

## Clove Bud Essential Oil과 Mild Heat 병합처리에 의한 Red Oak Leaf에 접종된 *Escherichia coli* O157:H7 제어 효과

— 연구노트 —

박수종 · 박준범 · 강지훈 · 송경빈

충남대학교 식품공학과

### Effects of Combined Treatment of Clove Bud Essential Oil and Mild Heat on Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 Inoculated onto Red Oak Leaves

Su-Jong Park, Jun-Beom Park, Ji-Hoon Kang, and Kyung Bin Song

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

**ABSTRACT** This study was performed to evaluate the effects of combined treatment of clove bud essential oil (CBEO) and mild heat (MH) on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto red oak leaves. Combined treatment of 0.2% CBEO with MH at 50°C exhibited the highest inhibitory effect against *E. coli* O157:H7 among treatments, resulting in 1.45 log reduction compared with water washing treatment. In addition, inhibitory effect of the combined treatment was maintained during storage of red oak leaves at 4°C for 9 days, showing 1.67~2.25 log reductions compared with non-treated samples. Thus, these results indicate that combined treatment with CBEO/MH can be used to ensure the microbiological safety of fresh leaf vegetables such as red oak leaves during storage.

**Key words:** clove bud essential oil, combined treatment, *Escherichia coli* O157:H7, mild heat, red oak leaf

## 서 론

최근 전 세계적으로 건강한 삶의 질을 위해 신선 식품에 대한 관심과 수요가 증가하고 있다(1). 대표적 식중독균인 *Escherichia coli* O157:H7은 육류, 우유, 요거트, 샐러드, 과일 주스 등 다양한 식품의 오염 원인균으로 주목받고 있다(2). 가열살균 공정은 효과적인 미생물 제어 방법이지만 식품 내 영양소 파괴 및 조직 손상과 같은 문제로 모든 식품에 적용이 어려우며 교차오염 또한 완전히 예방할 수 없다(2). 특히 신선 농산물은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 등 병원성 미생물에 의해 쉽게 오염되기 때문에 식중독 발생 위험이 높다(3). 따라서 신선 농산물에 의한 식중독 발생을 낮추기 위해 효과적인 세척 방법이 필요하다.

신선 농산물의 미생물 제어를 위해 현재 가장 많이 사용되고 있는 세척제는 염소계 세척제이다(4). 염소계 세척제는 신선 농산물에 오염된 병원성 미생물을 2 log colony forming unit(CFU)/g 수준까지 감소시킨다고 알려져 있으나(5), 실제 식품 적용 농도가 제한적이다(6). 또한, 트리할로메탄과 같은 발암물질 생성으로 인해 인체 안전에 영향을 끼치는 문제점도 있다(7). 이러한 이유로 최근 염소계 세척제를 대

체할 수 있는 세척제를 찾기 위한 연구가 많이 수행되고 있다(8,9).

식물성 essential oil(EO)은 우수한 항균 효과를 가진 천연 물질로(2), 0.01~1% 범위에서 신선 농산물에 세척 적용이 가능하다고 보고된 바 있다(10). 특히 eugenol이 주성분인 clove bud essential oil(CBEO)은 다양한 병원성 미생물에 대한 항균 효과가 뛰어나다고 보고되었다(2,11).

Mild heat(MH) 처리는 40~50°C의 온도에서 세척 처리하는 방법으로 상추와 시금치 등 녹색 채소의 품질을 개선시키고(12), 세척제와 병합 처리 시 효과적으로 미생물 수를 감소시킨다고 알려져 있다(13-15). 그러나 아직까지 신선 농산물에 대한 EO와 MH의 병합 처리 효과를 분석한 연구는 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7이 접종된 red oak leaf에 CBEO와 MH의 단일 및 병합 처리 후 미생물 제어 효과를 확인하고, 병합 처리에 따른 저장 중 미생물의 수 변화를 분석함으로써 CBEO/MH 병합 처리의 신선편이 채소에 대한 세척 적용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에서 사용한 clove bud essential oil(purity, 100%)은 (주)에코케이션(Seongnam, Korea)에서 구입하였다.

Received 25 July 2017; Accepted 12 September 2017

Corresponding author: Kyung Bin Song, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

E-mail: kbsong@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6723

Red oak (*Lactuca sativa* var. *crispa*) leaf 시료는 (주)알가팜텍(Paju, Korea)에서 당일 수확한 것을 구입하여 크기 및 외관 상태가 균일하도록 선별하여 실험에 사용하였다.

### *Escherichia coli* O157:H7 배양

*E. coli* O157:H7(ATCC 43889, NCTC 12079) 각 strain을 tryptic soy broth(TSB, Difco Co., Detroit, MI, USA) 25 mL에 접종한 후 37°C shaking incubator에서 18~24시간 배양하였다. 배양된 각 strain culture를 10 mL씩 혼합하여 cocktail inoculum을 제조하였고, 3,000×g(4°C)에서 10분 동안 원심분리 하여 얻어진 cell pellet을 0.1% sterile peptone water(SPW)로 2회 세척하였다. 최종적으로 준비된 cocktail inoculum의 초기 균 농도는 7~8 log CFU/mL였다.

### 병원성 미생물 접종

*E. coli* O157:H7 접종을 위해 선별된 red oak leaf의 잔존 미생물 수를 감소시키고자 clean bench에 장치된 ultraviolet(UV)-C(G40T10, Sankyo-Denki Co., Kanagawa, Japan)를 이용하여 시료 양면을 각각 15분씩 조사하였다. UV-C 조사 처리 후 시료당(2.5 g) 100 µL의 cocktail inoculum을 균일하게 접종하였고 2시간 동안 clean bench에서 부착시켰다. Koseki 등(16)에 따르면 일반적으로 잎의 뒷면(adaxial side)에 기공이 존재하기에 미생물을 뒷면에 접종 시 접종 미생물이 내부로 침투하여 세척 물질의 접근이 어렵다는 것을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 시료 표면에 부착된 미생물에 대한 세척 처리 효과를 분석하기 위한 목적으로, *E. coli* O157:H7이 기공 내부로 침투하는 것을 막기 위하여 red oak leaf의 앞면(abaxial side)에 접종을 실시하였다.

### CBEO 및 MH 단일 세척 처리

CBEO의 세척 농도는 기존 연구(10)를 참조하여 0.05, 0.1, 0.2%로 설정하였다. 증류수에 각 농도에 해당하는 CBEO를 첨가하고 homogenizer(Ultra-Turrax T25, IKA, Saufan, Germany)로 10,000 rpm에서 2분 동안 균질하여 CBEO 세척 용액을 준비하였다. 접종된 시료 20 g을 준비된 500 mL 세척 용액에 2분간 침지하여 세척 처리한 후 clean bench에서 건조하였다. MH 처리 온도 또한 기존 문헌(13-15) 조사를 통해 30, 40, 50°C로 설정하였고, CBEO와 동일하게 세척 처리하였다. 또한, 각 처리에 따른 균 제어 효과를 비교하기 위하여 단순 물 세척 처리(25°C)를 대조구로 이용하였다.

### CBEO와 MH 병합 세척 처리 및 저장 조건

CBEO와 MH의 병합 세척 용액은 설정된 농도(0.05, 0.1, 0.2%)의 CBEO 세척 용액을 제조한 후 교반기(PC-420D, Corning, Acton, MA, USA)를 이용해 30, 40, 50°C로 각각

가열하여 준비하였으며, 접종된 시료를 2분간 침지하여 세척 처리하였다. 비 세척 처리구와 세척 처리구 시료는 low density polyethylene(LDPE) film bag(18×21 cm)에 개별 포장하여 온도 4±1°C, 상대습도 75±5%의 저온 냉장고(VS-1302L, Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)에서 9일간 저장하면서 각 저장일수(0, 2, 5, 9일)별로 시료를 꺼내서 미생물 수 측정 실험을 진행하였다.

### 세척 처리 후 및 저장 중 *E. coli* O157:H7 수 측정

Red oak leaf 시료 10 g과 0.1% SPW 90 mL를 sterile bag에 넣은 후 3분간 stomacher(MIX 2, AES Laboratoire, Combourg, France)를 이용하여 red oak leaf 시료가 완전히 마쇄되도록 균질화시켰다. 균질화된 시료 용액을 50 mL conical tube에 넣고 0.1% SPW로 10배 연속 희석한 후 MacConkey sorbitol agar(Difco Co.) 배지에 100 µL씩 분주하여 도말하였다. 도말된 배지는 37°C에서 24시간 동안 배양하여 형성된 colony 수를 확인하였다. 측정된 *E. coli* O157:H7 수는 시료 g 당 log CFU로 표시하였고 3회 반복 실험하였다.

### 통계 분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 수행하여 평균 ±표준편차로 나타냈다. 통계적 유의성 검사는 SAS version 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)로 분산분석( $P<0.05$ )을 하고, Duncan's multiple range test를 실시하여 대조구와 처리구 간의 유의성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### CBEO와 MH 단일 및 병합 세척 처리 효과

*E. coli* O157:H7이 접종된 red oak leaf 시료에 CBEO 농도 및 MH 온도별 단일 세척 처리 후 미생물 수 변화를 분석하였다(Table 1). CBEO와 MH 처리에 따른 *E. coli* O157:H7의 수 변화는 단순 물 세척 처리구와의 차이(log reduction)로 나타내었다. CBEO 0.05, 0.1, 0.2% 처리는 각각 0.48, 0.56, 0.72 log CFU/g의 미생물 수 감소를 보였다.

**Table 1.** Changes in the population of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on red oak leaves after CBEO or MH treatment (Unit: log CFU/g)

| Treatment <sup>1)</sup> | Log reductions           |
|-------------------------|--------------------------|
| CBEO 0.05%              | 0.48±0.20 <sup>b2)</sup> |
| CBEO 0.1%               | 0.56±0.19 <sup>b</sup>   |
| CBEO 0.2%               | 0.72±0.11 <sup>a</sup>   |
| MH 30°C                 | 0.15±0.06 <sup>c</sup>   |
| MH 40°C                 | 0.48±0.13 <sup>b</sup>   |
| MH 50°C                 | 0.66±0.08 <sup>a</sup>   |

<sup>1)</sup>CBEO: clove bud essential oil, MH: mild heat.

<sup>2)</sup>Any means in the same column (a-c) followed by different letters are significantly ( $P<0.05$ ) different by Duncan's multiple range test.

이는 Singh 등(17)이 thyme essential oil 0.01, 0.1, 1%로 *E. coli* O157:H7이 접종된 상추를 세척 처리하였을 때 각각 0.1, 1.2, 1.69 log CFU/g의 미생물 수를 감소시켰다는 연구 보고와 유사하였다. 이러한 결과는 EO 세척 처리 시 농도가 증가할수록 신선 농산물에 오염된 미생물을 효과적으로 감소시킬 수 있다는 것을 보여주는 결과이지만, Bhargava 등(18)은 높은 농도의 EO를 식품에 적용할 경우 독특한 향 특성 때문에 오히려 식품 품질에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서 적용된 CBEO 처리 농도는 낮은 농도 범위(0.05~0.2%)로 신선 농산물의 품질에는 영향을 끼치지 않으나 상대적으로 농도가 낮기 때문에 미생물 제어 효과(1 log CFU/g 미만)는 크게 나타나지 않은 것으로 판단된다(Table 1). 따라서 신선 농산물의 품질 변화를 야기하지 않는 농도에서 EO의 세척 효과를 높일 수 있는 병합 처리가 필요하다.

MH 처리는 다양한 세척제와 병합 처리 시 시료의 품질은 유지시키면서 세척 효과는 증대시킨다고 알려져 있다(4, 13-15). 따라서 본 연구에서는 30, 40, 50°C MH 단일 처리의 세척 효과를 확인하고, 각 농도에서의 CBEO와 병합 처리하여 세척 효과를 분석하였다(Table 1, 2). 30°C MH 처리는 0.15 log CFU/g의 낮은 미생물 수 감소를 보였는데, 이러한 결과는 대조구인 단순 물 세척 처리의 온도가 25°C로 큰 차이가 없었기 때문으로 판단된다. 반면 40°C MH 처리의 경우 30°C MH 처리보다 약 0.3 log CFU/g 이상 높은 미생물 수 감소를 나타내었으며, 50°C MH 처리는 대조구보다 0.66 log CFU/g만큼 *E. coli* O157:H7 수를 감소시켜 모든 처리 온도 중 가장 효과적이었다(Table 1). 이러한 결과는 Son 등(14)이 *E. coli* O157:H7이 접종된 시금치에 1분 동안 40°C와 50°C MH 단일 세척 처리 후 단순 물 세척 처리와 비교하였을 때 각각 0.31, 0.75 log CFU/g의 미생물 수 감소를 보인 결과와 유사하였다. 또한, baby spinach에 대한 Huang과 Chen(4)의 연구에서도 *E. coli* O157:H7 수 변화에 있어 5분간의 40°C MH 처리는 단순 물 세척(22°C) 처리와 차이가 없었으나 50°C MH 처리(2분)의 경우에는 0.5 log CFU/g 더 높은 감소를 보여 본 연구 결과와 비슷하였다. 이러한 결과로부터 신선 농산물의 미생물 제어에는 50°C MH가 보다 효과적인 온도라고 생각된다.

CBEO 처리의 세척 효과를 증대시킬 수 있는 최적 MH 온도 조건을 선별하기 위해 농도별 CBEO와 30, 40, 50°C MH 처리를 각각 병합 처리한 후 *E. coli* O157:H7 수 변화를 분석하였다(Table 2). 0.05% CBEO와 30, 40, 50°C MH 병합 처리 후 *E. coli* O157:H7 수 감소는 각각 0.53, 0.72, 0.75 log CFU/g이었고, 0.1% CBEO와의 병합 처리는 각각 0.69, 0.75, 1.21 log CFU/g의 미생물 수 감소를 보였다. 0.2% CBEO의 경우 온도별 MH 처리와 병합 처리 후 *E. coli* O157:H7 수가 각각 0.85, 0.98, 1.45 log CFU/g만큼 감소하여 모든 CBEO 농도 조건에서 가장 높은 미생물 제어 효과를 보였다(Table 2). 또한, 본 연구 결과로부터 30°C와 40

**Table 2.** Changes in the population of *E. coli* O157:H7 inoculated on red oak leaves after combined treatment of CBEO and MH (Unit: log reduction)

| Treatment  | Temperature (°C)          |                         |                         |
|------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
|            | 30                        | 40                      | 50                      |
| CBEO 0.05% | 0.53±0.20 <sup>Cb1)</sup> | 0.72±0.10 <sup>Ba</sup> | 0.75±0.05 <sup>Ca</sup> |
| CBEO 0.1%  | 0.69±0.11 <sup>Bb</sup>   | 0.75±0.08 <sup>Bb</sup> | 1.21±0.07 <sup>Ba</sup> |
| CBEO 0.2%  | 0.85±0.20 <sup>Ab</sup>   | 0.98±0.10 <sup>Ab</sup> | 1.45±0.15 <sup>Aa</sup> |

<sup>1)</sup>Any means in the same column (A-C) or same row (a-b) followed by different letters are significantly ( $P<0.05$ ) different by Duncan's multiple range test.

°C MH 처리보다 50°C MH 처리가 CBEO 농도와 상관없이 가장 효과적으로 CBEO 처리의 세척 효과를 증대시킴을 확인하였다. 이러한 결과는 Son 등(14)이 0.5% fumaric acid와 40, 50, 60°C MH 처리를 각각 병합 처리하였을 때 50°C에서 가장 높은 미생물 제어 효과가 나타났다는 결과와 유사하였다. 이와 더불어 *E. coli* O157:H7이 접종된 시금치와 콩나물에 1.5, 2, 2.5% lactic acid와 20, 40, 50°C의 MH를 각각 병합 처리한 경우, 50°C MH 처리가 lactic acid의 농도와 관계없이 가장 높은 균 감소를 보였다는 Dikici 등(12)의 연구 결과 역시 본 연구 결과와 유사하였다. 따라서 이러한 결과로부터 50°C MH가 CBEO 세척 효과를 가장 높일 수 있는 처리 온도라고 판단된다.

#### CBEO와 MH 병합 처리에 따른 저장 중 *E. coli* O157:H7 수 변화

다양한 병합 처리 조건 중 미생물 제어 효과가 가장 높았던 0.2% CBEO와 50°C MH의 병합 세척 처리 후 저장 중 red oak leaf에 접종된 *E. coli* O157:H7 수 변화를 측정하였다(Table 3). 일반적으로 저온저장(4~5°C)은 미생물 성장을 저해한다고 알려져 있으나 본 연구에서는 모든 처리구에서 저장 2일까지는 균 수 차이가 유의적으로 발생하지 않다가 저장 5일 이후 증가하는 경향을 보였다. 이는 red oak leaf에 접종된 *E. coli* O157:H7이 저장 중 저온 환경에 적응하여 나타난 현상이라고 생각된다. 이와 더불어 접종 전 UV-C 조사를 통해 표면 잔존 미생물이 감소하면서 *E. coli* O157:H7이 보다 성장하기 용이한 상태로 전환되었기 때문에 저장 중 균 수가 다소 증가한 것으로 보인다. 이러한 본 연구 결과와 유사하게 Lopez-Velasco 등(19)은 시금치를 12.5%의 sodium hypochlorite로 살균 처리한 후 *E. coli* O157:H7을 접종하여 저장 중 저장 온도에 따른 성장 패턴을 분석하였는데, 4°C 저장 처리구에서 저장 10일 후 1 log cycle 이상의 균 증식을 확인하였다. 균 수 증가 이유로는 *E. coli* O157:H7의 저온 환경에 대한 적응과 더불어 초기 잔존 미생물의 감소로 인해 *E. coli* O157:H7이 경쟁 없이 성장에 필요한 영양소와 증식 공간을 확보할 수 있었기 때문이었다고 보고한 바 있다(19).

비 세척 처리구의 저장 초기(0일) *E. coli* O157:H7 수는 5.13 log CFU/g이었고, 병합 세척 처리구는 3.38 log CFU/g

**Table 3.** Changes in the population of *E. coli* O157:H7 inoculated on red oak leaves after combined treatment of 0.2% CBEO and MH at 50°C during storage at 4°C (Unit: log CFU/g)

| Treatment <sup>1)</sup> | Storage time (day)        |                         |                         |                         |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                         | 0                         | 2                       | 5                       | 9                       |
| Control                 | 5.13±0.18 <sup>Ac2)</sup> | 5.15±0.04 <sup>Ac</sup> | 5.63±0.12 <sup>Ab</sup> | 5.84±0.08 <sup>Aa</sup> |
| Water                   | 4.03±0.09 <sup>Bc</sup>   | 4.13±0.11 <sup>Bc</sup> | 4.43±0.09 <sup>Bb</sup> | 4.90±0.13 <sup>Ba</sup> |
| Combined treatment      | 3.38±0.07 <sup>Cb</sup>   | 3.48±0.25 <sup>Ca</sup> | 3.50±0.04 <sup>Ca</sup> | 3.59±0.02 <sup>Ca</sup> |

<sup>1)</sup>Control: non-treatment, Water: distilled water washing, Combined treatment: 0.2% CBEO/50°C MH.

<sup>2)</sup>Any means in the same column (A-C) or same row (a-c) followed by different letters are significantly ( $P<0.05$ ) different by Duncan's multiple range test.

g으로 대조구보다 1.75 log CFU/g 낮은 미생물 수가 검출되었다. 또한, 저장 9일 동안 비 세척 처리구와 단순 물 세척 처리구의 미생물 수는 각각 0.71, 0.87 log CFU/g 증가한 반면에 병합 세척 처리구는 0.21 log CFU/g의 낮은 증가 수준을 보였다(Table 3). 이는 CBEO와 MH 병합 처리가 처리 직후 효과적으로 미생물 수를 감소시키면서 동시에 저장 중에도 그 효과가 지속됨을 보여주는 결과라고 생각된다. 특히 저장 9일 후 비 세척 처리구의 *E. coli* O157:H7 수는 5.84 log CFU/g인 반면 병합 처리구는 3.59 log CFU/g으로 2.25 log CFU/g의 감소 수준을 나타내어 저장 기간 중 가장 큰 차이를 보였다. 이러한 결과는 MH 처리가 CBEO의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균 효과를 보다 더 증대시켰기 때문이라고 판단된다. Wei 등(20)에 의하면 citric acid와 50°C MH 처리를 병합 처리하였을 때 저장 초기 비 세척 처리구와 병합 처리구 사이의 총 호기성 세균 수 차이는 2.10 log CFU/g인 반면에 저장 7일 후에는 2.58 log CFU/g으로 저장 중 균 제어 효과가 높아진다고 보고하여 본 결과와 유사하였다. 이러한 결과들로부터 50°C MH 처리는 CBEO를 포함한 다양한 세척제의 미생물 감소 효과를 증진시킬 수 있는 병합 처리 기술이라고 생각된다. 또한, 본 연구에서 개발한 CBEO와 MH 병합 처리는 저장 중 red oak leaf와 같은 신선 농산물의 미생물 제어 측면에서 효과적으로 적용 가능하다고 판단된다. 기존 선행 연구(12)에 의하면 MH 처리는 신선 농산물의 품질을 개선할 수 있다고 알려져 있으나, CBEO와 같은 EO와의 병합 처리 후 품질 변화를 분석한 연구는 아직 미비한 상황으로 품질변화 관련한 향후 추가적인 연구 수행이 더 필요하다고 생각된다. 특히 본 연구노트에서는 CBEO와 MH 병합 처리에 의한 신선 농산물에 대한 미생물 제어 효과와 세척 적용 가능성을 검토하는 데 주로 초점을 둔 hurdle technology 개발 연구로서 그 의미가 있다고 판단된다.

## 요 약

본 연구에서는 신선 농산물의 미생물학적 안전성을 제고하기 위해 항균 효과가 있는 clove bud essential oil(CBEO)과 mild heat(MH) 처리를 병합 처리하여 *Escherichia coli* O157:H7이 접종된 red oak leaf의 미생물 수 변화를 측정하였다. 0.2% CBEO와 50°C MH 병합 처리구는 단순 물

세척 처리구보다 1.45 log CFU/g 더 낮은 미생물 수를 나타내어 모든 병합 조건 중 가장 높은 미생물 제어 효과를 보였다. 또한, 본 병합 처리구는 비 세척 처리구와 비교하여 9일 간의 저장 기간 동안 1.67~2.25 log CFU/g 더 낮은 미생물 수를 나타내어 미생물 제어 효과가 지속됨을 확인하였다. 따라서 이러한 결과들로부터 CBEO와 MH의 병합 세척 처리는 저장 중 red oak leaf와 같은 신선 농산물의 미생물학적 안전성을 확보하는 데 효과적으로 사용될 수 있다고 판단된다.

## REFERENCES

- Artés F, Gómez P, Aguayo E, Escalona V, Artés-Hernández F. 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol Technol* 51: 287-296.
- Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36: 162-167.
- Leistner L, Gould GW. 2012. *Hurdle technologies: combination treatments for food stability, safety and quality*. Springer, New York, NY, USA. p 1-15.
- Huang Y, Chen H. 2011. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. *Food Control* 22: 1178-1183.
- Gündüz GT, Gönül ŞA, Karapınar M. 2010. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. *Food Control* 21: 513-517.
- Baek SB, Kim SW, Ha SD. 2012. Reduction of *Escherichia coli* on surfaces of utensils and development of a predictive model as a function of concentration and exposure time of chlorine. *Foodborne Pathog Dis* 9: 1-6.
- del Carmen Velázquez L, Barbini NB, Escudero ME, Estrada CL, de Guzmán AMS. 2009. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. *Food Control* 20: 262-268.
- Rico D, Martin-Diana AB, Barat JM, Barry-Ryan C. 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends Food Sci Technol* 18: 373-386.
- López-Gálvez F, Gil MI, Truchado P, Selma MV, Allende A. 2010. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiol* 27: 199-204.
- Zhang L, Critzer F, Davidson PM, Zhong Q. 2014. Formu-

- lating essential oil microemulsions as washing solutions for organic fresh produce production. *Food Chem* 165: 113-118.
11. Ivanovic J, Dimitrijevic-Brankovic S, Mistic D, Ristic M, Zizovic I. 2013. Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. *J Funct Foods* 5: 416-423.
  12. Dikici A, Koluman A, Calicioglu M. 2015. Comparison of effects of mild heat combined with lactic acid on Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7, O103, O111, O145 and O26 inoculated to spinach and soybean sprout. *Food Control* 50: 184-189.
  13. Park SM, Kang JH, Son HJ, Oh DH, Min SC, Song KB. 2016. Combined treatments of chestnut shell extract, fumaric acid, and mild heat to inactivate foodborne pathogens inoculated on beetroot (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Food Sci Biotechnol* 25: 1217-1220.
  14. Son HJ, Kang JH, Oh DH, Min SC, Song KB. 2016. Combined treatment of fumaric acid with mild heat to inactivate microorganisms on fresh spinach during storage. *J Appl Biol Chem* 59: 69-74.
  15. Park JH, Hong SI, Jeong MC, Kim D. 2013. Effect of mild heat and organic acid treatments on the quality of fresh-cut lotus roots. *Korean J Food Preserv* 20: 23-29.
  16. Koseki S, Yoshida K, Kamitani Y, Itoh K. 2003. Influence of inoculation method, spot inoculation site, and inoculation size on the efficacy of acidic electrolyzed water against pathogens on lettuce. *J Food Prot* 66: 2010-2016.
  17. Singh N, Singh RK, Bhunia AK, Stroshine RL. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *LWT—Food Sci Technol* 35: 720-729.
  18. Bhargava K, Conti DS, da Rocha SR, Zhang Y. 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiol* 47: 69-73.
  19. Lopez-Velasco G, Davis M, Boyer RR, Williams RC, Ponder MA. 2010. Alterations of the phylloepiphytic bacterial community associated with interactions of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of packaged spinach at refrigeration temperatures. *Food Microbiol* 27: 476-486.
  20. Wei H, Brandt MJ, Wolf G, Hammes WP. 2005. Optimization of acidified warm water treatment to improve the microbiological status and sensory quality of iceberg lettuce. *Eur Food Res Technol* 220: 168-175.