

고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정

안은영 · 신동화 · 백남인* · 오진아
전북대학교 식품공학과, *경희대학교 농학과

Isolation and Identification of Antimicrobial Active Substance from *Sophora flavescens* Ait.

Eun-Young Ahn, Dong-Hwa Shin, Nam-In Baek* and Jin-A Oh
Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University
*Department of Agriculture, Kyung Hee university

Abstract

The ethanol extract and its chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. exhibited growth inhibition on some food poisoning bacteria. The minimum inhibitory concentration of the above extracts were 50~500 ppm and below 50 ppm *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, 19112, 19113, 19114, 15313). By silica gel column chromatography twice, antimicrobial active compound S-10-6 was isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. The fraction S-10-6 showed strong growth inhibition at 10 ppm on 5 strains of *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis* ATCC 14593 and *Staphylococcus aureus* KFCC 11764 but *Escherichia coli* ATCC 25922 was not inhibited at 100 ppm and also confirmed bactericidal effect at 30 and 50 ppm on 5 strains of *L. monocytogenes*. The antimicrobial compound S-10-6 was identified as kushenol F, a kind of flavanone compound, by EI/MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Key words: *Sophora flavescens* Ait., antimicrobial activity, kushenol F

서 론

천연에 존재하는 항균제에는 우유와 난백에 들어있는 lactoferin, lysozyme 등의 효소제, 과일에 많이 들어있는 유기산류, 저급지방산 ester들⁽¹⁾, 향신료의 정유성분^(2,3), 갑각류의 키틴질로부터 추출한 chitosan⁽⁴⁾, 미생물에서 생산되는 bacteriocin⁽⁵⁻⁷⁾ 등이 제시되고 있으며 이밖에도 오랜 기간 질병치료제나 식품의 재료로 이용되어 오면서 무해성이 간접적으로 입증된 생약재 및 식용식물 추출물로부터 항균 활성물질 탐색⁽⁸⁻¹²⁾과 활성 본체의 구명⁽¹³⁻¹⁹⁾에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

천연 항균제의 보고인 식용식물은 기본 대사에 관여하는 당, 지방산, 아미노산 같은 1차 대사산물과 1차 대사의 중간산물로부터 합성되는 2차 대사산물을 함유하고 있는데 후자의 경우 특정 식물에만 분포되어 있으며 혈압강하⁽²⁰⁾, 항산화^(21,22), 항암효과⁽²³⁾ 등 다양

한 생리활성을 나타내며 특히 항균 활성물질의 경우 essential oil, flavonoid, tannin을 비롯하여 대부분이 terpenoid계와 phenolic 화합물로 알려져 있다^(24,25).

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 콩과에 속한 다년생 본초로 성질은 차고 무독하며 강한 쓴맛을 지니고⁽²⁶⁾ 항부정맥증에 효능⁽²⁷⁾이 있다고 알려져 있으며 한약재로 이용 되어왔다. 최근에는 건조한 고삼 뿌리의 75% 에탄올 추출물이 *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, 19112, 19113, 19114 및 15313)에 대하여 디스크 확산법에서 뚜렷한 항균 효과를 보이다가 액체배양법에서는 그 효과가 감소하였다는 보고가⁽²⁸⁾ 있어 이를 재 실험한 결과 항균 효과가 상승하는 현상을 확인하여 이로부터 항균 활성 물질을 분리하고 구조를 구명하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

고삼(*Sophora flavescens* Ait.)은 건조된 제품을 전주 시 소재 건재상에서 구입한 후 분쇄하여 추출용 시료

Corresponding author: Dong-Hwa Shin, Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Dukjin-dong, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

로 사용하였다.

추출 및 용매분획

고삼 800 g에 75% 에탄올 3 L를 가해 78°C 수욕상에서 3 시간 추출한 후 농축하여 얻은 에탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매별 분획물을 얻었다. 추출물과 각 분획물은 진공 농축기와 진공 건조기로 용매를 제거한 후 에탄올에 용해시킨 후 항균활성 실험에 사용하였다.

Silica gel column chromatography

고삼 에탄올 추출물을 순차 분획하여 항균활성을 확인한 결과 클로로포름 분획물이 항균효과와 수율이 높아 이로부터 활성물질을 분리하였다. 클로로포름 분획물 (21 g)을 silica gel (500 g, 70~230 mesh, Merck)이 핵산:에틸아세테이트:메탄올(20:3:1, v/v)로 현탁 충전된 column (5.5×46 cm)에서 에틸아세테이트와 메탄올의 비율을 단계적으로 증가시키는(핵산:에틸아세테이트:메탄올 = 20:3:1 → 메탄올, v/v) step-wise 용출 방법으로 분리하여 15개(S-1~S-15)의 획분을 얻었고 이 중에서 활성과 수율이 우수한 S-10-6으로부터 항균 활성 물질을 분리하였다. 획분 S-10 (3 g)은 다시 핵산:에틸아세테이트:메탄올(8:5:1, 6:5:1, v/v)용매계로 silica gel column chromatography (150 g, 3.3×31 cm) 하여 총 9개의 소획분 (S-10-1~S-10-9)을 얻었으며 이 중에서 항균 효과가 인정되면서 수율과 정제도가 우수한 S-10-6의 구조를 동정하였다. 이때 용리물들은 TLC 상에서 전개시킨 후 UV (254 nm, 365 nm)의 흡수 양상과 황산 (15~20%) 발색시 나타나는 점적의 모양에 따라 분취하였다.

분석 기기

IR은 Perkin Elmer 599B를 사용하였고 ¹H-NMR은 ZEOL JNM-LA400 (400 MHz)을, ¹³C-NMR은 ZEOL JNM-LA400 (100 MHz)을 사용하고 CDCl₃:CD₃OD=

5:1 을 용매로 하였다.

사용 미생물 및 배지

항균 활성 시험에 사용한 미생물과 배지는 Table 1과 같다.

항균 활성 측정

시험 균주가 접종된 사면배지에서 1백금이를 취해 10 mL 액체배지에 접종, 30°C에서 24 시간 배양 시킨 배양액 0.1 mL를 다시 10 mL 액체배지에 접종하여 30°C에서 24 시간 배양시켰다. 이 균주 배양액 0.1 mL를 에탄올로 용해 후 membrane filter (0.2 μm)로 채운 시킨 각 시료를 일정농도(ppm)로 첨가한 액체배지에 접종한 후 30°C에서 72 시간(또는 48 시간)동안 배양 하면서 24 시간(또는 12 시간) 간격으로 620 nm에서 혼탁 정도로 증식억제 효과를 비교하였다. 이때 첨가되는 용매 자체의 항균력을 배제하기 위하여 모든 시험은 처리농도와 동일하게 에탄올 만을 첨가한 대조구를 설정하였다.

살균 효과 측정

각 균주가 배양된 사면배지에서 1백금이씩 취해 10 mL 액체배지에 접종, 30°C에서 24 시간 배양하였다. 이 배양액 0.1 mL를 정제된 물질이 일정농도로 첨가된 액체배지에 접종하여 30°C에서 72 시간 동안 배양하면서 24 시간 간격으로 표준평판천 배양법에 의해 생균수를 계수하고 같은 방법으로 균주배양액 0.1 mL의 생균수를 계수하여 초기 접종균수를 구했다. 처리구와 동일 농도로 에탄올 만을 가한 것을 대조구로 하였다.

결과 및 고찰

에탄올 추출물과 용매 분획물의 항균 효과

고삼 75% 에탄올 추출물을 50, 100, 500 및 1000 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 *L. monocytogenes*를

Table 1. List of strains and media used for antimicrobial experiment

Microorganism tested	Media used	Incubation temperature (°C)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Tryptic soy broth & agar (Difco)	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19112		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	Tryptic soy broth & nutrient agar (Difco)	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		35
<i>Staphylococcus aureus</i> KFCC 11764		35

Table 2. Minimum inhibitory concentration of ethanol extract and solvent fraction of *Sophora flavescens* Ait. on *Listeria monocytogenes*

<i>L. monocytogenes</i>	Minimum inhibitory concentration (ppm)			
	EtOH extract	CHCl ₃ fraction	EtOAc fraction	BuOH fraction
ATCC 19111	50<M ¹⁾ <100	M<50	100<M	100<M
ATCC 19112	100<M<500	M<50	100<M	100<M
ATCC 19113	100<M<500	M<50	100<M	100<M
ATCC 19114	100<M<500	M<50	100<M	100<M
ATCC 15313	M<50	M<50	100<M	100<M

¹⁾Minimum inhibitory concentration(ppm)

배양시킨 결과(Table 2) 실험 균주에 대한 최소 증식 억제 농도가 50~500 ppm 이었고 용매 분획물의 경우 클로로포름 분획물만이 50 ppm 농도에서 균의 증식을 완전히 억제하였다. 동일한 실험 균주에 대하여 고삼 에탄올 추출물 및 클로로포름 분획물이 2000 ppm 농도에서 약간의 증식억제 효과만을 나타내었다는 보고⁽²⁸⁾와 달리 본 실험에서는 보다 낮은 농도에서 항균 효과가 뚜렷이 나타났는데 이는 실험 방법의 차이로 인한 결과로 추정해 볼 수 있다. 즉 액체배양법에서 항균 활성 측정시 한⁽²⁸⁾ 등의 방법과는 달리 시료를 에탄올로 완전히 용해시킨 후 재균하므로써 막에 의한 유효성분의 손실을 최소화 하므로써 항균 효과가 상승하였다고 생각하는 바이며 이는 액체배양법에서 중요하게 고려되어야 할 사항으로 여겨진다.

활성 물질의 정제와 얻어진 획분들의 항균 효과

뚜렷한 항균 효과를 보인 고삼 클로로포름 분획물에서 활성 물질을 분리하기 위하여 silica gel column 으로 분리하여 얻은 획분들을 20 및 50 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 *L. monocytogenes* ATCC 19114를 배양시킨 결과는 Table 3과 같다. 용매조건이 15:3:1~9:3:1인 범위에서 용출된 S-5, S-6, S-7, S-8, S-9 및 S-10 획분들은 20 ppm 농도에서 균의 증식을 완전히 억제하였고 나머지 획분들이 첨가된 배지는 적용 농도에서 일정 시간 동안만 항균 효과를 보이거나 배양 초기부터 대조구와 같은 증식양상을 나타내므로써 실험 균주에 대한 최소 증식억제 농도가 50 ppm 이상임을 알 수 있었다. 활성 획분중에서 S-10이 수율 및 정제도가 우수하여 이를 다시 silica gel column으로 분리하고 얻어진 소획분들을 10 및 30 ppm 수준으로 배지에 첨가하여 *L. monocytogenes* ATCC 19114를 배양시켰다. 그 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 소획분 S-10-6과 S-10-7이 실험 균주에 대해 뚜렷한 항균 효과를 나타냈으며 이때 S-10-7의 효과가 좀 더 우수하

Table 3. Minimum inhibitory concentration and yield of fraction obtained after silica gel column chromatography of chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on *L. monocytogenes* ATCC 19114

Fraction	Elution solvent (hexane : EtOAc : MeOH)	MIC (ppm)	Yield ²⁾ (%)
S-1	20:3:1		
S-2	20:3:1	50<M ¹⁾	0.073
S-3	15:3:1	50<M	0.016
S-4	15:3:1	50<M	0.118
S-5	15:3:1	50<M	0.215
	12:3:1	M<20	0.020
S-6	12:3:1	M<20	0.042
S-7	12:3:1	M<20	0.131
	10:3:1		
S-8	10:3:1	M<20	0.056
S-9	10:3:1	M<20	0.122
S-10	10:3:1	M<20	0.428
	9:3:1	50<M	0.225
S-11	8:3:1	50<M	0.055
S-12	6:3:1	50<M	0.031
S-13	6:3:1	50<M	0.123
S-14	6:3:1	50<M	0.048
S-15	4:3:1, MeOH		

¹⁾See footnote on Table 2

²⁾Fraction weight (g)/dried plant (g)×100

였다. 그러나 소획분 S-10-6이 건조 약재에 대한 수율과 정제도(Fig. 1)가 우수하게 나타나므로써 이의 구조를 동정하였다.

Table 4. Minimum inhibitory concentration and yield of fraction obtained after silica gel column chromatography of G-10 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on *L. monocytogenes* ATCC 19114

Fraction	Elution solvent (Hexane : EtOAc : BuOH)	MIC (ppm)	Yield ²⁾ (%)
S-10-1	8:5:1	30<M ¹⁾	0.007
S-10-2	8:5:1	30<M	0.013
S-10-3	8:5:1	30<M	0.006
S-10-4	8:5:1	30<M	0.018
S-10-5	8:5:1	30<M	0.090
S-10-6	8:5:1 6:5:1	10<M<30	0.058
S-10-7	6:5:1	M<10	0.026
S-10-8	6:5:1	30<M	0.009
S-10-9	6:5:1	30<M	0.026

¹⁾See footnote on Table 2

²⁾See footnote on Table 3

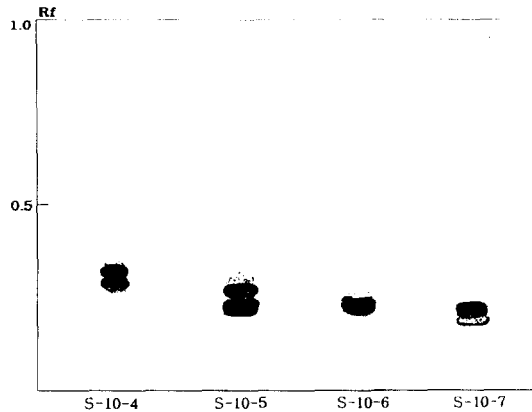


Fig. 1. Thin layer chromatogram of fraction of S-10 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* AIT. ethanol extract (Hexane : EtOAc : MeOH=6 : 5 : 1).

활성 소획분 S-10-6의 항균 효과

활성 소획분 S-10-6을 10~100 ppm 수준으로 배지에 첨가한 후 실험 균주를 배양시킨 결과는 Fig. 2와 같다. *L. monocytogenes* ATCC 19111, *B. subtilis* ATCC 14593 및 *S. aureus* KFCC 11764의 경우 S-10-6이 10 ppm 첨가되었을 경우에도 배양시간 내내 혼탁도가 전혀 증가하지 않으므로 뚜렷한 증식억제 효과가 관찰되었으며 *L. monocytogenes* ATCC 19112, ATCC 19113 및

ATCC 15313의 배양시에도 동일한 항균 효과가 나타났다. 그러나 *E. coli* ATCC 25922 경우 활성 소획분이 100 ppm 첨가되어도 대조구와 마찬가지로 균이 증식하므로써 항균 효과가 전혀 나타나지 않았다. 소획분 S-10-6의 *L. monocytogenes*에 대한 항균 효과는 합성 보존제⁽²⁸⁾와 감초 분리물인 소획분 G-4-4의 효과⁽²⁹⁾보다도 우수하였으며 *S. aureus*에 대해서는 Corilagin 등의 tannin 류⁽³⁰⁾를 비롯하여 phloroglucinol 유도체⁽¹³⁾ 등의 최소 증식억제 농도 범위가 50~300 ppm인 것을 감안한다면 고삼에서 분리된 활성 소획분 S-10-6은 보존제로서의 이용 가치가 충분히 있다고 생각되며 활성 본체의 구명과 더불어 균체에 미치는 구체적인 항균 기작에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

활성 소획분 S-10-6의 살균 효과

고삼으로부터 분리된 활성 소획분 S-10-6은 10 ppm 수준에서도 *L. monocytogenes* 대하여 뚜렷한 증식억제 효과를 나타냈었기에 항균 정도를 확인하기 위하여 30 및 50 ppm수준으로 배지에 첨가한 후 균을 배양시키면서 균수의 변화를 관찰하였다. 24 시간 배양 후 대조구는 초기균수에 비하여 10²~10³ CFU/mL 만큼 균수가 증가한 반면 처리구는 실험균주 모두 균수가 감소어 S-10-6의 살균효과가 인정되었다(Fig. 3).

L. monocytogenes ATCC 19111은 30 ppm 첨가구에서 24 시간 배양후 10³ CFU/mL 정도 균수가 감소하다가 이후에는 균수가 증가하여 72 시간 배양시 초기 접종수준으로 균수가 증가하였고, 50 ppm 첨가구에서는 배양 도중 계속하여 균수가 감소, 72 시간 후에는 초기에 비해 10⁶ CFU/mL 정도 균수가 감소하므로써 동일 농도에서 감초 분리물⁽²⁹⁾보다 효과가 우수하였다. ATCC 19112는 24 시간 배양 후 30 ppm 농도에서 10³ CFU/mL, 50 ppm 농도에서 10⁴ CFU/mL 정도 균수가 감소하여 감초 분리물에서의 균수 감소 정도⁽²⁹⁾ 보다는 우수하였으나 초기 접종수준에 차이(10¹)가 있어 두 물질간의 효과 차이는 단언할 수 없었다. ATCC 19113은 30 ppm 농도에서 24 시간 배양 후 균수가 약간의 감소 추세를 보이다가 이후에는 현저하게 감소하였고, 50 ppm 농도에서는 24 시간 배양 후 10⁵ CFU/mL 정도 균수가 감소하고 배양 도중 균수의 변화가 거의 없었으며 72 시간 배양 후에는 처리 농도간의 균수의 차이가 거의 없었다. ATCC 19114는 30 ppm 첨가구에서 24 시간 배양 후 10⁴ CFU/mL 정도 균수가 감소하였고 72 시간까지 약간의 감소 경향을 나타내었고 50 ppm 첨가구에서는 24 시간 배양 후 10⁴ CFU/mL 정도 균수가 감소하였고 이후 72 시간 배양까지 다시 10²

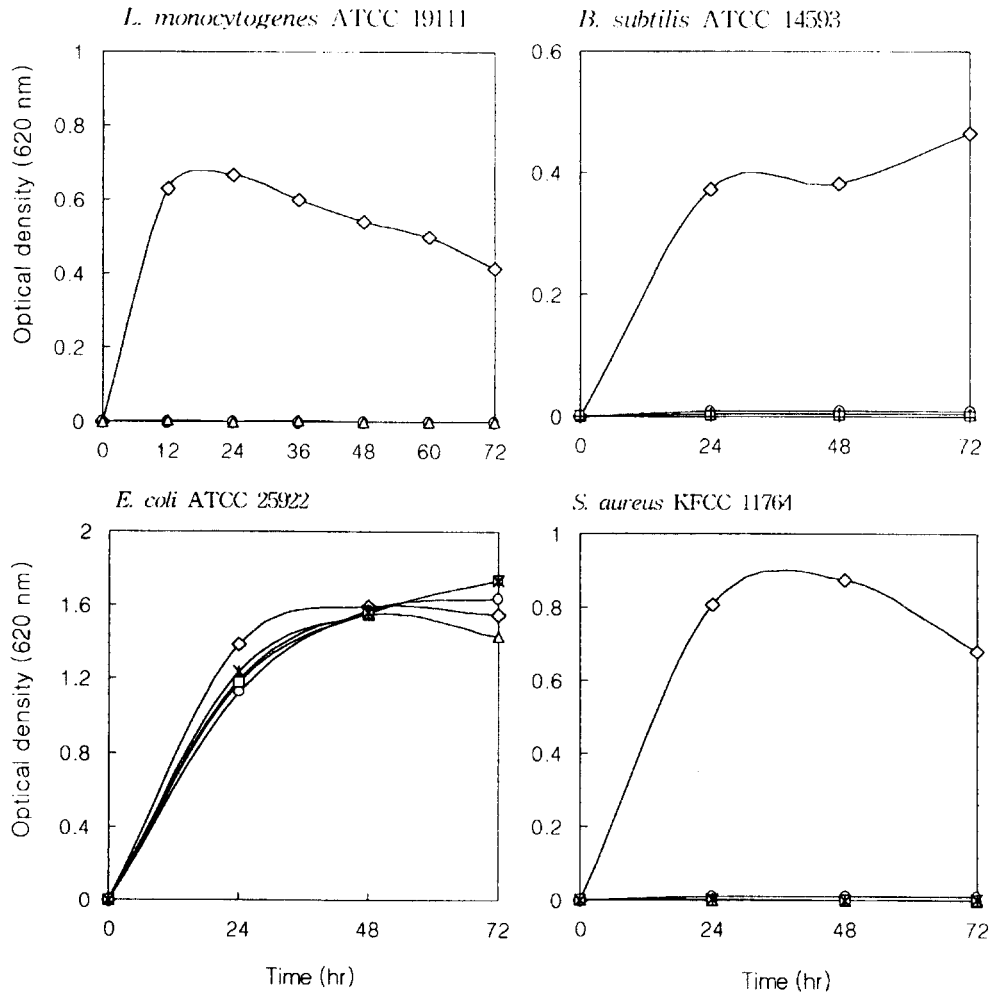


Fig. 2. Growth inhibition by G-4 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on several strains of bacteria. \diamond - \diamond : control, \circ - \circ : 10 ppm, \triangle - \triangle : 30 ppm, \square - \square : 50 ppm, $+$ - $+$: 100 ppm

CFU/mL 정도 균수가 감소하므로서 완전살균의 가능성이 시사되었으며 동일농도의 감초 분리물⁽²⁹⁾ 보다 효과가 우수하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 50 ppm 농도에서 감초 분리물의 경우 *L. monocytogenes* ATCC 19112에 대한 살균효과가 가장 강하였으며 배양 도중 균에 따라 균수가 증가하거나(ATCC 19113, 19114 및 15313) 뚜렷한 균수의 변화가 나타나지 않았던(ATCC 19111)⁽²⁹⁾ 반면에 고삼 분리물인 S-10-6은 *L. monocytogenes* ATCC 19114에 대한 살균효과가 가장 우수하였으며 배양중 모든 실험균주의 수가 감소하는 경향으로 S-10-6의 살균효과가 더 높음을 확인할 수 있었다.

활성 소획분의 구조 동정

고삼으로부터 분리된 S-10-6은 담황색의 분말로 황산 발색시 진한 주황색을 나타내었다. MS spectrum (Fig. 4)에서 분자이온(M^+) peak로 분자량이 424인 화합물임을 알 수 있었다. 1H -NMR (Fig. 5)에서 7.22 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6'), 6.33(1H, dd, $J=8.5, 2.4$ Hz, H-5'), 6.27 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3') signal로부터 benzene환의 존재를 알 수 있고, 6.0 (1H, s, H-8), 5.50 (1H, dd, $J=11.1, 5.0$ Hz, H-2)로부터 flavanone 골격의 2번 탄소의 proton의 존재를 추적하였고 4.90 (1H, t, $J=6.7$ Hz, H-7'')로부터 이웃에 쇠상 사슬의 methylene을 갖는 이중결합 proton의 존재를 확인하였다. 또한

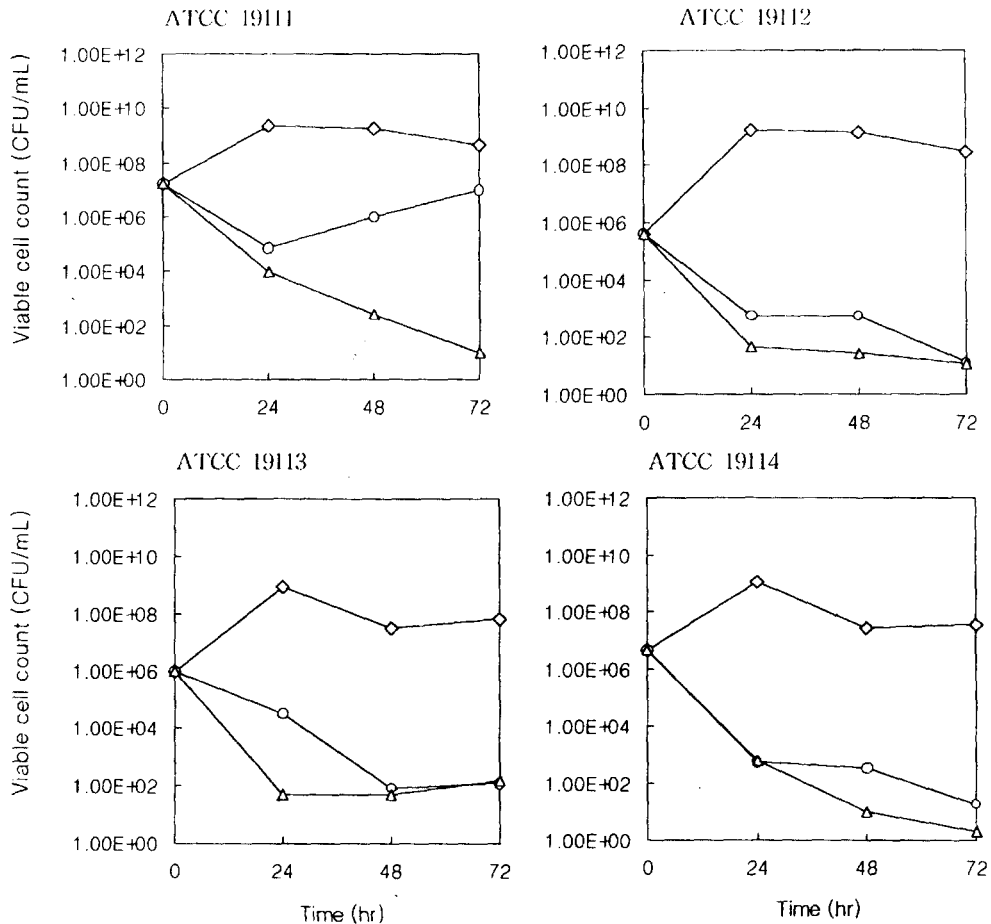


Fig. 3. Bactericidal effect of G-4-4 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract on *L. monocytogenes*. ◇—◇: control, ○—○: 30 ppm, △—△: 50 ppm

geminal coupling을 하는 exo-methylene의 존재를 4.50 (1H, d, $J=21.1$ Hz, H-4a"), 4.49 (1H, d, $J=21.1$ Hz, H-4b") signal로 확인할 수 있었으며 3개의 singlet methyl signal이 1.56 (3H, s), 1.51 (3H, s), 1.40 (3H, s) (H-5", 9", 10")에서 관측되었다. 이상의 결과로부터 고삼 분리물 S-10-6은 A환이 3치환, B환이 2치환된 flavanone 골격에 불포화 결합을 갖는 isprenoid 측쇄가 결합된 화합물임을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 5)을 살펴보면 총 25개의 탄소 signal이 관측되었는데 192.78 ppm에서 ketone, 154~163 ppm에서 산소가 결합된 benzene 탄소, 117~148 ppm에서 이중결합 탄소, 102~110 ppm에서 olefinic methine, 31~92 ppm에서 exomethylene의 존재를 확인할 수 있었고, 74.33 ppm에서 산소가 결합한 methine, 17, 18, 25 ppm에서 3개의 methyl signal을, 27~46 ppm에서 4개의 methy-

lene과 methyl 탄소의 존재를 확인하였다. 이상의 결과로보아 고삼에서 분리된 항균 활성물질인 S-10-6은 flavanone 골격의 B환의 2,4 탄소와 A환의 5,7 탄소에 hydroxy기가 결합되어 있고 6번 탄소에 측쇄결합을 갖고 있음을 확인하였고 Wu 등⁽¹⁾과 Shirataki 등⁽²⁾의 결과를 비롯하여 관련문헌⁽²⁾과 비교 검토한 결과 kushenol F로 동정하였다.

요 약

고삼 75% 에탄올 추출물과 클로로포름 분획물을 첨가하여 몇가지 식중독 미생물의 증식억제 양상과 분리된 유효 물질의 구조를 확인하였다. 이 분획물의 항균 효과를 시험한 결과 *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, 19112, 19113, 19114 및 15313)에 대한 최소

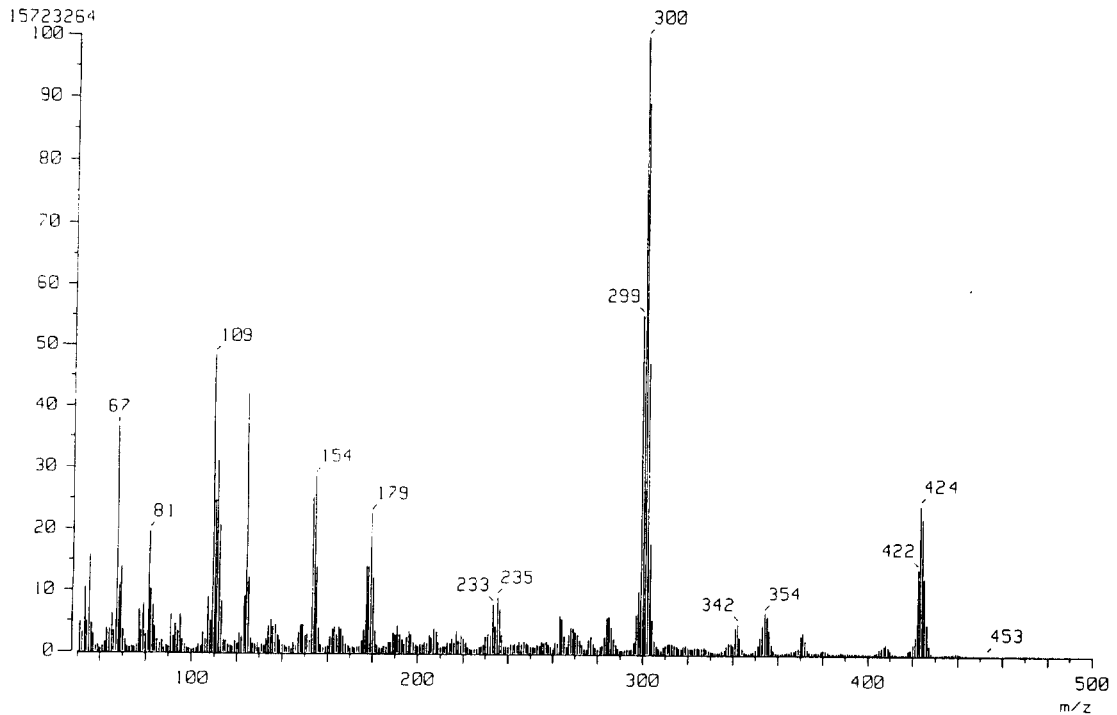


Fig. 4. EI/MS spectrum of S-10-6 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract.

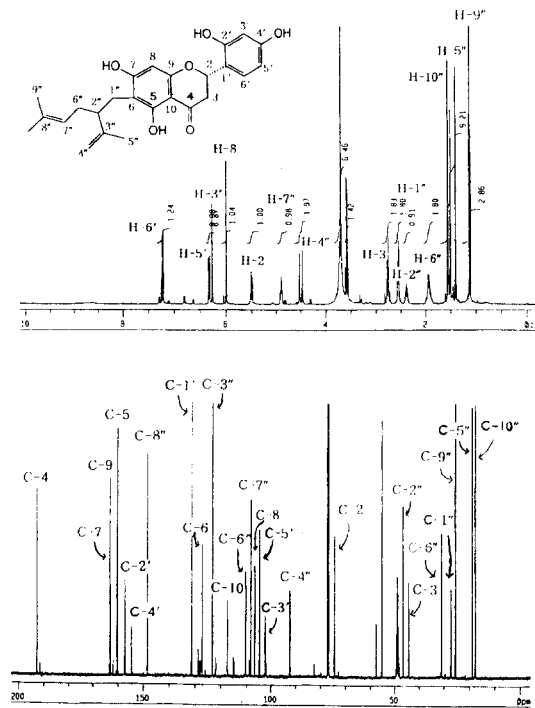


Fig. 5. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of S-10-6 isolated from chloroform fraction of *Sophora flavescens* Ait. ethanol extract ($\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD}=5:1$).

증식억제 농도가 각각 50~500 ppm과 50 ppm 이하로 확인되었다. 항균 활성을 보인 클로로포름 분획물을 silica gel column chromatography로 연속 2회 정제하여 얻은 황색 분말의 항균 활성 소획분 S-10-6은 *L. monocytogenes* 5 균주, *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 10 ppm 농도에서 뚜렷한 증식억제 효과를 보였으며 특히 *L. monocytogenes* 5 균주에 대해서는 30~50 ppm 수준에서 살균 효과가 인정되었으나 *E. coli* 경우 100 ppm 농도에서도 증식억제 효과가 없었다. 항균 활성을 보인 소획분(S-10-6)을 IR, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 로 구조를 동정한 결과 flavanone 화합물의 하나인 kushenol F로 확인되었다.

감사의 글

이 연구는 농림수산 특정연구과제(첨단기술개발)로 수행한 결과의 일부로 이에 감사를 드립니다.

문헌

1. Beuchat, L.R. and Golden, D.A.: Antimicrobial occurring naturally in foods. *Food Technol.*, **43**, 134-141 (1989)
2. Tirillini, B., Velasquez, E.R. and Pellegrion, R.: Chemical composition and antimicrobial of essential oil of

- Pipper angustifolium*. *Planta Med.*, **62**, 372-373 (1996)
3. Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M.: Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils *J. Agri. Food Chem.*, **44**, 1202-1205 (1996)
 4. Simpson, B.K., Gagne', N., Aschie, I.N.A. and Noroozi, E.: Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp. *Food Biotechnol.*, **11**, 25-44 (1997)
 5. Jung, D.S.: A natural antimicrobial substance; nisin. *Kor. J. Appl. Microbial. Biothechnol.*, **6**, 24-31 (1993)
 6. Li, J., Chen, G. and Webster, J.M.: Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.*, **58**, 1081-1086 (1995)
 7. Nakatani, N., Ikeda, K., Kikuzaki, H., Kido, M. and Yamaguchi, Y.: Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochemistry*, **27**, 3127-3129 (1988)
 8. Han, D.C. and Kyung, K.H.: Antimicrobial activity of autoclaved cabbage juice (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 74-79 (1995)
 9. Kim, S.J. and Park, K.H.: Antimicrobial substances in leek (*Allium tuberrosom*) (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 604-608 (1996)
 10. Shin, D.H., Kim, M.S. and Han, J.S.: Antimicrobial effect of ethanol extracts from some medical herbs and their fractionates against food-born bacteria (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 808-816 (1997)
 11. Roh, H.J., Shin, Y.S., Lee, K.S. and Shin, M.K.: Antimicrobial activity of water extract of green tea against cooked rice putrefactive microorganism (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 66-71 (1996)
 12. Park, S.K., Park, J.R., Lee, S.W., Seo, K.I., Kang, S.K. and Shim, K.H.: Antimicrobial activity and heat stability of water-pretreated extract of leaf mustard dolsan (*Brassica juncea*) (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**, 707-712 (1995)
 13. Yamaki, M., Kashihara, M., Ishiguro, K. and Takagi, S.: Antimicrobial principle of Xian he cao. *Planta Med.*, **55**, 169-170 (1990)
 14. Batista, O., Duarate, A., Nascimanto, J. and Simoes, M. F.: Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *J. Natural Product*, **57**, 858-861 (1994)
 15. Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M.: Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J. Agri. Chem.*, **40**, 245-248 (1992)
 16. Hashidoko, Y., Tahara, S. and Mizutani, J.: Antimicrobial sesquiterpene from damaged *Rosa rugosa* leaves. *Phytochemistry*, **28**, 425-430 (1989)
 17. Biyiti, L., Pesando, D. and Dao, S.P.: Antimicrobial activity of two flavones isolated from the cameroonian plant *Erythrina sigmoidea*. *Planta Med.*, **54**, 126-128 (1987)
 18. Kuk, J.H., Ma, S.J. and Park, K.H.: Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 204-210 (1997)
 19. Ma, S.J., Ko, B.S. and Park, K.H.: Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from park of *Aralia elata* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 807-812 (1995)
 20. Harbone J.B. and Baxter H.: *Phytochemical Dictionary*, Taylor and Francis Ltd., p. 403 (1993)
 21. Yen, G.C, Wu, S.C and Duh, P.D.: Extraction identification of antioxidant components from the leaves of mulberry. *J. Agri. Chem.*, **44**, 1687-1690 (1996)
 22. Asamarai, A.M., Addis, P.B., Epley, R.J. and Krick, T. P.: Wild rice hull antioxidant. *J. Agri. Chem.*, **44**, 126-130 (1996)
 23. Park, J.D., Lee, Y.H., Baek, N.I., Kim, S.I. and Ahn, B. Z.: Isolation of antitumor agent from the heartwood of *Dabergia odorifera* (in Korean). *Kor. J. Pharmagon.*, **26**, 323-326 (1995)
 24. Seoul National University Natural Products Research Institute: Traditional oriental medicines database. Seoul systems CO., LTD. (1996)
 25. 우원식 : 천연물화학연구법. 민음사, p. 45-167 (1989)
 26. 신민교 : 임상본초학. 남산당, p. 314-316 (1986)
 27. Kee, C.H.: *The pharmacology of chinese herbs*. CRC Press, Inc., p. 63-66 (1993)
 28. Han, J.S.: Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by plant extract. *M.S. Thesis*, Chonbuk National Univ., Seoul, Korea (1995)
 29. Ahn, E.Y., Shin, D.H., Baek, N.I. and Oh, J.A.: Isolation and Identification of Antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* FISCH (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* (in process)
 30. Burapadaja, S. and Bunchoo, A.: Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Med.*, **61**, 365-366 (1995)
 31. Wu, L.J., Miyase, T., Ueno, A., Kuroyanagl, M., Noro, T. and Fukushima, S.: Studies on the constituents of *Sophora flavescens* AIT. (in Japanese). *Yakukaku Zasshi*, **105**, 736-741 (1985)
 32. Shirataki, Y., Yokoe, I., Noguchi, M., Tomomori, T. and Komatsu, M.: Studies on the constituents of *Sophora* species XXII. Constituents of the root of *Sophora moorcroftiana* BENTH. ex BAKER. (1) *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2220-2223 (1988)