pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 4, pp. 225~231 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.4.225

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

건열처리를 이용한 알팔파의 주요 식중독균 저감화

홍순영 · 김수진 · 방우석*
영남대학교 식품영양학과

Effects of Dry Heat Treatment on the Reduction of Main Food-Borne Bacteria on Alfalfa Seeds

Soon-Young Hong, Su-jin Kim, Woo-Suk Bang*
Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Korea

(Received June 09, 2022/Revised July 25, 2022/Accepted July 27, 2022)

ABSTRACT - In this study, the conditions of dry heat treatment (21 days at 65°C, 16 days at 70°C, 10 days at 75°C, and 7 days at 80°C) were investigated to inactivate *Bacillus cereus* ATCC 12480, *Listeria monocytogenes* ATCC SSA81, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 on alfalfa seeds, without affecting the rate of germination of seeds. Alfalfa seeds were inoculated at levels of 6–7 log CFU/g and treated with dry heat at 65°C, 70°C, 75°C, and 80°C; thereafter, the rate of seed germination was determined. The rate of germination was set at 70%, according to the market standards. The bacteria were inactivated when *B. cereus* was treated with dry heat for 21 days at 65°C, 18 days at 70°C, 14 days at 75°C, and 4 days at 80°C; *L. monocytogenes* was treated for 21 days at 65°C, 18 days at 70°C, 12 days at 75°C, and 7 days at 80°C; *S. aureus* was treated for 18 days at 65°C, 18 days at 70°C, 11 days at 75°C, and 4 days at 80°C; *E. coli* O157:H7 was treated for 21 days at 65°C, 18 days at 70°C, 12 days at 75°C, and 6 days at 80°C; and *Sal.* Typhimurium was treated for 24 days at 65°C, 22 days at 70°C, 14 days at 75°C, and 7 days at 80°C. For all bacteria, the D-value (R^2 = 0.5656–0.7957) significantly decreased when the temperature increased from 65°C to 80°C (P<0.05). Since dry heat treatment of alfalfa seeds at 80°C for 7 days affects their germination rate, dry heat treatment at 75°C for 14 days is the most effective way to ensure their safety. This study suggests a potential method of bacterial inactivation using dry heat treatment to increase the microbiological safety of sprouts.

Key words: Alfalfa, Dry heat treatment, Food-borne bacteria, Germination rate, Inactivation

사람들의 생활수준 향상과 소득 증가로 well-bing과 로하스(LOHAS, Lifestyles of health and sustainability)와 같은 건강에 대한 관심과, 핵가족 및 1인 가구가 증가하면서 신선편의식품에 대한 소비가 확대되고 있다. 신선편의식품에 대한 소비가 증가함에 따라, 신선편의식품 종류 중 하나인 새싹채소 소비 또한 증가하고 있다. 새싹채소는 씨앗을 발아시켜 유근을 2-5 mm 정도 기르는데 생육 기간은 3일에서 4일 정도이고 길이는 5-8 cm 정도일 때 떡잎이 전개되지 않은 상태의 새싹을 통째로 식용하는 채소이다[1]. 새싹채소는 아미노산, 비타민, 무기질, 식이섬유, 효소 등을 풍부하게 함유하고 있고, 항산화, 항암, 항염증 등의 기능성을 지니고 있다[2-4]. 새싹채소의 종류에는 녹두, 다채, 들깨, 메밀, 무, 배추, 보리, 브로콜리, 순무, 아마란스, 알팔파, 양배추, 유채, 케일 등이 있고, 조직이 부드러워 식미감이 좋아 겉절이, 비빔국수, 비빔밥, 샌드위치, 샐러드, 수프, 식품의 장식, 쌈밥, 전채요리, 회 등 다양한 분야의 식품에서 이용되고 있다[5-7].

새싹채소는 육안으로 품질이나 위생 상태를 평가하기 어렵고 가열하지 않고 생으로 섭취하는 식품으로 식중독 발병의 잠재적인 위험 요소로, 새싹채소와 관련된 식중독 사건이 세계적으로 빈번하게 발생하고 있다[8-10]. 1988년부터 2020년까지 전 세계에서 총 14,739건의 식중독 사고가 발생하고 58건의 사망자가 발생하였는데, 그 중 알팔파 새싹이 55% 이상 차지하였다[11]. 새싹채소 관련 식중독 사건

*Correspondence to: Woo-Suk Bang, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38541, Korea
Tel: +82-53-810-2877, Fax: +82-53-810-4768
E-mail: wsbang@ynu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중 병원성 *Escherichia coli* (*E. coli*)와 *Salmonella*가 식중독 발병의 주된 원인이었고, *Listeria*도 종종 발견되었다[11]. 국내에서 새싹채소 관련 식중독 사건은 발생하지 않았지만 시판하는 새싹 채소에서 *Bacillus cereus,* 병원성 *E. coli, Staphylococcus*가 검출된 사례가 있다[12,13]. 최근 세계적으로 새싹채소 종자의 교역 물량이 증가하고 있고, 새싹채소 종자의 해외 채종이 증가함에 따라 여러 감염병이 확산되고 있는 추세이므로 새싹채소의 안전성을 확보하기 위한 대책이 필요한 실정이다[14].

새싹채소 종자를 수확하기 전 농장의 오염된 토양, 분변, 관개수 등에 오염되거나 수확한 후 작업자의 부적절한 취급, 오염된 작업 도구 등에 의해 종자에 오염될 수 있다[15]. 새싹채소는 조직이 연해 수확 후 세척을 통한 살균 작업은 어렵고 식중독을 유발한 새싹채소는 대부분 종자 상태에서 오염되어 있었다[8,16]. 미국 National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)는 새싹이 발아하기 전 종자 상태에서 총 균 수를 5 log CFU/g 이상 감소시킬 것을 권장하고 있다[16]. 하지만 새싹채소 종자가 발아하는 환경과 미생물이 증식하는 환경이 비슷하기 때문에 종자 상태에서 멸균되지 않으면 종자가 발아하는 과정에서 미생물이 빠르게 증식할 수 있다[17]. 종자를 멸균하기 위해 과도한 스트레스를 적용하게 되면 발아율이 감소할 수 있고, 이는 경제적 가치의 감소로 이어진다. 따라서 새싹채소의 안전성을 확보하기 위해 새싹이 발아하기 전 종자상태에서 발아율에 영향을 미치지 않고 멸균하는 것이 중요하다.

본 연구에서는 신선편의식품 중 하나인 새싹채소 중 식중독 사건에 가장 많은 비율을 차지하고 있는 알팔파에 대한 안전성을 확보하기 위해, 건열처리에 대한 발아율의 영향과, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Staphyloccocus aureus* (*S. aureus*), 병원성 *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium (*Sal*. Typhimurium)의 미생물 저감 효과에 대해 조사하여 알팔파 종자의 안전성을 확보하고, 일정한 품질의 알팔파 새싹을 생산하기 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

Materials and Methods

실험 재료

실험에서 사용한 종자는 알팔파로, 경기도 부천 소재 청농종묘(주)에서 구입하였다. 외관이 손상되지 않은 종자를 선별하여 실험에 사용하였고, 제품에 명시되어 있는 종자의 발아율은 70% 이상이다. 미생물 분석을 위해 액체 배지는 nalidixic acid (50 μg/mL)를 포함한 tryptic soy broth (TSB; Bacto™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) (TSBN), 고체 배지는 tryptic soy agar (TSA; Bacto™, Becton, Dickinson and Company) (TSAN)를 사용하였고, peptone water (PW; Bacto™, Becton, Dickinson and Company)를 0.1% 농도로 제조하여 희석에 사용하였다.

사용 균주

중앙대학교 식품공학과(Anseong, Korea)에서 분양받은 Gram-positive 식중독 미생물인 *Bacillus cereus* ATCC 12480, *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a ATCC SSA81, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538과 Gram-negative 식중독 미생물인 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028을 실험에 사용하였다. 모든 균주는 -70°C 초저온 냉동고(MDF-U53V, Sanyo, Osaka, Japan)에서 stock culture하여 보관한 것을 최소 3회 이상 계대 배양하여 정지기의 균을 실험에 이용하였다. 각 균주는 알팔파 종자에 자연적으로 발생하는 미생물의 영향을 최소화하기 위해 TSBN에 적응시켜 실험에 사용하였다.

미생물 접종

TSBN 180 mL에 *B. cereus, L. monocytogenes, S. aureus, E. coli* O157:H7 그리고 *Sal.* Typhimurium의 집락을 취해 넣은 후 incubator (WIF-105, Wisecubed®, Seoul, Korea)에서 35-37°C로 22±2시간 배양한 다음, 0.1% peptone water 1,620 mL를 넣어 배양액을 준비하였다. 배양액에 알팔파 종자 200 g을 넣어 자석교반기(SP131320-33, Barnstead, IA, USA)를 이용해 상온(20-30°C)에서 5분간 마그네틱바로 교반 하였다. 면포에 부어 클린벤치에서 2시간동안 상온(20-30°C)에서 건조하였다. 접종된 종자의 균수는 6-7 log CFU/g이었다.

종자 건열 처리

미생물에 접종된 알팔파 종자(10 g)를 멸균된 petri dish에 담아 drying oven (VS-1202D3, Vision Bionex, Bucheon, Korea)에서 65, 70, 75, 80°C로 건열처리 하였다. 65°C에서는 최대 24일, 70°C에서는 최대 22일, 75°C에서는 최대 14일, 80°C에서는 최대 7일간 처리하였고, 발아율은 열처리 이후 확인하였다.

종자 발아

Petri dish에 면포를 깔아 증류수 10 mL를 넣어 알팔파 종자 100립을 치상한 후, 클린벤치에 암상태로 상온(20-30°C)에서 5일간 침종해 발아시켰다. 5일간 수분이 마르지 않도록 증류수를 보충하였다. 싹이 튼 눈의 길이가 1 mm 이상인 것을 발아한 것으로 간주하였다.

미생물 분석

미생물 실험용 시료는 멸균 처리된 spatula를 사용하여 멸균 시료백에 시료 10 g 과 0.1% peptone water 90 mL를

첨가하여 균질기(BagMixer400, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France)를 이용해 2분간 260 rpm으로 균질화 한 후, 0.1% peptone water로 10진 희석하여 TSAN으로 주입 평판법(pour plate) 하였다. Plate는 35-37°C로 22-24시간동안 incubator에서 배양한 후 25-250개 사이의 집락을 계수하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 수행하였으며 평균과 표준편차로 표시하였다. 미생물을 일정온도에서 처리하여 90%를 사멸시키는데 소요되는 시간인 D 값(R^2=0.5656–0.7957)의 회귀분석과 발아율은 SPSS (ver. 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여, 5% 유의수준(P<0.05)에서 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 실시하여 Duncan's multiple range test로 처리군 간의 유의적인 차이를 검증하였다.

Results and Discussion

건열처리 후 알팔파 종자의 주요 식중독 세균 수준

알팔파 종자를 5종의 식중독 미생물을 접종하여 건열처리 하였을 때 종자에서 미생물 저감 효과를 Table 1-4에 나타내었다. 65°C에서 건열처리 하였을 때 *S. aureus*는 15일, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Sal.* Typhimurium은 18일, *E. coli* O157:H7은 21일간 건열처리 하였을 때 알팔파 종자에서 미생물이 검출되지 않았다. 70°C에서 건열처리 하였을 때 *L. monocytogenes*, *S. aureus*는 14일, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *Sal.* Typhimurium은 16일간 건열처리 하였을 때 알팔파 종자에서 미생물이 검출되지 않았다. 75°C에서 건열처리 하였을 때 *E. coli* O157:H7은 9일, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Sal.* Typhimurium은 10일간 건열처리 하였을 때 알팔파 종자에서 미생물이 검출되지 않았다. 80°C에서 건열처리 하였을 때 *B. cereus*, *S. aureus*는 4일, *L. monocytogenes*는 5일, *E. coli* O157:H7, *Sal.*

Table 1. Bacterial population on alfalfa seeds treated with dry heat at 65°C

Time (day)	Bacterial population (log CFU/g)				
	B. cereus	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*E. coli* O157:H7	*Sal.* Typhimurium
Control	6.37±0.06^{dA}	6.26±0.44^{bA}	6.24±0.09^{bA}	6.26±0.63^{dA}	6.00±0.14^{cA}
3	2.25±0.12^{cB}	2.52±0.45^{aB}	2.27±0.18^{aB}	2.65±0.29^{cB}	1.56±0.20^{bA}
6	1.56±0.25^{bA}	1.49±0.11^{aA}	1.58±0.17^{aA}	2.18±0.25^{bcA}	1.41±0.40^{bA}
9	0.83±0.41^{aA}	0.91±0.49^{aA}	0.67±0.52^{aA}	1.65±0.46^{abA}	0.72±0.57^{cA}
12	0.67±0.52^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.67±0.52^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.33±0.52^{cA}
15	0.50±0.55^{aA}	0.33±0.52^{aA}	ND^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.33±0.52^{cA}
18	ND^{a}	ND^{a}	ND^{a}	0.33±0.52^{a}	ND^{c}
21	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{cA}

Values are mean±standard deviation; ND, not detected. $^{a-d}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at P<0.05; $^{A-B}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at P<0.05.

Table 2. Bacterial population on alfalfa seeds treated with dry heat at 70°C

Time (day)	Bacterial population (log CFU/g)				
	B. cereus	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*E. coli* O157:H7	*Sal.* Typhimurium
Control	6.37±0.06^{dAB}	6.64±0.18^{eB}	6.24±0.09^{aA}	6.45±0.12^{eAB}	6.40±0.25^{eAB}
2	2.35±0.09^{cA}	3.97±1.61^{dA}	2.16±0.18^{bA}	3.15±1.17^{dA}	3.00±0.76^{dA}
4	1.94±0.15^{cA}	1.95±1.17^{cA}	1.88±0.18^{cA}	1.91±1.14^{cdA}	2.47±0.34^{cdA}
6	0.88±0.45^{bA}	1.38±0.88^{bcA}	0.96±0.51^{bA}	1.54±0.43^{cA}	1.28±0.15^{bcA}
8	0.67±0.52^{bA}	0.98±0.54^{bcA}	0.50±0.55^{bA}	0.83±0.41^{abcA}	1.01±0.53^{abcA}
10	0.83±0.41^{bA}	0.67±0.52^{abA}	0.67±0.52^{bA}	0.33±0.52^{abcA}	1.05±0.12^{abcA}
12	0.67±0.52^{bA}	0.33±0.52^{abA}	0.67±0.52^{bA}	0.50±0.55^{abcA}	0.88±0.45^{abcA}
14	0.17±0.41^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	0.33±0.52^{abA}	0.50±0.55^{abA}
16	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}

Values are mean±standard deviation; ND, not detected. $^{a-e}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at P<0.05; $^{A-B}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at P<0.05.

Table 3. Bacterial population on alfalfa seeds treated with dry heat at 75°C

Time (day)	Bacterial population (log CFU/g)				
	B. cereus	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*E. coli* O157:H7	*Sal.* Typhimurium
Control	6.37±0.06^{eA}	6.61±0.22^{fA}	6.24±0.09^{eA}	6.15±0.56^{dA}	6.19±0.30^{fA}
1	3.16±0.21^{dAB}	4.22±0.13^{eAB}	3.43±0.41^{dA}	4.22±0.70^{cAB}	4.47±0.19^{eB}
2	2.38±0.03^{cA}	3.67±0.19^{dC}	1.99±0.35^{cA}	2.77±0.81^{bAB}	3.22±0.33^{dBC}
3	1.49±0.11^{bA}	2.29±0.45^{cA}	1.56±0.15^{bA}	1.96±0.74^{bA}	2.39±0.20^{cA}
4	1.05±0.12^{aA}	1.77±0.33^{bA}	1.15±0.16^{abA}	1.28±0.83^{aA}	1.79±0.32^{bA}
5	1.05±0.12^{aA}	1.06±0.58^{aA}	1.15±0.16^{aA}	0.86±0.72^{aA}	0.82±0.67^{aA}
6	1.00±0.00^{aA}	0.88±0.45^{aAB}	1.00±0.00^{aA}	0.60±0.67^{aB}	0.72±0.57^{aAB}
7	1.00±0.00^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.67±0.52^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.50±0.55^{aA}
8	0.67±0.52^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.33±0.52^{aA}	0.50±0.56^{aA}
9	0.50±0.55^{aA}	0.17±0.41^{aA}	0.33±0.52^{aA}	ND^{aA}	0.50±0.57^{aA}
10	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}

Values are mean±standard deviation; ND, not detected. $^{a-f}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$; $^{A-B}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$.

Table 4. Bacterial population on alfalfa seeds treated with dry heat at 80°C

Time (day)	Bacterial population (log CFU/g)				
	B. cereus	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*E. coli* O157:H7	*Sal.* Typhimurium
Control	6.37±0.06^{cA}	6.47±0.27^{cA}	6.24±0.09^{cA}	6.47±0.43^{cA}	6.32±0.46^{cA}
1	1.87±0.11^{bA}	2.24±0.53^{bA}	1.59±0.11^{bA}	1.91±0.26^{bA}	1.78±0.19^{bA}
2	1.00±0.00^{aA}	1.00±0.00^{aA}	1.00±0.00^{aA}	1.18±0.21^{aA}	1.55±0.34^{bB}
3	0.67±0.52^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.67±0.52^{aA}	0.50±0.55^{aA}	0.93±0.48^{aA}
4	ND^{aA}	0.17±0.41^{aA}	ND^{aA}	0.17±0.41^{aA}	0.50±0.55^{aA}
5	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	0.17±0.41^{aA}
6	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{aA}

Values are mean±standard deviation; ND, not detected. $^{a-c}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$; $^{A-B}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$.

Typhimurium은 6일간 건열처리 하였을 때 알팔파 종자에서 미생물이 검출되지 않았다. 이는 65°C에서 10일, 70°C에서 1일 이상 건열처리 하더라도 알팔파 종자에서 미생물이 불활성화 되지 않았다는 Neetoo와 Chen[18]의 연구와 80°C에서 1일 이상 건열처리 하더라도 알팔파 종자에서 미생물이 불활성화 되지 않았다는 Hong과 Kang[19]의 연구와 유사하였다. Jun과 Lee[20]가 제안한 무 종자에서 미생물을 제어하는 최적 조건은 75°C로 30분간 열수처리 하는 방법이다. 그러므로 새싹채소를 75°C로 건열 및 열수처리 하는 것은 새싹채소의 안전성 확보에 있어 효과적인 방법으로 사료된다.

건열처리 후 발아한 알팔파 새싹의 주요 식중독 세균 수준

알팔파 종자를 5종의 식중독 미생물을 접종하여 건열처리 한 이후 5일간 침종하여 1 mm 이상 발아한 새싹의 주요 식중독 세균 수준은 Table 5에 나타내었다. *B. cereus*는 65°C에서 21일 이상, 70°C에서 18일 이상, 75°C에서 14일 이상, 80°C에서 4일 이상 건열처리 하였을 때 종자가 발아하여도 미생물이 검출되지 않았다. *L. monocytogenes*는 65°C에서 21일 이상, 70°C에서 18일 이상, 75°C에서 12일 이상, 80°C에서 7일 이상 건열처리 하였을 때 종자가 발아하여도 미생물이 검출되지 않았다. *S. aureus*는 65°C에서 18일 이상, 70°C에서 18일 이상, 75°C에서 11일 이상, 80°C에서 4일 이상 건열처리 하였을 때 종자가 발아하여도 미생물이 검출되지 않았다. *E. coli* O157:H7은 65°C에서 21일 이상, 70°C에서 18일 이상, 75°C에서 12일 이상, 80°C에서 6일 이상 건열처리 하였을 때 종자가 발아하여도 미생물이 검출되지 않았다. *Sal.* Typhimurium은 65°C에서 24일 이상, 70°C에서 22일 이상, 75°C에서 14일 이상, 80°C에서 7일 이상 건열처리 하였을 때 종자가 발아하여도 미생물이 검출되지 않았다. 알팔파 종자에 접종된 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Sal.*

Table 5. Bacterial population on alfalfa sprouts after dry heat seed treatment

Treatment		Bacterial population (log CFU/g)				
Temp. (°C)	Time (day)	*B. cereus*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*E. coli* O157:H7	*Sal.* Typhimurium
65	15	-	-	5.73±0.13	-	-
	18	5.75±0.15	5.07±0.15	ND	-	5.56±0.44
	21	ND	ND	ND	ND	5.73±0.07
	24	ND	ND	ND	ND	ND
70	14	5.59±0.15	5.75±0.07	5.76±0.15	-	-
	16	5.65±0.21	5.86±0.01	5.74±0.53	5.99±0.08	5.97±0.30
	18	ND	ND	ND	ND	5.99±0.30
	20	ND	ND	ND	ND	5.87±0.64
	22	ND	ND	ND	ND	ND
75	9	-	-	-	4.48±0.22	-
	10	-	5.76±0.22	5.59±0.09	4.88±0.46	5.59±0.09
	11	5.89±0.14	5.64±0.10	ND	4.77±0.22	5.63±0.19
	12	5.75±0.09	ND	ND	ND	5.77±0.08
	13	5.66±1.93	ND	ND	ND	5.78±0.02
	14	ND	ND	ND	ND	ND
80	4	ND	-	ND	-	-
	5	ND	5.77±0.27	ND	-	-
	6	ND	5.44±0.07	ND	ND	5.80±0.49
	7	ND	ND	ND	ND	ND

Values are mean±standard deviation; -, not tested; ND, not detected.

Typhimurium을 불활성화 시키기 위해서는 65°C에서 24일간, 70°C에서 22일간, 75°C에서 14일간, 또는 80°C에서 7일간 건열처리가 필요하다. 미생물을 접종한 알팔파 종자를 65, 70, 75, 80°C에서 건열처리 하였을 때 종자 상태에서 미생물이 검출되지 않더라도 20-30°C의 온도에서 5일간 발아하면서 log 5-6 CFU/g이상 미생물이 증가하였다. 이는 미생물을 접종한 무순 종자의 미생물이 완전히 제거되지 않은 조건에서, 25°C로 5일간 발아 하였을 때 미생물이 log 5-6 CFU/g까지 증가한 Bang 등[21]의 연구 결과와 비슷하였다. 그러므로 새싹이 발아하는 과정에서 미생물이 빠르게 증가할 수 있기 때문에, 새싹채소 종자에서 미생물이 불활성화 되었더라도 발아하는 과정에서 미생물이 검출되는지 확인하여야 새싹채소의 안전성을 확보할 수 있다.

건열처리 온도에 따른 살균력 비교

알팔파 종자에 접종된 미생물을 65, 70, 75, 80°C에서 건열처리 하였을 때 살균력을 비교하기 위해 한 온도에서 미생물이 90% 감소하는데 필요한 시간인 D값을 Table 6에 나타내었다. *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Sal.* Typhimurium 모두 65°C에서 80°C로 온도가 증가하면 D값이 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 그러므로 미생물의 균주에 상관 없이 열처리 온도가 높아질수록 종자에 접종된 미생물을 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다. 65°C로 건열처리 하였을 때, 균주별 D값이 유의적인 차이가 없었기 때문에, 65°C로 건열처리 하는 것은 균주에 상관 없이 미생물을 감소시키는데 효과가 있음을 확인하였다. 70°C로 건열처리 하였을 때, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Sal.* Typhimurium을 비교하였을 때와 *B. cereus*, *Sal.* Typhimurium을 비교 하였을 때 D값의 유의적인 차이가 없었다(P>0.05). *Sal.* Typhimurium은 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7과 비교하여 D값이 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). 그러므로 알팔파 종자를 70°C로 건열처리 하였을 때 *Sal.* Typhimurium에 비해 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7를 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다. 75°C로 건열처리 하였을 때, *B. cereus*, *S. aureus*, *Sal.* Typhimurium을 비교 하였을 때와 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7을 비교 하였을 때 D값이 유의적인 차이가 없었다(P>0.05). *B. cereus*, *Sal.* Typhimurium은 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7과 비교하여 D값이 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). 그러므로 알팔파 종자를 75°C로 건열처리

Table 6. D-values of bacterial on alfalfa seeds treated with dry heat

Strain	D-value (day)			
	65°C	70°C	75°C	80°C
B. cereus	5.07±0.03^{NSD}	3.97±0.03^{abC}	2.70±0.08^{bB}	0.72±0.03^{aA}
L. monocytogenes	5.37±0.56^{D}	3.47±0.50^{aC}	2.06±0.21^{aB}	1.26±0.09^{bA}
S. aureus	5.03±0.04^{D}	3.74±0.21^{aC}	2.31±0.30^{abB}	0.76±0.02^{aA}
E. coli O157:H7	4.94±0.49^{D}	3.54±0.31^{aC}	2.22±0.25^{aB}	1.20±0.18^{bA}
Sal. Typhimurium	5.48±0.40^{D}	4.32±0.17^{bC}	2.67±0.12^{bB}	1.37±0.14^{bA}

Values are mean±standard deviation; ^{NS}No significant difference; $^{a-b}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$; $^{A-D}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$.

하였을 때 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7은 *B. cereus*, *Sal.* Typhimurium에 비해 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다. 80°C로 건열처리 하였을 때, *B. cereus*, *S. aureus*을 비교하였을 때와 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Sal.* Typhimurium을 비교하였을 때 D값의 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Sal.* Typhimurium은 *B. cereus*, *S. aureus*와 비교하여 D값이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$) 그러므로 알팔파 종자를 80°C로 건열처리 하였을 때 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Sal.* Typhimurium은 *B. cereus*, *S. aureus*에 비해 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다.

Table 7. Effects of dry heat treatment on the germination rate of alfalfa seeds

Dry heat treatment conditions	Germination rate (%)
Control	87.33±2.52^{d}
24 days at 65°C	86.33±0.58^{cd}
22 days at 70°C	84.67±0.58^{c}
14 days at 75°C	77.00±1.00^{b}
7 days at 80°C	55.33±0.58^{a}

Values are mean±standard deviation; $^{a-b}$Means with different superscripts in the same column are significantly different at $P<0.05$.

건열처리 온도에 따른 발아율 확인

온도 65, 70, 75, 80°C에서 건열처리 한 알팔파 종자의 발아율은 Table 7에 나타내었다. 65°C에서 24일간 건열처리 하는 것은 대조군과 비교하여 발아율이 유의적인 차이가 없었으나($P>0.05$), 70°C에서 22일, 75°C에서 14일, 80°C에서 7일간 건열처리 하는 것은 대조군과 비교하여 발아율이 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 시중 알팔파 종자의 발아율 조건인 70% 미만으로 감소한 조건은 80°C에서 7일간 건열처리 하는 것이다. 이는 무순 종자를 80°C에서 48시간 이상 건열처리 하였을 때 발아율이 감소한 Bang 등[21]의 연구 결과와 유사하였다. 80°C에서 7일간 건열처리 하는 조건은 알팔파 종자의 발아율이 시중 알팔파 종자의 발아율 기준 미만으로 감소하기 때문에 적합하지 않은 조건이다. 그러므로 65°C에서 24일, 70°C에서 22일, 75°C에서 14일간 건열처리 하는 것이 알팔파 종자의 발아율에 영향을 미치지 않고 종자에 접종된 미생물을 불활성화 시키는 방법이다. 75°C에서 14일간 건열처리 하는 것은 대조군과 비교하여 발아율이 10% 이상 감소하였지만, 65°C에서 24일 및 70°C에서 22일간 건열처리 하는 조건에 비해 처리 시간을 8일 이상 줄일 수 있어 가장 효과적인 방법으로 사료된다.

본 연구에서는 세계적으로 새싹채소와 관련된 식중독 균인 *Listeria*, *E. coli*, *Salmonella*와 국내에 유통되는 새싹채소에서 발견된 *B. cereus, S. aureus*에 대한 안전성을 확보하기 위해 조작이 쉽고 편리한 건열처리를 이용하였다. 알팔파 종자의 발아율에 영향을 미치지 않고 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Sal.* Typhimurium을 불활성화 시키기 위해 가장 효과적인 방법은 75°C에서 14일간 건열처리 하는 방법이다. 이러한 결과는 일정한 품질의 알팔파 새싹채소를 생산하면서 안전성을 확보하는데 기초자료로 이용될 것으로 기대된다. 이후 연구에서 알팔파 종자 뿐만 아니라 다른 새싹채소 종자에서 식중독 균을 불활성화 시키는 연구가 추가적으로 이루어져야한다.

국문요약

본 연구에서는 건열처리를 통해 알팔파 종자에 접종된 *Bacillus cereus* ATCC 12480, *Listeria monocytogenes* ATCC SSA81, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028을 발아율에 영향 없이 불활성화 시키는 조건(65°C에서 21일, 70°C에서 16일, 75°C에서 10일, 80°C에서 7일)을 조사하였다. 알팔파 종자를 6-7 log CFU/g 수준으로 접종하고 65, 70, 75, 80°C로 건열처리 한 후, 발아율을 확인하였다. 알팔파 종자의 발아율은 시장에 유통되고 있는 알팔파 새싹의 발아율 기준인 70%로 설정하였다. 알팔파 종자에서 *B. cereus*는 65°C에서 21일, 70°C에서 18일, 75°C에서 14일, 80°C에서 4일, *Listeria monocytogenes*는 65°C

에서 21일, 70°C에서 18일, 75°C에서 12일, 80°C에서 7일, *S. aureus*는 65°C에서 18일, 70°C에서 18일, 75°C에서 11일, 80°C에서 4일, *E. coli* O157:H7은 65°C에서 21일, 70°C에서 18일, 75°C에서 12일, 80°C에서 6일, *Sal.* Typhimurium은 65°C에서 24일, 70°C에서 22일, 75°C에서 14일, 80°C에서 7일 이상 건열처리 하였을 때 완전히 불활성화 되었다. 모든 균주는 65°C에서 80°C로 온도가 상승할 때 특정 온도에서 세균의 90%를 죽이는 데 필요한 시간인 D-값 (R^2=0.5656–0.7957)이 유의미하게 감소하였다($P<0.05$). 80°C에서 7일간 건열처리 하였을 때 발아율이 70% 미만으로 감소하였기 때문에 75°C에서 14일간 건열처리 하는 것이 알팔파 종자의 안전성을 확보하는데 있어 가장 효과적인 방법이다. 이 연구는 알팔파 종자의 안전성을 확보하고 일정한 품질의 새싹을 생산하는데 기초자료로 이용될 것으로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Soon Young Hong https://orcid.org/0000-0001-9305-3280
Su Jin Kim https://orcid.org/0000-0002-7431-4905
Woo Suk Bang https://orcid.org/0000-0001-8276-1329

References

1. Kim D.S., Lee K.B., Physiological characteristics and manufacturing of the processing products of sprouts vegetables. *Korean J. Food Cook Sci.,* **26**, 238-245 (2010).
2. Fordham, J.R., Sprouting of seeds and nutrient composition of seeds and sprouts. *J. Food Sci.*, **40**, 552-556 (1975).
3. Price, T.V., Seed sprout production for human consumption-a review. *Can. Inst. Food Technol. J.*, **21**, 57-65 (1988).
4. Marton, M., Mandoki, Z.S., Csapo-Kiss, Z.S., Csapo, J., The role of sprouts in human nutrition. A review. *Acta Univ. Sapientiae.*, **3**, 81-117 (2010).
5. Fu, T., Stewart, D., Reineke, K., Ulaszek, J., Schlesser, J., Tortorello, M., Use of spent irrigation water for microbiological analysis of alfalfa sprouts. *J. Food Prot.*, **64**, 802-806 (2001).
6. Lee, K.S., Park, G.S., Studies in the consumption and preference for sprout vegetables. *J. East Asian Soc. Diet. Life.*, **12**, 896-905 (2014).
7. Choe, U., Yu, L.L., Wang, T.T., The science behind microgreens as an exciting new food for the 21st century. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 11519-11530 (2018).
8. Jun, S.Y., Decontamination of *Listeria monocytogenes*-Inoculated seed sprouts and development of a food safety HACCP plan. PhD thesis, Kyungbook University. Daegu, Korea (2011).
9. Waje, C., Kwon J.H., Improving the food safety of seed sprouts through irradiation treatment. *Food Sci. Biotechnol.*, **16**, 171-176 (2007).
10. Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the united states and European Union: Trends and causes. *Foodborne Pathog. Dis.*, **12**, 32-38 (2015).
11. Miyahira, R.F., Antunes, A.E.C. Bacteriological safety of sprouts: A brief review. *Int. J of Food Microbiol.*, **352**, 109266 (2021).
12. Kang, T.M., Cho, S.K., Park, J.Y., Song, K.B., Chung, M.S., Park, J.H., Analysis of microbial contamination of sprouts and fresh-cut salads in a market. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 490-494 (2011).
13. Jo, M.J., Jeong, A.R., Kim, H.,J., Lee, N.R., Oh, S.W., Kim, Y.J., Chun, H.S., Koo. M.S., Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 91-97 (2011).
14. Jun, S.Y., Lee, Y.K., Effects of heat treatments on the microbial reduction and germination rates of red radish sprout seeds (*Raphanus sativus*). *Korean J. Food Preserv.*, **21**, 544-548 (2014).
15. Yang, Y., Meier, F., Lo, J.A., Yuan, W., Sze, V.L.P., Chung, H.J., Yuk, H.G., Overview of recent events in the microbiological safety of sprouts and new intervention technologies. *Comr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **12**, 265-280 (2013).
16. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, **52**, 123-153 (1999).
17. Feng, G., Churey, J.J., Worobo, R.W., Thermal inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J. Food Prot.*, **70**, 1698-1703 (2007).
18. Neetoo, H., Chen, H., Individual and combined application of dry heat with high hydrostatic pressure to inactivate *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Food Microbiol.*, **28**, 119-127 (2011).
19. Hong, E.J., Kang, D.H., Effect of sequential dry heat and hydrogen peroxide treatment on inactivation of *Salmonella* Typhimurium on alfalfa seeds and seeds germination. *Food Microbiol.*, **53**, 9-14 (2016).
20. Jun, S.Y., Lee, Y.K., Effects of heat treatments on the microbial reduction and germination rates of red radish sprout seeds (*Raphanus sativus*). *Korean J. Food Preserv.*, **21**, 544-548 (2014).
21. Bang, J.H., Kim, H,Y., Kim, H.K., Beuchat, L.R., Ryu, J.H., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on radish seeds by sequential treatments with chlorine dioxide, drying, and dry heat without loss of seed viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6680-6686 (2011).