

매실추출물의 항균특성

하명희¹ · 박우포² · 이승철³ · 최성길 · 조성환[†]
경상대학교 식품공학과, 농업생명과학연구원, ¹진주보건대학 피부미용과,
²마산대학 식품과학부, ³경남대학교 식품생명공학부

Antimicrobial Characteristic of *Prunus mume* extract

Myung-Hee Ha¹, Woo-Po Park², Seung-Cheol Lee³,
Sung-Gil Choi and Sung-Hwan Cho[†]

Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Department of Cosmetology, Jin Ju Health College, Jinju 660-757, Korea

²Division of Food Science, Masan College, Masan 630-729, Korea

³Division of Food and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

Prunus mume extracts showed antimicrobial effects remarkably against the wide spectrum of putrefactive and food spoilage microorganisms above 250 ppm of concentration. Their thermal and pH stabilities were effective under the range of temperature (40 °C~120 °C) and pH (3~11). *Prunus mume* extracts seemed to be a natural antimicrobial ideally with the view of their effectiveness and thermal & pH stabilities. In addition, their action modes suggested that their hydrophilic components would perturb the functions of microbial cell membranes synergistically.

Key words : *Prunus mume* extracts, antimicrobial effects, thermal and pH stabilities, action modes

서 론

현재까지, 천연항균제로 개발하여 그 적용분야 및 사용 방법을 검토하고 있는 천연항균제로는 식물추출물(1-4), 특정단백질 및 효소류(5,6), lysozyme(7,8), bacteriocin(9,10), 유기산류(11,12), 지방산류(13) 등을 들 수 있다. 이 중, 상품화되어 있는 제품은 lysozyme을 비롯하여 일부식물추출물이 항균제제의 원료성분으로 이용되고 있는 형편이며, 생산체제가 대량화하지 못하고 있는 실정이다. 최근, 매실추출물(*Prunus mume* Sieb. et Zucc. extract:이하 PME라 칭함)의 항균, 항진균 및 항산화 효과가 발표되면서 광범위한 분야에서 탁월한 효과를 나타내고 있다(14). 본인 등도 매실추출물로부터 항균성 물질로 알려진 citric, malic, acetic 및 p-coumaric acid 등의 유기산을 분석하고, 5-hydroxymethyl

furfural, 3-methyl-2,3-furandione 등의 휘발성 항균성분을 분리·동정한 바 있다(15). 천연물에는 우리가 아직 확인하지 못한 여러 성분들이 존재하고, 또한 이미 알고는 있으나, 그 물질의 효용을 제대로 파악치 못하여, 산업화, 실용화가 되지 못하고 있다. 매실도 예외는 아니어서 적어도 수십 가지 이상의 여러 성분들이 복합적으로 이루어져 있으리라 예상은 되지만, 미량 존재하는 여러 가지 성분들의 분리나 효능은 알려진 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 매실추출물의 항균특성을 구명하는 기초적인 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

매실추출물(PME)의 조제

경남지역에서 생산, 재배되고 있는 매실(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)을 수확기에 구입하여 물로 세척한 다음, 적외

[†]Corresponding author. E-mail : sunghcho@gsnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

선이 장치되어 있는 추출실에서 박피하고 제핵한 후, 과육 부만을 500 g 을 수거하여 60~70℃의 건조실에서 30~60 분 동안 순환식 열풍건조기를 사용하여 건조시킨 매실의 과육부를 5℃ 저온실에서 분쇄기로 80~320 mesh 크기로 분쇄하여 추출시료로 사용하였다. 추출 시료에 5 배량의 물을 첨가하고, 균질기(homogenizer)로 균질화하여 한약 추출기 (H-2000, 한일엔지니어링, Korea)에서 3 시간동안 가압·침출시킨 후, 여과하여 1 차 추출하고, 다시 잔사에 5 배량의 물을 가하여 상기와 동일한 방법으로 2 차 추출한 후, 추출액을 합하여 여과지 (Whatman No.2)로 여과하였다. 이 추출여액을 50℃~60℃ water bath상에서 감압·농축하고 5℃의 냉장고에서 하룻밤 방치한 후, 원심분리하여 침전된 불순물을 제거하고 상층의 매실과육추출물을 모아 실험재료로 사용하였다.

항균력 시험균주

본 실험에서 PME의 항균력 검색을 위해 사용한 균주들은 일반적으로 곡류가공식품, 낙농가공식품, 육가공식품, 수산가공식품 및 기타 발효식품의 변질에 관여하는 부패미생물들로서 경상대학교 식품공학과에서 보관중이거나 한국중균협회에서 분양받아 실험에 사용하였다. 곰팡이 및 효모는 potato dextrose agar, 세균은 brain heart infusion agar (BHIA), tryptic soy agar (TSA) 등의 사면배지에 계대배양하여 4℃에 보관하면서 사용하였다.

Table 1. Microorganisms and media used for the primary screening of antimicrobial materials extracted from *Prunus mume* fruits

Bacteria	Fungi & Yeasts
<i>Escherchia coli</i> ATCC 4157	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 26768
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 6958	<i>Collectotrichum fragariae</i> ATCC 58568
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9818	<i>Fusarium oxysporum</i> ATCC 46995
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Saccharomyces cevevisiae</i> ATCC 9763
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 4428	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	

매실추출물의 항균력 검사

항균력 시험은 여러 농도의 PME로 포화시킨 paper disk 를 brain heart infusion agar plate상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 paper disk 확산법(16)을 이용하였다. 즉 tryptic soy agar의 사면에 배양된 공시균주 1 백금이를 취하여 10 mL tryptic soy broth에 접종하고 30℃에서 24 시간 배양한 후, 일정농도로 희석한 후 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5~8 mm BHIA 배지 표면에 접촉하고 도말봉으로 균일하게 도포한 다음, 멸균된 6 mm filter paper disk(Whatman No.2)를 무처

리구인 대조구를 별도로, phosphate buffer로 희석시킨 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 및 1,000 µg/mL 농도의 매실추출물 용액에서 침지 포화시킨 멸균된 6 mm filter paper disk(Whatman No.2)를 BHIA배지위에 올려놓고, 30℃에서 48 시간동안 배양한 후, disk 주위의 생육저해의 직경을 측정하여 항균성을 비교하였다.

PME중 항균물질의 열 및 pH 안정성 조사

항균활성물질의 열안정성을 측정하기 위하여, PME를 40℃에서 120℃의 온도범위 중 일정온도에서 30 분동안 열처리한 후, 시료용액으로 사용하였다. 살균 냉각한 potato dextrose agar 또는 tryptic soy agar 표면에 1,000 µg/mL 농도의 시험용액에 침지한 disk를 올려놓고, paper disk확산법 (16)으로 대조구와 같이 *S. choleraesuis* 및 *Bac. cereus*의 생육저해환을 측정 비교하였다. 또한 pH 안정성은 염산이나 수산화나트륨으로 PME의 pH를 3에서 11까지 조정하고 20 µL씩을 채취하여, 배지위에 일정간격으로 위치한 paper disk에 접촉한 후, 37℃에서 24시간 배양한다음, 열안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정·비교하였다.

PME에 의한 미생물 생육저해 농도 측정

미생물 생육저해농도 측정은 Turbidimetric Assay방법 (17)에 의하여 측정하였다. 즉, PME의 첨가농도별 항균효과를 미생물의 생육정도를 spectrometer(620 nm)로 흡광도를 측정·비교하고, 천연항균소재인 PME만을 넣은 tryptic soy broth배지를 blank로 사용하였다.

PME의 분획화

PME의 친수성 분획은 PME를 10 mM phosphate buffer (pH 7.6) 5배량으로 3회 반복 추출하여 물에 잘 녹는 물질만을 모은 후, 동결건조하고, 1%의 용액이 되게 한 후 사용하였고, 소수성 분획은 PME를 chloroform : MeOH(2 : 1, v/v)의 용액으로 상기한 방법으로 상온에서 추출하고, 그 추출액을 합하여 evaporator로 감압 농축한 후, 동결건조하고, 사용할 때에는 DMSO (dimethyl sulfoxide) 용액으로 잘 현탁하여 사용하였다.

PME처리에 의한 미생물 세포의 전자 현미경학적 형태변화 조사

항균력이 뛰어난 PME의 처리로 인한 미생물의 세포형태 및 기능성 변화를 알아보기 위해 투과전자현미경(TEM : Transmission electron microscope, Hitachi H-600)과 주사전자현미경(SEM : Scanning electron microscope, DS-130C ISI ABT)을 이용하여, 각각 Pyliotis(18) 및 Bendayan(19)의 방법에 준하여 처리전후의 세포 구조를 관찰하였다. β-galactosidase(β-D-galactoside galactohydrolase;

EC 3.2.1. 23)의 정량

PME처리가 미생물 세포막의 기능에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 세포를 파쇄하지 않고, 비교시험구인 toluene 과 PME의 존재시에 *Collectotrichum fragariae*의 β -galactosidase가 정량되는가의 여부를 Miller의 방법(20)에 준하여 살펴보았다. 침출액의 β -galactosidase 효소활성을 측정하여, 증류수를 넣은 경우를 '0'으로 하고 toluene을 넣어준 경우를 '100'으로 하여, PME가 미생물의 세포막기능에 미치는 영향을 비교하였다.

결과 및 고찰

PME의 항균효과

PME의 항균력을 측정하기 위하여 부패성 또는 병원성 공시세균 및 효모에 대한 PME의 항균력 실험결과는 다음과 같다. 즉, 공시균주를 brain heart infusion agar plate상에

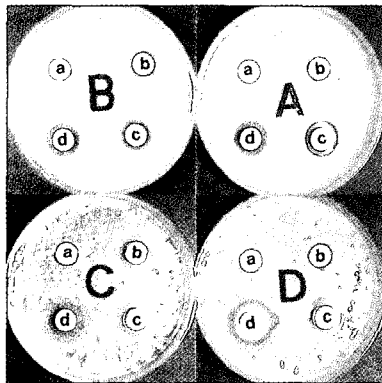


Fig. 1. Inhibitory effect of PME at different concentration on the growth of microorganisms

A : *Bac. cereus*, B : *E. coli*, C : *F. oxysporum*, D : *C. albicans*.
a : Control b : 100 μ g/mL c : 250 μ g/mL d : 500 μ g/mL of PME.

접종하여, 이들 균주에 대한 PME의 항균성을 검토한 결과는 Fig 1 및 Fig 2와 같다. PME 100 ppm 이상의 농도에 침지 처리한 paper disk 주위에는 균의 증식이 억제되어 clear zone을 형성함으로써 PME의 항균력을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. PME는 Gram 양성균, Gram 음성균, 곰팡이 및 효모 등 광범위한 영역의 미생물에 대하여 뚜렷한 생육저해를 보여 항균 및 항진균 작용이 우수한 식품보존료로 이용가능성을 확인해 주었다.

항균물질의 열 및 pH 안정성

PME가 함유하는 항균물질의 열 및 pH의 안정성을 측정한 결과는 Fig 3 및 Fig 4와 같다. 즉, 열안정성 실험결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이, *S. choleraesuis*의 생육저해의 지름은 전처리 온도범위에서 관계없이 생육저해환의 직

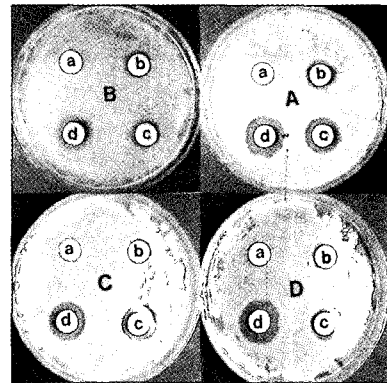


Fig. 2. Inhibitory effect of PME on the growth of microorganisms.

A : *Staphylococcus*, B : *S. choleraeuis*,
C : *Asp. flaves*, D : *S. cerevisiae*.
a : Control b : 100 μ g/mL c : 250 μ g/mL d : 500 μ g/mL of PME.

경이 약 18 mm 정도로 일정하였고, *Bac. cereus*의 경우에도 전처리 온도에 관계없이 약 12 mm로 일정하여 광범위한 처리 온도범위에서 PME 항균성분은 열에 대하여 상당히 안정한 물질임을 알 수 있었다. 아울러, PME 항균성분의

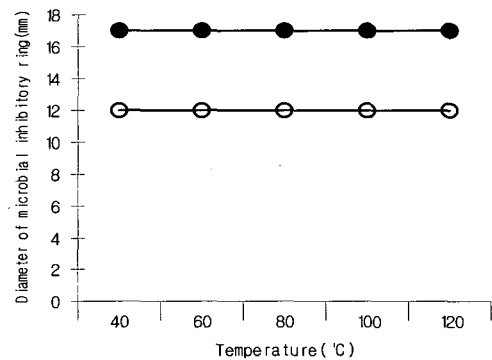


Fig. 3. Thermal stability of PME against the growth of *Salmonella choleraesuis*.

(●-●) and *Bacillus cereus*(○-○).

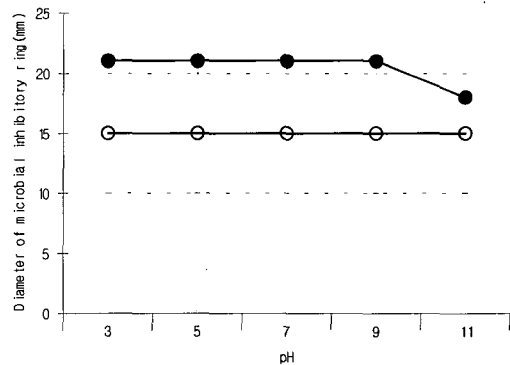


Fig 4. pH stability of PME against the growth of *Salmonella choleraesuis*.

(●-●) and *Bacillus cereus*(○-○).

pH 항균성분의 pH안정성은 Fig. 4 에서 보는 바와 같이, 넓은 pH범위 (pH 3~11)에서 동일한 크기의 생육저해환을 나타내어 pH 안정성을 보였으며, *S. choleraesuis*의 생육저해환의 지름은 pH 11에서 18 mm로 나타났으나, 그 이하 pH범위에서는 약 22 mm정도로 전처리 pH에 관계없이 일정하였고, *Bac. cereus*의 경우, 생육저해환의 지름은 약 15 mm정도로 전처리 pH에 관계없이 일정하게 나타나 PME의 항균활성물질은 넓은 pH범위에서 안정하였다. 이상의 결과를 요약하면 PME의 항균성분은 넓은 온도 범위(40~120℃)와 pH범위(pH 3~11)에서 동일한 생육저해환을 보여 광범위한 영역의 식품원료 및 가공식품에 대해서 PME처리로 뚜렷한 항균효과 및 저장효과를 기대할 수 있었다.

미생물에 대한 생육저해 농도

공시균주인 *Bac. subtilis* 및 *E. coli*에 대한 최소농도의 항균효과를 측정한 결과, Fig. 5 및 Fig. 6 에서 보는 바

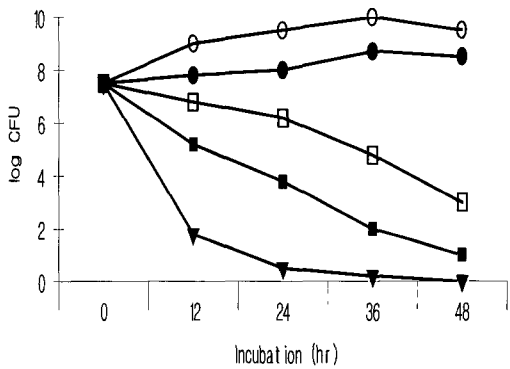


Fig. 5. Growth curve of *Bac. subtilis* on tryptic soy broth added with different concentration of PME.

○—○ : Control, ●—● : 100 µg/mL, □—□ : 250 µg/mL, ■—■ : 500 µg/mL, ▼—▼ : 1,000 µg/mL of PME.

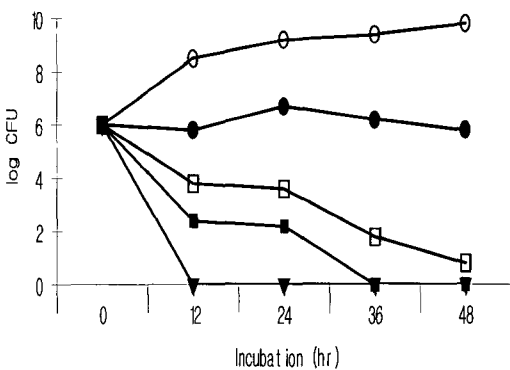


Fig. 6. Growth curve of *E. coli* on tryptic soy broth added with different concentration of PME.

○—○ : Control, ●—● : 100 µg/mL, □—□ : 250 µg/mL, ■—■ : 500 µg/mL, ▼—▼ : 1,000 µg/mL of PME.

와 같이 *Bac. subtilis* 및 *E. coli* 모두 PME농도 100 µg/mL에서는 뚜렷한 저해효과가 확인되지 않았으나, 그 이상의 농도에서는 PME의 농도가 높아질수록 미생물의 생육이 크게 억제되었다. 즉 250 µg/mL 이상의 PME농도에서는 균의 생육이 급격히 억제되어 48시간이후 균의 증식이 거의 중지되었다. 따라서 실험한 두 균주에 대하여 항균효과를 나타내는 최소생육저해농도는 250 µg/mL으로 사료되었다.

전자현미경을 이용한 PME처리 전후의 미생물 세포조직 및 세포형태변화

250 µg/mL의 PME용액으로 처리한 균체세포 및 포자를 처리하지 않은 대조구와 함께 전자현미경검정시료로 조제하여 TEM 및 SEM으로 촬영한 결과는 Fig. 7, Fig. 8 및 Fig. 9와 같다. 즉, Fig. 7 및 Fig. 8에서 보는 바와 같이, TEM에 의한 시료촬영결과, PME용액에 처리한 미생물 균체세포 및 곰팡이 포자는 세포막의 기능이 파괴되어 세포막의 기능이 상실되는 것을 알수 있었고, 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되었으며, 세포막의 삼투조절기능의 상실로 인하여 세포내용이 빈 ghost형태의 사멸균체수가 증가함을 알 수 있었다. 또한, Fig. 9에서 보는 바와 같이, SEM에 의한 시료 촬영결과에서도 PME처리로 미생물 균체가 세포벽 또는 세포막 파괴로 인하여 세포형태의 변화가 뚜렷하게 관찰되었다. 이상의 결과에서 미생물 균체세포에 대한 PME의 항균작용이 탁월함을 확인할 수 있었다. 따라서, 부패성 및 병원성 균주의오염 가능성이 있는 식품을 PME로 예방 처리함으로써 변패성 미생물균주에 의한 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 변패현상을 억제할 수 있을 것으로 추정되었다.

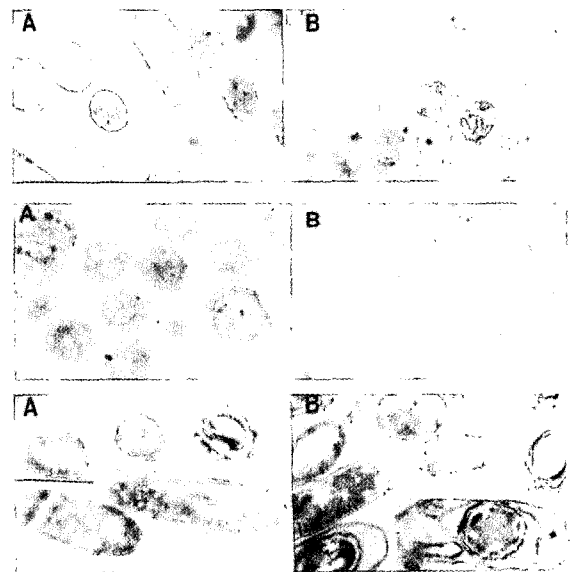


Fig. 7. Transmission electron micrograms of *Escherichia coli*(Top), *Salmonella choleraesuis*(Middle) and *Bacillus subtilis*(Bottom) A : Control, B : PME(250 µg/mL)-treated (Magnification : x17,000)

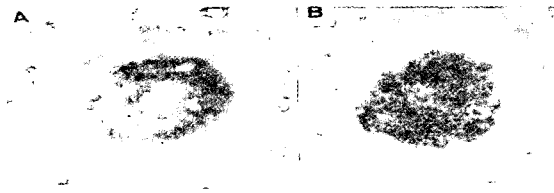


Fig. 8. Transmission electron micrograms of the conidiospore of *Aspergillus flavus*.

A : Control, B : PME(250 µg/mL)-treated (Magnification: x25,000).

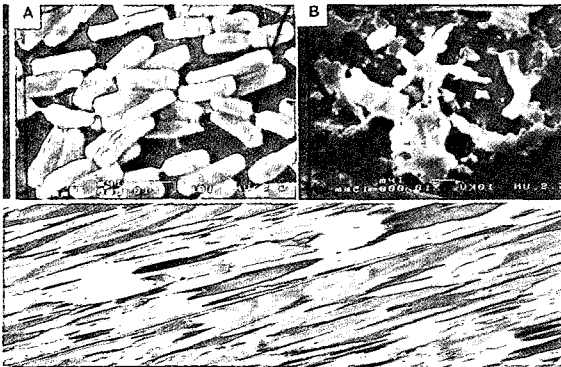


Fig. 9. Scanning electron micrographs of *Listeria monocytogenes* (top) and *Pseudomonas aeruginosa*(bottom).

A : Control, B : PME(250 µg/mL)-treated (Magnification: x10,000).

PME 처리가 미생물 세포막의 기능에 미치는 영향

PME가 세포막에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 먼저 membrane perturbation 시켰을 때, 세포내에 존재하는 β -galactosidase가 세포 외부로 분비되는가의 여부를 조사하였다. 먼저, 시험균주인 *Collectrichum fragariae*가 β -galactosidase를 생성하는가를 확인하기 위하여, IPTG (Isoproyl- β -D-Thiogalactopyranoside)와 X-gal을 가하여 준 배지에서 배양하여 이를 확인하였다(Fig. 10). PME가 세포막 perturbation에 영향을 미치는가를 조사하기 위해 세포를 배양한 후, ONPG(0-Nitrophenyl -D-galactopyranoside)와 세포혼합액에 증류수, toluene, PME 총 추출물, 소수성 및 친수성 분획을 가하여 주었다. β -galactosidase를 생성하는가를 알기 위해 glucose 최소 고체배지 표면에 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galatoside)을 골고루 도포한 후, 대상 균주 한 백금이를 접종하였다. 24시간이 경과한 후 colony의 색깔을 확인함으로써 β -galactoside의 존재 여부를 조사하였다. 측정하고자 하는 효소 β -galactosidase는 균체내에 존재하므로 PME가 세포막에 영향을 주지 않는다면, 증류수를 가하여 준 negative 대조군에서처럼 β -galactosidase의 활성을 나타내지 않으며, 이와는 반대로 세포막에 영향을 주어 세포막이 손상을 받아 β -galactisidase가 세포 밖으로 유출이 되면, toluene을 가하여 준 positive 대조군에서처럼 효소 활성이 검출될 것이다. Fig. 11에 나타낸 바와 같이, 증류수를 가해준 대조군에서의 값을 0으로 하고 toluene을 가하여 준 대조군을 100으로 하였을 때, PME의 총추출물의 경우

72%의 활성이 검출되었다. PME의 소수성 분획은 8%의 활성을 나타내는데 비하여, 친수성 분획은 toluene을 가하여 준 경우보다 더 높은 값을 보여 110%의 활성이 관측되었다. 즉, PME의 친수성 분획은 toluene 보다 세포막을 더 손상시키는 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 전자현미경을 이용한 미생물 세포조직 및 세포형태 변화 실험에서 세포막이 손상을 받았다는 실험 결과(Fig. 7~Fig. 9)와도 일치한다. 이상의 결과로, PME의 항균활성 물질은 친수성인 component에 기인한다는 것을 알았으며, 그 물질의 주요 항균작용은 세포의 membrane perturbation에 기인한 것으로 사료되었다.

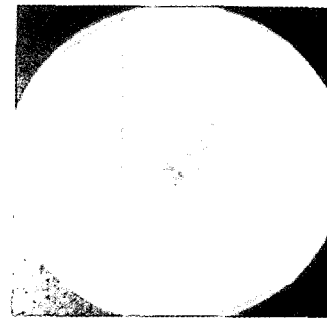


Fig. 10. Confirmation of testing microorganism, *Collectrichum fragariae*, showing β -galactosidase activity.

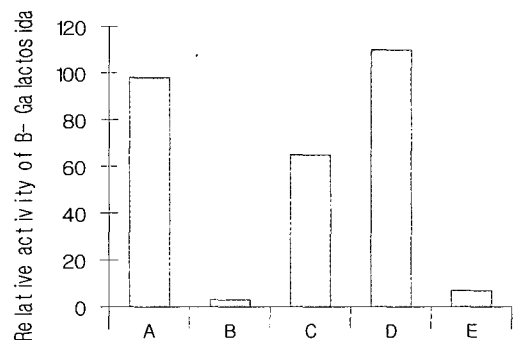


Fig. 11. The effect of PME on the membrane perturbation of *Collectrichum fragariae*. The cells were treated with the reagents ; toluene (A), distilled water (B), PME (0.1%, C), hydrophilic (0.1%, D) and hydrophobic (0.1%, E) fractions of PME in the media containing ONPG as a substrate for β -galactosidase.

요 약

매실추출물의 항균력을 조사한 결과, 250 µg/mL 이상의 농도에서 뚜렷한 항균활성을 보였고, 광역의 병원성 및 부패성 미생물들에 대하여 항균활성을 나타내었다. 또한, 매실추출물의 항균물질은 넓은 범위의 온도(40~120°C) 및

pH(3~11)에서 안정성을 나타냈다. 따라서 매실추출물의 항균물질은 항균활성이 높고, 항균 spectrum이 광범위할 뿐만 아니라, 넓은 범위의 온도 및 pH에 안정하여 이상적인 천연 항균제로서의 개발가능성을 제시하였다. 아울러, 매실추출물의 항균작용을 조사한 결과, 매실추출물에는 두 종류 이상의 항균물질이 존재하며 이 물질들의 상승작용으로 항균활성을 나타냄을 확인하였다. 매실추출물의 항균활성은 친수성 성분임을 확인하였으며, 항균물질의 주요 작용기작은 세포막 perturbation에 기인한 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Briozzo, J., Nunez, L., Chirife, J., Herszage, L. and D' Aquino, M. (1989) Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 69-75
- Adel M. Mahasneh, and Ahmad A. El-Oglah. (1999) Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 271-276
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., and Abo-Raya, S.H. (1989) Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.*, 54, 74-76
- Zaika, L. L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*, 9, 97-102
- Oram, J.D. and Reiter, B. (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron chelating agents. *Biochem. Biophys. Acta.*, 170, 351-355
- Reiter, B. and Hamulv, G. (1984) Lacteroxidase antimicrobial system : National occurrence, biological functions, and practical applications. *J. Food Protect.*, 47, 724-727
- Hughey, V.L. and Johnson, E.A. (1987) Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2165-2169(1987)
- Bester, B.H. and Lombord, S.H. (1990) Influence of lysozyme on selected bacteria associated with gouda cheese. *J. Food Protect.*, 53, 306-312
- Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W., and Hutkins, R.W. (1990) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Protect.*, 53, 194-198
- Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K. (1989) Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Protect.* 52, 856-858
- Freese, E., Sheu, C.W., and Galliers, E. (1973) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321-325
- Anderson, M. E. and Marshall, R. T. (1989) Interaction of concentration and temperature of acetic solution on reduction of various species of microorganism on beef surfaces. *J. Food Protect.*, 52, 312-316
- Park, J.S., Kohmoto, S., and Nishimura, S. (1986) Antifungal properties of some short chain fatty acids against phytopathogenic fungi. *Korean J. Plant Pathol.*, 2, 89-94
- Kim, G.S. (1985) Studies on the antimicrobial activities and substances of *Prunus mume*. Thesis in Ewha Womens' University
- Ha, M.H., Park, W.P., Lee, S.C., and Cho, S.H. (2005) Organic acids and volatile compounds isolated from *Prunus mume* extract. *Korean J. Food Preserv.*, 12, 195-198
- Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 307-310.
- Davidson, P.M. and Parish, M.E. (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 43, 148-155
- Pyliotis, N.A., Withecross, M.J., and Jacobsen, J.V. (1979) Localization of gibberlic acid-induced acid phosphorylase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. *Planta*, 147, 134-142
- Bendayan, M. (1984) Protein-A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications and limitations. *J. Elect. Microsc. Tech.*, 1, 243-270
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., p.352-355.