

冷凍 및 解凍速度가 牛肉表面 大腸菌群의 半致死的 損傷率에 미치는 影響

이용욱·황성우

서울대학교 보건대학원

The Effects of Freezing and Thawing Rates on the Percentage of Sub-lethally Injured Total Coliform on Beef Surface

Yong-Wook Lee and Sung-Woo Hwang

School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110, Korea

ABSTRACT-Most of meat spoilage bacteria are Gram negative, which are very sensitive to freezing; for instance, 90% of *E. coli* cells are killed or sub-lethally injured by freezing at -30°C , and the freeze-injury rate is dependent upon freezing rate. Since the injured bacterial cells are sensitive to selective agents, they fail to multiply in selective media. Injured bacterial cells are, however, capable of spontaneous repair at appropriate environmental and nutritional conditions. Enumeration of injured bacterial cells involves artificial induction of repair at these conditions.

Cubic beef samples ($3 \times 3 \times 3\text{cm}$) were frozen at -60°C , -40°C , or -18°C . The samples frozen at each temperature were thawed at 4°C , 20°C , or by microwave. After these respective freezing and thawing treatments, the percentage of sub-lethally injured total coliforms out of total surviving ones was measured and compared. The results were as follows:

1. The interaction between freezing and thawing on injury rate was not significant.
2. The injury rates (as means of all three thawing treatments post-freezing) by freezing at -60°C , -40°C , or -18°C were 32.2%, 30.5% and 19.2% respectively.
3. The injury rates (as means of all three freezing treatments) by thawing at 4°C , 20°C , or by microwave were 49.3%, 11.7% and 21.0% respectively.
4. The highest injury rate was caused by freezing at -60°C and subsequent thawing at 4°C . However, since the injury rates by freezing treatment were not significantly different, freezing at -18°C and subsequent thawing at 4°C can also be recommended, from an economic perspective.

Keywords □ Freezing and thawing rate, Beef, *E. coli*, Thermocouple.

食肉의 汚染 및 腐敗 微生物은 健全한 肉質의 内部에는 거의 없거나 少數에 不過하지만, 屠畜, 處理하는 동안에 家畜의 體表面이나 洗滌水, 器具等 주로 周圍環境으로부터 混入되어 온다¹⁾.

肉類에는 水分含量이 많고, 筋肉中 酵素作用에 의한 自己消化의 結果로 여러 分解段階의 窒素化合物, 鹽類 등이 存在하기 때문에 細菌이 增殖하기에 매우 좋은 營養條件이 된다²⁾. 그런데 酵素의 作用이나 微生物의 生育이 低溫 또는 凍結狀態에서는 어려우므로^{3,4)}, 冷凍은 食肉의 自己消化의 進行과 腐敗 微生物의 繁殖을 抑制하는 效果的인 保

Received for publication 17 February, 1988
Reprint requests; Dr. Y.W. Lee at the above address

存方法으로서 널리 이용되어지고 있다⁵⁻⁸⁾.

食肉을 冷凍시키면 食肉內의 微生物들은 水分結水으로 因해 濃縮되어지는 細胞外液에 暴露되며²⁾, 濃縮된 細胞外液과의 滲透壓差에 의해 脫水되어^{2,3)} 一部는 致死되기도 하고 一部는 細胞의 構造와 機能에 半致死的 損傷을 입게 되는데^{3,9)}, 特히 冷凍에 의해 損傷입은 菌들은 選擇物質에 敏感하여서 選擇의 培地를 利用한 一般의인 分離培養法으로는 檢出되지 않기 때문에^{3,10,11)} 過去에는 冷凍에 의해 致死된 것으로 誤認되기도 했으나, 適當한 溫度와 營養이 주어지면 스스로 損傷을 恢復하고 增殖을 繼續할 수 있고¹⁰⁻¹³⁾ 病原性 細菌의 境遇에는 損傷입기 前과 同一한 菌力を 發揮할 수 있게 되기 때문에^{10,12,14)} 潛在的 危險要素가 되고 있다. 食肉을 腐敗시키는 細菌들의 大部分은 Gram 陰性細菌들인데^{15,16)}, Gram 陰性細菌들은 冷凍에 對해 敏感하여⁴⁾ *E. coli*와 같은 境遇에는 -30°C에서의 冷凍後에 90% 以上이 損傷을 입거나 致死되며 이들의 致死率 또는 損傷率은 冷凍方法에 따라 다른 것으로 알려졌다^{4,17)}. 冷凍 및 解凍에 의해 損傷된 菌數를 알아보는 것은 2가지 目的에서 意味가 있는데, 첫째는, 細胞들의 損傷率은 致命率에 比例하므로 損傷率을 봄으로써 微生物에 가장 큰 打擊을 줄 수 있는 冷凍 및 解凍方法을 알 수 있으며, 둘째로는, 冷凍食肉은 解凍 後에는 더욱 腐敗되기 좋은 狀態가 되기 때문에¹⁾ 損傷된 菌들의 再生 및 그로 因한 潛在的 危險을 豫測하여 防止하는데 必要하다.

한편, Bryan의 報告¹⁸⁾에 의하면, 主要 細菌性 食中毒 發生의 55%는 不適當한 冷却에 의한 것이며 26%는 調理 前後 1日 以上 經過된 食品에 의한 것으로서, 全體 食中毒의 80% 以上이 食品의 適切한 溫度管理에 의해 豫防될 수 있음을 示唆하는 바, 食肉의 冷凍과 解凍 및 解凍 後 管理는 食肉衛生上 매우 重要な 일이 되고 있다.

따라서 本 研究에서는 牛肉의 冷凍時 凍結速度와 解凍速度에 따른 腐敗細菌들의 損傷程度를 알아보기 爲해 Gram 陰性細菌이면서도 食肉에 흔히 存在하는⁹⁾ 大腸菌群을 指標細菌으로 選定하였고, -60°C, -40°C, -18°C에서 各各 冷凍시킨 牛肉을 4°C와 20°C에서, 그리고 microwave로 解凍시킨 後 大腸菌群의 損傷率을 測定하였으며, 冷凍 및

解凍方法別 損傷率을 比較하여 가장 큰 損傷率을 發生시키는 冷凍方法과 解凍方法을 알아보고자 하였다.

材料 및 方法

實驗材料—冷凍시키지 않은 牛肉을 서울市內 屠畜場에 隣接한 精肉店에서 構入하여 한 邊의 길이가 3 cm인 正六面體로 切斷하여 實驗材料로 하였다.

實驗方法—牛肉試料를 비닐랩으로 包藏하여 Table 1과 같이 3가지 溫度에서 冷凍處理하고 各各의 冷凍處理에 대해 3가지 方法으로 解凍시킨 後, 牛肉表面의 大腸菌群이 半致死的 損傷을 입는 比率을 冷凍-解凍處理別로 比較하였다.

1) 冷凍처리: 먼저 各 冷凍溫度에서 半肉試料가 凍結되는데 所要되는 時間을 測定하기 爲해 試料의 中心部와 表面에 各各 Thermocouple (Pt 100 m)을 裝置하여 冷凍시키면서 自動溫度記錄器 (Shinko Electric Instrument, Japan)로 時間經過에 따른 試料의 溫度變化를 記錄하였고, IIR (International Institute of Refrigeration)¹⁹⁾의 凍結에 對한 定義를 따라 中心部 溫度가 -10°C에 達하였을 때 冷凍處理를 終了하였으며 凍結 所要 時間 및 凍結速度역시 IIR의 定義에 따라 다음 式에 의해 算出하였다.

○ 凍結速度 = (cm/h) = 試料의 最小 깊이 / 凍結 所要時間

○ 凍結 所要時間 (h) : 試料의 表面 溫度가 0°C에 到達하는 瞬間부터 中心部 溫度가 -10°C에 到達하는 瞬間까지의 時間

2) 解凍處理: 凍結된 試料의 解凍 所要時間을

Table 1. Conditions of freezing and thawing treatment

Treatment	Temperature	Instrument
Freezing	-60°C	Created by filling of dry ice in -40°C freezing chamber
	-40°C	Forma Bio freezer
	-18°C	Freezer compartment of domestic refrigerator
Thawing	4°C	Domestic refrigerator
	20°C	Low temperature incubator
	microwave	Domestic electronic oven

알기 爲해 冷凍時와 마찬가지로 解凍 中에 試料의 溫度變化를 記錄하면서 試料의 中心部 溫度가 0°C 에 이를 때 解凍을 終了하였다¹⁹⁾.

3) 損傷입은 牛肉表面 大腸菌群의 定量: 冷凍-解凍處理에 의해 半致死의 損傷을 입은 大腸菌群 細胞들을 定量하기 爲해 먼저 選擇培地를 利用하여 損傷입지 않은 大腸菌群만을 定量하고 이어서, Bibek Ray 等^{10-12,20-22)}이 推薦한 (Repair method of freeze-injured coliform)을 Fig. 1과 같이 應用하여 損傷입은 菌을 再生시킨 後, 再生된 菌과 損傷입지 않은 菌을 함께 定量하여 再生 後의 菌數에서 再生 前의 菌數를 빼어준 數로 損傷입은 菌數를 算定하였다. ① 損傷입지 않은 大腸菌群 細胞들의 分離培養.....冷凍-解凍 處理를 한 牛肉 試料를 非選擇性 營養培地인 TSB (Trypticase Soy Broth, Difco) 400 ml/內에서 5 分間 진탕한 後 試料를 除去하고, 懸濁液 0.5 ml 및 5 ml를 2雙씩 取하여 Membrane Filter Technique²³⁾을 따라 m-Endo Broth (Difco)를 써서 35°C, 24時間 條件에서 大腸菌群을 分離培養하였다. ② 損傷입은 大腸菌群 細胞의 再生誘導

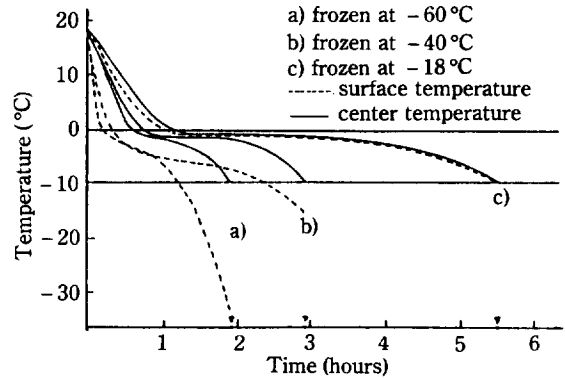


Fig. 2. Freezing curves of beef samples at various temperatures

.....①에서 取하고 남은 TSB 懸濁液을 25°C에서 1時間 20分 동안 培養¹⁰⁾하여 損傷입은 菌들이 再生되도록 誘導하였다. ③ 損傷입지않은 大腸菌群 및 再生된 大腸菌群(總生存大腸菌群) 細胞의 分離培養.....②의 方法으로 損傷입은 菌의 再生을 誘導한 後에, 懸濁液을 ①와 同量 取하여 ①와 同一한 方法으로 大腸菌群을 選擇의 分離培養하였다.

結果 및 考察

牛肉의 冷凍溫度別 凍結速度-한 邊의 長이가 3 cm인 正六面體의 牛肉 試料를 -60°C, -40°C 및 -18°C에서 冷凍處理하는 동안, 試料의 表面과 中心部 溫度變化를 時間 經過에 따라 測定, 記錄한 冷凍曲線은 Fig. 2와 같다.

牛肉의 凍結速度는 위의 冷凍曲線上에서 計算해 낼 수 있으며^{5,19)} 그 結果는 Table 2와 같다.

牛肉의 解凍方法別 解凍時間 및 解凍速度-凍結된 牛肉 試料를 4°C, 20°C에서 그리고 microwave로 解凍하면서 試料의 表面과 中心部の 溫度變化를 測定, 記錄한 解凍方法別 解凍曲線은 Fig. 3과 같다.

Table 2. Freezing rate of beef sample at various temperatures (sample depth=1.5cm)

Freezing temperature	Freezing time (h)	Freezing rate (cm/h)
-60 °C	1.8	0.8
-40 °C	2.7	0.6
-18 °C	4.5	0.3

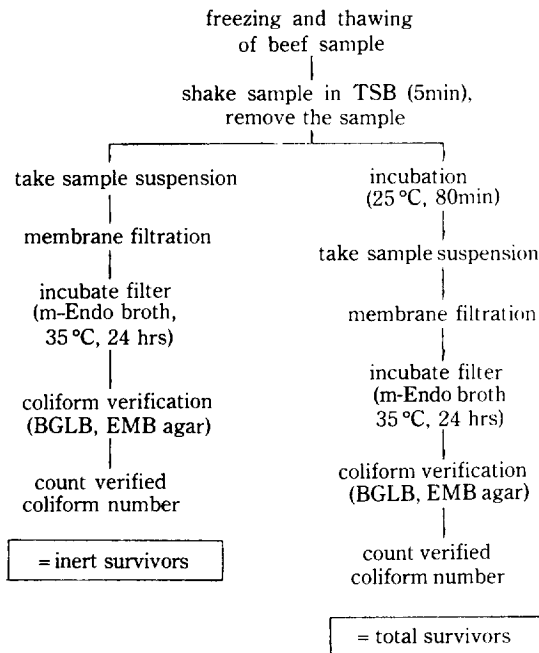


Fig. 1. Enumeration procedure of inert and total survivors of total coliform on the surface of frozen-thawed beef sample

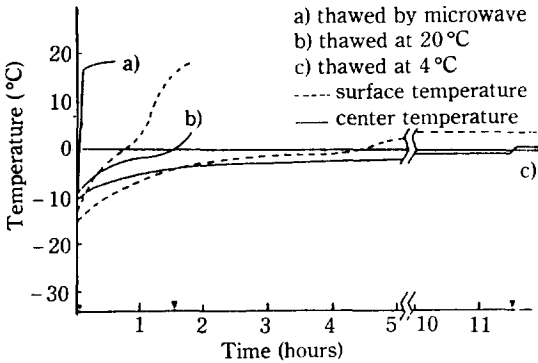


Fig. 3. Thawing curves of frozen beef samples at various temperature (sample depth=1.5cm)

各 溫度에서의 解凍曲線으로부터 解凍所要時間 및 解凍速度를 求할 수 있는데^{5,9)} 그 결과는 Table 3과 같다.

冷凍 및 解凍에 의한 牛肉表面 大腸菌群의 損傷率—牛肉試料를 -60°C, -40°C, -18°C에서 冷凍處

Table 3. Thawing time and thawing rate of frozen beef sample at various temperature.

Thawing temperature	Thawing time	Thawing rate (cm/h)
4 °C	11.5hrs	0.1
20 °C	1.5hrs	1.0
microwave ^{a)}	2min	5.0

a): Thawing by domestic electronic oven

리하여 凍結시키고, 各各에 對해 4°C, 20°C에서, 그리고 microwave로 解凍시킨 後, 冷凍-解凍處理에 의해 損傷입은 牛肉表面 大腸菌群의 總生存菌數에 對한 百分率을 算出한 結果는 Table 4와 같다.

이 結果에서는 冷凍溫도와 解凍方法 사이에 交互作用이 없는 것으로 認定되어, 冷凍에 의한 損傷率은 나중의 解凍方法에 關係없이 一定하며, 解凍方法에 따른 損傷率의 變化도 冷凍에 의해 影響

Table 4. Number of inert and total survivors and percentage of injured total coliform after freezing-thawing treatment

Treatment		Replication ^{b)} No.	Total coliform counts		% Injured (%)
Freezing temperature	Thawing temperature		Survivors (× 15 cells per 1cm ²)		
			Inert	Total	
-60°C	4 °C	1	25	41	39.02
		2	10	31	67.74
	20 °C	1	90	105	14.29
		2	45	54	16.67
	M.W. ^{a)}	1	18	24	25.00
		2	78	112	30.36
-40°C	4 °C	1	8	13	38.46
		2	13	39	66.67
	20 °C	1	15	17	11.76
		2	16	19	15.79
	M.W. ^{a)}	1	38	48	20.83
		2	36	51	29.41
-18°C	4 °C	1	32	42	23.81
		2	6	15	60.00
	20 °C	1	16	17	5.88
		2	17	18	5.56
	M.W. ^{a)}	1	90	100	10.00
		2	115	128	10.16

a): Thawing by microwave

b): Each combination of freezing-thawing treatment was repeated twice.

Table 5. Mean percentage of injured total coliform by respective freezing-thawing treatment

Freezing temperature	Thawing temperature			Mean
	4°C	20°C	M.W. ^{a)}	
-60°C	39.02	14.29	25.00	32.15
	67.74	16.67	30.36	
-40°C	38.46	11.76	20.83	30.49
	66.67	15.79	29.41	
-18°C	23.81	5.88	10.00	19.24
	60.00	5.56	10.16	
Mean	49.29	11.63	20.96	

a): Thawing by microwave

을 받지 않는 것으로 나타났다. 각 냉동 온도 및解冻 방법에 의한 평균 손상률은 Table 5 및 Fig. 4에 나타난 바와 같으며 Fig. 4의 [A]는 냉동 온도에 따른 평균 손상률을, [B]는解冻 방법에 따른 평균 손상률을 보인 것이다.

1) 냉각 속도가 손상률에 미치는 영향: 냉각 속도에 따른 손상률은解冻 방법에 관계없이 냉각 속도가 빠를수록 손상 정도가 높은 것으로 나타났으나有意한 差異는 認定되지 않았다.

Calcott and Macleod²⁴⁾는 *E. coli*를 증류수와 食鹽水中에서 냉각시켰을 때, 냉각 속도²⁵⁾가 10°C/min~100°C/min인 範圍에서는 냉각 속도가 빠를수록 致死率이 增加하지만 10°C/min 以下에서는 냉각 속도가 빠를수록 致死率은 減少한다고 報告하였고, Obafemi¹³⁾는 鷄肉을 여러가지 速度로 냉각시킨 後, 냉각 속도가 10°C/min 以下인 範

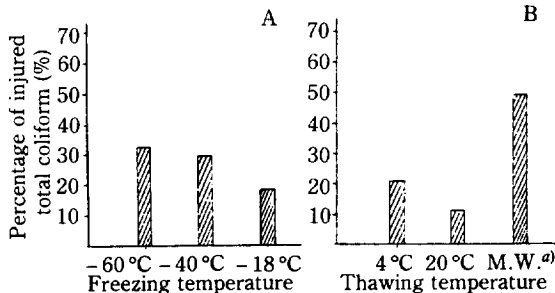


Fig. 4. Mean percentage of injured total coliform by respective freezing-thawing treatment

a): Thawing by microwave

圍에서는 速度가 빠를수록 *S. typhimurium*의 致死率이 減少하였다고 報告하였으며, Mazur²⁶⁾는 냉각 속도가 10°C/min일 때 致死率이 가장 높은 理由로서, 10°C/min 以下의 냉각 속도에서는 細胞들이 주로 細胞外 結氷으로 인해 增加하는 溶質의 濃도에 의해 損傷을 입게 되므로 냉각 속도가 빨라지면 溶質에 暴露되는 時間이 짧아지기 때문에 致死率이 낮으며, 10°C/min 以下에서는 細胞內部에서 結氷이 일어나기 때문에 냉각 속도가 빠를수록 致死率이 높다는 推論을 提案한 바 있다.

本 實驗에서의 냉각 속도는, 10°C/min 以下의 냉각 속도는 dry ice/ acetone 浸漬法과 같은 特殊한 冷却法에 의해서만 얻어질 수 있는 것이기 때문에²⁵⁾, 모두 10°C/min를 넘지 않을 것으로 推測되며, 따라서 凍結速度가 빨라짐에 따라 즉, 냉각 속도가 빨라짐에 따라 前述한 研究結果들과 달리 損傷率이 增加하는 傾向이 나타난 것은, 각 냉동 온도에서의 牛肉의 最終 表面溫度 即, 大腸菌群의 暴露溫度가 Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 -35°C, -15°C, -10°C로 各各 다르기 때문에 이 差異가 純粹한 冷却溫度에 의한 效果에 對해 confounding variable로 作用했기 때문이라고 볼 수 있다. 그러나, 이러한 點은 大腸菌群의 暴露溫度別 및 暴露時間別 損傷率에 關한 研究에 의해 밝혀져야 할 것으로 思料된다.

2)解冻 방법이 손상률에 미치는 영향

解冻 방법에 따른 손상률의 變化를 냉동 온도別로 分別하여 보면 Fig. 5와 같다.

解冻 방법에 따른 손상률을 比較한 結果, 4°C에서의解冻 때 가장 큰 손상률을 볼 수 있었으며,解冻 방법에 따른 손상률에는 有意한 差異가 있는 것으로 나타났다 ($p < 0.01$).

냉동食肉이解冻되는 동안에 微生物들은 周圍의 結氷되었던 高濃度の 溶媒가 녹음에 따라 다시 溶媒效果에 暴露되기 때문에²⁷⁻³⁰⁾解冻이 빨리 終結될수록 暴露時間이 짧게 되며, 따라서 損傷率도 적게 된다. 本 實驗에서 4°C에서의解冻 때 가장 큰 손상률이 나타난 것은 이러한 기작에 의한 것으로 思料된다. Obafemi¹³⁾는 液體 Freon으로 냉각시킨 對數期的 *S. typhimurium*들을 4°C에서 80分間解冻시켰을 때 40°C에서 13分間解冻시켰을 때보다 더 致命的이었다고 報告한 바 있다. 또

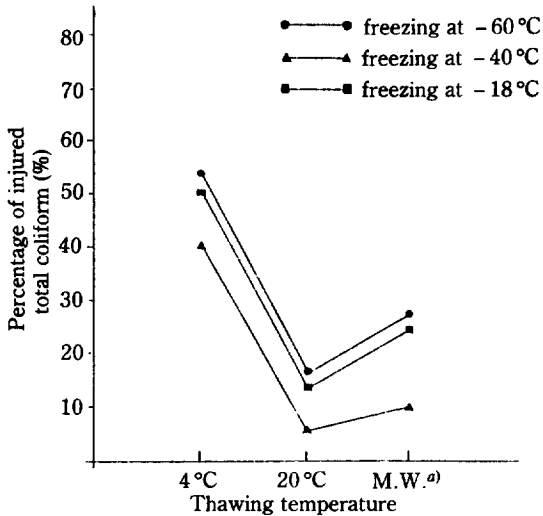


Fig. 5. Percentage of injured total coliform by respective freezing-thawing treatment
a): Thawing by microwave

Christophersen³¹⁾도 高速解凍보다 低速解凍이 凍結된 細胞에 對해 많은 危害를 주었다고 報告한 바 있다.

Christophersen³¹⁾은 一般的으로 10°C 以下에서 解凍할 때 微生物 汚染水準이 낮았다고 報告했으며, 이에 따라 France 農林省³²⁾은 肉類의 解凍時 表面溫度가 10時間 以上 10°C를 超過해서는 안된다고 規定한 바 있다.

그러나 本 實驗에서 microwave에 의한 解凍보다 解凍速度가 훨씬 느린 20°C에서의 解凍에서 가장 낮은 損傷率이 나타난 것에 對해서는 다른 角度에서 原因을 찾아 볼 수 있다. 卽, Fig. 3에 나타난 바와 같이 20°C에서 解凍이 完了되기 까지는 90分이 所要되지만 試料表面은 45分만에 解凍溫度를 넘어서서 微生物의 生育이 可能한 溫度 및 營養條件을 提供하게 되므로, 損傷입은 大腸菌群 細胞들의 一部가 解凍 中에 自然的으로 再生되었을 수 있으며^{10,14)}, 따라서 再生誘導에 의한 菌數 增加가 작았고 損傷率도 낮은 것으로 思料된다. 그러나 이러한 推測은 損傷입은 菌들의 再生과 關聯된 溫度 및 時間變數를 包含하도록 計劃된 實驗에 의해 밝혀져야 할 課題이다.

국문요약

한 邊의 길이 3cm인 正六面體의 初期溫度 18°C인 牛肉試料를 비닐랩으로 包藏하여 -60°C, -40°C, -18°C에서 冷凍處理하고, 各各에 對해 4°C와 20°C에서 그리고 microwave를 照射하여 解凍한 다음, 冷凍-解凍處理에 의해 半致死的 損傷을 입은 牛肉表面 大腸菌群의 總生存大腸菌群에 對한 百分率을 測定하여, 冷凍-解凍處理에 의한 大腸菌群의 損傷率을 冷凍溫度別 및 解凍方法別로 比較한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. -60°C, -40°C, -18°C에서 牛肉試料의 凍結速度는 各各 0.8 cm/h, 0.6 cm/h 그리고 0.3 cm/h였다.
2. 4°C, 20°C에서 그리고 microwave를 照射하여 牛肉試料를 解凍시켰을 때 解凍 所要時間은 各各 11.5時間, 1.5時間 그리고 2分이었다.
3. 冷凍 및 解凍處理의 牛肉表面 大腸菌群의 損傷率에 對한 影響에서는 冷凍處理와 解凍處理 사이에 交互作用은 없는 것으로 나타났다.
4. 牛肉의 解凍速度에 따른 牛肉表面 大腸菌群의 平均損傷率은 凍結速度 0.8 cm/h, 0.6 cm/h, 0.3 cm/h에 對해 各各 32.2%, 30.5%, 19.2%였으며 凍結速度에 따른 有意한 差異는 없었다.
5. 牛肉의 解凍方法別 牛肉表面 大腸菌群의 平均損傷率은 4°C에서 11.5時間, 20°C에서 1.5時間 그리고 microwave로 2分 解凍시키는 方法들에 對해 各各 49.3%, 11.7%, 21.0%였으며, 그 中 가장 높은 損傷率을 發生시키는 解凍方法은 4°C에서 11.5時間 解凍하는 方法이었다 ($p < 0.01$).
6. 牛肉表面 大腸菌群의 損傷率을 가장 크게 發生시키는 冷凍-解凍方法은 -60°C에서 冷凍시키고 4°C에서 解凍시키는 方法이었다. 冷凍溫度 間에는 有意한 差異가 없었기 때문에 經濟的인 面을 考慮한다면 -18°C에서 冷凍시키고, 4°C에서 解凍시키는 方法도 좋다고 할 수 있다.

참고문헌

1. 주현규, 임무현, 민경찬, 배정설, 조규성 : 最新食品衛生學, 裕林文化社, (1987).
2. Robinson, R.K.: Microbiology of frozen foods, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1985.
3. Speck, M.L. and B. Ray: Effects of freezing and storage on microorganisms frozen foods: a Review, *Journal of Food Protection*, **40**, 333, 1977.
4. Ingram, M. and B.M. Mackey: Inhibition and inactivation of vegetative microbes, Academic Press, London, 1976.
5. 李英春 : 食品冷凍工學, 新光出版社, (1987).
6. Boegh-Soerensen, L. and F. Bramsnaes: The effect of storage in retail cabinets on frozen foods, *Bull. Int. Inst. Refrig.* (Annexe 1977-1), 375, 1977.
7. Boegh-Soerensen, L. and K. Bech-Jacobsen; Total time for frozen foods in the freezer chain and in display cabinets. In: Thermal Processing and Quality of Foods (Eds P. Zeuthen *et al.*), (Proceedings of COST 91 symposium in Athens), Applied Science Publishers, London, 1984.
8. Clemmensen, J. and P. Zeuthen: Physical factors influencing the quality of unwrapped pork sides during freezing, In: Proceedings from MRI symposium No. 3: Meat freezing-Why and How, Meat Research Institute, Langford, 1974.
9. 신경호 : 서울시 一部地域 冷凍牛肉 및 豚肉의 細菌學的 調査研究, 서울大學校 保健大學院 碩士學位論文, (1987).
10. Ray, B.: Methods to detect stressed microorganisms, *Journal of Food Protection*, **42**, 346, 1979.
11. Read, R.B. Jr.: Detection of Stressed Microorganisms-Implications for Regulatory Monitoring, *Journal of Food Protection*, **42**, 368, 1979.
12. Ray, B.: Methods to detect stressed microorganisms, *Journal of Food Protection*, **42**, 346, 1979.
13. Obafemi, A.: The survival of *Salmonella typhimurium* in processed frozen poultry, Ph.D. Thesis, University of Reading, England, 1983.
14. Sorrells, K.M., M.L. Speck, and J.W. Warren: Pathogenicity of *Salmonella gallinarum* after metabolic injury by freezing, *Applied Microbiology*, **19**: 39, 1970.
15. Haines, R.B.: Proceedings of the Royal Society, **B 124**: 451, 1963.
16. Georgala, P.I. and A. Hurst: *Journal of Applied Bacteriology*, **26**, 346, 1963.
17. Luyet, B.: Basic physical phenomena in the freezing and thawing of animal and plant tissues. In: The Freezing Preservation of Foods (Eds D.K. Tressler, W.B. van Arsdell and M.J. Copley), AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, 1968.
18. Bryan, F.L.: Factors that contribute to outbreak of foodborne disease, *Journal of Food Protection*. **41**, 816, 1978.
19. IIR (International Institute of Refrigeration): Recommendations for the processing and handling of frozen foods, IIR, Paris, 1979.
20. Ray, B. and Speck, M.L.: *Journal of Applied Microbiology*, **24**, 585, 1972.
21. Powers, E.M. and Thomas G. Latt.: Rapid Enumeration and Identification of Stressed Fecal Coliforms, *Journal of Food Protection*, **42**, 432, 1979.
22. Hartman, P.A.: Modification of Conventional Methods for Recovery of Injured Coliforms and Salmonellae, *Journal of Food Protection* **42**, 356, 1979.
23. American Public Health Association: Standard Methods for the examination of water and wastewater, 16th ed. A.P.H.A., 1985, pp. 860-901.
24. Calcott, P.H. and Macleod. R.A.: *Canadian Journal of Microbiology*, **20**, 671, 1974.
25. Takano, M., Simbol, A.B. Yasin, M. and Shibasaki, I.: *Journal of Food Science*, **44**, 112, 1979.
26. Mazur, P.: Cryobiology, Academic Press, N.Y., 1966.
27. Calcott, P.H.: Freezing and thawing

- microbes, *Patterns of Progress*, Meadowfield Press Ltd., Shildon Co. Durham, 1978.
28. Bailey, C.: Industrial thawing methods. In: Minutes of COST 91, Sub-Group 3, meeting in Gothenburg (April 1981). Danish Meat Products Laboratory, Copenhagen, 1981.
 29. James, S.J., Nair C. and Bailey C.: The effect of the rate of freezing and thawing on the drip loss from frozen beef. In: *Thermal Processing and Quality of Foods* (Eds P. Zeuthen *et al.*) (Proceedings of COST 91 Symposium in Athens), Applied Science Publishers, London, 1984.
 30. Jason, A.C.: Rapid thawing of foodstuffs. In: *Proceedings of IFST*, 7(3), 146, 1974.
 31. Christophersen, J.: *Low temperature biology of foodstuffs*, Pergamon Press, Braunschweig, 1968.
 32. Ministere de l'Agriculture: Reglementation des conditions hygeniques congelation de conservation et de decongelation des denrees animals et d' orgine animales, Article 20, 1974.