

치자 열매에서 항미생물 활성을 갖는 3,4-Dihydroxybenzoic Acid의 분리

임철근 · 문제학* · 박근형

전남대학교 식품공학과, *日本 徳島大學 醫學部 營養學科

Isolation of 3,4-Dihydroxybenzoic Acid, Which Exhibits Antimicrobial Activity, from Fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis

Cheol-Keun Yim, Jae-Hak Moon* and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

*Department of Nutrition, University of Tokushima, Japan

Abstract

The methanol extract of *Gardenia jasminoides* Ellis showed antimicrobial activity against bacteria and yeasts. The extract was successively purified with solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, octadecylsilane column chromatography. The purified active substance was isolated by high performance liquid chromatography. The isolated compound was 3,4-dihydroxybenzoic acid which was determined by mass spectrometer, gas chromatograph-mass spectrometer, ¹H-nuclear magnetic resonance, ¹³C-nuclear magnetic resonance and two-dimensional nuclear magnetic resonance. The content of 3,4-dihydroxybenzoic acid was 32.7 µg/g in dried fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis.

Key words : *Gardenia jasminoides* Ellis, antimicrobial activity, 3,4-dihydroxybenzoic acid

서 론

최근 유해 미생물에 의한 피해는 식품산업 뿐만 아니라 의약, 농업, 저장, 유통산업 등 광범위한 영역에서 직면하고 있는 심각한 문제이다. 따라서 항균제가 개발되어 왔으나 이들 항균제는 대부분 화학적 합성품으로 현재 이들의 안전성에 대한 문제가 대두되고 있고 있으며, 또한 소비자들의 인공 합성품의 기피 현상으로 비교적 안전성과 환경 친화성이 있는 천연 항균제의 개발이 요구되어지고 있다⁽¹⁾.

이러한 취지에서 많은 연구가 식물을 대상으로 수행되었다. 식물 자원은 매우 다양한 유용 성분을 함유하고 있으며, 또한 식물은 자기방어 수단의 하나로 항균성 물질을 생산한다고 알려져 있어 식물 자원에서 항미생물 활성 물질을 찾으려는 시도가 계속되어 왔다⁽²⁾. 이러한 식물 자원을 대상으로 수행된 항균활성의 연구

를 살펴보면 대황⁽³⁾, 미늘죽⁽⁴⁾, 계피⁽⁵⁾, 황기⁽⁶⁾, 생강⁽⁷⁾, 호장근⁽⁸⁾, 모과⁽⁹⁾, 털새동부의 뿌리⁽¹⁰⁾, 환삼덩굴⁽¹¹⁾의 추출물에 항균활성이 있음이 보고된 바 있고, 홍화⁽¹²⁾, 두릅⁽¹³⁾, 솔잎⁽¹⁴⁾, 백두옹⁽¹⁵⁾, 왕겨⁽¹⁶⁾에서는 항균활성의 본체가 규명된 바 있다.

한편, 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)는 상록활엽 관목으로서 중국, 일본, 대만 등에서 생산되고, 우리나라의 남부 지역 중에 완도군을 중심으로 한 남해안 지역에서 재배되고 있다. 치자나무의 꽃은 7월에 백색으로 피고, 10월에 꽃 뒤의 씨에 싸여진 황색의 열매가 치자이다⁽¹⁷⁾. 치자는 황색 색소를 갖고 있어 예로부터 색소 소재로 이용⁽¹⁸⁾되었고 한약재로도 이용⁽¹⁹⁾되어 왔을 뿐 아니라 유산균 음료, 국수, 단무지 등의 식품 착색제로 이용되고 있다. 또한 치자 추출물이 결핵균에 대한 항균효과⁽²⁰⁾가 있으며, 치자 열매물이 항균효과가 있음⁽²¹⁾이 보고된 바 있다.

따라서, 치자 열매에는 항균활성을 갖는 기능성 물질의 존재가 시사되나 활성 본체 규명에 관한 연구가 미흡하여 치자에 함유된 항미생물 활성물질 탐색을 시도하였다.

Corresponding author : Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Kwangju 500-757, Korea

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis) 열매는 전라남도 완도군 군외면에서 채취하여, 실온에서 건조한 후 사용하였다.

활성물질의 정제 및 분리

활성물질의 추출은 치자 1.8 kg을 homogenizer (BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki Kaisha LTD, Tokyo, Japan)로 마쇄한 다음 *n*-hexane, methanol(각각 10 L에 24시간 침지)로 순차 추출하였다.

용매분획은 Ma 등⁽¹³⁾의 방법에 따라, methanol 추출물을 cooling aspirator가 장치된 vacuum evaporator (TYPE N-2N, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압농축하여 methanol을 제거하고, buffer용액(0.2 M monobasic sodium phosphate-0.2 M dibasic sodium phosphate, pH 7.5)과 ethyl acetate를 이용하여 수상획분(buffer층)과 중성획분(ethyl acetate-soluble neutral fraction)으로 분획하였다. 수상획분은 1 M HCl을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 뒤, 다시 ethyl acetate로 분배하여 수용성획분(aqueous fraction)과 산성획분(ethyl acetate-soluble acidic fraction)으로 분획하였다.

Silica gel adsorption column chromatography는 Park 등⁽²²⁾의 방법에 따라, 활성획분의 약 10배량에 상당하는 silica gel (110 g, 63~200 μ m, Merck, Darmstadt, Germany)을 ethyl acetate로 slurry를 만들어 column (3.0 \times 40 cm)에 충전시킨 후, ethyl acetate-methanol 용매계로 methanol 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 25, 100% (농도별로 1,100 mL씩)까지 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법으로 분획하였다. Hexane-ethyl acetate-methanol 용매계의 chromatography는 동일한 silica gel 45 g을 column (2.0 \times 28 cm)에 충전시킨 후, hexane-ethyl acetate-methanol의 용매계로 농도비를 8:6:1, 6:8:1, 4:10:1(농도비 별로 900 mL씩)까지 단계적으로 증가시키면서 용출 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography는 Park 등^(22,23)의 방법에 따라, Sephadex LH-20 (25~100 μ , Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 methanol-CHCl₃ (4:1, v/v) 용매계로 하룻밤 팽윤시킨 후, column (4 \times 100 cm, total volume 1,000 mL)에 충전하고 동용매계로 용출 분획하였다.

Octadecylsilane (ODS) column chromatography는 약 200배량에 상당하는 ODS gel (26 g, 70~230 mesh, YMC, Kyoto, Japan)을 methanol로 slurry를 만들어

column(2.0 \times 28 cm)에 충전시킨 후, methanol-H₂O 용매계로 methanol 농도를 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100%(농도별로 90 mL씩)까지 단계적으로 증가시키면서 용출 분획하였다.

High performance liquid chromatography(HPLC)는 μ Bondapak C₁₈ column(0.39 \times 30 cm)을 이용하여 분당 1 mL(Model 510 solvent delivery system, Millipore, Milford, MA, U.S.A.)로 용출하였으며 검출은 UV detector(254 nm, Model Waters 486 tunable absorbance detector, Millipore, Milford, MA, U.S.A.)를 이용하였다.

활성물질의 구조 확인

Mass spectrometer(MS) 분석은 Waters (Milford, MA, U.S.A.) IntegriTY™ System의 Thermabeam™ Mass detector(Milford, MA, U.S.A.)를 이용하여 이온화(70 eV), ion source temperature 200°C의 조건에서 direct inlet 방식으로 분석하였고, gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) 분석은 gas chromatograph (Varian STAR 3400CX, Walnut Creek, CA, U.S.A.)와 mass spectrometer (Varian SATURN 4D, Walnut Creek, CA, U.S.A.)에 Rtx[®]-1 capillary column (30 m \times 0.25 mm, Varian Instruments 2700, Walnut Creek, CA, U.S.A.)을 장착하고, ion source temperature 200°C, ionizing voltage 70 eV 조건으로 분석하였다. Trimethylsilyl(TMS) 유도체화는 Park 등⁽²⁴⁾의 방법으로 시료 10 μ g당 시약(pyridin : N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide : trimethylchlorosilane, 10 : 5 : 1, v/v)을 20 μ L 가하고 60°C에서 30분 동안 반응시켰다. ¹H-nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), ¹³C-nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) 기기 분석은 Fourier transform-nuclear magnetic resonance (FT-NMR) 기기(400 MHz, Varian Unity Plus-300, Paloalto, CA, U.S.A.)를 사용하였으며, 용매는 CD₃OD, 그리고 내부 표준 물질은 tetramethylsilane을 각각 사용하였다.

항미생물 활성 측정

항미생물 활성 측정을 위해 사용한 미생물은 11종의 Gram 양성 세균(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *L. brevis* KCTC 3102, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3100, *Pediococcus cerevisiae* KCTC 1628, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* KCTC 3195, *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096, *S. mutans* ATCC 25175)과 4종의 Gram 음성 세균(*Escherichia coli* ATCC

10536, *Vibrio vulnificus* CDC C7184, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) 그리고 효모 2종(*Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1850)을 사용하였다.

배지는 *S. mutans*는 BHI배지(Difco, Detroit, MI, U.S.A.), *V. vulnificus*는 LB배지(Difco), 젖산균은 *Lactobacilli* MRS배지(Merck, Darmstadt, Germany), 그 밖의 세균은 Nutrient배지(Merck)를 각각 사용하였고, 효모는 YM배지(Difco)를 사용하였다.

배양온도는 세균의 경우 37°C 또는 30°C에서 24시간 동안, 효모는 30°C에서 24시간 동안 3회 반복하여 전배양을 행한 후 접종균주로 사용하였다.

항미생물 활성의 검정은 Zaika⁽²⁵⁾의 paper disc(φ8 mm, Whatman)방법으로 측정하였다. 먼저 Davidson과 Parish⁽²⁶⁾의 pour-plate method에 의해 45°C로 조절된 멸균 배지 20 mL에 전 배양액 0.1 mL를 무균적으로 옮겨 잘 혼합시킨 후 지름이 9.0 cm인 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 50 μL 정도의 용매에 녹인 시료를 적하하여 용매를 제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85% 식염수로 확산시켜 세균은 37°C 또는 30°C에서 16시간 동안, 효모는 30°C에서 16시간 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기(mm)로 활성의 정도를 측정하였다.

정제과정의 항균활성 모니터링(bioassay guided purification)은 *S. aureus*를 대상으로 하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리

치자(1.8 kg, 수분함량 10.5%±0.15)의 methanol 추출물(371.2 g/치자 1.760 g)이 항균활성을 보이자 활성의 확인과 활성물질의 성질을 파악하고자 용매분획하여 수상획분, 중성획분, 산성획분으로 분획한 다음, 각 획분에 대하여 치자 1 g 상당량의 추출물로 항미생물 활성을 검정하였다. 그 결과(Table 1), ethyl acetate-soluble acidic 획분(10.6 g/치자 1.757 g)에 활성이 관찰되어, methanol 추출물의 항균활성을 재확인하였을 뿐 아니라 산성물질에 의해 항균활성이 발현되고 있으며, 이 활성물질은 그람음성, 양성세균, 그리고 효모를 포함한 넓은 항균 spectra를 나타냈다. 산성획분을 ethyl acetate-methanol 용매계의 silica gel adsorption column chromatography로 용출 분획한 다음 항미생물 활성을 검정한 결과, ethyl acetate-methanol 용매계 100:0(v/v)의 용출획분(4.49 g/치자 1.748 g)에서 활성을 나타냈다. 이에 용매계의 극성을 낮추어 hexane-ethyl acetate-methanol 용매계의 silica gel adsorption column chromatography로 용출 분획하고 항미생물 활성을 검정한 결과, hexane-ethyl acetate-methanol 용매계 8:6:1(v/v/v)의 용출획분(1.18 g/치자 1.741 g)에서 활성을 나타내 상당한 정제효과를 얻을 수 있었다. 이 활성획분을 methanol-CHCl₃ (4:1, v/v) 용매계를 이동상으로 한 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 용출,

Table 1. Antimicrobial activities of the solvent fractionated fractions from fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis

Microorganisms	Clear Zone (mm)			
	Aqueous fraction ¹⁾	Neutral fraction ¹⁾	Acidic fraction ¹⁾	B.A. ²⁾
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	12	9
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	13	10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	-	-	12	11
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	-	-	12	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	12	11
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	15	12
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-	-	14	9
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	-	11	9
<i>Streptococcus pyogenes</i> KCTC 3096	-	-	12	10
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3195	-	-	13	10
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	-	-	14	10
<i>Lactobacillus brevis</i> KCTC 3102	-	-	15	10
<i>Pediococcus cerevisiae</i> KCTC 1628	-	-	18	14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	-	-	15	9
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	16	9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	-	-	12	9
<i>Vibrio vulnificus</i> CDC C7184	-	-	10	8

¹⁾Extract of 1 g weight equivalent/disc.

²⁾0.5 mg benzoic acid/disc.

-: No inhibition.

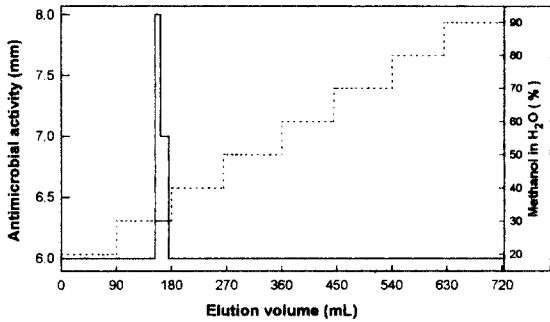


Fig. 1. Antimicrobial activity after ODS column chromatography of the active fraction from *Gardenia jasminoides* Ellis fruits. Bioassay: paper disc method against *S. aureus*.

분획하고 항미생물 활성을 검정한 결과, total volume에 대한 elution volume의 비(V_e/V_t)가 1.07~1.12의 좁은 용출범위(138 mg/치자 1,710 g)에서 활성을 보여 매우 높은 정제효과를 얻을 수 있었을 뿐 아니라, 이 활성 본체는 동일조건에서 용출된 brassinolide, methyl-4-chloro indole, 4-hydroxycinnamic acid 등의 용출위치^(16,22,27)를 고려할 때, 분자량 200 부근의 저분자 물질일 것으로 추정되었다. 이어서 이 활성획분을 methanol-H₂O 용매계를 이동상으로 한 ODS column chromatography로 용출 분획하고 항미생물 활성을 검정한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 methanol-H₂O 용매계 30:70(v/v)의 용출획분(80.2 mg/치자 1,601 g)에서 활성이 나타나, 비교적 극성이 큰 물질일 것으로 추정되었다. 이 활성획분은 30% methanol을 이동상으로 한 μ Bondapak C₁₈ column의 HPLC에 의해 3.28분에서 단일 peak로 분리되어, 활성 본체를 단리(50.1 mg/치자 1,530 g)에 성공하였다. 분리된 활성물질은 건조치자 g 당 32.7 μ g 정도 함유되어 있었다.

단리된 활성물질의 구조확인

¹H-NMR의 분석 결과, δ 6.78에 1H분의 doublet ($J=8.3$ Hz, H-5), δ 7.42(s)와 7.40(d, $J=2.0$ Hz)에 2H분의 proton signal이 관찰되어 3치환체의 벤젠환 구조를 가진 화합물임이 추측되었다. ¹³C-NMR spectrum 으로부터 1종의 carboxyl기 유래의 탄소 signal (δ 170.3) 및 6종의 sp^2 탄소 유래의 signal [δ 151.5(C-4), 146.1(C-3), 123.9(C-6), 123.3(C-1), 117.7(C-2), 115.7 (C-5)]이 각각 관찰되어 benzoic acid를 부분 구조로 한 화합물일 가능성이 강하게 시사되었다. ¹³C-¹H COSY (correlation spectroscopy)의 분석 결과로부터 carboxyl 기의 탄소를 포함하여 4종의 4차 탄소가 존재함을 알

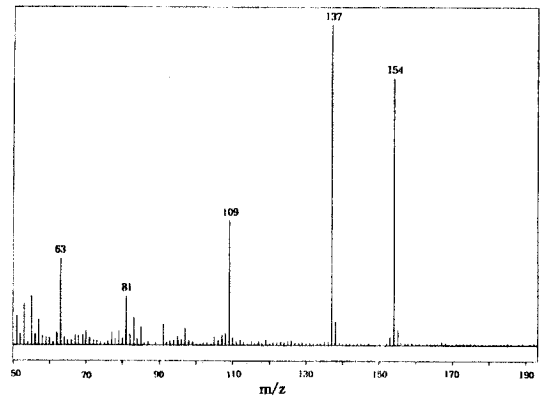


Fig. 2. MS spectrum of the active substance from fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis.

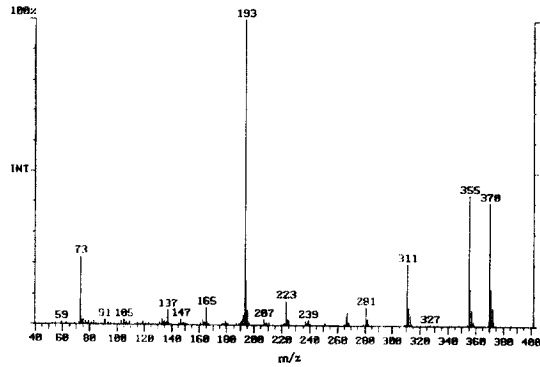


Fig. 3. GC-MS spectrum of the trimethylsilylated active substance from fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis.

았으며, 상기의 ¹H-NMR spectrum 상에서 관찰된 2H 분의 proton signal(δ 7.42와 7.40)은 각각 다른 2종의 탄소에 결합된 signal들 [δ 7.42 (1H, br. s, H-2), 7.40 (1H, dd, $J=2.0, 8.3$ Hz, H-6)]이 서로 중첩되어 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 각 탄소와 수소 signal들의 귀속 및 proton signal들의 분열 패턴에 더하여, MS spectrum(Fig. 2)은 3,4-dihydroxybenzoic acid의 특징적인 분자 ion [m/z 154(molecular ion, M⁺)]과 fragment ion [m/z 137(M-17, base peak), m/z 109 (M-45)]이 관찰되어 3,4-dihydroxybenzoic acid의 가능성이 확인되었다. 또한 분리된 활성물질의 일부를 TMS 유도체화하여 측정된 GC-MS spectrum(Fig. 3)은 3,4-dihydroxybenzoic acid의 하나의 COOH기와 두 개의 OH기에 TMS가 도입된 trimethylsilyl ester(trimethylsilyl ether)의 구조(C₁₆H₃₀O₄Si₃, molecular weight 370)로 관측되어 활성 본체가 3,4-dihydroxy-benzoic acid 가능성이 더욱 확인되었다. Hydroxyl기 및 carboxyl기의 결합

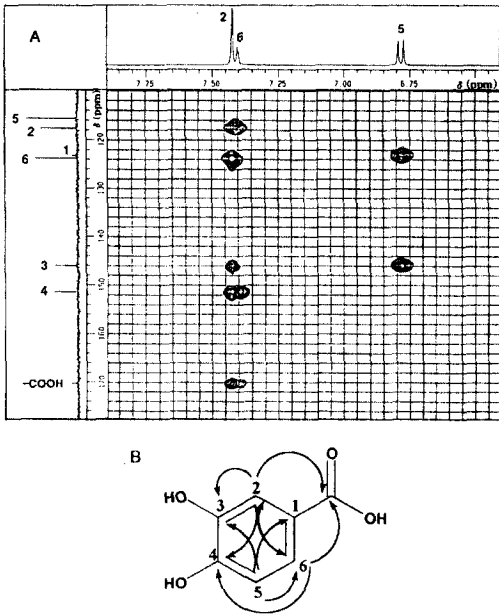


Fig. 4. HMBC spectrum (A) and structure (B) of the active substance from fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis.

위치를 재확인하기 위한 HMBC의 분석 결과(Fig. 4), 2위와 6위의 proton으로부터 carboxyl기 및 4위의 탄소에, 그리고 2위와 6위 상호간의 탄소에 각각 cross peak가 관찰되었으며, 2위의 proton으로부터 3위의 탄소에 cross peak가 관찰되고, 5위의 proton으로부터 1위, 3위, 6위의 탄소에 각각 cross peak가 관찰되어, 활성 화합물의 구조는 3,4-dihydroxybenzoic acid로 분리되었다.

3,4-Dihydroxybenzoic acid는 두릅(*Aralia elata*.) 수피에 존재하는 항미생물 활성물질⁽²⁸⁾로 단리된 바 있고, 오리나무(*Alnus* spp.)에서도 존재가 확인된 물질⁽²⁹⁾로, 항산화 활성⁽³⁰⁾ 등이 보고된 바 있으나, 치자 열매에서 3,4-dihydroxybenzoic acid가 항미생물 물질로 분리·동정된 것은 처음으로 생각된다. 치자 열매는 항미생물 활성 물질을 갖는 3,4-dihydroxybenzoic acid와 함께 치자 황색소를 포함하여 항균활성을 갖는 기능성 소재, 기능성 색소로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis) 열매의 methanol 추출물은 Gram양성 세균, Gram음성 세균, 효모 등의 미생물에 대하여 항미생물 활성을 보여, solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography,

Sephadex LH-20 column chromatography, ODS column chromatography, HPLC 등에 의해 얻어진 활성 물질을 MS, GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 그리고 2D-NMR 등의 기기 분석에 의해 3,4-dihydroxybenzoic acid로 동정하였다. 치자 열매에서 3,4-dihydroxybenzoic acid가 항미생물 활성물질로 분리·동정된 것은 처음으로 생각된다. 3,4-dihydroxybenzoic acid는 건조 치자 열매에 g당 32.7 µg 정도 함유되어 있었다.

감사의 글

이 연구는 목포대학교 식품산업연구센터와 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 결과로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Cho, S.Y., You, B.J., Chang, M.H., Lee, S.J., Sung, N.J. and Lee, E.H. Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26: 261-265 (1994)
2. Kim, S.J. and Park, K.H. Antimicrobial activities of the extracts of vegetable *Kimchi* stuff. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27: 216-220 (1995)
3. Paik, S.B., Kyung, S.H., Doh, E.S., Oh, Y.S. and Park, B.K. Screening and identification of fungicidal compounds derived from medicinal plants against cucumber powdery mildew. *Kor. J. Environ. Agric.* 13: 301-309 (1994)
4. Ji, W.D., Jeong, M.S., Choi, D.H. and Chung, Y.G. Growth inhibition of garlic (*Allium sativum* L.) juice on the microorganisms. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41: 1-5 (1998)
5. Park, E.T., M.Y., Lee, J.G. and Chang, D.S. Antimicrobial activity and antimutagenesis of Cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume) bark extract. *Kor. J. Food Hyg. Safety* 13: 337-343 (1998)
6. Koo, B.S., Ryu, J.C., Chung, T.Y. and Kim, K.C. Purification and characterization of natural antifungal protein from astragal seeds. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 379-386 (1998)
7. Sheo, H.J. The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 94-99 (1999)
8. Yamaki, M., Asogawa, T., Kashihara, M., Ishiguro, K. and Takagi, S. Screening for antimicrobial action of chinese crude drugs, and active principles of huzhang. *Shoyakugaku Zasshi* 42: 153-154 (1988)
9. Lee, J.H. and Lee, S.R. Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26: 317-323 (1994)
10. Kim, H.S. Antimicrobial activity and characteristics of *Amblytropis pauciflora* Kitagawa extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 993-999 (1998)

11. Park, S.W., Woo, C.J., Chung, S.K. and Chung, K.T. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. Kor. J. Food Sci. Technol. 26: 464-470 (1994)
12. Baek, N.I., Kim, Y.H., Ahn, E.M., Bang, M.H., Nam, J.Y. and Kwon, B.M. Isolation of biologically active compounds from the flower petals of *Carthamus tinctorius* L. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 197-200 (1998)
13. Ma, S.J., Kuk, J.H., Ko, B.S and Park, K.H. Isolation of 3,4-dihydroxycinnamic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*. Kor. J. Food Sci. Technol. 28: 600-603 (1996)
14. Kuk, J.H., Ma, S.J. and Park, K.H. Isolation of characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. Kor. J. Food Sci. Technol. 29: 204-210 (1997)
15. Lee, H.H., Ma, S.J., Moon, J.H. and Park, K.H. Isolation of characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid and 3,4-dihydroxycinnamic acid with antimicrobial activity from root of *Pulsatilla koreana*. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 191-196 (1998)
16. Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong K.Y. and Park, K.H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans* 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 2273-2276 (1998)
17. Kim, T.J. *Gardenia jasminoides* for grandiflora. In: Korean Resources Plants. Vol. 4, pp. 118-119. Seoul Univ. Publishing Co., Seoul, Korea (1997)
18. Jeong, H.S., Kim, S.J. and Park, K.H. Characteristics of the conversion pigment from *Gardenia jasminoides* yellow pigment. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 319-323 (1998)
19. Park, U.Y., Chang, D.S. and Cho, H.R. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 21: 91-96 (1992)
20. Shin, S.S. Antibacterial Activity of Soluble Extracts of *Gardenia jasminoides* Against Mycobacteria Other Than Tubercle Bacillus. M.S. thesis, Chungang Univ., Seoul, Korea (1986)
21. Park, S.K. A study on the colorfastness and antibacterial properties of the natural dyeing with *Gardenia jasminoides*. M.S. thesis, Chonbuk National Univ. Chonju, Korea (1996)
22. Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T. Brassinosteroids and monoglycerides with brassinosteroid-like activity in immature seeds of *Oryza sativa* and *Perilla frutescena* and in cultured cells of *Nicotiana tabacum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 2241-2243 (1994)
23. Park, K.H., Kim, S.J. and Hyun, K.H. Brassinosteroid substances in immature *Cassipourea* seeds. Agric. Chem. Biotechnol. 36: 99-104 (1993)
24. Park, K.H., Park, J.D., Hyun, K.H., Nakayama, M. and Yokota, T. Brassinosteroids and monoglycerides in immature seeds of *Cassia tora* as the active principles in the rice lamina inclination bioassay. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1343-1344 (1994)
25. Zaika, L.L. Their antimicrobial activity and its determination. J. Food Safety 9: 97-118 (1988)
26. Davidson, P.M and Parish M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. J. Food Technol. 43: 148-155 (1989)
27. Park, K.H., Yokota, T., Sakurai, A. and Takahashi, N. Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloroindole-3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. Agric. Chem. Biotechnol. 51: 3081-3086 (1987)
28. Ma, S.J., Ko, B.S. and Park, K.H. Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*. Kor. J. Food Sci. Technol. 27: 807-812 (1995)
29. Djerassi, C., Connolly, J.D. and Faulkner, D.J. 3,4-dihydroxybenzoic acid, Vol. 3, pp. 1557-1558. In: Dictionary of Natural Products. Chapman and Hall Press, London, U.K. (1994)
30. Kim, J.S., Lee, G.D., Kwon, J.H. and Yoon, H.S. Identification of phenolic antioxidative components in *Crataegus pinnatifida* bunge. Agric. Chem. Biotechnol. 36: 154-157 (1993)

(1999년 7월 26일 접수)