

Chemical Marker를 이용한 살균도 예측

최양문 · 김희준*

고려대학교 생물공학연구소,

*U.S. Army RD&E Center Solder Systems Command

Evaluation of Lethality by Chemical Marker

Yang-Mun Choi and Hie-Joon Kim*

Institute of Biotechnology, Korea University,

*U.S. Army RD&E Center, Solder Systems Command

Abstract

The rate constants and activation energies for formation of two chemical markers, M-1 and M-2 at sterilization temperatures were determined in a meatball system. Destruction rates for bacterial spores were also determined. The rate constants for M-1 and M-2 formation at 121°C were 0.03 and 0.28 Abs/min, respectively. The activation energies for M-1 and M-2 were 27.9 and 24.6 Cal/mol. M-2 was formed faster than M-1 and reached a maximum and decreased. M-1 formation continued up to 30 min at 121°C and 10 min at 131°C, which makes M-1 a more useful chemical marker for high F_0 values. The D-values for spores (*B. stearothermophilus* ATCC 12980) at 111, 114.4, 117.7 and 121°C were 7.5, 4.5, 1.9 and 0.58 respectively. At temperatures between 111 and 121°C, there was a liner correlation between destruction of the spores and the M-1 formation. It was difficult to get accurate D-value at 126°C and 131°C, because almost all spores were dead before temperature at the center of the meatball reached 126°C. These data suggest that the chemical marker should be used to evaluate overprocessing as well as microbial lethality in aseptic processing.

Key words: Chemical marker, lethality, *B. stearothermophilus*, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6methyl-4(H)-pyran-4-one, 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone

서 론

1809년 Nicolas Appert가 유리용기속에 여러가지 고기와 야채를 채우고 폴크마개를 한 후 수시간 동안 끓는 물속에서 가열한 식품은 장기간 보존할 수 있다는 것을 발표한 후 열처리에 의한 방법은 계속 발전하여 현재 식품보존법으로 가장 널리 사용되고 있다. 열처리 방법중 식품을 retort pouch나 can과 같은 용기에 넣고 밀폐한 후 고온고압의 살균기에서 살균하는 방법은 식품을 가열시 열전쌍에 의해서 쉽게 냉점의 온도 profile을 알 수 있어 안정성 확보에 매우 용이하다. 그러나 용기접촉면으로 부터 식품의 중심부로 열이 전도되는 데는 상당한 시간이 걸리기 때문에 식품표면이 과도하게 가열되어 비타민 손실과 단백질의 과변성에 의한 영양손실 및 식품조직의 연화와 같은 식품품질 저하가

초래된다. 이런 단점을 개선하기 위한 방법으로 aseptic processing이 약 40년전에 고안되고 발전해 왔다⁽¹⁾. Aseptic processing이란 pump에 의해 식품이 scraped surface heat exchanger (SSHE)나 ohmic heater 등에 의해 가열된 후 holding tube와 cooling tube를 거쳐 미리 멸균된 용기에 포장되는 방법을 의미하며 우유나 주스와 같은 액상식품에 널리 사용되고 있다. 그러나, 입자를 포함한 저산성식품(pH>4.5)에서는 미생물학적 안정성을 이유로 미국 FDA에서 사용이 허가되어 있지 않는 상태이다⁽²⁾. 미생물학적 안정성을 확보하기 위해서는 식품살균시 식품입자의 냉점온도 및 관내에서의 체류시간을 알아야 하지만, 흐르는 유체속에 있는 입자의 냉점온도 profile을 직접적으로 측정한다는 것은 현재로는 거의 불가능한 일이다⁽³⁾. 간접적으로 온도 profile을 얻기 위한 대표적인 방법으로는 수학적 modeling^(4,5)과 내열성 미생물 포자의 사멸율로부터 살균도를 계산하는 방법^(6,7)들이 연구되어지고 있다. 그러나, 수학적 modeling은 복잡한 식품의 구성성분을 단순화하고, 여

Corresponding author: Yang-Mun Choi, Institute of Biotechnology, Korea University, 1 Annam-dong, Sungbug-gu, Seoul 135-075, Korea

러 가지 가정 등을 도입함으로써 현실과는 차이가 있는 결과를 나타내는 단점과, 내열성 포자를 이용하는 방법^(9,11)은 포자들이 전부 사멸한 후에는 더 이상의 살균도를 구할 수 없는 단점을 갖고 있다.

이러한 단점을 극복하고자 김 등⁽¹²⁾은 식품을 가열할 때 식품내에 있는 당과 유리 아미노산은 아민류에 의한 Maillard 반응으로 생성된 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one(M-1)과 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (M-2)이 온도의 상승과 가열시간이 증가함에 따라 그 생성속도 및 생성량이 증가함을 발견하였다. 또한 김과 최^(13,14)들은 5 kW 및 25 kW 연속적 ohmic heater에서 가열된 meatball에서 생성된 chemical marker (M-1과 M-2)의 양과 포자 사멸율의 상관관계로부터 살균도를 예측할 수 있음을 보고하였다.

그러나, 연속적 ohmic heater에서 가열된 meatball들은 각각의 가열온도 및 가열시간이 다르기 때문에 개개의 meatball에서 생성된 chemical marker의 생성 kinetics를 정확히 알 수 없는 단점을 나타내고 있다. 입자식품의 연속적 살균에 있어 움직이는 입자들의 보다 정확한 살균도의 예측을 위해서는 우선 chemical marker의 정확한 생성 kinetics를 아는 것은 중요한 일이다. 따라서 본 연구에서는 Biological Indicator Evaluator Resistometer (Bier, Joslyn Valve, Macadon, NY)를 사용하여 각 온도에 따른 meatball 내에서의 chemical marker 생성속도상수와 활성화 에너지를 구하여 등온가열시뿐만 아니라 비등온가열조건에서의 살균도를 예측할 수 있는 기초자료로서 chemical marker의 생성 kinetics를 규명하였다. 또한 내열성 포자 사멸율과 chemical marker의 생성과의 상관관계를 나타내어 생성된 chemical marker로 살균도를 예측할 수 있음을 규명하였다.

재료 및 방법

포자현탁액

Cook & Brown 배지⁽¹⁵⁾를 사용하여 *B. stearothermophilus* ATCC 12980의 포자를 생성시켰다. Cook & Brown 배지의 조성은 Bacto-Tryptone (Difco) 3.0 g/L, Bacto-peptone (Difco) 6.0 g/L, yeast extract (Difco) 3.0 g/L, beef extract (Difco) 1.5 g/L, agar (Difco) 25.0 g/L와 Mn^{2+} mg/L이었다. 3 mL 멸균 생리식염수로 agar slant에서 배양한 종균을 세척한 세척액을 80°C에서 10분간 활성화시킨 후 10배 희석한 세척액 5 mL을 2.8 L Fernbach flask에 넣은 250 mL 고체배지에 접종하여 55°C에서 5일 배양하였다. 10개의 Fernbach flask에서

생성된 포자는 구부러진 유리 막대를 사용하여 고체배지 표면을 긁은 후 살균수로 세척하여 수확하였다. 수확된 포자현탁액은 10,000 g에서 30분 원심분리하여 침전된 포자는 살균수로 세척한 후 다시 원심분리하였다. 이와 같은 세척을 3회 실시한 후 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) 용액(50 mL)으로 현탁시켜 spore bead 제조시까지 4°C에서 냉장보관하였다.

Spore bead

냉장보관된 포자현탁액을 100°C steam chamber에서 20분간 활성화시킨 후 포자현탁액 1 mL당 멸균된 4% alginate 용액 3 mL을 혼합 후 16 gage 주사바늘을 장착한 주사기에 담고 한 방울씩 멸균된 2% $CaCl_2$ 용액에 떨어뜨려 응고시켜 spore bead를 제조하였다. 이때 spore bead의 평균 무게는 0.012 g이었으며, 생산 spore 측정방법에 따라 측정할 때 spore bead 한 개당 평균 6×10^7 개(방법은 "생산 spores 측정"을 참조)의 포자를 포함하였다.

Meatball

곱게 갈은 소고기(90% 이상 살코기)에 1% ribose (M-1 precursor), 10% glucose (M-2 precursor)와 0.2% $CaCl_2$ 를 첨가하여 잘 혼합한 후 5 g 취하여 한 개의 spore bead를 중심부에 넣어 meatball을 만든 뒤 2% alginate 용액에 담그고 다시 2% $CaCl_2$ 용액에 침지시켜 meatball 전체를 alginate coating 함으로써 가열시 부스러짐을 방지하였다.

가열조건

Stainless steel cup (2.1×3.6 cm)에 meatball과 7 mL의 증류수를 첨가하고 BIER를 사용하여 가열하였으며, meatball 중심부의 온도는 열전쌍을 사용하여 측정하였다.

생산 spores 측정

가열된 meatball로부터 spore bead를 채취하여 1% Na-citrate 용액 0.9 mL에 넣고 1시간 진탕시켜 spore bead를 완전히 용해한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 0.1 mL를 첨가하였다. Spore bead로부터 용해된 spore 용액은 멸균수로 10 배수씩 희석하여 0.1 mL를 AAMS (antibiotic assay medium supplemented with soluble starch) 배지 plate에 도말하고 55°C에서 1일 호기배양한 후 colony를 세어 생산한 포자 수를 확인하였다. AAMS배지 조성은 Bacto-peptone 6.0 g/L, Bactotryptone 4.0 g/L, Yeast extract 3.0 g/L, Lab Lamb beef

extract 1.5 g/L, Dextrose 1.0 g/L, Soluble starch 1.0 g/L, Agar 15 g/L이며 pH는 6.9로 조정하였다.

Chemical marker의 정량

소고기의 단백질 또는 아민류와 M-1의 전구체로서 glucose, M-2의 전구체인 ribose로 첨가되어 만들어진 meatball을 가열시 Maillard 반응으로 생성되는 chemical marker (M-1, M-2)의 측정은 다음과 같이 하였다. BIER에서 가열한 meatball 중앙부위의 고기를 약 0.15~0.20 g 정도 취하여 10배의 증류수를 첨가하고 Polyttron (Brikmann Instruments, Westbury, NY)을 사용하여 chemical marker (M-1, M-2)를 추출하였다. 추출액은 원심분리하고 상등액을 0.4 μm membrane filter (Nylon 66, Alltech, Deerfield, IL)로 여과하여 시료로 사용하였다. 시료의 측정은 anion exclusion chromatographic column과 photodiode array detector를 장착한 HPLC system을 이용하여 285 nm에서 측정하였다⁽¹²⁾.

데이터 분석

각 가열온도 및 가열시간에서의 시료는 2개 이상의 시료로부터 평균치를 구하여 plotting 하였다. D-value (decimal-reduction time)는 각 온도에서 미생물의 농도를 1/10로 감소시키는 데 필요한 시간으로서 생산곡선의 직선적인 부분 즉 1차 함수적으로 감소하는 범위에서 구하였다. Z-value는 D-value를 1/10로 감소시키는 데 필요한 온도 상승이며, decimal reduction curve로부터 구하였다.

Chemical marker의 반응속도는 시간(분)당 chemical

marker 정량방법에 따라 흡광도 285 nm에서의 증가분으로 하였고, 반응속도상수는 각온도에서 marker들의 일차함수적 생성속도로부터 계산하였으며, 활성화에너지는 아래의 Arrhenius식에 의거하여 결정하였다.

$$\log \frac{k_1}{k_2} = \frac{-Ea}{2.303} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (1)$$

k는 각온도에서 반응속도상수, T는 절대온도, Ea는 활성화 에너지를 나타내고 있다. Log k와 절대온도 T의 관계를 일차함수적으로 plotting하여 이 직선으로부터 활성화에너지를 구하였다.

이때 R은 기체상수로 1.987 Cal/K를 사용하였다.

결과 및 고찰

포자의 열 불활성화

Meatball 중앙에 위치한 alginate bead속 *B. stearothersmophilus* spore의 D-value는 111-121°C에서 구하였으며, 126°C 이상 온도에서 D-value의 값은 설정온도까지 올라가는 동안 대부분의 spore가 사멸하여 정확한 D-value의 측정이 불가능하였다. BIER를 이용한 heating system에서 외부로부터 meatball의 spore bead가 위치한 중심부까지 설정온도에 도달하기까지 약 6분이 소요되었으며, 각 온도에서의 spore의 D-value는 meatball 중앙부가 설정온도까지 상승한 후 spore 사멸율로부터 계산하였다. Fig. 1과 같이 meatball속에서 *B. stearothersmophilus* spore의 D-value는 121°C에서 0.58분으로 기존에 발표⁽¹⁶⁻¹⁸⁾된 2.5-5.2분에 비하여

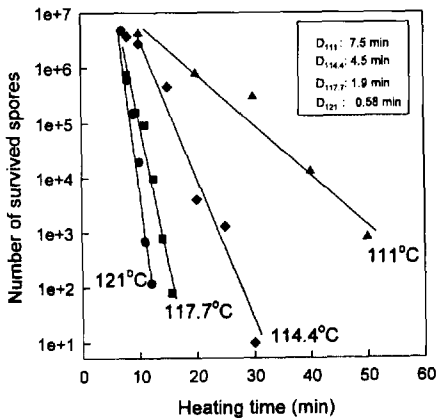


Fig. 1. Thermal inactivation of *B. stearothersmophilus* ATCC 12980. Each spore bead in a meatball was heated at 111(▲—▲), 114.4(◆—◆), 117.7(■—■) and 121°C (●—●).

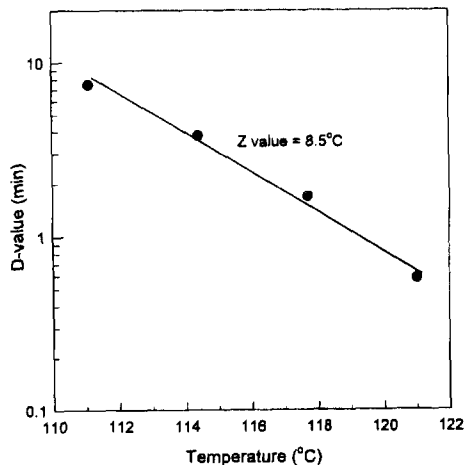


Fig. 2. Thermal destruction curve for *B. stearothersmophilus* ATCC 12980 in the meatball system.

상당히 낮았다. 이는 meat의 영향에 기인하는 것으로 주로 소고기의 사후 강직으로 인한 pH의 저하에 원인이 있는 것으로 사료된다. Meatball 제조에 사용된 소고기의 pH는 10배의 증류수를 첨가하여 homogenization 시킨 후 측정된 결과 5.4이었다. Z-value는 8.5°C (Fig. 2)로서 다른 연구자가 보고^(16,17,19)한 8.1~8.3°C에 비하여 약간 높은 수치를 나타내고 있다.

Chemical marker

121°C에서 가열된 meatball 중앙부위에 생성된 M-1과 M-2의 결과(Fig. 3)에서 M-1은 약 25분까지 일차함수적으로 증가하였으나, M-2는 10분 정도 증가한 후 감소하였다. 이러한 M-1의 일차함수적 증가는 F_0 가 25분에 해당되는 것으로서 그 양은 FDA에서 요구하는 약산성 식품의 냉점에 있어서 살균도 $F_0=3$ 분 이상⁽²⁰⁾에 비하여 8배 정도를 더 예측할 수 있는 양임을

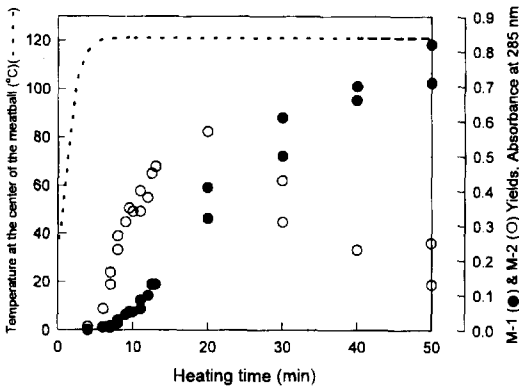


Fig. 3. Chemical marker yields at 121°C in meatballs.

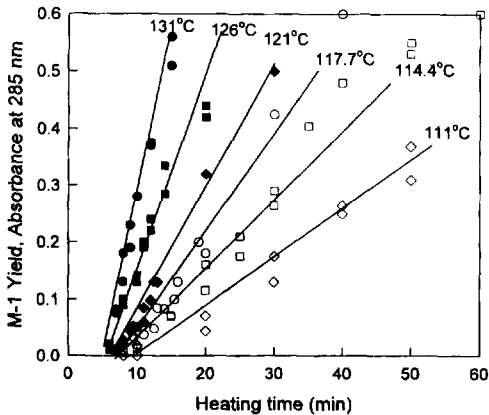


Fig. 4. M-1 Yield in meatballs at 111°C (◇—◇), 114.4°C (□—□), 117.7°C (○—○), 121°C (◆—◆), 126°C (■—■) and 131°C (●—●).

알 수 있다. Fig. 4는 각 온도에서의 M-1의 생성율을 나타낸 것으로서 131°C에서 설정온도로부터 약 10분 이상 일차함수적으로 증가함을 나타내고 있다. 이러한 수치는 일반적으로 *Clostridium botulinum*에 적용되는 Z-value=10분⁽²¹⁾을 사용하여 아래의 살균도를 나타내는 식 (2)로 계산하면 F_0 는 100분으로서 FDA의 최저 살균도 3분에 비하여 약 33배이다. 이러한 결과들은 aseptic processing시 이동하는 입자식품들의 살균도뿐만 아니라 과가열정도를 예측할 수 있음을 나타내고 있다. 측정된 범위(111~131°C)에서의 M-1의 평균 Q_{10} -value는 약 3.6 (Table 1로부터)으로서 일반적인 화학변화에서의 2보다는 높은 수치를 나타내었다.

$$F_0 = \int_0^t 10^{(T-T_{121.1})/Z} dt \quad (2)$$

Meatball system 속에서 chemical marker의 활성화 에너지는 각 온도에서의 생성속도상수(Table 1)로부터 계산하였으며 M-1은 111-131°C에서, M-2는 반응속도가 빨라 126°C 이상의 온도에서는 정확한 생성속도상수 측정이 불가능하여 111-121°C까지에서 구한 결과

Table 1. Rate constants for M-1 and M-2 at various temperature

Temperature (°C)	Rate constant	
	M-1	M-2
111	0.0095	0.121
114.4	0.0160	0.176
117.7	0.0218	0.259
121	0.0302	0.285
126	0.0412	
131	0.0684	

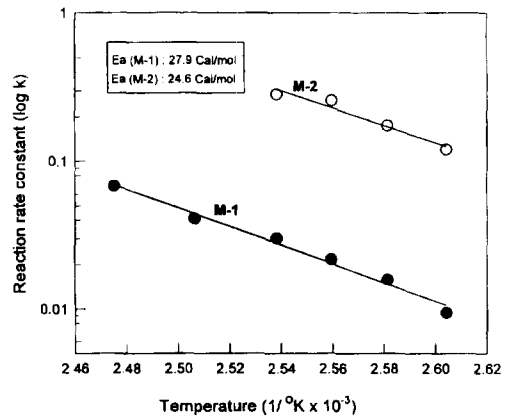


Fig. 5. Arrhenius plot for chemical marker yield in the meatball system.

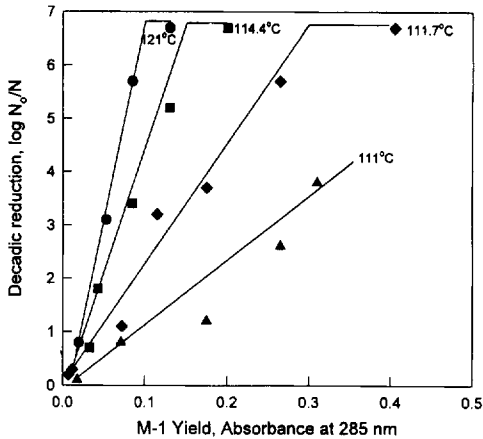


Fig. 6. Correlation between microbial destruction and chemical marker yield (M-1) at 111°C (▲—▲), 114.4°C (◆—◆), 117.7°C (■—■) and 121°C (●—●).

(Fig. 5) 각각 35.1과 31.4 kcal/mole 이었다.

Chemical marker 생성과 포자 사멸율의 상관관계

Chemical marker의 생성율로 살균도를 예측하기 위하여 x-축은 M-1의 생성을 y-축은 미생물포자의 대수적 감소를 나타내어 그들의 상관관계를 나타내었다. M-1과 포자의 대수적 감소의 상관관계는 일차함수적으로 좋은 상관관계(Fig. 6)를 얻었다. 온도가 증가함에 따라 기울기가 증가함은 온도증가에 따른 M-1의 증가속도보다 포자의 대수적 사멸속도가 커지는 것을 나타내고 있다. M-1의 Q_{10} -value는 3.6이며 미생물의 Q_{10} -value는 $Q_{10}=10^{10/z}$ 의 공식으로부터 계산하면 약 30이 된다. M-1의 Q_{10} -value 3.6에 비하여 약 8배 높은 것을 알 수 있으며 M-1의 생성속도는 식품의 cooking value (일정한 가열조리 후 부터는 과가열로서 식품의 품질저하를 초래함)로 생각할 수 있다. 이러한 관점에서 볼 때 Fig. 6는 식품살균시 높은 온도에서 단시간 살균함으로서 미생물의 사멸을 극대화하고 식품의 품질 저하를 극소화할 수 있음을 잘 나타내고 있다. M-2의 경우는 126°C 이상에서는 생성속도가 빨라 정확한 생성속도상수를 구하기 어려웠으며, 또한 111~121°C 사이에서도 짧은 시간내에 생성 최고점을 지나 감소했기 때문에 좋은 상관관계를 얻기가 어려웠다. 그러나 각기 다른 온도에서 같은 M-1의 생성시, M-1과 더불어 M-2의 생성 kinetics를 앞으로서 즉, two-marker model를 사용하여 가열처리된 식품의 온도 profile과 살균도를 예측할 수 있을 것으로 사료된다. 121°C 이상 온도에서는 설정온도에 도달중 대부분의 포자들이 사멸하여 포자 사멸율로는 살균도를 전혀

알 수 없었다. 이것은 실제적으로 aseptic processing시 이용되는 온도인 130-140°C에서는 포자를 사용하여 살균도를 예측할 수 없음을 나타내는 것이다. M-1의 생성으로는 131°C에서도 $F_0=100$ 까지 예측할 수 있어 chemical marker는 aseptic processing의 최적화 살균조건을 설정하는데 크게 기여할 것으로 사료된다.

요 약

Meatball system에서 M-1과 M-2의 생성속도상수 및 활성화 에너지와 더불어 *B. stearothermophilus* ATCC 12980의 사멸율을 검토하였다. 121°C에서 M-1과 M-2의 생성속도상수는 각각 0.03과 0.28 Abs/min 였으며, 활성화 에너지는 27.9와 24.6으로 계산되었다. M-2는 M-1 보다 빨리 생성되었다가 감소되었으며, 121°C에서는 M-2는 약 10분, M-1은 40분 이상 생성량이 증가하였다. 이런 결과는 M-1이 M-2 살균도의 예측에 있어 보다 유용하게 사용될 수 있음을 나타내고 있다. *B. stearothermophilus* ATCC 12980의 D-value는 111, 114.4, 117.7, 121°C에서 각각 7.5, 4.5, 1.9와 0.58이었으며, 포자의 사멸율과 M-1의 생성은 일차함수적 상관관계로 나타낼 수 있었다. 126°C 이상의 온도에서는 설정온도에 도달시까지 포자가 사멸하여 정확한 D-value를 구하기가 불가능하였다. 이러한 결과는 chemical marker를 이용하여 식품살균시 미생물의 사멸율은 물론 과가열 정도를 예측할 수 있음을 제시하고 있다.

문 헌

- Heldman, D. R.: Establish aseptic thermal processing for low-acid foods containing particulates. *Food Technol.*, **43**, 122 (1989)
- Digna, D.M., Berry, M.R., Pflug, I.J. and Gardine, T.D.: Safety consideration in establishing aseptic processes for low-acid foods containing particulates. *Food Technol.*, **43**, 118 (1989)
- Sastry, K.: Mathematical evaluation of process schedules for aseptic processing of low-acid foods containing discrete particulates. *J. Food Sci.*, **51**, 1323 (1986)
- Brown, K.L., Ayres, C.A., Gaze, J.E. and Newman, M. E.: Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particles. *Food microbiol.*, **1**, 187 (1988)
- Sastry, S.K., Li, S.F., Patel, P., Konanyakam, M., Bafna, P., Doores, S. and Beelman, R.B.: A bioindicator for verification of thermal processes for particulate foods. *J. Food Sci.*, **53**, 1528 (1988)
- de Ruyter, P.W. and Brunet, R.: Estimation of process condition for continuous sterilization of food containing particulates. *Food Technol.*, **27**, 44 (1973)

7. Sastry, S.K., Heskitt, B.F. and Blaisdell, J.L.: Experimental and modeling studies on convective heat transfer at the particle-liquid interface in aseptic processing systems. *Food Technol.*, **43**, 132 (1989)
8. Larkin, J.W., Pan, B.S., Toledo, R.T. and Chio, K.M.: Measurement of residence time distribution of fluid and particles in turbulent flow. *J. Food Sci.*, **56**, 255 (1991)
9. Sastry, S.K., Li, S.F., Patel, P., Konanayakam, M., Bafna, P., Doores, S. and Beelman, R.B.: A Bioindicator for verification of thermal processes for particulate foods. *J. Food Sci.*, **53**, 1528 (1988)
10. David, J. R.D. and Merson, R.L.: Kinetics parameters for inactivation of *Bacillus stearothermophilus* at high temperature. *J. Food Sci.*, **55**, 488 (1990)
11. Pflug, I.J., Smith, G., Holcomb, R. and Blanchett, R.: Measuring sterilizing values in containers of food using thermocouples and biological indicator units. *J. Food Sci.*, **43**, 119 (1980)
12. Kim, H.-J. and Taub, I.A.: Intrinsic chemical markers for aseptic processing of particulate foods. *Food Technol.*, **47**, 91 (1993)
13. Kim, H.-J., Choi, Y.-M., Yang, A.P.P., Yang, T.C.S., Taub, I.A., Giles, J., Ditusa, C., Chaill, S., and Zoltai, P.: Microbiological and Chemical Investigation of ohmic heating of particulate foods using a 5 KW ohmic system. *J. Food Process. Preserv.*, **20**, 41 (1996)
14. Kim, H.-J., Choi, Y.-M., Yang, T.C.S., Taub, I.A., Tempest, P., Skudder, Tucker, C., and Parrott, D.L.: Validation of ohmic heating for quality enhancement of military rations and commercial shelf-stable food products. *Food Technol.*, **50**, 253 (1996)
15. Cook, A.M. and Brown, M.R.W.: The relation between heat activation and colony formation for the spores of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Pharm. Pharmacol.*, **17**, 20 (1964)
16. Feeherry, F.E., Munsey, D.T. and Rowley, D.B.: Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 365 (1987)
17. Berry, M.R. Jr and Bradshaw, J.G.: Comparison of sterilization values from heat penetration and spore count reduction in agitating retorts. *J. Food Sci.*, **51**, 477 (1986)
18. Mayou, J.L. and Jezeski, J.J.: Effect of using milk as a heating medium on the apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Prot.*, **40**, 228 (1977)
19. Wescott, G.G., Fairchild, T.M. and Foegeding, P.M.: *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow system. *J. Food Sci.*, **60**, 446 (1995)
20. Pflug, I.J., Berry, M.R. and Dignan, D.M.: Establishing the heat-preservation process for aseptically-packed low-acid food containing large particulates, sterilized in a continuous heat-hold-cool system. *J. Food Prot.*, **53**, 312 (1990)
21. Spencer, R.: Heat resistance of microorganism. *Food Manufacture*, **42**, 29 (1967)

(1996년 7월 25일 접수)