냉장실 온도확인	20분 1회	자동온도 기록지
	표시문안	보관온도, 유통기한 등 표시	표시문안 확인	포장 시	제품출하 관리일지
	출하온도	-18℃ 이하	차량온도기록지 점검	출하 시	온도기록지

5) 연구결과 요약

본 연구를 통해 굴의 원래품질을 유지하면서 병원성 미생물이나 바이러스를 효과적으로 살균할 수 있도록 양식단계서부터 최종 소비자까지 전 단계에 걸쳐 관리 가능한 최적의 가공조건을 수립하였다.

특히 해양오염으로 인한 식중독균이나 노로바이러스 등의 경우에는 양식장에서 오염되었을 경우 가열하지 않고 이를 제거할 수 있는 방법이 현재까지는 사실상 없었는데 초고압처리기술을 이용해 이 같은 문제를 해결하였다.

뿐만 아니라 기존 보유중인 조직과 관리수준만으로도 위 연구결과를 기준으로 관리하면 대량생산도 별다른 무리 없이 가능할 것으로 생각된다.

제 10 절 초고압처리 시제품의 품질관리

1. 연구수행방법 및 이론

초고압 처리기술 HPP(High-Press processing) 처리 최적공정 확립에 따른 시제품 안정성을 검토하기 위하여 시제품을 대상으로 유해미생물 5종(*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*)의 주기적인 위생검사를 실시하였다.

각 시료샘플은 탈각된 굴을 HPP 처리 최적화 조건 (3,000bar/2분)으로 처리하여 생굴내 일반세균수 검사 및 유해미생물 검출 여부를 비교분석하였다. 모든 실험의 대조구는 HPP 처리를 하지 않은 시료를 이용하였으며, 8회 반복 실험하여 결과를 비교하였다.

1) 일반세균수 검사

세균수 측정법은 일반세균수를 측정하는 표준평판법을 사용하였으며 표준한천배지에 검체를 혼합 응고시켜 배양 후 발생한 세균 집락수를 계수하여 검체중의 생균수를 산출하였다. HPP 처리를 가한 시료(시험군) 25g 을 멸균한 blender에 취하여 멸균인산완충액 225ml 와 혼합한 뒤 균질화한다. 시험용액 1ml 와 10배 단계 희석액 1ml 씩을 2개의 멸균 페트리접시에 무균적으로 취하여 약 43~45℃ 로 유지한 표준한천배지(Plate Count Agar)를 약 20ml 분주하여 검체와 배지를 잘 혼합하여 응고시킨다. 응고시킨 페트리접시는 37℃ Incubator에서 24~48시간 배양하여 30~300개의 집락을 생성한 평판을 택하여 집락수를 계산하였다. HPP 처리를 하지 않은 시료를 대조군으로 하여 압력처리유무에 따른 세균수 변화를 비교하였다.

2) 유해미생물 검사

일반세균수검사와 동일하게 HPP 처리를 가한 시료(시험군) 25g 을 멸균한 blender에 계량하여 멸균인산완충액 225ml 와 혼합한 뒤 균질화하며 HPP 처리를 하지 않은 시료를 대조군으로 압력처리 전과 후의 따른 유해미생물 검사를 실시하였다. 균 검출 여부는 대상미생물의 선택배지를 이용하여 검출하였으며 표준균주를 이용하여 집락을 판별하였다. 각 균의 검사방법은 아래와 같이 실시하였다.

- 대장균(*Escherichia coli*)

균질화 된 시료 1ml 를 3개의 EC broth 에 접종하여 44.5±0.2℃ 에서 24±2시간 배양 후 가스가 발생된 발효관을 양성으로 추정하였다. 양성에 해당되는 발효관의 검체를 EMB 평판배지(Eosin Methylene Blue Agar) 에 접종하여 35±1℃ 에서 24±2시간 배양한 후 초록색 금색 광택을 띄는 집락을 대장균 양성으로 판정하였다.

- 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)

균질화 한 시료 1ml 를 10% NaCl을 첨가한 TSB(Tryptic soy broth)배지에 가하여 35~37℃에서 16시간 증균배양 하였다. 이 증균배양액을 Egg yolk Emulsion을 첨가한 MSA(Mannitol Salt Agar) 에 1백금이 streak하여 37℃에서 16~24시간 배양한다. 배양결과 난황첨가 MSA 배지에서 황색 불투명 집락(만니톨 분해) 을 나타내고 주변에 혼탁한 백색환(난황반응)이 있는 집락은 확인시험을 실시하였다. 분리배양된 평판배지상의 집락을 보통한천배지(Nutrient agar) 에 옮겨 37℃에서 18~24시간 배양한 후 *Staphylococcus* spp. API kit를 사용하여 생화학 시험을 실시하였으며 판독된 결과를 바탕으로 황색포도상구균 양성을 판정하였다.

- 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)

균질화 한 시료 1ml 를 LEB(*Listeria* enrichment broth) 배지에 가하여 30℃에서 24시간 증균배양한 후 Oxford agar 배지에 1백금이 streak하여 30℃에서 24~48시간 배양하였다. 배양 후 배지에서 black colony를 형성한 집락을 *Listeria* spp. 로 판정하였다.

- 살모넬라(*Salmonella typhimurium*)

균질화 된 시료 1ml 를 BPW(Burrered Peptone Water) 에 접종하여 35℃에서 18±2시간 증균배양하였다. 배양액 0.1ml를 Rappaport-Vassiliadis(RV) Broth에 접종하여 42℃에서 24±2시간 선택증균배양하여 MacConkey agar에 1백금이 streak 하여 37℃에서 24시간 배양하여 집락을 확인하였다.

- 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)

균질화 한 시료 1ml 를 APW(Alkaline peptone water)배지에 접종하여 35℃에서 18~24시간 증균배양한 후 배양액을 TCBS agar (Thiosulfate-Citrate-Bile- Sucrose) 배지에 1백금이 streak하여 35℃에서 18~24시간 배양하여 직경 2~4mm 청록색의 서당 비분해 집락이 형성되면 양성으로 판정하였다.

2. 연구결과

1) 일반세균수 변화

HPP(초고압기) 처리 유무에 따른 굴의 일반세균수를 확인한 결과 압력 처리 전(대조구)보다 처리 후(시험구)의 세균수가 약 1log 적게 검출되어 HPP처리를 함으로써 평균 88.15%

세균 감소 효과를 얻을 수 있다. (표 24. 그림22. 참조)

표24. HPP 처리 유무에 따른 일반세균수 변화

(단위 : CFU/g)

조건 횟수	HPP 처리 전	HPP 처리 후	감소율 (%)
1회	2.3×10^4	4.3×10^3	81.30%
2회	1.8×10^4	2.9×10^3	83.89%
3회	2.0×10^4	1.3×10^3	93.50%
4회	9.8×10^3	7.5×10^2	92.35%
5회	3.2×10^4	1.7×10^3	94.69%
6회	1.2×10^4	3.1×10^3	74.17%
7회	9.5×10^3	7.7×10^2	91.89%
8회	9.4×10^3	6.2×10^2	93.40%
평균			88.15%

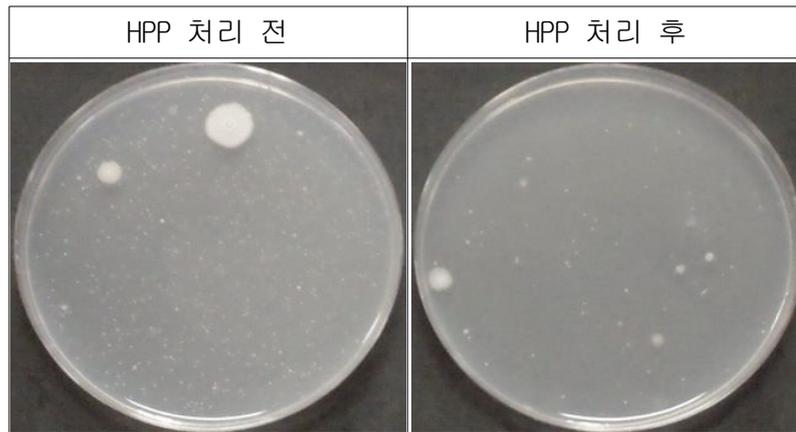


그림22. HPP 처리에 따른 일반세균수 변화

2) 유해미생물 변화

① 대장균(*Escherichia coli*)

HPP(초고압기) 처리 유무에 따른 대장균 변화를 표 25 와 그림 23 에 나타내었다. 동일한 압력 처리 조건으로 처리된 시료로 8회 시험하였으며 압력처리를 하지 않은 굴 (대조구)에서 대장균이 3회 검출되었으나 압력처리를 한 굴 (시험구)은 모두 불검출 되었다. 이에 따라 압력처리가 대장균 사멸에 영향을 미치는 것으로 확인되었으며 유해미생물 사멸에 압력처리가 유효한 것으로 판단된다.

② 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)

HPP(초고압기) 처리 유무에 따른 황색포도상구균 변화를 표 25 와 그림 24 에 나타내었다. 동일한 압력 처리 조건으로 처리된 시료로 8회 시험하였으며 압력처리 유무에 관계없이 총 8회 모두 *Staphylococcus* spp. 가 검출되었다. 검출된 배양체로부터 황색포도상구균의 존재유무를 판정하기 위해 MSA 배지에 배양된 colony 중 황색포도상구균 의심 colony와 그 외 colony를 무작위 선택하여 NA 배지에 획선배양을 통한 균분리를 실시하였다. 그 후 분리된 단일 colony를 *Staphylococcus* spp. Kit를 이용하여 동정한 결과 황색포도상구균이 아닌 다른 종(*S. warneri*, *Micrococcus* spp. 등)으로 확인되었으며 (표 25 참고.) 압력처리를 한 굴에서 황색포도상구균은 불검출 됨을 확인하였다.

③ 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)

HPP(초고압기) 처리 유무에 따른 리스테리아 모노사이토제네스 변화를 표 25 에 나타내었다. 동일한 압력 처리 조건으로 처리된 시료로 8회 시험하였으며 처리 전 시료와 처리 후 시료 모두 균이 불검출이었으며 압력처리 유무에 관계없이 리스테리아 균은 굴에 존재하지 않았음을 확인하였다.

④ 살모넬라(*Salmonella typhimurium*)

HPP(초고압기) 처리 유무에 따른 살모넬라 변화를 표 25 에 나타내었다. 동일한 압력 처리 조건으로 처리된 시료로 8회 시험하였으며 압력처리 유무에 관계없이 모두 불검출 됨을 확인하였다.

⑤ 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)

HPP(초고압기) 처리 유무에 따른 장염비브리오 변화를 표 25 에 나타내었다. 동일한 압력 처리 조건으로 처리된 시료로 8회 시험하였으며 처리 전 시료와 처리 후 시료 모두 불검출 됨을 확인하였다.

표25. HPP 처리 유무에 따른 일반세균수 변화

균종	횟수 HPP 처리	1회	2회	3회	4회	5회	6회	7회	8회
		<i>Escherichia coli</i>	전	-	-	+	-	-	+
	후	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	전	-	-	-	-	-	-	-	-
	후	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	전	-	-	-	-	-	-	-	-
	후	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	전	-	-	-	-	-	-	-	-
	후	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	전	-	-	-	-	-	-	-	-
	후	-	-	-	-	-	-	-	-

(+ : 양성, - : 음성)

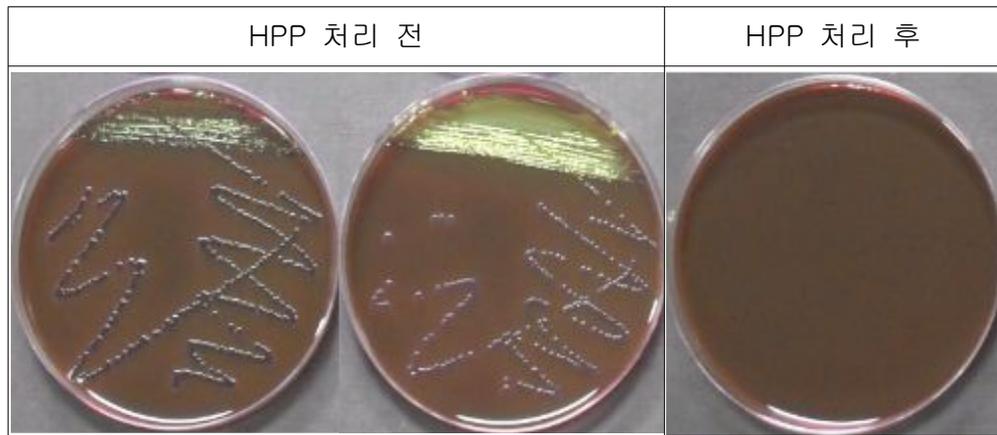


그림23. HPP 처리에 따른 대장균(*Escherichia coli*) 변화

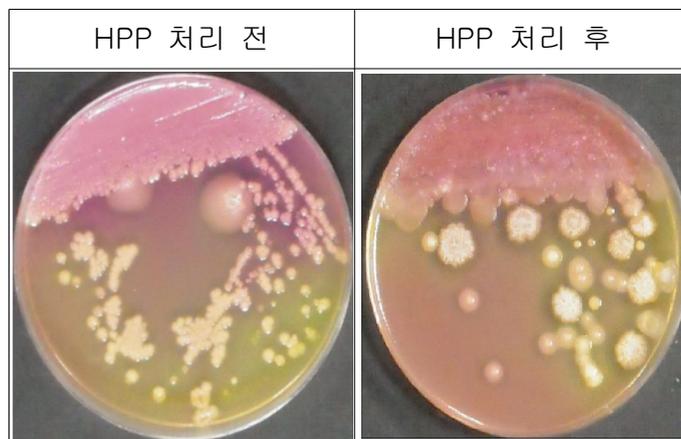


그림24. HPP 처리에 따른 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 변화

제 11 절 생굴제품 생산 및 사업화

1. 생굴제품 생산

굴은 해양오염에 취약하며, 쉽게 변질되는 특성을 가지고 있어 양식, 가공, 유통 중 부적절한 관리로 인하여 품질저하가 빨리 일어나는 단점으로 생물 상태로는 유통이 매우 취약한 수산식품이다.

굴을 가열살균하면 저장기간은 연장시킬 수 있으나 가열처리에 따른 생굴 본래의 독특한 풍미와 조직감의 변질 때문에 바람직하지 않다.

위 “제9절 생굴의 포장/가공 조건에 따른 최적 가공조건 및 유해미생물과 바이러스 사멸을 위한 생산공정 시스템 개발” 연구결과에서와 같이 굴의 원래품질을 유지하면서 병원성 미생물이나 바이러스를 효과적으로 살균할 수 있도록 양식단계서부터 최종 소비자가까지의 전 단계에 걸쳐 관리 가능한 최적의 가공조건을 수립하였다.

이 같은 연구결과를 토대로 굴 제품을 안전하게 생산할 수 있는 시스템이 만들어졌으며, 해외 영업을 통해 기존 거래중인 일본 바이어로부터 1차로 40pt 컨테이너 1대 분량을 주문받아 수출을 위한 본 제품 생산을 할 수 있었다.

2. 사업화

1) 현재까지 판매실적

HPP 살균처리된 냉동 I.Q.F굴을 지난 2011년 5월에 일본 TW TRADING CO., LTD 사에 처음 수출하였다. 수출량은 19ton 이며, 금액은 USD120,600 이다.

용도는 일본인들이 냉동굴을 샴샤브해서 먹을 때나 굴튀김으로 먹을 때 완전 익힐 경우 맛이 없고 튀김의 경우 빵가루가 검게 타는 문제로 표면만 익혀 섭취하다보니 굴의 내장에 있던 노로바이러스나 유해세균으로 발생하는 식중독 사고가 매년 적지 않았으며, 사망하는 사례까지 발생되었다.

기존 거래중이던 현지 바이어에게 HPP 살균처리된 I.Q.F 냉동굴을 제안하였으며, 제안이 긍정적으로 받아들여 수출할 수 있게 되었다.

□ HPP 처리된 굴 주문서

TWT

TW TRADING CO., LTD.
102, 6-10, NISHIWAKA-CHOU,
MISHIMA-SHI, SHIZUOKA, 411-0038, JAPAN.

有限会社 ティダブルトレーディング
〒411-0038 静岡県 三島市西若町6番10号
パストラルハイム 三島式番館102

TEL 055-941-5370 FAX 055-941-5371 E-mail twt@nifty.com

<FAX 送信>

MESSRS : HAEJIN MOOLSAN CO., LTD.
#1650-1, SONGJUNG-DONG, GANGSEO-KU
BUSAN, KOREA

DATE : 2011, 03. 14.

いつも御世話になっております。

さて、貴社で送ってくれたHPP OYSTERのSAMPLEの件ですが、

検討した結果生食用で販売可能か市場の反応を確認する必要があるようです。

今年のTEST用で流通を進行する計画であり、1次分量 40f×1コンテナ分量に対する生産を要請します。

Ship日は追後再びご連絡致します。

よろしくお願い致します。

以上です。

TW TRADING CO., LTD.

渡辺 哲也

PRESIDENT T. WATANABE

다음에 감사드립니다.

귀사에서 보내주신 HPP 굴 SAMPLE을 검토한 결과 생식용으로 판매 가능한지 시장의 반응을 확인할 필요가 있을 것 같습니다.

올해 TEST용으로 판매를 진행할 계획이며, 1차분 물량 40pt 1컨테이너 분량에 대한 생산을 요청합니다.

선적일은 추후 연락드리겠습니다.

□ 수출면장



수출신고필증(수출이행, 감지)

USD 1,070.6300 계약번호1:

InvoiceNo:WJ-110516

※처리기간 : 즉시

제출번호 12726-11-050020U	⑤ 신고번호 054-10-11-00015479	④ 신고일자 2011/05/16	⑦ 신고구분 H	⑧ C/S구분
① 신고자 불영관세사무소 창원			일반P/L신고	
② 수출대상자 우진물산(주) (통관고유번호) 우진물산-1-00-1-01-5 수출자구분 B	⑨ 거래구분 11	⑩ 종류 A	⑪ 결제방법 TT	
수출화주 해진물산(주) (통관고유번호) 해진물산-1-87-1-01-2 (주소) 부산광역시구송정동 1650-1 (대표자) 손석민 (소재지) 618 (사업자등록번호) 603-81-12264	⑫ 목적국 JP JAPAN	⑬ 적재항 KRPUS 부산항	⑭ 선박회사 (항공사)	
	⑮ 선박명(항공사명)	⑯ 출항예정일자 //	⑰ 적재예정포세구역 -	
	⑱ 운송형태 10 LC	⑲ 검사희망일 2011/05/16		
	⑳ 물품소재지 650 경남통영시도산면도선리 157			
③ 제조자 해진물산(주) (통관고유번호) 해진물산-1-87-1-01-2 제조장소 618	⑳ U/C번호	㉑ 물품상태 N		
사업단지번호 999	㉒ 사전임시계통통보여부 A	㉓ 반송 사유		
④ 해외거래처 TW TRADING CO LTD (해외거래처번호) JPTWTRAD0001X	㉔ 환급신청인 2 (1:수출/위탁자, 2:제조자) 간이환급 NO			
. 품명, 규격 (란번호/총판수:001/001)				
㉕ 품명 FROZEN OYSTER IQF	㉖ 상품명			
㉗ 거래품명 FROZEN OYSTER IQF				
㉘ 모델, 규격	㉙ 성분	㉚ 수량	㉛ 단가(USD)	㉜ 금액(USD)
FROZEN OYSTER IQF (HIGH PRESSURE PROCESSING)		19,000 (KG)	6.4	121,600
본 신고필증은 수출통관 사무처리에 관한 고시 제213호에 따라 세관장으로 부터 신고수리된 것을 확인하여 발령 교부됨				
㉝ 세번번호 0307, 10-2000	㉞ 순중량 19,000.0 (KG)	㉟ 수량	㊱ 신고가격(FOB)	\$ 120,666 ₩129,188,608
㊲ 수출장번호	㊳ 수입신고번호	㊴ 원산지 KR-	㊵ 포장중수(종류)	1,900 (CT)
㊶ 수출요건확인 (발급서류명)	A-비대상 (국제적멸종위기종수출허)			
㊷ 총중량 20,900.0(KG)	㊸ 총포장중수 1,900 (CT)	㊹ 총신고가격 (FOB)	\$ 120,666 ₩129,188,608	
㊺ 운임(W) 1,000,000	㊻ 보험료(W)	㊼ 결제금액	CFR-USD-121,600.00	
㊽ 수입화물 관리번호		㊾ 컨테이너번호	N	
※신고인기재란 선적기간 : 2011-05-16 - 2011-06-15		㊿ 세관기재란		
		통영세관 관할 관세사 정태안 전자서부수출통관증명		
㊿ 운송(신고인)	④ 적재의무기한 2011/06/15	㉑ 담당자	㉒ 신고수리일자 2011/05/16	
㉑ 기간 / / 부터 / / 까지				

업태/종목: 제조업, 제조, 도매, 서/수산물가공, 도시락, 수

Page 1/1

- (1) 수출신고수리일로부터 30일내에 적재하지 아니한 때에는 수출신고수리가 취소되고 이물건 관료료가 부과될 수 있으므로 적재시기를 확인하시기 바랍니다.
(관세법 제251조, 제277조) 또한 휴대전화 반출시에는 반드시 출국심사(부두, 조소, 공항) 세관공무원에게 제시하여 확인을 받으시기 바랍니다.

- (2) 수출신고필증의 진위여부는 관세청 인터넷통관포탈에 조회하여 확인하시기 바랍니다. (http://portal.customs.go.kr)

□ 수출대행 계약서

수출대행계약서

갑 : 우진물산(주)

을 : 해진물산(주)

상기 갑, 을 양자간에 다음과 같이 수출대행 계약을 체결한다.

- 다 음 -

제 1 조 수출대행 물품의 규격, 수량 및 금액은 다음과 같다.

품 명	규 격	수 량	단 가	금 액	비 고
FROZEN OYSTER I.Q.F	S	19,000kgs	@\$6.40	\$121,600.00	

제 2 조 같은 을 또는 제3자의 명의로 내도된 T/T, 계약서 또는 신용장을 양도받거나, 을이 갑 명의로 도래한 T/T, 계약서 또는 신용장에 의하여 제1조의 물품을 단순 수출대행하며 을은 대항수수료로 (kg당 1)번씩 계산하여 일금 ₩19,000 원정를 갑에게 지불하여야 한다.

제 3 조 을은 신용장 상의 선적 기일 내에 충분히 선적할 수 있도록 을의 책임하에 선박수배, 검사, 통관 등의 제반조치를 취하여야 한다. 단, 을의 요구 시는 같이 선박수배 및 기타 통관 업무를 대행할 수 있다.

제 4 조 을은 계약서 상에 명시된 제 조건 및 을과 수입자간의 수출계약조건에 따라 충실하게 물품을 제조, 선적하여야 하며, 본 수출로 인하여 발생하는 제세공과금 및 각종 경비와 수수료를 부담한다.

제 5 조 같은 본 제품 수출로 인해 수입자로부터 제기되는 어떠한 CLAIM(제품의 품질, 수량의 하자 및 수출불이행, 지급거절, 인도지연등 모든 청구를 포함) 및 기타 본 수출로부터 야기되는 예상치 못한 사태에 대하여도 일체의 책임을 부담하지 않으며, 그 모든 책임은 을의 부담으로 한다.

수출명의자가 갑이라는 이유로 갑이 제 3자에 대하여 책임을 지게 될 경우에는 을이 그 책임 전부를 이행하여 갑에게 손해가 없도록 할 것을 확약한다.

또한 본건 수출에서 편의상 갑의 명의로 관공서 및 은행 등에 제출되는 각서, 기타 증빙서류에 대한 책임의 이행도 일괄 을이 부담한다.

제 6 조 수출물품의 출발지에서 해당 CY(CFS) 까지의 내륙 운송 시 발생될 위험부담에 대해서는 을의 책임으로 전손 부보한다.

제 7 조 갑, 을 공히 본 계약을 위약 하였을 경우, 위약 당사자는 그 손해를 배상하여야 한다.

제 8 조 본 계약조건 상의 해석에 갑, 을간 이견이 있을 시는 갑의 해석이 우선한다.

제 9 조 본 계약에 관한 분쟁 발생시는 갑의 주소지를 관할하는 법원을 합의 관할로 한다.

제10 조 이상 제 조항에서 명시되지 않은 사항은 상호 협의하여 정하되, 상관습에 따르며, 후일에 중하기 위하여 본 계약서 2통을 작성하여 각자 서명날인한 후 한통씩 보관하기로 한다.

2011년 5월 일

갑 : 慶南 統營市 道山面 道善里 107
 宇晉物産 株式 會社
 代表理事 李 守



을 : 公山市 江西區 松亭洞 1650-1番地
 海珍物産(株) 會社
 代表理事 孫 錫 珉



2) 판매계획

(단위: 백만원)

구분	2011년 1~5월	2011년 10월 ~ 2012년 5월	2012년 10월 ~ 2013년 5월	2013년 10월 ~ 2014년 5월	비고
I.Q.F 냉동굴	129	300	600	1,000	냉동
	- 기존 굴 거래업체(TW TRADING CO., LTD)에 추가공급 - 일본 I.Q.F 냉동굴 유통전문기업과 튀김용굴 제조업체 등에 안전성에 대한 적극적 홍보로 수출활로 개척				
홀셀/하프셀	-	100	200	400	냉장/냉동
	- 국내 CVS, 중.소형마켓을 중심으로 제품홍보 후 2012년 공급개시 목표로 영업활동 전개 - 국내 일식당 유통전문 기업에 공급 - 일본,홍콩 등 기존 하프셀 시장에 바이어 접촉을 통해 제품홍보로 시장개척				
탈각 굴	-	50	100	200	냉장
	- 국내 CVS, 중.소형마켓을 중심으로 제품홍보 후 2012년 공급개시 목표로 영업활동 전개 - 기존 탈각굴 시장에 경쟁제품으로 초기 시장진입에 어려움이 예상되나 안정성에 대한 적극적인 홍보로 판매망을 구축해나갈 계획				
목표 계	129	450	900	1,600	

한국과 일본의 굴 시장은 매우 크지만, HPP살균 처리된 굴이 잘 알려지지 않은 점 등을 감안할 때 점진적으로 성장한다는 기준으로 판매계획을 수립하였다.

특히 굴은 기존 공급처의 시장 독점력이 높아 초기진입에 어려움은 예상되지만, 기존제품 보다 안전성이 강화됨에 따라 그동안 위생등의 문제로 구매하지 않던 소비자들이 쉽게 접근할 수 있는 신규제품으로 시장이 형성될 수 있을 것으로 예상된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 달성도

1. 연구개발 최종목표

생굴에 잔존해 있는 유해 미생물 및 노로바이러스를 신가공기술인 비열처리 초고압(high pressure processing, HPP)처리기술을 이용하여 안전한 수산제품을 생산하기 위한 효과적인 살균법 개발과 식품산업에 대한 적용성 검토 및 유통 가능한 생굴의 제품개발을 통해 국내시장 및 해외수출 확대에 기여

- 유해 미생물 및 노로바이러스의 생굴 내 잔존유무를 객관적으로 증명할 수 있는 검사법 연구
 - 유해 미생물 진단법 개발
 - 노로바이러스 대체 바이러스 진단법 개발
 - HPP의 적용에 따른 생굴의 가공적성 분석
 - HPP 처리후 발생하는 관능적 변화분석

- HPP 기술을 활용하여 유해 미생물 및 바이러스를 사멸할 수 있는 최적 가공조건 연구
 - 유해 미생물 및 바이러스 사멸 조건
 - 관능적 변화를 최소화한 최적 가공 조건 및 탈각조건

- HPP 기술을 이용한 유해 미생물 및 노로바이러스를 사멸하는 살균공정 확립
 - 생굴제품 포장조건에 따른 최적 가공조건 개발(봉지굴, 트레이굴, 수출용벌크 굴 등)
 - 유해 미생물 및 바이러스 사멸을 위한 생산 공정시스템 개발

- 최적화된 초고압 공정을 이용한 안전한 생굴의 제품개발 및 상업화
 - 비열처리 생굴의 시장성 조사 및 홀셀, 하프셀 시제품 생산
 - 보존기간 연장 확인 및 설정
 - 유통을 위한 포장디자인 개발
 - 생굴제품 생산 및 사업화 계획 수립
 - 생굴제품의 처리/판매 후 품질 관리

2. 연구목표 및 달성도

연구개발목표	목표대비결과	목표 달성도 (%)
유해 미생물 및 노로바이러스의 생굴 내 잔존유무를 객관적으로 증명할 수 있는 검사법 연구	<ul style="list-style-type: none"> - HPP조건에 따른 유해미생물 살균조건과 HPP 후 미생물의 증식속도에 대해 파악하였음. - 노로바이러스의 대체 바이러스에 대한 배양법 및 검출법에 대한 조건을 확립하였음 - HPP조건에 따른 물성변화 정도를 분석완료 하였으며, 관능적 변화에 대한 압력기준지표를 수립 하였음 	80%
HPP 기술을 활용하여 유해 미생물 및 바이러스를 사멸할 수 있는 최적 가공조건 연구	<ul style="list-style-type: none"> - HPP조건에 따른 생굴의 물성과 성분변화 정도를 파악한 후 유해미생물 및 노로 바이러스 사멸 또는 살균 조건을 확인하였음. - HPP조건별 탈각정도를 측정하였으며, 유해미생물과 바이러스를 안전한 수준으로 감소시키면서 보존기한을 늘이고 관능적 변화를 최소화한 최적의 조건을 확인하였음. 	90%
HPP 기술을 이용한 유해 미생물 및 노로바이러스를 사멸하는 살균공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 유해 미생물 및 노로바이러스를 안전한 수준까지 사멸하는 HPP 조건을 수립하였음. - 굴의 포장/가공 조건에 따른 최적 가공조건 및 유해미생물과 바이러스를 안전한 수준까지 사멸하는 생산공정 시스템을 개발 하였음. 	100%
최적화된 초고압 공정을 이용한 안전한 생굴의 제품개발 및 상업화	<ul style="list-style-type: none"> - 포장디자인 개발과 시제품 생산을 위한 HPP조건을 확립하였으며, 시제품 생산 후 생굴의 시장성조사를 위한 소비자 기호도 분석을 실시하였음. - 생굴제품의 사업화 계획을 수립하였으며, 제품의 수출이 1차로 전개되었음. - 시제품의 품질관리를 위한 연구를 통해 최종제품의 안전성을 검증하였음. 	100%
전체 연구 대비 목표 달성도		100%

제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

초고압기술은 물을 압력매체로 높은 정수압을 이용한 신개념의 식품가공기술로서 기존의 열처리와 화학첨가물을 이용한 식품가공기술과 달리 천연으로 식품고유의 맛, 영양소, 향 등의 파괴가 거의 없이 보다 안전하게 소비자에게 제공할 수 있는 비열 식품 가공기술임.

현재 회사에서 보유중인 초고압처리기술(high pressure processing ; HPP) 장비를 활용하여 생굴의 유해미생물 및 바이러스를 안전한 수준까지 감소시킬 수 있는 최적 가공조건(압력, 시간, 온도)이 확립되었으며, 제품이 해외시장으로 판매되었음. 이 같은 결과는 HPP를 활용한 비열처리 기술을 실용화 한 경우로써 향후 다양한 제품에 적용시킬 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 생각됨.

HPP처리 후 발견되는 관능적인 변화에 대해서도 소비자 입장에서 확인하고 시장진입이 가능한지 등에 대한 연구 자료는 비슷한 류의 수산물을 HPP 처리할 때 지표가 될 수 있을 것으로 보이며, 향후 다른 제품에서도 같은 방식으로 접근할 수 있을 것으로 예상됨.

노로바이러스(Norovirus)의 경우 인간의 장을 숙주로 증식하는 바이러스로 보통의 바이러스 배양법으로는 배양 시킬 수가 없음. 이러한 이유로 본 연구에서는 노로바이러스와 Calicivirus 과에 속하면서 단일가닥의 RNA를 가지는 유전학적, 생화학적, 물리화학적인 특성이 유사한 Feline calicivirus(FCV)와 Murine norovirus(MNV)를 노로바이러스의 대체 모델로 이용하여 연구하였으며, 연구 결과 feline calicivirus는 CrFK, Murine norovirus는 Raw 264.7 murine macrophage에 감염을 일으키며 각 숙주세포에 cytopathic effect를 일으켜 숙주로부터 분리할 수 있었음. 이로 인해 노로바이러스 대체바이러스에 대한 검출법을 확립하게 되었음.

그동안의 연구를 통해 비열 살균기술이 식품의 안전성확보에 크게 기여할 수 있게 된 점을 알 수 있었으며, 이 같은 연구결과를 활용하여 굴뿐만 아니라 가리비조개, 바지락조개 등 패류, 각종 채소 및 과일, 축산물, 가공식품 등과 특수 기능식이나, 영·유아식품, 신선식품 등에 대해서도 위해 세균을 제거하고 식중독 발병률을 감소시키는 다양한 연구를 진행할 수 있는 근거가 마련된 것으로 생각됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 · 산업화 계획

- 굴이나 식품 등에 잔존해 있는 위해미생물이나 바이러스 등을 제거하거나 유통 중 생육을 억제하는 방법으로 그동안 전통적으로 가열 등의 물리적 방법이나 식품 소독제나 방부제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔음.
- 그러나 이러한 기술들은 굴과 같이 열처리 등없이 바로 먹는 해산물이나 야채, 과일, 달걀, 어·육류 등 신선식품 살균에는 적용하기 어려우며, 식품보존제의 사용에 있어서도 소비자들의 가공식품에 대한 기대수준이 높아짐에 따라 그 사용한도가 점차 제한되고 있음.
- 이에 따라 세계적으로 여러 가지 비열처리 기술(non-thermal process)에 대한 연구와 실용화가 이루어지고 있음. 이러한 비열처리 가공기술 중 초고압처리기술(high pressure processing ; HPP)은 UV살균 등 기존 비열처리 살균방법에 비해 월등히 높은 살균력을 가지는 것으로 확인되었음.
- 국내·외 기술개발 현황의 분석 및 평가에서 언급한 바와 같이, 식품 살균을 위한 HPP 초고압 처리기술의 적용 기술은 뛰어나며, 실제 해외에서는 식품의 살균에 적지 않게 적용되고 있음.
- 본 과제의 연구결과에서 나타난 바와 같이 제조공장에서 적용되어 판매가 진행되었으며, 향후 판매계획 또한 수립되어있음.
- 다른 식품에서도 본 연구결과를 응용하여 보다 쉽게 접근할 수 있으며 산업화 공정에 적용할 수 있는 토대가 마련되었음.
- 본 연구에서는 HPP 초고압 처리처리 기술을 도입함으로써 수산식품 뿐만 아니라 식품 산업 전반에 보다 안전한 제품 공급을 위한 연구를 진행 할 수 있는 계기가 마련되었으며, 이 같은 결과가 식품 유통망 확대에 실질적으로 기여될 수 있을 것으로 보여짐.

제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술 확산 계획

- 최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지고 시장에서 신선한 제품을 찾는 경향이 강해지면서 식품업계에서는 최소한의 가공을 통하여 자연 그대로의 품질을 유지하는 식품 개발에 대한 관심이 고조되고 있음.
- 식품의 살균을 위하여 전통적으로는 가열 등의 물리적 방법이나 식품소독제나 보존제의 첨가와 같은 화학적 방법을 사용하여 왔으나, 가열 가공식품은 열에 의해 영양성분을 파괴시키고 텍스처 및 색의 변화 그리고 향미성분의 손실 등 식품의 품질저하를 일으키게 되는 등 품질 및 소비자 기호도가 감소하게 됨.
- 특히 시장에서 어류, 육류, 채소, 과일, 생식 등의 신선식품 및 영·유아용 식품과 같은 비가열 식품의 수요가 점점 더 증가하는 동시에 각종 위해세균이 검출되고 이에 따른 논란이 확대됨에 따라 품목별로 위해세균에 대한 적절한 살균방법의 개발이 절실한 시점임.
- 미국에서 보고된 자료에 의하면 식품 내의 세균감염으로 인한 질병 발생건수가 매년 7백만 건으로 7,000여명이 사망에 이르고 있으며, 이중에서 육류 및 어류로 인한 발병이 전체 발생건수의 절반 이상을 차지하고 사망자가 4,000명으로 육류 및 어류의 안전문제가 큰 문제로 등장하고 있음.
- 따라서 현재의 가열살균 기술로는 적용하기 힘든 각종 개별식품에 대한 맞춤형 적용연구는 식품업계의 고충을 해결해 주기 위한 이유에서뿐만 아니라 소비자들에 보다 안전한 식품을 자국민의 건전한 식문화를 창달하기 위한 대응적인 차원에서도 하루 속히 이루어져야할 것으로 사료됨.
- 또한, 본 과제를 통해 획득된 HPP초고압 처리기술과 이 기술로 생산된 굴 제품에 대한 홍보를 관련업체에 기술개발 결과에 대한 전단을 제작하여 배포할 계획이며, 국내 유통·판매 시 판매대에 HPP 초고압 처리기술에 대한 POP등을 제작하여 홍보할 계획임.
- 본 과제 종료 후 9개월 이내에 HPP초고압 처리기술을 알리기 위한 홍보를 개시할 계획이며, HPP초고압 처리기술을 이용한 살균기술의 특성 및 기준을 식품공전에 기재될 수 있는 방안을 마련도록 하여 이 기술을 관련업체에서 합법적으로 사용하도록 할 예정임.

제 3 절 특허·논문 등 지식 재산권 확보계획

□ 특허출원

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	비고
2010	초고수압처리기술을 이용하여 생굴의 유해미생물과 노로바이러스를 제거하는 방법	해진물산주식회사 [발명자] 손석민 이명숙	대한민국	10-2010-008 9329	

□ 논문게재

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외구분
		주저자	교신저자	공동저자			
2009	Feline calicivirus에서 항바이러스 활성을 가지는 천연식물자원 탐색	김경란	이명숙	김영목, 이은우, 이대성	Journal of Life Science	19(7)	국내
2010	Antiviral Activiry of Seaweed Extracts against Feline Calicivirus	김경란	이명숙	김영목, 이대성,	Fish Aqua Sci	13(2)	국내

제 4 절 추가연구 및 타 연구에 활용계획

- 앞서 언급한 바와 같이 비가열 신선식품의 소비량이 점차 증가하고 있는 현시점에 이러한 식품으로 인한 식중독의 위험은 따라서 증가할 수밖에 없고 소비자들에게 미치는 영향 또한 지대한 것으로 여겨짐.
- 그러나 비가열 식품이라는 특성을 지닌 어류, 육류, 채소, 과일, 생식 등 여러 신선식품은 최소한의 가열 공정만을 거치게 되므로 식품원료 내에 존재하는 미생물 또한 그대로 유지될 수밖에 없는 문제점을 내포하고 있음.
- 최근 미국에서 보고된 자료에 의하면 식품 내의 세균감염으로 인한 질병 발생건수가 매년 7백만 건으로 7,000여명이 사망에 이르고 있으며, 한 연구결과에서는 일부 시판생식에서 식중독 균과 대장균군이 검출되어 생식제품들의 미생물학적 안전성에 대한 문제가 제기된 바 있고 특히 수산식품 및 축산식품으로 인한 미생물의 오염으로 인해 구토, 설사, 복통 등의 질병이 발생되어 사망 또는 피해를 입는 사례가 보고되고 있음.
- 따라서 현재의 가열살균 기술로는 적용하기 힘든 각종 개별식품에 대해 HPP초고압처리 기술을 적용하여 연구를 진행할 계획이며, 대표적으로는 해외에서 현재 판매되고 있는 육류제품, 비가열 음료, 즉석섭취식품 등이 이에 해당됨.

제 5 절 연구기획사업

- 본 과제 종료 후 1년 이내에 HPP초고압처리 기술을 이용한 위해 세균살균 기술을 위크샵 등을 통하여 업계를 대상으로 발표하고자 하며, 특히 국내 식품업계의 관련분야 비가열 전문가 양성을 위한 사업 등에 적극적으로 활용할 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 수산식품과 관련한 식중독의 주요 원인으로는 bacteria 및 virus 등의 병원성 미생물이 가장 일반적이며, 그중 감염을 유발하는 가장 일반적인 종류의 미생물로는 *Eschericia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* 등이 있으며, 해산물에 존재하는 병원성 미생물을 감소시키는 방법을 통해 수산식품의 품질을 높이고 그 유통기한을 연장시킬 수 있음(Dunn, 1991; Dunn, 1995; Martinez-Manzanares, 1992).
- *L. monocytogenes*는 비포자형성균으로서 이미 오래 전부터 식중독 균으로 널리 알려져 있으며, 리스테리아증(*listeriosis*)의 원인이 되는 주요 병원성 미생물로서 관심을 받고 있음. *L. monocytogenes*는 식품 종류에 따라 그 오염이 다르게 나타나는데, 특히 어류 및 새우, 연어 외 해산물 샐러드 등의 인스턴트 수산식품은 이 *L. monocytogenes*에 의해 오염될 가능성이 상당히 높은 것으로 분류됨(Ben Embarek, 1994; Lasse vigel, 1998).
- 특히 최근들어 *E.coli* O157:H7과 관련된 식중독이 급격히 증가하고 있는 실정인데, CSPI 및 CDC 보고서에 따르면 1990-2002년 사이에 해산물에서 *E.coli* O157:H7으로 인한 식중독이 여러 건 보고되었으며, 미국에서는 매년 약 73,000건의 *E.coli* O157:H7 관련 식중독이 발병하고 있음(CSPI, 2003; CDC, 2003; Su and Brandt, 1995).
- 최근 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지고 시장에서 신선한 가공식품을 찾는 경향이 강해짐에 따라, 원료와 생산품의 천연 그대로의 품질을 신선하게 유지하면서 식중독 및 부패를 방지하는 기술인 최소가공기술(Minimal process tecnology)에 대한 관심이 증대되고 있음. 특히, 여러 비열 가공 기술 중 초고압처리기술(high pressure processing ; HPP)이 혁신적인 비가열 살균 기술로서 각광받고 있음.
- HPP 처리기술은 1990년대 일본에서 개발되기 시작 된 이후, 미국, 유럽 등 여러 국가에서 실제 식품 산업에 이용되어 2004년에는 약 100,000 톤의 식품이 HPP 기술로 가공되었음.

- HPP 처리기술은 압력의 범위에 따라 아임계(~10 MPa), 초임계(10~40 MPa), 고압(40~100 MPa), High Pressure Homogenization(150~250 MPa) 및 초고압(100~900 MPa)으로 나누어 응용기술들이 개발되고 있으며 아임계는 주로 분석시 전처리 기술로 활용되고 있으나 현재는 천연물로부터 천연 색소나 향을 추출하는 장치나 공정개발에 집중되고 초임계는 추출 또는 분리에 상용화가 이루어 졌으며, 이를 이용한 nano입자 제조 및 NDS(nutrient delivery system) 연구에 초점이 맞추어 있음.
- 일본 및 벨기에 등에서는 고압(~100 MPa), 고온(~50℃) 조건 하에서 효소를 활용하여 가수분해를 촉진하는 기술이 개발되어 상용화 시점에 있고 나노에멀전 및 분산분야에 high pressure homogenization 기술이 실용화 되었고 초고압 기술은 식품가공의 전처리, 비열살균, 보존 및 신규한 가공기술로 활용되고 있음.
- 비열 가공 기술을 이용한 shelf-life 연장 및 응용 연구(Pulsed electric field(PEF) as a pasteurization technology, High hydrostatic pressure(HPP) for pasteurization and sterilization of food, and extraction, Pulsed light as a surface-disinfecting method 등)
- 식품가공 분야에 활용되는 초고압 시스템 및 장치 개발 분야는 미국, 일본 및 유럽이 주도하고 있으며 Avure(미국), Elmhurst Systems(미국), Engineered Pressure systems, Inc.(미국), Stansted Fluid Power(영국), NC Hyperbaric(스페인), 고베제강소(일본), 미쓰비시(일본) 등에서 상업적 규모의 장치를 생산하고 있음.
- 식품에 대한 초고압처리 가공분야는 세계적으로 56개(한국 3개) 기업이 상업적 규모의 장치를 갖추고 있으며, 종업원 50명 이하의 기술 집약형 중소기업이 37%를 차지함.
- 노로바이러스 검사방법 관련 기술에서 일본이나 독일 회사에서 수시간내 결과를 확인할 수 있는 효소면역법 진단키트를 판매하고 있으나 정확도가 60%에도 미치지 못함

제 7 장 참고문헌

- 미생물학적인 관점에서 조개의 초고압처리법/*Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6 (2005) 257-270.
- 고압과 열처리에 의한 굴의 물리적 생화학적 특성/*Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8 (2007) 30-38.
- 조개의 초고압 처리에 의한 calicivirus와 enterovirus의 불활성화/*Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8 (2007) 213-217.
- 초고압 처리한 굴의 냉동 보관시 미생물학적, 이화학적 특성의 변화)/*Food Control* 19 (2008) 1139-1147.
- 굴내에 있는 *Vibrio parahaemolyticus*의 불활성화를 위한 초고압 처리 조건/*International Journal of Food Microbiology* (2008)
- 초고압 처리에 의한 hepatitis A virus, poliovirus와 norovirus 대체 바이러스의 불활성화 /*Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9 (2008) 206-210.
- 식품의 보존 방법(공개특허/크래프트 후우즈 홀딩즈 인코포레이티드; Ohio State Univ. 리서치 파운데이션, 10-2005-0069316)
- 고압처리전분(등록특허/ 콘 프로덕츠 인터내셔널 인코포레이티드, 10-1997-0014876)
- (WO/2006/096074) HIGH PRESSURE PROCESSING OF BIOACTIVE COMPOSITIONS
- United States Patent 6177115 Ultra high pressure, high temperature food preservation process US Patent Issued on January 23, 2001
- United States Patent 6207215 High temperature/ultra high pressure sterilization of foods US Patent Issued on March 27, 2001
- (WO/1997/021361) HIGH TEMPERATURE/ULTRA-HIGH PRESSURE STERILIZATION OF LOW ACID FOODS
- WO/2000/015053) ULTRA HIGH PRESSURE, HIGH TEMPERATURE FOOD PRESERVATION PROCESS
- United States Patent 7101585 Ultra high pressure homogenization process for making a stable protein based acid beverage
- (WO/1999/029187) ULTRA HIGH PRESSURE, LOW TEMPERATURE FOOD RESERVATION PROCESS

- 노로바이러스만이 특이적으로 증폭되는 검출 방법 및 노로바이러스에 특이적인 염기 서열에 상동성이거나 상보적이고 서브타입에 따라 최소 돌연변이를 일으키는 자리에 위치되는 서열을 갖는 프라이머를 사용함으로써, 노로바이러스의 특이적 부위와 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 제공 (노로바이러스 검출 시약, 토소가부시키가이샤, 일본)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.