

오매의 Butanol추출물이 *Salmonella typhimurium*의 생육에 미치는 영향

서 명 희 · 배 지 현⁵

계명대학교 식품영양학과

Effect of Butanol Extracts from *Prunus mume* on the Growth of *Salmonella typhimurium*

Seo, Myung-Hee · Bae, Ji-Hyun⁵

Department of Food Science and Nutrition, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

ABSTRACT

The antimicrobial properties of extracts of *Prunus mume* were tested on *Salmonella paratyphimurium* and *S. typhimurium*. First, the *Prunus mume* was extracted with methanol at several temperatures, and then fractionation of the methanol extracts from *Prunus mume* was carried out by using petroleum ether, chloroform, ethyl acetate or butanol. Secondly, absorption column chromatography (using a Diaion HP 20) was conducted to eliminate some water soluble materials that might inhibit the antimicrobial activity of some extracts. The antimicrobial activity of each of the *Prunus mume* extracts was determined using a paper disc method against several food-borne pathogens. The growth inhibition curve was determined using butanol extracts of *Prunus mume* against *Salmonella typhimurium*. The extraction temperature did not have any significant effect on the yield of the extract or on the level of antimicrobial activity. The butanol extract of *Prunus mume* showed strong antimicrobial activity against *Salmonella paratyphimurium* and *S. typhimurium*: a 1,000 ppm of butanol extract of *Prunus mume* retarded the growth of *S. typhimurium* up to 36 hours. (*Korean J Nutrition* 35(9) : 926~931, 2002)

KEY WORDS: *Prunus mume*, antimicrobial activity, food-borne pathogens.

서 론

유해 미생물에 의한 피해는 식품산업 뿐만 아니라 의약, 농업, 식품 저장, 유통산업 등 광범위한 영역에서 심각한 문제로 대두되고 있는 추세이다. 식품의 저장기술은 외부로부터 미생물의 침입을 방지하고, 침입한 미생물의 생육을 저지하며 식품성분 상호간의 반응을 최소화시키기 위해 발전되어 왔다. 식품의 저장기간을 연장시키고 변질을 막기 위해 사용되는 식품보존제는 대부분이 화학적 합성품으로 이들의 안전성에 대한 문제가 부각되면서, 소비자들의 인공 합성품에 대한 기피 현상으로 비교적 안전성과 환경 친화성이 있는 천연 항균제의 개발이 요구되고 있다.¹⁾ 자연계에는 항균작용을 나타내는 물질이 많이 알려져 있고, 이와 같은 천연물에 존재하는 항균성 물질을 식품보존제로 이용하고자 하는 연구가 널리 수행되어 왔다.²⁾ 이 중 식물자원은 여러 가지 형태의 자기 방어 수단인 하나로 자체내에 항균성 물질을 생산한다고 알려져 있어, 이러한 식물자원으로부터

항미생물활성 물질을 찾으려는 연구가 진행되고 있다.³⁾ 항균작용을 나타내는 천연물이 식품보존제로서 이용되기 위해서는 반드시 안전성과 경제성이 확보되어야 하는데, 식품의 경우 인간이 계속해서 섭취해 왔던 동·식물체로부터 항균성분을 추출해서 식품첨가물로 개발하는 것이 유리하다. 따라서 최근에는 실생활에서 많이 섭취해온 식품재료나 생약재료로부터 천연 항균성 물질을 검색하고 이것을 식품에 이용하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.^{4,5)} 한편 매실 (*Prunus mume*)은 장미과 (科), 벽나무속 (屬)에 속하는 매화나무의 과실로 유기산인 citric acid, malic acid, succinic acid가 다량 함유되어 있으며, terpenoid류로는 sitosterol과 oleanolic acid가 함유되어 있고, 무기성분으로는 K, P, Ca, Al, Na 및 Mg 등이 함유되어 있다.⁶⁾ 매실은 엑기스를 추출하여 차로 음용하기도 하며 감기나 피로 회복, 식욕 증진 등에 이용하기도 하는데, 말린 매실인 오매는 주독, 해독, 및 구충 등에 효과를 나타내는 한약재로 이용되어 왔다.⁷⁾ 매실의 항균 작용에 관한 최근 연구로는 매실 추출물을 함유한 매실음료의 식중독 유발세균에 대한 항균효과가 발표된 바 있는데, 매실추출물을 함유한 음료의 경우 식중독 유발세균의 증식을 억제하는 효과가 여전히 남

접수일: 2002년 7월 13일

채택일: 2002년 11월 1일

⁵To whom correspondence should be addressed.

아 있음이 보고된 바 있다.⁸⁾ 본 연구에서는 이와 같이 국내 뿐만 아니라 일본 및 중국 등지에서 민간요법으로 널리 이용되고 있는 오매를 선택하여, 이들을 유기용매로 계통 분획하고 그 추출물이 식중독 유발 세균의 증식에 미치는 영향을 조사해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료준비

대구광역시 중구 남성로 약령시장에서 2000년 3월 오매 (烏梅, *Prunus mume*)를 구입하고 이 중 주름이 많고 흑색을 띄며 직경이 1~1.5 cm 정도 되는 것을 골라, 이물질 제거 후 실험에 사용하였다.

2. 오매 Methanol 추출의 용매 계통 분획

오매 1 kg에 대해 methanol (EP급, J.T.Baker, U.S.A.)을 오매 중량의 2배 분량인 2L 넣은 후 20℃, 30℃, 40℃ 각각 온도에서 8시간 동안 방치하여 1회 추출한 후, Whatman No.2 (Whatman international Ltd., England)에 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액은 감압농축기 (EYELA, N-N. Series, Japan)를 사용하여 45℃에서 감압·농축하였으며 농축한 methanol 추출물은 petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, 및 butanol을 각각 사용하여 Fig. 1과 같은 방법으로 용매 계통 분획 하였다. 이 때 methanol 추출물과 각종 유기용매를 분별깔대기에 넣고 5분간 수작업으로 흔들어 혼합한 후, 15분간 실온에 방치시킨 후 분리하였다.

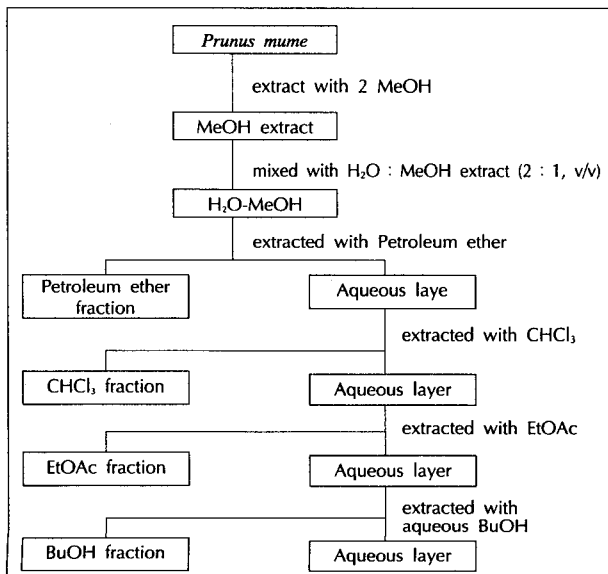


Fig. 1. Fractionation of the methanol extract from *Prunus mume*.

3. Diaion HP-20 column Chromatography

용매 분획물 중 항균활성에 저해 요인으로 작용할 것으로 사료되는 일부 당을 제거하기 위해서 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하였다. Diaion HP-20 (Mistubishi Industrial Ltd, Japan)을 비이커에 넣어 ethanol에 24시간 동안 침지한 후 ethanol을 제거하고 2차 증류수로 잔존하는 ethanol을 깨끗이 씻어내었다. 그 후 24시간 2차 증류수에 팽윤시켜 column (size, 지름 15 cm × 길이 50 cm)에 500 ml 충전하였다. 3% HCl과 3% NaOH로 활성화 시킨 후 용매 계통 분획하여 얻은 오매 추출물을 수지 위로 조심스럽게 떨어뜨린 후 100% 증류수, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 및 80% ethanol의 용매 200 ml로 각각 분획 추출하였다. Diaion HP-20 레진은 당과 같은 수용성 물질을 흡착하는 특성을 지닌 레진으로, 이것을 사용한 목적은 본 실험에 사용한 오매가 과실류로 당의 함량이 높아 항균활성에 저해를 주게 될 요인으로 작용할 가능성이 있다고 판단되어 이를 제거하기 위함이었다.

4. 사용 균주 및 배지

오매 추출물의 분획별 항균성 검색을 위해 사용한 균주는 Table 1과 같이 식중독 유발 및 식품 부패와 관련된 세균 7종으로 한국생명공학연구원 유전자 은행에서 분양 받아 사용하였다. 분양받은 균주를 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, USA) 배지에 부활시켜 37℃ 배양기에서 2일 동안 호기적 조건으로 계대 배양하였으며, 항균성 실험에는 고체 배지인 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, USA)를 사용하였다.

5. 오매 추출물의 항균활성 측정

항균성 물질을 검색하기 위해 본 실험에서는 paper disc 방법을 사용하였다.⁹⁾ Tryptic Soy Broth (TSB)배지에서 배양한 세균을 spectrophotometer (Nontron instruments, Italy) 620 nm에서 O.D.값 0.4 (농도 10⁶ CFU/ml)로 흡광도를 조절하고 pour-plate method에 따라 Tryptic

Table 1. List of microorganisms used for antimicrobial activity test

Strains	
Food	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
spoilage	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
and	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
pathogenic	<i>Salmonella paratyphimurium</i> ATCC 11511
bacteria	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931
	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9199
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022

Soy Agar (TSA)배지가 분주된 배양접시에, TSB 배지에서 키운 균을 분주하여 균일하게 섞은 후 실온에서 균했다. 이 배지 위에 멸균된 paper disc를 시료 수에 맞게 올리고 밀착시킨 후 오매의 methanol, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, butanol, 수용성 추출물을 각각 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm 및 1,000 ppm으로 희석하여 20 µ씩 천천히 흡수시켰다. 대조군으로 오매 추출물이 들어 있지 않은 70% ethanol을 실험군과 동일한 방법으로 점적하였다. 준비된 모든 plate는 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 clear zone (mm)의 크기를 측정하여 각 분획물의 항균 활성 정도를 측정하였다.

6. 미생물의 생육 곡선 측정

오매의 ethyl acetate 추출물과 butanol 추출물을 membrane filter (0.2 µm, pore size, Toyoroshi kaisha, Ltd. Japan)로 제균시키고, 액체배지에 각 추출물을 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm 및 1,000 ppm 농도별로 첨가하였다. 여기에 O.D.값을 0.4로 맞춘 세균 배양액을 접종하여 rotary shaking incubator (Korea Mech Ltd.) 37°C, 100 rpm에서 72시간 배양하고, 12시간마다 세균 배양액의 증식정도를 620 nm에서 측정하였다.¹⁰⁾

결과 및 고찰

1. 온도 변화에 따른 추출 수율

추출 온도가 수율 및 항균력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 methanol의 온도를 20°C, 30°C 및 40°C로 각각 변화시켜 추출해 본 바 Table 2와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 각 온도별 추출물의 수율은 20°C에서는 12.3% 30 및 40°C에서는 각각 13.6%와 15.8%의 수율을 나타내어, 온도가 높아질수록 수율이 높게 나타났으나 그 차이는 미미하였다. 또한 추출 온도가 항균력에 나타내는 영향을 조사해 본 바, 온도별로 추출한 methanol 추출물은 각종 식중독 유발균에 대해 항균력의 차이를 보이지 않았다. 이는 Mack 등¹¹⁾이 추출용매인 ethanol의 온도를 20°C, 40°C 및 60°C로 달리하여 추출한 단삼 추출물이 균의 증식에 동일한 억제효과를 드러낸다는 보고와 일치하여 추출 온도가 항균력에 큰 영향을 주지 않는다는 점을 알 수 있었다.

Table 2. Yield of methanol extracts from *Prunus mume* at various temperature

Temperature	Dry weight (g)	Yield (%)
20°C	123	12.3
30°C	136	13.6
40°C	158	15.8

2. 오매의 각종 유기용매 및 수용액 추출물의 수율

오매의 methanol 추출물을 petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, butanol 추출물 및 수용성 분획물로 각각 분리한 결과 각 분획물의 추출 수율은 Table 3과 같았다. 오매의 petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, butanol 추출물 및 수용성 분획물이 각각 0.4%, 0.7%, 3.9%, 4.2% 및 3.1%로 나타나, petroleum ether의 수율이 가장 낮았고 butanol 추출물의 수율이 가장 높았다.

3. 오매 추출물의 항균활성 검색

Paper disc 방법으로 오매의 각종 유기용매 추출물 및 수용성 분획물을 각종 식품부패균 및 식중독균에 적용시켜 항균 활성을 실험해 본 바 Table 4와 같은 결과를 얻을 수 있었다. Disc에 점적한 오매의 각종 추출물의 농도가 증가할수록 항균 활성이 높게 나타났다. 이중 오매의 butanol 추출물은 *Salmonella paratyphimurium*에 대해 가장 높은 항균력을 보여 각 농도별로 큰 inhibition zone을 나타내었으며 *Salmonella typhimurium*에 대해서도 같은 경향을 나타내었다. 일반적으로 식물의 butanol 추출물에는 사포닌 성분, 유기산류, 탄닌, 당, 배당체 및 기타 알칼로이드류가 주로 용출되는 것으로 알려져 있는데¹²⁾ 본 실험에서 나타난 오매 butanol 추출물의 항균력도 이들 성분들에 기인할 것으로 추측된다. 한편 Lee 등⁵⁾은 황백의 butanol 추출물이 Gram 음성세균에 대해 높은 항균성을 보였다고 하였으며, Hong 등¹³⁾은 유백피의 butanol 추출물이 *Bacillus subtilis*에 대해 강한 항균성이 있다고 보고한 바 있다. 오매의 petroleum ether 추출물은 이질균인 *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* 및 *Shigella flexneri* 균주에 대해서 전혀 항균 활성을 나타내지 않은 반면, 오매의 ethyl acetate 추출물은 항균성을 보였다. Lee 등¹⁴⁾은 황금, 작약, 대추 및 감초로 구성된 황금탕이 *S. dysenteriae*, *S. boydii* 등에 강한 항미생물 활성을 나타냄을 보고한 바 있다. 지방, 왁스, 정유성분 및 소량의 배당체가 용출되는 것으로 알려진 petroleum ether 추출물과 phenol류, terpenoid 및 flavonoid 등의 성분이 용출되는 chloroform 추출물¹²⁾에는 항균활성이 별로 나타나지 않아, 이는 실험 과정에서 이상의 비수용

Table 3. Yields of various organic solvent and water extracts from *Prunus mume*

Fraction	Dried weight (g)	Yield (%)
Petroleum ether extract	3.8	0.4
Chloroform extract	6.5	0.7
Ethyl acetate extract	39.0	3.9
Butanol extract	41.7	4.2
Aqueous extract	31.1	3.1

Table 4. Antimicrobial activities of various extracts of *Prunus mume* against food spoilage and food-borne pathogenic bacteria

Strains	Fraction conc. (ppm)	Clear zone on plate (mm) ^{a)}					
		M	PE	C	EA	B	A
<i>E. coli</i>	100	11	- ^{b)}	-	11	11	9
	250	14	9	8	15	14	15
	500	15	10	11	17	14	18
	1,000	16	11	13	20	18	19
<i>P. aeruginosa</i>	100	10	-	11	14	-	-
	250	12	-	12	17	13	-
	500	13	-	13	19	14	13
	1,000	14	-	14	21	16	19
<i>S. typhimurium</i>	100	9	-	7	11	13	10
	250	13	10	10	12	15	12
	500	16	10	12	13	15	13
	1,000	18	10	13	14	19	15
<i>S. paratyphimurium</i>	100	10	9	11	10	11	12
	250	12	10	11	12	14	14
	500	14	11	12	13	16	16
	1,000	15	12	13	16	22	21
<i>S. sonnei</i>	100	10	-	11	9	-	11
	250	13	-	11	14	-	13
	500	14	-	12	16	15	15
	1,000	17	-	14	19	17	18
<i>S. dysenteriae</i>	100	-	-	-	8	-	-
	250	10	-	9	14	10	10
	500	11	-	11	16	16	13
	1,000	13	-	14	18	17	14
<i>S. flexneri</i>	100	9	-	9	9	-	-
	250	10	-	11	16	13	-
	500	11	-	12	16	15	16
	1,000	13	-	14	19	17	19

a) diameter, b) not shown clear zone

M : Methanol extract, PE : Petroleum ether extract, C : Chloroform extract, EA : Ethylacetate extract, B : Butanol extract, A : Aqueous extract

성 항균물질들이 agar plate내로 잘 확산되지 않았거나 또는 농축과정에서 휘발성 항균 물질들이 소실될 수도 있었을 것으로 사료된다. 본 실험에서 가장 높은 항균력을 보였던 오매의 butanol 추출물로부터 항균력에 지장을 줄 수 있는 일부 수용성 물질을 제거하기 위해 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하였다. 오매의 butanol 추출물을 여러 농도의 ethanol을 사용하여 분획별로 분취하고 TLC상에 전개시켜 수용성 물질의 일부가 제거됨을 확인한 후, *S. typhimurium*에 대한 항균력을 조사해 본 바, 30% 혹은 40% ethanol로 씻어낸 분획물 (Frac. III)에서 가장 높은 항균효과를 보였다 (Fig. 2).

4. 오매 butanol 추출물이 *S. typhimurium*의 성장에 미치는 영향

*S. typhimurium*은 1887년 식중독 원인균으로서 가장 먼

저 발견된 것으로, 우리나라에서는 이 균에 의한 식중독 발생 건수가 세균성 식중독 가운데 제 2위를 차지하고 있으며, 환자수는 제 1위에 이르고 있다. 뿐만 아니라 이 균은 전염병 중 장티푸스를 일으키기도 하는 아주 유해한 병원균이다.¹⁵⁾ 본 실험에서는 오매의 butanol 추출물이 *S. typhimurium*의 생육 저해에 미치는 영향을 조사해 본 바 Fig. 3과 같은 성장 곡선을 관찰할 수 있었다. 오매의 butanol 추출물을 첨가하지 않은 control의 경우 배양 직후부터 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고 100 ppm 농도로 오매 butanol 추출물을 첨가한 실험군도 급격한 O.D.값의 증가를 보여 균의 생장이 활발함을 관찰할 수 있었다. 오매의 butanol 추출물을 250 ppm 농도로 첨가했을 경우도 100 ppm보다는 증식 속도가 감소되었지만 균의 생장이 활발한 것으로 관찰되었다. 한편 500 ppm과 1,000 ppm 농도의 오매 butanol 추출물을 첨가한 배양액에서는 균의 증식이

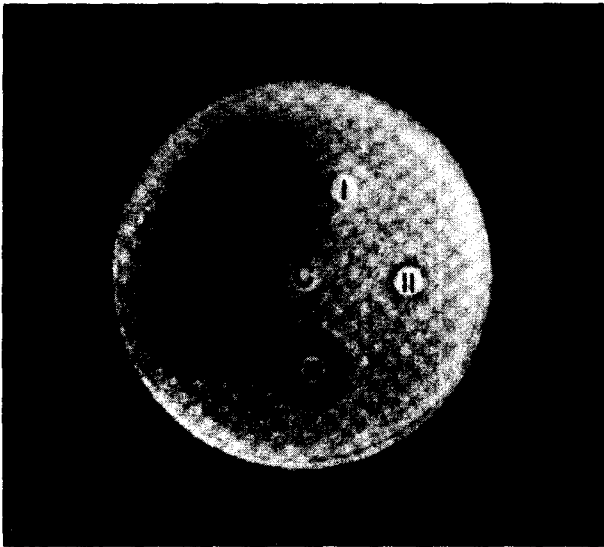


Fig. 2. Antimicrobial activity of the butanol extracts of *Prunus mume* against *Salmonella typhimurium* at the concentration of 1,000 ppm. C : control (70% ethanol, 20 μ l), Frac. I : Fraction eluted with H₂O, Frac. II : Fraction eluted with 10% or 20% ethanol, Frac. III : Fraction eluted with 30% or 40% ethanol, Frac. IV : Fraction eluted with 50% or 60% ethanol, Frac. V : Fraction eluted with 70% or 80% ethanol

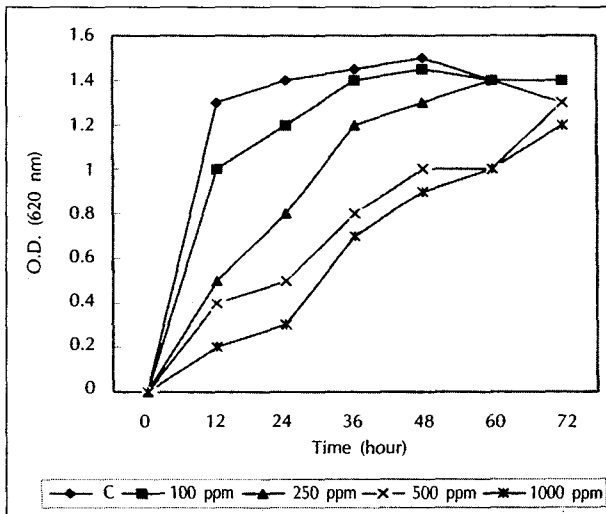


Fig. 3. Effect of butanol extracts of *Prunus mume* against the growth of *Salmonella typhimurium*. Growth activity was determined by optical density at 620nm after incubation of *Salmonella typhimurium* with butanol extracts for 72 hours at 37°C.

농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었고, *S. typhimurium*의 생육을 36시간까지 저지할 수 있었다. Shin 등¹⁶⁾은 자소잎의 ethanol 추출물을 500 μ g/ml와 1,000 μ g/ml씩 배양액에 첨가했을 때 *S. typhimurium*의 생육 억제 효과가 36시간까지 지속된다고 보고한 바 있다. 또한 Chung 등¹⁷⁾도 영지 추출물이 특이적으로 *S. typhimurium*에 대해 항균 활성을 갖는다고 보고한 바 있어, 천연물에서 분리되는 다

양한 종류의 항균성 물질을 활용하면 식중독균의 성장을 효율적으로 억제할 수도 있을 것으로 사료된다. 한편 본 실험에서 사용한 오매의 butanol 추출물 중 항균 작용을 나타내리라 예상되는 물질은 매실에 풍부한 구연산이라 추정되는데 Fiscer와 Fletcher¹⁸⁾은 구연산이 삶은 달걀중의 세균 번식을 억제한다고 보고한 바 있으며, Notermans 등¹⁹⁾은 진공포장 감자 제조시 구연산과 초산을 조합하여 참가한 결과 *C. botulinum* type B의 생육과 독소생성을 저해한다고 보고한 바 있다. 또 Chung과 Goepfert²⁰⁾의 보고에 따르면 *Salmonella* 속 세균 3종을 대상으로 여러 가지 유기산의 항균 활성효과를 비교한 결과, propionic acid, acetic acid, adipic acid, succinic acid, lactic acid, tartaric acid, citric acid 순으로 효과가 높았다고 한다.

결론

본 연구에서는 succinic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid 등의 유기산과 sitosterol 및 무기질 등이 많이 함유되어, 민간과 한방에서 널리 이용되어 온 오매를 이용하여 이것의 식품 부패성 및 식중독 유발 세균에 대한 항균활성을 측정하였다. 오매를 추출온도를 달리하여 먼저 methanol로 추출한 후, petroleum ether, chloroform, ethyl acetate 및 butanol을 이용하여 실온에서 각각 용매별로 계통 분획하고, 남은 수용액 분획물과 함께 각종 식품 부패균 및 식중독 유발 세균에 대한 항균력을 조사하였다. 추출용매의 온도는 오매 methanol 추출물의 수율 및 항균력에 큰 영향을 미치지 않았으며, 용매별 분획물 중 각종 균주에 대해 가장 높은 항균활성을 보인 추출물은 오매의 butanol 추출물이었다. 오매의 butanol 추출물을 Diaion HP-20 column Chromatography에 적용시켜 일부 수용성 물질을 제거한 후 *Salmonella typhimurium*에 대한 항균력을 조사해 본 바 높은 항균활성을 측정할 수 있었으며, 균의 성장도 억제시킴을 관찰할 수 있었다. 오매의 butanol 추출물은 1,000 ppm 농도에서 *S. typhimurium*의 성장을 36시간까지 지연시킬 수 있었다.

Literature cited

- 1) Cho SY, You BJ, Chang MH, Lee SJ, Sung NJ, Lee E. Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method. *Korean J Food Sci Technol* 26: 261-265, 1994
- 2) Conner DE, Beuchat LR. Effects of essential oils from plants on food spoilage yeasts. *J Food Sci* 49: 429-434, 1984

- 3) Kim SJ, Park KH. Antimicrobial activities of the extracts of vegetable Kimchi stuff. *Korean J Food Sci Technol* 27: 216-220, 1995
- 4) Lee HY, Kim CK, Sung TK, Moon TK, Lim CJ. Antibacterial activity of *Ulmus pumila* L. extract. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 20(1): 1-5, 1992
- 5) Lee PW, Sin DW. Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Korean J Food Sci Technol* 23(2): 200-204, 1991
- 6) Kim IH. A tree and a herbs to be drugs. Chungang University a publishing department, pp. 33-28, 1997
- 7) Lim CM, Kyung KY, Yoo YJ. Antimicrobial effect of BHA and BHT. *Korean J Food Sci Technol* 19: 54-60, 1987
- 8) Bae JH, Kim GJ. The effects of beverage contained *Prunus mume* extracts on growth of food-borne pathogens. *J East Asian of Dietary Life* 9(2): 214-222, 1999
- 9) James GC, Sherman J. Chemotherapeutic agent in Microbiology, A laboratory manual chemical agents of control, pp. 247-254, 1987
- 10) Karapinar M. Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. *International J Food Microbiol* 10: 193-200, 1990
- 11) Mack JS, Park OY, Kim YM, Jang, DS. Effect of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *salviae miltiorrhizae* extract. *J Korean Soc Food Nutr* 23(6): 1001-1007, 1994
- 12) Woo WS. Research in Natural Products Chemistry, pp. 61-378, Seoul National Univ. Publish, Seoul, 1996
- 13) Hong ND, Rho YS, Kim NJ, Kim, JS. A study on efficacy of Ulmi Cortex. *Korean J Pharmacogn* 21(2): 217-222, 1990
- 14) Lee IL, Park HS. Antimicrobial effect of skullcap plant. *Korean J Pharmacogn* 18: 249-253, 1987
- 15) Moon BS. Food Sanitation, pp. 88-92, Shinkwang Publishing Co., Seoul, 2000
- 16) Shin DH, Kim MS, Han JS. Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionated against food borne bacteria. *Korean J Food Sci Technol* 29(4): 808-816, 1997
- 17) Chung DO, Jung JH. Studies on antimicrobial substances of *Ganoderma lucidum* *Korean J Food Sci Technol* 24(6): 552-557, 1992
- 18) Fischer JR, and Fletcher DL. Microbiological properties of hard-cooked eggs in a citric acid based preservative solution. *J Food Protect* 48: 252-256, 1985
- 19) Notermans S, Dufrenne J and Keybets MJ. Use of preservative to deley toxin formation by *Clostridium botulinum* (type B, strain Okra) in vacuum-packed, cooked potatoes. *J Food Protect* 48: 851-856, 1985
- 20) Chung KC and Goepfert JM. Growth of *Salmonella* at low pH. *J Food Sci* 35: 326-328, 1970