

밤나무 잎의 항미생물 효과 및 활성물질

최 옥 범

전북과학대학 호텔조리영양과

Active Compounds and Antimicrobial Effects from *Castanea crenata* Leaf

Ok-Beom Choi

Dept. of Hotel Culinary Arts and Nutrition, Jeonbuk Science College, Jeongup 580-712, Korea

Abstract

Antimicrobial effects of the extracts from *Castanea crenata* leaf were investigated. The antimicrobial effects of methanol extract (8 mg, 20 mg) of 0.2 g and 0.5 g. eq. of *Castanea crenata* leaf was stronger than that of 0.65 mg of benzoic acid against Gram(+) bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* and Gram(-) bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Growth inhibition of various microorganisms was observed in *Castanea crenata* leaf, therefor the *Castanea crenata* leaf were solvent fractionated. The ethyl acetate-soluble acidic and phenolic fraction were showed remarkable antimicrobial activity against microorganisms tested. The acidic fraction was purified with silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC, subsequently. The antimicrobial active substance isolated from the acid fraction of *Castanea crenata* leaf was characterized as stigmast-5-en-3-ol(β -sitosterol) by MS and NMR analysis.

Key words : *Castanea crenata* leaf extracts, antimicrobial effects, stigmast-5-en-3-ol (β -sitosterol)

서 론

식품은 원료의 채취에서부터 가공, 저장 및 유통단계에 이르기까지 다양한 요소들이 작용하여 생물화학적 변화를 일으켜 저장성이나 안전성에 문제를 주고 있다. 이중 특히 미생물에 의한 식품 및 원료의 부패는 품질과 저장기간을 결정하는 중요한 요소일 뿐만 아니라 이들로부터 생성되는 각종 미생물과 독소물질은 식중독을 포함한 여러 병리적인 해를 유발하여 건강에 심각한 장애를 일으키는 것으로 나타나 있다. 따라서 미생물의 영향에 의한 품질의 저하와 부패를 억제하여 보존 및 안전성을 향상시키기 위한 다

양한 방법들이 오래 전부터 연구되어 왔으며, 가열, 건조, 냉동 등의 물리적인 방법과 미생물을 이용한 발효, 보존료의 첨가, 마이크로파나 방사선 조사를 이용한 살균 및 포장재의 개선, 기체조절 등의 다양한 방법이 이용되고 있다¹⁻⁵⁾. 이들 중 사용의 편의성과 경제성, 효과 면에서 가장 널리 사용되고 있는 방법은 전통적으로 항미생물 작용을 가지는 것으로 알려진 식염, 당, 식초, 훈연물질, 식물성분 및 보존료 등을 사용하여 미생물의 작용을 효과적으로 억제하는 방법이다.

그러나 최근 소비자의 식품에 대한 선호도가 보다 안전하고 건강지향적인 경향으로 변화하고 있어 당과 염이 많이 함유된 식품은 그들의 건강에 문제를 유발

† Corresponding author : Ok-Beom Choi, Department of Hotel Culinary Arts and Nutrition, Jeonbuk Science College, 9-28 Jeongup, Jeonbuk 580-712, Korea.

Tel : +82-63-530-9105, E-mail : okbeom@jbsc.ac.kr

할 수 있을 것으로 인식하고 있고, 첨가물 및 화학적 합성품이 가해지지 않은 자연식품이나 최소가공식품(minimally processed food)⁶⁾을 선호하는 경향이 두드러지고 있다. 또한 식품에 가장 널리 사용되고 있는 보존료는 대부분이 화학적 합성품으로 이들은 인체에 독성을 일으키거나 지속적인 섭취에 의한 체내 축적으로 발암, 돌연변이 유발, 만성 독성을 나타내며, 최근 내분비계 교란물질 흔히 말하는 환경호르몬으로 작용할 수 있는 가능성이 제기되고 있어 이들의 기피 현상이 두드러지고 있다⁷⁾. 이에 따라 식품산업 및 학계에서는 안전성이 확보되고 보다 효과가 우수한 보존료의 개발에 관심이 집중되고 있으며, 특히 천연물로부터 이들을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다^{8~10)}.

일반적으로 자연계에 존재하는 동·식물 및 미생물 등은 외부 자극에 대한 생체내의 반응 물질이나 대사 물질, 구성 성분으로 다양한 생리 활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 중 항미생물 효과를 나타내는 물질로는 향신료로 널리 이용되어온 마늘, 생강 등의 추출물과 오미자, 대추, 감초 등의 한약재 및 버섯류, 다양한 식물의 추출물, 동물의 세포핵에서 얻어지는 단백질의 일종인 protamines, histone 등의 세포핵 염기성 단백질, 자연계에 널리 존재하는 천연의 염기성 고분자 다당류인 키틴 및 키토산뿐만 아니라 수산물 및 해조류에서도 항미생물 효과가 있는 물질이 보고되고 있다. 그 외 lysozyme 등의 효소류, 각종 유기산류와 우리가 일상에서 널리 이용하고 있는 과일, 채소류에서도 이들 물질의 존재가 확인되고 있다^{11~14)}. 또한 최근에는 박테리아가 생산하는 항균 peptide인 nisin 등의 bacteriocin과 polylysine, 유산균 등 미생물이 생산하는 항균물질들이 안전성을 확보할 수 있다는 점에서 식품첨가물로의 이용성에 관심이 모아지고 있다^{15~19)}. 따라서 추후 보존료에 대한 연구는 자연계에 존재하는 천연물 성분 및 미생물이 생산하는 물질 등 보다 안전성을 확보할 수 있는 쪽으로 초점이 맞추어질 것으로 보이며, 국내에서도 이들 물질의 확보를 위해 다양한 식물 및 부산물 등 다양한 자원에 대한 검색과 이들 물질의 추출, 정제방법의 확립, 추출물의 분리·동정 및 대량 생산, 안전성 검사 등 많은 부분에 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

이에 본 연구자는 천연물로부터 항미생물 활성을 갖는 물질의 분석 및 동정을 통해 식품이나 동물 또는 어패류 양식장의 어병 치료제 등에 적용하는 방법을 연구하던 중 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있는 식물로 주로 과실을 수확하여 식용하거나 일부를 한약재 및 양금 등의 가공식품으로 이용하고 있

는 밤나무가 과실 이외에도 수피, 뿌리, 꽃, 잎을 달인 액이나 분말은 창상 및 염증의 치료에 효과가 있고, 특히 잎은 알레르기 억제제나 창상에 효과가 있어 민간약^{20,21)}으로 사용해온 것에 주목하여, 밤나무 잎의 항미생물 효과를 검색하고 이에 함유된 물질 규명을 시도하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 밤나무(*Castanea crenata* S. et Z.) 잎은 전라남도 순천시 야산에서 자생하고 있는 밤나무에서 잎이 여리지 않고 또한 경화되지 않은 5월 하순에 엽장 14cm× 엽폭 5cm 크기로 채취하여 잎자루를 제거하고 수분 5% 이하로 음건하여 시료로 하였다.

2. 시료의 추출 및 조제

건조한 밤나무 잎 1 kg을 5 L의 *n*-hexane에 하룻밤 침지시킨 후 homogenizer로 마쇄하여 재차 추출한 다음 Whatman No. 2와 G₃ glass filter로 여과하였다. 여과 후 남은 잔사를 다시 EtOAc 5 L와 MeOH 5 L를 가해 동일한 방법으로 추출하여 여과한 다음, 각각의 여액을 cooling aspirator가 장치된 vacuum evaporator를 사용하여 37°C에서 감압농축한 후 얻어진 *n*-hexane, EtOAc, MeOH 추출물의 항미생물 활성을 검정하였다.

3. 항미생물 활성 측정

항미생물 활성의 측정은 paper disc법^{22,23)}으로 실시하였다. Pour-plate method에 의해 45°C로 조절된 각각의 멸균배지 15 mL에 검정에 사용된 각 미생물의 전배양액 0.1 mL를 혼합시킨 후 petri dish에 넣고 응고시켰다. 다음 일정량의 시료를 흡착시킨 후 용매를 제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85%의 식염수 75 µL로 확산시킨 다음, 세균 중 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1628은 37°C에서 16시간, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *Leuconostoc mesenteroides* KCTC 3100, *Vibrio vulnificus* CDC C7184는 30°C에서 16시간, 효모 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1850와 *Candida albicans* ATCC 10231은 30°C에서 16시간 배양하여 clear zone의 크기(mm)로 활성을 측정하였으며, 대조구로 benzoic acid를 사용하였다. 이때 활성 검

정을 위해 사용된 미생물은 해당조건에서 3회 반복하여 전배양을 실시한 후 접종균주로 사용하였으며, 사용된 배지는 세균의 경우, *S. mutans*는 BHI배지(Difco), *V. vulnificus*는 LB 배지(Difco), 젖산균은 Lactobacilli MRS 배지(Difco)였으며, 그 밖의 세균은 Nutrient 배지(Difco)를 사용하였고, 효모는 YM 배지(Difco)를 사용하였다.

4. 활성 성분의 정제

1) 용매 분획에 의한 정제

MeOH 추출물을 농축하여 MeOH을 완전히 제거한 뒤 EtOAc와 buffer 용액(0.2 M Na₂HPO₄-0.2 M NaH₂PO₄, pH 7.5)으로 수상(buffer fraction)과 중성획분(EtOAc-soluble neutral fraction)으로 분획하였다. 수상획분을 0.1 M HCl을 이용하여 pH 3.0으로 조절한 뒤 다시 EtOAc로 분배하여 산성 획분(EtOAc-soluble acidic fraction)과 수용액획분(aqueous fraction)을 얻은 후 이들 중성 획분, 산성 획분, 수용액 획분에 대하여 항미생물 활성을 검정하였다.

2) Silica Gel Absorption Column Chromatography에 의한 정제

시료의 약 10배량에 상당하는 silica gel을 EtOAc로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, MeOH-EtOAc 용매계로 MeOH 농도를 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법으로 분획하여 활성을 검정하였다. 또한, 시료의 약 10배량에 상당하는 silica gel을 CHCl₃으로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, MeOH-CHCl₃ 용매계로 MeOH 농도를 단계적으로 증가시켜 용출 분획한 다음 활성을 검정하였다.

3) Sephadex LH-20 Column Chromatography에 의한 정제

Sephadex LH-20(25~100 mesh, Pharmacia사)을 MeOH-CHCl₃(4:1, V/V) 용매계로 하룻밤 팽윤시킨 후, column(3.3×100 cm, bed volume 1,000 mL)에 충전하고 동 용매계를 사용하여 용출 분획한 다음 활성을 검정하였다.

4) HPLC에 의한 정제

시료를 filter(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2 μm)로 여과한 후, Delta-pak C₁₈ column(1.9×30.0 cm)과 80% MeOH을 이용하여 용출 분획하였으며, 이때 사용한 HPLC의 조건은 Waters associates model 510, Waters 486 UV detector, Wave length 210 nm, MeOH-H₂O

(80:20, V/V)용매계, Delta-pak C₁₈ column (φ 1.9 ×30.0 cm), Flow rate 9.0mL/min 이었으며, 동조건에서 Radial-pak C₁₈ column(8×100 mm)으로 70%와 60% MeOH 용매를 사용하여 재차 정제하였다.

5. 활성 물질의 구조 분석

정제된 활성물질의 구조를 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, HMBC 등의 기기분석을 통해 분석하였다. 활성물질을 직접주입구(Direct injection port, DIP)가 장치된 MS (JMS-DX 302 WA, Jeol, Japan)를 이용하여 EI-MS(electron impact mass spectrometry)로 분석하였으며, 조건은 Jeol JMS-DX 302 WA mass spectrometer, Ion Source chamber Temp. 200 °C, Scanning Mass Range 50~500m/z, Ionizing Voltage 70 eV였다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR 분석은 Jeol JNM-L 500 [399.95 MHz (¹H), 94.45 MHz (¹³C)] NMR기기를 사용하였고 용매는 CDCl₃를, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였으며, ¹H, ¹³C NMR data외에 DEPT (Distortionless enhancement by polarization transfer), 2D-NMR, ¹³C-¹H COSY (Shift correlated spectroscopy), ¹H-¹H COSY, HMBC (¹H-detected multiple-bond hetero nuclear multiple quantum coherence spectrum) data를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 항미생물 효과

밤나무 잎 추출물의 항미생물 활성은 항균활성 물질의 검정법으로 확립된 paper disc법으로 시료를 각각 *n*-hexane, EtOAc, MeOH로 순차 추출하여 정제한 다음 각각의 추출물에서 항미생물 활성을 측정하였다. 그 결과 MeOH 추출물에 대부분 활성이 집중되는 것으로 나타나 밤잎차 0.2 g, 0.5 g에 해당하는 (시료 1 g당 수율 ≍ 0.19 g, 0.21 g) MeOH 추출물 8 mg과 20 mg으로 13종의 미생물에 대해 생육 저해 활성을 측정한 결과, Table 1에 제시한 바와 같이 Gram 양성 세균 중에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 대조구로 사용한 benzoic acid 0.65 mg보다 강한 활성이 나타났고, *M. luteus*와 *L. mesenteroides*, *B. subtilis*에서도 활성이 인정되었으며, Gram 음성 세균인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*에서도 강한 활성이 나타났다. 그외 *S. mutans*를 비롯한 몇몇 균주와 효모에서는 활성이 미약하였지만 비교적 넓은 항균 spectra를 나타내 밤나무 잎에 항미생물 효과가 확인되었다.

2. 활성 성분의 정제

Table 1. Antimicrobial activity of MeOH extract from extracts of *Castanea crenata* leaf

Microorganism	Clear zone (mm)		
	¹⁾ Extracts		²⁾ B.A.
	0.2 g	0.5 g	0.65 mg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5638	³⁾ 12.2±0.3	15.3±0.6	13.7±0.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	⁴⁾ —	15.2±0.3	14.7±0.6
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	—	13.7±0.6	12.7±0.6
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	11.5±0.5	15.7±0.6	12.0±1.0
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3104	12.0±0.5	13.7±0.6	12.0±0.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100	12.3±0.6	16.3±0.6	11.7±0.6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	12.7±0.6	15.3±0.6	12.7±0.6
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	11.2±0.3	16.3±0.3	11.7±0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1628	12.7±0.6	16.7±0.3	13.0±0.5
<i>Vibrio vulnificus</i> CDC C7184	—	11.3±0.6	11.7±0.6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11.7±0.6	16.3±0.6	12.7±0.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1850	11.0±0.0	12.3±0.6	13.7±0.6

¹⁾ *Castanea crenata* leaf extracts(g eq.) /10 mm paper disc, ²⁾ Benzoic acid 0.65 mg/10 mm paper disc.

³⁾ Inhibition value are the mean ±S.D.(n=3), ⁴⁾ No growth inhibition.

활성 물질의 분석을 위해 활성이 집중된 시료 1 kg에서 얻어진 MeOH 추출물 187 g을 용매 분획하여 산성, 중성, 염기성 획분으로 나누고 이들 분획에 대하여 항미생물 활성을 검정한 결과 대부분의 활성이 산성 획분과 중성 획분에서 나타났으며, 중성 획분은 다시 중성과 페놀성 획분으로 분획하여 활성을 확인한 결과 페놀성 획분에서 활성이 인정되었다. 이때 얻어진 산성 획분과 페놀성 획분의 양은 각각 10.85 g과 8.9 g이었으며, 이들 획분 중 산성 획분의 구조 분석을 실시하였다. 용매 분획하여 얻어진 산성 획분(10.85 g)을 CHCl₃-MeOH 혼합 용매계로 silica gel adsorption column chromatography를 실시하여 분획하고 활성을 검정한 결과, CHCl₃-MeOH, 95:5에서 90:10사이의 용매계에서 활성이 집중되어 이를 CHCl₃-EtOAc를 사용하여 re-silica gel adsorption column chromatography를 실시한 결과, CHCl₃-EtOAc(V/V), 95:5와 80:20, 0:100의 세 부분에서 활성을 갖는 분획으로 분리되었다. 이들 중 가장 활성이 강하고 집중된 CHCl₃-EtOAc(V/V), 95:5(69 mg)을 MeOH-CHCl₃(V/V, 4:1) 용매계의 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분획하고 활성을 검정한 결과 bed volume에 대한 elution volume의 비

(Ve/Vt)가 0.64~0.74의 용출획분(23 mg, 980 g fr. wt. eq.)에서 활성이 집중되었으며, 이 활성 획분을 re-Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 재정제하여 13.8 mg(976 g fr. wt. eq.)의 활성 획분을 얻었다. Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 정제된 산성 획분의 활성 분획(13.8 mg)을 농축하여 소량의 MeOH을 가하자 MeOH에 용해되지 않는 비교적 깨끗한 결정성 물질이 분리되었다. 이에 MeOH을 가하여 시료를 더욱 정제한 후 7.8 mg의 CHCl₃가용 물질을 분리해 기기분석을 통해 물질을 분석하였다.

3. 활성 물질의 구조 해석

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리된 CHCl₃ 가용 획분의 활성 본체를 규명하고자 direct probe 방식의 EI-MS 분석을 한 결과(Fig. 1) molecular ion (*rel. int.*)이 base peak로 m/z 414(100)에 나타났으며, 특징적인 fragment ion이 m/z 396(63.4), 329(40.7), 303(33.3), 273(19.8), 213(24.3), 161(18.7)에 나타났다. 이 spectrum으로 NIST library 검색을 실시한 결과(Fig. 2) stigmast-5-en-3-ol의 가능성(NIST entry No. 43367)이 시사되었다.

이에 CDCl_3 를 용매로 $^1\text{H-NMR}$ 을 분석한 결과(Fig. 3), 6개의 Methyl Proton [δ 0.68(3H, s, H-25), 0.82(3H, d, $J=8.5$, H-28), 0.85(3H, d, $J=8.5$, H=27), 0.87(3H, t, overlapped with H-27, H-29), 0.92(3H, d, $J=6.5$, H-26) 1.01(3H, s, H-24)], δ 3.52 위치에 OH를 갖는 C의 proton(proton on hydroxylated carbon, ^1H , m, H-3)의 존재가 확인되었다. 또한 동용매로 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 실시한 결과(Fig. 4) 6개의 methyl carbon [δ 11.8(C-25), 12.0(C-29), 18.8(C-26), 19.0(C-27), 19.4(C-24), 19.8(C-28)], 11개의 methylene carbon [δ 21.0(C-11), 23.0(C-20), 24.3(C-15), 26.0(C-23), 28.2(C-16), 31.6(C-2), 31.9(C-7), 33.9(C-19), 37.2(C-1), 39.7(C-12), 42.2(C-4)], 2개의 olefinic carbon [δ 121.2(C-6), 140.3(C-5)], 1개의 hydroxylated methin carbon [δ 71.3(C-3)], 7개의 methin carbon [δ 29.1(C-22), 31.8(C-8), 36.1(C-18), 45.8(C-21), 50.0(C-9), 56.0(C-17), 56.7(C-14)] 그리고 2개의 quaternary carbon [δ 36.4(C-10), 42.2(C-13)] 등 총 29개의 carbon signal이 관찰되었으며, 이 결과는 DEPT

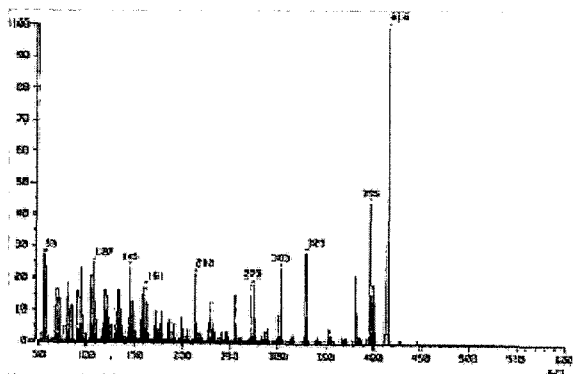


Fig. 1. Direct-EI-MS spectrum of the isolated active substance in *Castanea crenata* leaf(acid fraction).

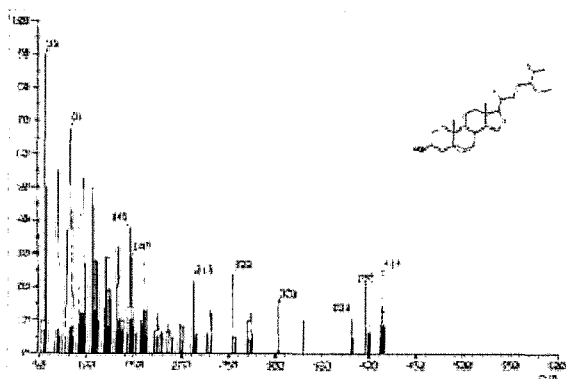


Fig. 2. EI-MS library spectrum of stigmast-5-en-3-ol.

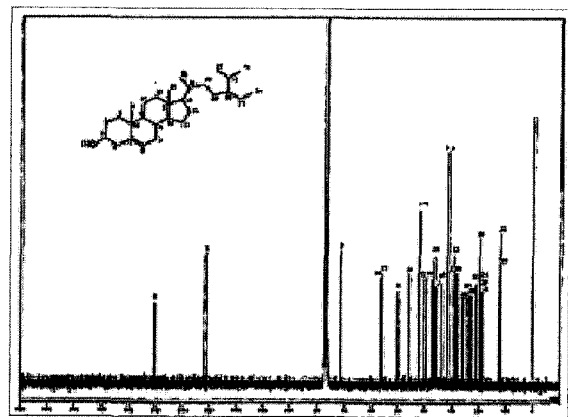


Fig. 3. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of the isolated active substance in *Castanea crenata* leaf(acid fraction) (125.65 MHz, CDCl_3).

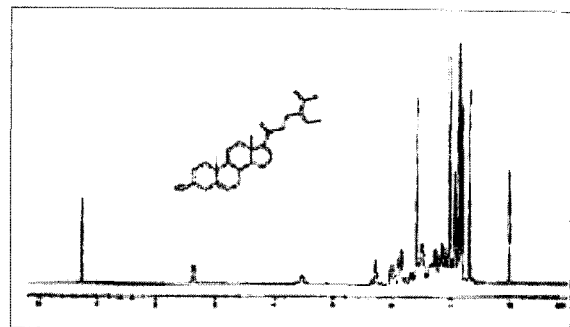


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the isolated active substance in *Castanea crenata* leaf(acid fraction) (500 MHz, CDCl_3).

experiment의 결과와도 일치하였으며, 이 data와 authentic sample의 NMR data를 비교한 결과, 일치하는 것을 확인하여 산성 획분에서 분리된 밤나무 잎 활성물질은 stigmast-5-en-3-ol(β -sitosterol)로 분석되었다.

요 약

밤나무 잎에 함유된 기능성 물질 검색의 일환으로 항미생물 효과를 검정하고 활성물질의 분석을 시도하였다. 예비실험을 통해 추출물의 활성을 확인한 후 시료를 n-hexane, EtOAc, MeOH로 순차 추출하여 정제한 다음 활성이 강한 MeOH 분획의 0.2 g, 0.5 g에 해당하는 추출물로 13종의 미생물에 대해 활성을 측정된 결과, Gram 양성 세균 중에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 대조구로 사용한 benzoic acid보다 강한 활성이 나타났고, *M. luteus*와 *L. mesenteroides*, *B. subtilis*에서도 활성이 인정되었으며, Gram 음성 세균

인 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*에서도 강한 활성이 나타나 밤나무 잎 추출물은 비교적 넓은 항균 spectra와 활성이 있음이 확인되었다. 이에 활성물질을 규명하고자 시료를 solvent fractionation, silica gel adsorption column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, HPLC 등으로 정제하고 활성이 나타난 산성 획분과 페놀성 획분의 물질을 분리한 후 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등으로 분석한 결과, 산성 획분에서는 stigmast-5-en-3-ol(β -sitosterol)이 활성을 갖는 물질로 나타났다.

참고문헌

- Smith, JL, Buchanan, RL and Palumbo, SA. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis(review). *J. Food Prot.* 46:545. 1983
- Munekazu, I, Hironori, T, Masaru, S, Junji, Y, Masayoshi, O, Yasutoshi, O and Teruhisa, F. Flavanones with potent antibacterial activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:892. 1994
- Nellie, G. Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Thesis of M.S., McGill Univ., Montreal, Canada 1993
- Nguyen, VCh, Tadao, K, Hiromichi, K and Masao, F. Antimicrobial activity of Kumazasa(*Sasalbo-marginata*). *Agric. Biol. Chem.* 46:971. 1982
- Gould, GW. Mechanisms of action of food preservation procedures. pp.336-340. Elsevier Applied Sci., New York. 1989
- Hoover, DG. Minimally processed fruits and vegetables(Reducing microbial load) by nonthermal physical treatments. *Food Tech.* 51:66. 1997
- Kadinaal, AFM, Waalkens-Berendsen, DH and Arts, CJM. Pseudo-Oestrogen in the diet: Health benefits and safety concerns. *Trends in Food Sci. Technol.* 8:327-333. 1997
- Larry, RB and David, A. Golden, antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Tech.* 43:134. 1989
- Council for Agr. Sci. and Technol, Naturally occurring antimicrobials in food. Task Force Report, No. 132 (1998)
- Farag, RS, Daw, ZY, Hewedi, FM and El-Baroty, GSA. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, 52:665. 1989
- Farag, RS, Daw, ZY, Hewedi, FM and Abo-Raya, SH. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 54:74. 1989
- Bester, BH and Lombard, SH. Influence of lysozyme on selected bacteria associated with gouda cheese. *J. Food Prot.* 53:306. 1990
- Quattara, B, Simard, RE, Holley, RA, Piette, GJP and Begin, A. Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *J. Food Prot.* 60:246. 1997
- El-Gazzar, FE, Rusul, G and Marth, EH. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different initial pH values. *J. Food Prot.* 50:940. 1987
- Berry, ED, Liewen, MB, Mandigo, RW and Hutkins, RW. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Prot.* 53: 194. 1990
- Spelhaug, SR and Harlander, SK. Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52:856. 1989
- Branen, AL, Go, HC and Genske, RP. Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Food Sci.* 40:446. 1975
- Sadaki, O. The development of functional foods and materials, *Bio Industry* 13:44-50. 1996
- Elliott, M, Jr. Biological properties of plant flavonoids, An overview. *J. Pharmacognosy* 34:344-348. 1996
- Choi, OB, Yoo, GS and Park, KH. The processing of tea with *Castanea crenata* leaves and its chemical composition. *J. Kor. Tea Soc.*, 3:105-115. 1997
- Choi, OB, Kim, KM, Yoo, GS and Park, KH. Anti-allergic effects of *Castanea crenata* leaf tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30:468-471. 1998
- Zaika, LL. Spices and herbs, thier antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safety* 9:97-118. 1988
- Davidson, PM and Parish, ME. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *J. Food Technol.* 43:148-155. 1989

(2005년 10월 28일 접수; 2005년 11월 15일 채택)