

키토산 첨가에 의한 축육 소시지의 보존성 개선에 관한 연구- II 키토산의 분자량에 따른 보존성의 차이

윤선경 · 박선미 · 안동현[†]

부경대학교 식품생명공학부

Studies on the Improvement of Storage Property in Meat Sausage Using Chitosan - II Difference of Storage Property by Molecular Weight of Chitosan

Sun-Kyoung Youn, Sun-Mee Park and Dong-Hyun Ahn[†]

Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

This study was examined for antibacterial effect of various molecular weight of chitosan against spoilage bacteria in emulsion sausage. Four different kinds of chitosan, molecular weights (M.W.) of 1 kDa, 5 kDa, 30 kDa and 120 kDa, were used. The more molecular weight of chitosan is high, the more storage property of sausage is good during storage at 30°C. Storage properties of sausages between added 0.5% of M.W. 120 kDa chitosan and 150 ppm of sodium nitrite were about the same. Effect of growth-inhibitory of spoilage bacteria was not detected 0.2% of M.W. 1 kDa chitosan. 0.2% of M.W. 5 kDa chitosan have growth-inhibitory effect over 80% against only 3 strains among bacteria isolated from spoiled emulsion sausage. But, 0.2% of M.W. 30 kDa chitosan have growth-inhibitory effect over 80% against all strains of bacteria related to spoilage of emulsion sausage, except *S. typhimurium*. Especially, 0.2% of M.W. 120 kDa chitosan inhibited over 80% growth against all strains used in this study. The antibacterial activity was increased with their molecular weight.

Key words meat sausage, chitosan, storage property, molecular weight

서 론

축육 가공제품은 식문화의 서구화에 따라 우리나라 식생활에서 큰 비중을 차지하게 되었다. 특히 1980년대 이후부터 1990년대 중반까지는 급격한 신장세를 보이다가 최근 약세를 보이기는 하나 전반적으로 증가하는 추세를 보이고 있다(1). 1990년대에 들어 소득의 증대로 인해 소비자들은 식품의 양적인 면에서 보다 질적인 면으로 추구하는 경향이 강하게 나타나고 있다. 그 결과 영양적으로 문제가 되는 성분이나 인체에 문제가 될 수 있는 인공합성 첨가물이 존재하는 식품을 기피하는 경향이 강해지고 있다. 축육 가공제품에 있어서는 영양적으로 문제가 될 수 있는 것은 포화지방산의 과다 함유와 인공합성 첨가물 중에서 발색 및 보존료로 이용되는 아질산염이 문제가 되어 왔다(2). 아질산염은 염지한 고기의 특이한 육색을 발현하고 미생물의 생육을 억제하는데 특히 저온 혐기성 균인 *Clostridium botulinum*의 생육과 독소의 생성을 억제하는 중요한 역할을 하지만, 고기 중의 2급 아민과 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성할

수 있다(3,4). 그러므로 사용량을 제한하면서 사용하고 있으며, 우리나라의 경우 제품 중의 잔존 아질산근을 70 ppm 이하로 규정하고 있다(5). 그러나 아질산염을 대체할 수 있는 천연 물질은 아직 발견되지 않고 있는 실정이다.

미생물의 생육을 억제하는 천연 물질로서는 여러 가지가 있는데, 그 중에 키토산이 항 미생물 효과가 큰 것으로 알려져 있다(6,7). 키토산은 자연계에 cellulose 다음으로 많이 존재하는 키틴을 탈 아세틸화한 것으로 다당류 중에서는 2번 탄소에 아미노기를 가지고 있어 특이한 기능성을 나타낸다(8,9). 키토산은 세균의 생육 억제효과(10-14), 항 진균효과(15-17)가 있으며, 이를 고기나(18, 19) 식물의 부패 방지에 이용한 보고도 있다(20-22). 이러한 키토산의 항미생물 효과는 탈 아세틸화도와 분자량의 영향을 받는데, 특히 분자량에 따라 미생물들의 생육 억제효과가 다른 것으로 알려져 있다(23,24).

본 연구에서는 축육소시지의 보존기간을 연장시키기 위한 목적으로 키토산을 이용함에 있어 첨가하는 키토산의 분자량에 따른 항균성 및 보존성의 차이를 검토하였다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

재료

유화형 소시지의 제조에 사용된 원료는 도살 직후의 신선한 돼지 뒷다리의 적육과 등 지방을 이용했고, 키토산은 분자량별로 약 1 kDa, 5 kDa, 30 kDa 그리고 120 kDa의 4종류를 이용했다. 분자량 약 1 kDa과 5 kDa의 키토산은 탈 아세틸화도 95%이상, 중금속 미검출, 비소 미검출의 (주)키토라이프의 것을 이용했고, 분자량 약 30 kDa의 키토산은 탈 아세틸화도 92%이상, 중금속 미검출, 비소 미검출의 (주)Biotech의 것을 이용했다. 또한 분자량 약 120 kDa의 키토산은 탈 아세틸화도 85%이상, 중금속 20 ppm이하, 비소 미검출의 신영키토산의 것을 사용했다.

유화형 소시지의 제조

신선한 돼지 뒷다리 적육과 등 지방을 세절하고, 적육 60%, 지방 20%, 얼음물 20%의 비율로 silent cutter(ST11, ADE사제, 독일)에 넣고 혼합, 유화했다. 이때 식염 1.4%, 인산염 0.3%, 설탕 0.5%, monosodium glutamate 0.2%, ascorbic acid 0.05%, casein 1.0%, 전분 1.0%를 각각 첨가하고, 향신료로 nutmeg 0.1%, white pepper 0.3%, allspice 0.1% 등을 첨가했다. 아질산염은 표준으로 150 ppm을 첨가하고, 전혀 첨가하지 않은 것과 75 ppm첨가한 것을 대조구로 했다. 완성된 유화물은 polyvinyl casing에 충전하고 결찰했다. 열탕에서 중심온도가 65°C에서 30분간 가열처리하고 급냉 후 30°C에 저장하면서 실험재료로 사용했다.

키토산의 첨가

소시지에 첨가하는 키토산은 분자량 약 120 kDa과 30 kDa의 것은 0.3%의 절산용액에 용해한 후 pH 5.5로 조절하여 첨가했고, 분자량 약 5 kDa과 1 kDa의 키토산은 증류수에 용해하여 pH 5.5로 조절해서 첨가했다 소시지에 첨가량은 최종농도 0.20%, 0.35% 그리고 0.50%로 했다.

소시지의 보존성

제조한 유화형 소시지를 30°C에서 7일간 저장하면서 검체를 채취하여 생균수를 측정했다 생균수는 각 시료 1 g을 무균적으로 채취하고 멸균한 phosphate buffered saline용액(pH 7.4) 9 mL을 첨가하여 균질(AM-7, Ace homogenizer, Nihonseiki, Japan)한 다음, 10배 희석법으로 희석하여 nutrient agar에 도말하고 30°C에서 24시간 배양한 후 colony수를 측정했다.

키토산의 항균력 측정

키토산 농도별로 Muller Hinton broth(Difco)배지에 첨가하여 축육 소시지의 부패 미생물로 알려져 있는 *E. coli* ATCC25922, *Salmonella enteridis* ATCC13076, *S. typhimurium* ATCC14028, *Listeria innocua* ATCC33090, *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* FPC344, *Bacillus subtilis* KFCC35421, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Pseudomonas aeruginosa*와 부패된 소시지에서 분리한 7종의 균주를 접종하여 30°C에서 48시간 배양하면서, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균에 대한 생육억제효과를 측정했고, paper disk법으로 항균력을 측정했다(25).

결과 및 고찰

키토산의 분자량에 따른 항균성

부패한 축육소시지에서 분리한 7종의 균주와 소시지의 부패에 관여하는 것으로 알려진 7개의 균주에 대해 paper disk법으로 분자량에 따른 키토산의 항균성의 차이를 조사했다. 0.35% 첨가한 경우 분자량 약 1 kDa과 약 5 kDa의 키토산에서는 항균성이 관찰되지 않았다. 그러나 분자량 약 30 kDa과 약 120 kDa의 키토산에서는 강한 항균성이 나타났다(Table 1). 그 중에서도 분자량 약 120 kDa의 키토산에서 *S. typhimurium*, *E. coli*, 분리 균주 중 *ES-2* 그리고 *ES-4*에서 분자량 약 30 kDa의 키토산에서 보다 강한 항균성을 나타내어 분자량 120 kDa에서 가장 강한 항균성을 나타냄을 알 수 있었다. 흡광도로 관찰한 이들 미생물에 대한 키토산의 생육억제효과 결과도 비슷한 경향을 나타냈다(Table 2). 분자량 약 1 kDa의 경우, 모든 균이 0.20% 첨가시에는 생육억제효과가 나타나지 않았으나, 0.35%를 첨가한 경우 4종이 약한 생육억제효과가 나타났다. 또한 분자량 약 5 kDa의 키토산에 있어서도 0.20%를 첨가한 결과 5종의 균에서 약한 생육억제효과가 나타났고, 0.35%의 첨가량에서 10종의 균에서 생육이 억제되었다. 그러나 강한 생육억제가 아니기 때문에 paper disk법에서는 환이 나타나지 않은 것으로 사료된다 한편 분자량 약 30 kDa의 키토산에 있어서는 0.20%의 첨가량에서 모든 균에 생육억제효과가 있었는데 특히 일반적으로 문제가 되는 *E. coli*와 *B. subtilis*는 90% 이상의 생육억제효과를 나타냈고 다른 5종의 균에 대해서도 80% 이상의 생육억제효과를 나타냈다 또한 분자량 약 120 kDa의 키토산에 있어서는 0.20%를 첨가했을 때 10종의 균에서 80% 이상의 생육억제효과를 나타내 가장 생육억제효과가 크게 나타났다. 이와 같은 결과는 키토산 용액의 pH를 5.9~6.0으로 조절한 것이 pH 3.6부근의 것보다 MIC가 높게 나타났다고 한 Yun 등(23)의 보고를 미루어 보아 본 실험에서는 pH

Table 1. Antimicrobial activity of various chitosan by paper disk method

Strains	Low M.W. ¹⁾	1 kDa	5 kDa	High M.W. ²⁾	30 kDa	120 kDa
	control	0.35%	0.35%	control	0.35%	0.35%
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	++	++
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	+	++
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	++	++
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+-
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	+	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	+	++
ES*-1	-	-	-	-	++	++
ES*-2	-	-	-	-	+	++
ES*-3	-	-	-	-	++	++
ES*-4	-	-	-	-	+	++
ES*-5	-	-	-	-	+	+
ES*-6	-	-	-	-	+	+
ES*-7	-	-	-	-	+	+

*The strains were isolated from spoiled emulsion sausages (ES).

-: No clear zone +: Diameter of clear zone <1 mm. ++: Diameter of clear zone >1 mm.

M.W: molecular weight.

¹⁾Get out ion water

²⁾0.3% lactic acid solution

Table 2. Inhibitory effect of chitosan against some spoilage bacteria in sausage

Strains	1 kDa			5 kDa			30 kDa			120 kDa		
	0.20%	0.35%	0.50%	0.20%	0.35%	0.50%	0.20%	0.35%	0.50%	0.20%	0.35%	0.50%
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	88.8	89.0	88.4	89.5	90.1	89.7
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	12.4	16.7	77.8	86.0	93.8	84.0	93.4	93.6
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	86.9	86.7	86.4	87.7	97.9	87.6
<i>L. innocua</i>	-	36.9	19.0	37.4	49.7	50.9	85.1	84.8	84.2	84.4	83.9	83.1
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	6.0	19.1	94.6	94.3	94.4	95.2	95.0	94.7
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	48.1	84.0	88.0	88.1	87.9	89.5	89.1	88.6
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	29.2	92.9	92.3	82.7	92.6	93.6	93.2	93.0
ES*-1	-	82.6	82.1	85.4	82.9	80.2	78.5	81.6	81.9	82.9	83.4	82.8
ES*-2	-	77.3	81.9	86.1	85.3	83.6	78.1	84.8	83.3	86.0	84.2	84.8
ES*-3	-	-	46.9	73.7	70.6	68.6	76.3	74.0	76.0	79.6	79.4	78.9
ES*-4	-	-	64.6	-	78.7	76.8	66.8	75.8	75.8	77.1	77.0	79.3
ES*-5	-	86.8	87.8	89.6	89.5	87.9	81.1	84.7	86.7	87.3	86.3	87.9
ES*-6	-	-	-	-	-	64.8	37.2	78.6	81.3	79.2	80.8	79.9
ES*-7	-	-	-	-	-	10.9	69.7	66.7	63.1	72.7	72.6	70.5

Inhibition rate was indicated by percentage as follow. % = [1 - culture of chitosan(OD₆₀₀)/control(OD₆₀₀)] × 100

The strains were incubated on Mueller Hinton broth at 30°C for 48 hr

*: The strains were isolated from spoiled emulsion sausages.

-: Not detected inhibitory effect.

를 55로 조절했기 때문에 균의 생육억제에 필요한 키토산의 농도가 높아진 것으로 볼 수 있다. 그러나 키토산의 분자량이 36 kDa과 54 kDa보다 94 kDa이 항균효과가 떨어진다고 한 보고(23)와는 차이가 있었다.

키토산의 분자량에 따른 소시지의 보존성

유화형 소시지 제조시 키토산을 첨가하여 보존성의 차이를 실험했다. 저온 살균 처리한 소시지를 30°C에 저장하면서 생균수를 측정했다. 아질산염을 75 ppm첨가하고 키토산 0.20%를 첨가한 결과, 분자량 약 1 kDa과 5 kDa의 경우 약간의 보존효과를 나타냈는데 비해 분자량

약 30 kDa과 120 kDa의 키토산의 경우는 비교적 강한 보존효과를 나타냈다. 특히 분자량 약 120 kDa의 키토산을 첨가한 경우는 아질산염 150 ppm을 첨가한 것과 동일한 보존효과를 나타냈다(Fig. 1) 아질산염을 전혀 첨가하지 않고 키토산 0.50%만으로 보존효과를 관찰한 결과(Fig. 2), 분자량 약 1 kDa과 5 kDa의 경우에 있어서는 거의 보존효과가 없었으나, 분자량 약 30 kDa과 120 kDa의 경우에 있어서는 높은 보존효과가 나타났다. 분자량 약 30 kDa과 120 kDa의 키토산을 0.50% 첨가하면 아질산염의 보존효과를 거의 대체할 수 있었다. 그러나 분자량 약 120 kDa의 키토산을 0.50%정도 첨가하면 키토산

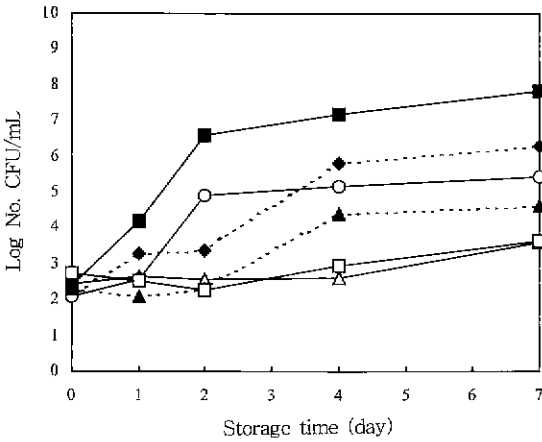


Fig. 1. Changes in total bacterial cell count of the sausage prepared with different molecular weights of chitosan.

- Blank (Chitosan 0%+Nitrite 0 ppm)
- △ Standard (Chitosan 0%+Nitrite 150 ppm)
- ◆ 1 kDa Chitosan (0.2%)+Nitrite (75 ppm)
- 5 kDa Chitosan (0.2%)+Nitrite (75 ppm)
- ▲ 30 kDa Chitosan (0.2%)+Nitrite (75 ppm)
- 120 kDa Chitosan (0.2%)+Nitrite (75 ppm)

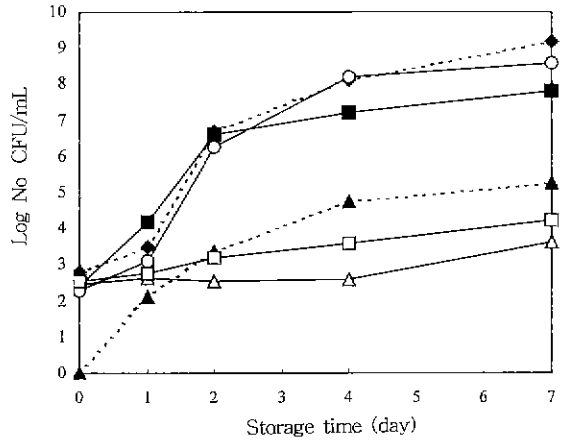


Fig. 2. Changes in total bacterial cell count of the sausage prepared with different molecular weights of chitosan.

- Blank (Chitosan 0%+Nitrite 0 ppm)
- △ Standard (Chitosan 0%+Nitrite 150 ppm)
- ◆ 1 kDa Chitosan (0.5%)+Nitrite (0 ppm)
- 5 kDa Chitosan (0.5%)+Nitrite (0 ppm)
- ▲ 30 kDa Chitosan (0.5%)+Nitrite (0 ppm)
- 120 kDa Chitosan (0.5%)+Nitrite (0 ppm)

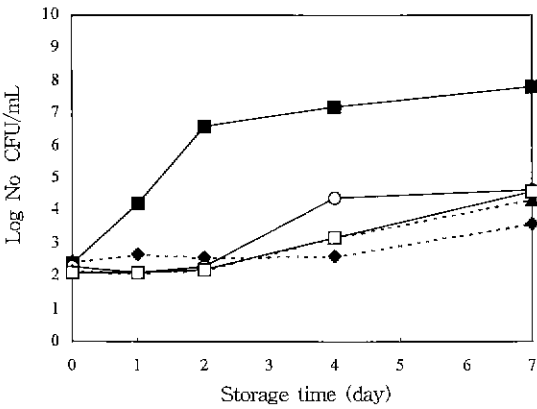


Fig. 3. Effect of the addition level of chitosan (30 kDa) on total bacterial cell count of the sausage.

- Blank (Chitosan 0%+Nitrite 0 ppm)
- ◆ Standard (Chitosan 0%+Nitrite 150 ppm)
- Chitosan (0.20%)+Nitrite (75 ppm)
- ▲ Chitosan (0.35%)+Nitrite (75 ppm)
- Chitosan (0.50%)+Nitrite (75 ppm)

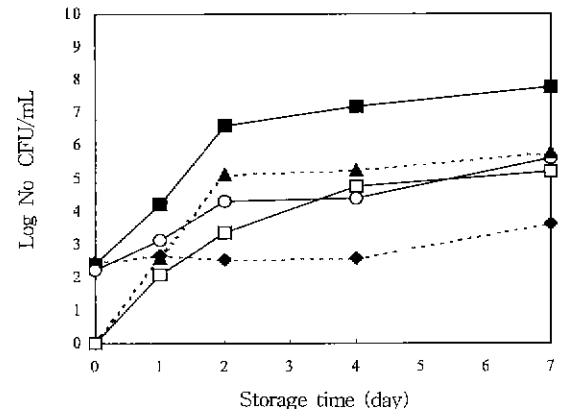


Fig. 4. Effect of the addition level of chitosan (30 kDa) on bacterial cell count of the sausage.

- Blank (Chitosan 0%+Nitrite 0 ppm)
- ◆ Standard (Chitosan 0%+Nitrite 150 ppm)
- Chitosan (0.20%)+Nitrite (0 ppm)
- ▲ Chitosan (0.35%)+Nitrite (0 ppm)
- Chitosan (0.50%)+Nitrite (0 ppm)

용액의 점도가 높기 때문에 소시지의 물성 및 유향 안정성을 나쁘게 하는 경향이 있으므로(26), 실제 소시지에 첨가하기는 어려움이 있다. 따라서 분자량 약 30 kDa 키토산의 첨가량에 따른 보존효과를 조사한 결과(Fig. 3), 아질산염을 75 ppm 첨가했을 때 키토산 0.20% 이상의 첨가량에서 거의 비슷한 안정된 보존성을 나타냈으나, 0.35% 이상의 첨가시료에서 탁월한 보존효과를 나타냈다. 아질산염을 전혀 첨가하지 않은 상태에서는 분자량 약 30 kDa의 키토산 만으로는 아질산염을 150 ppm 첨가한 것과 같

은 보존효과를 나타내지는 못했으나, 0.20% 이상의 첨가량에서는 거의 일정한 보존효과를 나타내 30°C의 온도에서 7일간 저장해도 소시지는 부패하지 않았다(Fig. 4). 유향형 소시지는 가열처리하여 유통·저장하는 제품으로 전보(27)에서와 같이 소시지의 부패에 관여하는 균들은 대개 그람 양성균들이다. 이는 그람 음성균들은 열에 민감하여 가열처리한 제품에는 존재하기 어렵기 때문인데, 키토산은 균의 세포벽에 작용하여 생육을 억제한다는 보고(28)를 고려할 때, 세포벽이 비교적 간단한 그람

양성균에 대해서 키토산의 생육억제효과가 높게 나타나 (23) 소시지와 같은 가열식품의 보존성을 향상시키는 목적으로 이용하기 적합하다고 사료된다.

요 약

가열소시지의 부패에 관여하는 균에 대한 항균성은 키토산의 분자량이 클수록 높은 것으로 나타났다. 즉, 분자량 약 1 kDa과 5 kDa의 키토산은 약한 항균성을 나타냈으나 30 kDa과 120 kDa의 키토산은 강한 항균성을 나타냈는데, 그 중에서도 특히 분자량 약 120 kDa의 키토산이 가장 강한 항균성을 나타냈다. 키토산을 첨가하여 제조한 유헴형 소시지를 30°C에 보존하면서 보존성을 관찰한 결과, 분자량 약 30 kDa과 120 kDa의 키토산을 첨가한 경우 높은 보존효과를 나타냈다 특히 분자량 약 120 kDa의 키토산을 0.5%첨가한 경우는 아질산염을 완전히 대체하는 보존효과를 나타냈다. 또한 분자량 약 30 kDa의 키토산을 0.2%이상 첨가하고 아질산염을 75 ppm 첨가하면 거의 완전한 보존효과를 나타냈고, 아질산염을 전혀 첨가하지 않아도 상당히 강한 보존효과를 나타내어 30°C에서 7일간 저장해도 부패되지 않았다. 본 실험의 결과 키토산의 항균성 및 보존효과는 분자량이 클수록 우수하여, 소시지와 같은 가열 식품에 있어 분자량 약 30 kDa이상의 키토산을 첨가하면 보존성을 향상시키는 데 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1 The Agriculture, Fisheries & Livestock News. Korea Food Yearbook (1997)
2. Cassens, R.G. : Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol.*, **49**, 72-115 (1995)
- 3 Cassens, R.G., Greaser, M.L., Ito, T. and Lee, M. : Reaction of nitrite in meat *Food Technol.*, **19**, 46-57 (1979)
- 4 Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C. : Biogenic amine souces in cooked cured shoulder pork. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3097-3101 (1996)
5. *Official Book for Food*. Korean Food & Drug Administration, p.200 (1999)
6. Sudarshan, N.R., Hoover, D.G. and Knorr, D. : Antimicrobial action of chitosan. *Food Biotech.*, **6**, 257-272 (1992)
- 7 Uchida, Y. : Antibacterial activities of chitin and chitosan. *Jpn. Food Chem.*, **4**, 22-29 (1988)
- 8 Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. : Chitin : New facets of research. *Science*, **212**, 749-753 (1981)
9. Knorr, D. : Use of chitinous polymers in food - A challenge for food research and development. *Food Technol.*, **38**, 85-97 (1984)
10. Chang, D.S., Cho, H.R., Goo, H.Y. and Choe, W.K. : A development of food preservation with the waste of crab processing. *Bull. Korean Fish Soc.*, **22**, 70-78 (1989)
11. Wang, G.H. : Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J. Food Protection*, **55**, 916-919 (1992)

12. Tsai, G.J. and Su, W.H. : Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Protection*, **62**, 239-243 (1999)
13. Roller, S. and Covill, N. : The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. *J. Food Protection*, **63**, 202-209 (2000)
14. Rhoades, J. and Roller, S. : Antimicrobial actions of de-graded and negative chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 80-86 (2000)
15. Allan, C.R. and Hadwiger, L.A. : The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.*, **3**, 285-287 (1979)
16. Fang, S.W., Li, C.J. and Shin, Y.C. : Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *J. Food Protection*, **56**, 136-140 (1994)
17. El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A. and Benhamou, N. : Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens' induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycol. Res.*, **96**, 769-779 (1992)
18. Darmadji, P. and Izumimoto, M. : Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Sci.*, **38**, 243-254 (1994)
19. Darmadji, P. and Izumimoto, M. : Effect of chitosan and nitrite on the properties of fermented meat. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **65**, 639-646 (1994)
20. El Ghaouth, A., Arul, J., Grenre, J. and Asselin, A. : Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruit. *Phytopathology*, **82**, 398-402 (1992)
21. Hadwiger, L.A., Fristensky, B. and Riggelman, R.C. : Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interaction, increase crop yields. In *Chitin, chitosan and related enzymes*, Zikakis, J.P. (ed.), Academic Press, New York, p.291-302 (1984)
22. Walker-Simmons, M., Hadwiger, L.A. and Ryan, C.A. : Chitosan and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 194-199 (1983)
23. Yun, Y.S., Kim, K.S. and Lee, Y.N. : Antibacterial and antifungal effect of chitosan. *J. Chitin Chitosan*, **4**, 8-14 (1999)
24. Kim, S.K., Jeon, Y.J. and Zan, H.C. : Antibacterial effect of chitooligosaccharides with different molecular weights prepared using membrane bioreactor. *J. Chitin Chitosan*, **5**, 1-8 (2000)
25. Zarka, L.L. : Spice and herbs, Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*, **9**, 97-100 (1998)
26. Youn, S.K., Park, S.M., Kim, Y.J. and Ahn, D.H. : Effect on storage property and quality in meat sausage by added chitosan. *J. Chitin Chitosan*, **4**, 189-195 (1999)
27. Park, S.M., Youn, S.K., Kim, H.J. and Ahn, D.H. : Studies on the improvement of storage property in meat sausage using chitosan - I. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 167-171 (1999)
28. Leuba, J.L. and Stossel, P. : Chitosan and other polyamines: antifungal activity and interaction with biological membranes. In *Chitin in nature and technology* Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G. (eds). Plenum Press, New York. p.215-221 (1986)