

양배추 Coleslaw 제조 중 HACCP 설정을 위한 식초를 이용한 *E. coli* 제어

류동걸¹ · 고재민¹ · 박수형² · 안길환^{1*}

Control of *E. coli* in Cabbage during Producing Coleslaw by Vinegar for HACCP

Dongkul Ryu¹ · Jaemin Ko¹ · Suhyoung Park² · Gilhwan An^{1*}

ABSTRACT

Cabbage, the main material of coleslaw was not safely washed because it is uneven and tightly layered. In this study, vinegar was used to control the number of *E. coli* in cabbage for coleslaw production. When cabbage was soaked in 10% acetic acid, The number of bacteria was reduced by 10^{-3} was survived after 5min and 10^{-6} after 30min. After soaking, 15-20% (w/w of cabbage) of 10% acetic acid was remained in chopped cabbage. Spraying 10% acetic acid up to 3% of cabbage weight decreased the number of bacteria by 1/1000 after 60min. Spraying 3% (v/w of cabbage) of vinegar containing 10% acidity decreased the bacteria by 2/3 after 20min but no further decrease was observed. This result indicated that vinegar can be used only in the case that contamination is low.

Key words: Acetic acid, Bacteria, Survival rate, Colony forming unit

1. 서론

1995년 세계무역기구 (World Trade Organization, WTO)가 정식 출범한 이후 식품안전과 관련하여 SPS(Sanitary and Phytosanitary Standards) 협정이 발효됨에 따라 국제적으로 통용할 수 있는 위생기준을 확보할 필요성이 대두되었다. 이에 따라 미국, 캐나다, 유럽, 일본 등 세계 각국에서는 사전 예방적 위생관리제도인 위해요소중점관리기준 (Hazard Analysis Critical Control of Point; HACCP)을 도입하였다.

또한, 식품의 운반과정은 물리적, 화학적, 미생물학적 위해 요인에 노출되기 쉬우므로 이들 위해 요소로부터 식품을 효과적으로 보호하기 위한 노력들이 이어지고 있다. 운반 과정에 대한 별도의 위생관리규정을 두는 것뿐만 아니라 가공이나 기타 업종에 대한 HACCP을 위한 사전 요건 중의 하나로 규정하고 있거나 HACCP의 한 부분으로 보는 경향이 강하다. 세계 각국은 자국의 위생관련법 혹은 별도의 지침서를 통해 식품 운반업에 관련된 종사자들이 식품의 운반과정 중 위생관리를 자연스럽게 실천할 수 있도록 유도하고 있다(Kim et al., 2009).

이러한 식품의 안전성과 동반하여 식품의 기능성이 함께 주목 받고 있다. 소비자들의 스스로의 식품에 대한 인식변화가 건강을 위한 전 세계적인 웰빙 열풍으로 이어져 과채류의 소비가 급증하고 있다(US GAO 2002). 그 이유는 비타민, 무기질, 섬유소, 항산화제 등의 주요 공급원 식품이며, 체중 조절에도 중요한 몫을 차지하고 있기 때문이다. 또한 과채류의 섭취가 심혈관계나 관상동맥 질환으로 인한 질병 및 사망률의 감소효과 등 건강상의 많은 도움을 준다. 이러한 장점이 부각되면서 샐러드는 국민 대다수가 즐겨 먹는 식품으로 자리매김 하고 있다. 바쁜 일상과 가족 수의 감소 등 생활 패턴의 변화로 소비자들이 원하는 상품을 공급하기 위하여 세척 후 포장하여 즉석에서 섭취할 수 있는 ready-to-eat 샐러드 포장제품이 많아지고 있으며 소비량 또한 증가되는 추세이다(Kim et al., 2004).

보통 샐러드 류의 주원료인 채소류는 특히 어떠한 열처리 없이 신선한 상태로 섭취하게 되는 경우가 많은데, 만약 제대로 세척되지 않은 채소를 섭취할 경우 식중독의 원인으로 나타내게 된다(US FDA 2004). 그러나 양배추 함유 샐러드는 대부분 자연환경에서 재배되기 때문에 병원성 세균에 오염될 수 있는 확률이 적지 않으며 과채류의 병원성 미생물 오염 정도는 재배에 사용되는 농경수의 오염 정도, 거름을 퇴비로 사용하는지 여부, 인근 가축사육 여부, 그리고 농산물 생산, 처리, 가공, 포장 등의 과정 중 취급자들의 건강과 위생상태 등이 영향을 미칠 수 있다. 따라서 간혹 식중독균이 발견되는 경우가 생겨나고 있다(Kim et al., 2009; Kim et al., 2005).

우리나라 식중독 발생 양상은 전통적 식중독 균인 *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* 등에 의한 식중독 사

¹ 충남대학교 식품공학과(Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yusung-gu, Daejeon 305-764, Korea)

² 국립원예특작과학원 채소과(National Institute of Horticultural & Herbal Science, Imok-Dong 475, Jangan-Gu, Suwon 440-706, Korea)

* Corresponding author: 안길환(Gilhwan An)

Tel.: +82-42-821-7592 Fax: +82-42-823-4835

E-mail: ghahn@cnu.kr

2010년 11월 5일 투고

2010년 11월 29일 심사완료

2010년 12월 13일 게재확정

고 이외에 바이러스나 *Escherichia coli* O157:H7 등에 의한 식중독 발생이 증가하고 있으며 최근에는 원재료 오염에 의한 식중독 사고 또한 증가하고 있어 식품의 기능성은 다시 식품의 안전성으로 이어진다. 이러한 이유로 사전 예방적 관리 시스템인 위해 요소 중점관리제도의 도입과 정착이 지속적으로 요구되고 있다(Kim et al., 2010).

소스나 마요네즈 각종 요거트 류를 곁들여 섭취할 수 있는 coleslaw는 바쁜 현대인들이 쉽게 만들 수 있을 뿐만 아니라 백화점, 대형 할인매장, 등을 통해 많이 판매되고 있다. 패밀리 레스토랑 등의 샐러드 바를 통해서도 많이 이용되고 있지만 이러한 coleslaw는 양배추를 원료로 한 샐러드로 가열을 하지 못하기 때문에 염소소독을 한 후 세척으로 살균한다. Coleslaw 원료 중 양배추의 제조 공정은 다음과 같다: 1. 양배추 4절 절단 2. 비 가식부 제거 3. 염소 용액에 침지 살균 4. 물 세척 2회 5. 세절기로 세절 (7.5 mm 규격) 6. 컨베이어로 이동 7. 샐러드 원료 첨가 8. 혼합 9. 포장 10. 냉장저장 및 유통의 공정을 통하여 소비자가 제품을 접하게 된다.((주)삼조산업)

제조공정을 살펴본 결과 coleslaw의 소스에 들어가는 식초를 이용하여 세척과정 중에 이용하여 세척하면, *E. coli*에 대하여 살균효과를 가져올 것이며, 염소살균과 세척에 의한 생산 공정과 비용을 절감할 수 있고 염소를 이용한 식품의 소독을 할 경우 유기산과 반응 하여 THMs 와 같은 독성 물질을 생산하는 단점이 있는 것으로 보고된다 (Hwang et al., 2010). 그러므로 염소살균을 대신하여 식품위생학적인 문제를 해결 또는 완화에 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료되어 HACCP의 도입이 유리할 것으로 판단되었다.

식초는 술과 함께 인류의 식 생활사에서 가장 오랜 역사를 갖는 발효식품 중의 하나로 비린내 감소 (Youn et al., 2000), 성인병 예방 (Ha et al., 2000) 등에 널리 사용되고 있다. 특히 식품의 부패 방지에 방부제로서 뛰어난 역할을 하며 이는 초산이 세균 특히 부패균의 생육을 억제하기 때문이며 식초수를 사용하여 소독하였을 경우 미생물적 품질에서 차아염소산나트륨을 이용하였을 경우와 비슷하거나 우수한 효과가 있으며 식품 부패균과 *E. coli*의 생육억제에 우수한 효과가 있고 식중독균에 대해서 강한 소독효과가 있다고 보고되었다(Kim and Kim, 2009).

본 실험은 오염 미생물인 *E. coli* 제거가 샐러드류와 coleslaw 제품 제조에 중요한 중점관리요소(CCP)인데 식초를 이용하였을 때의 살균효과를 조사 및 검증하고 이를 이용한 HACCP 공정을 개발하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 양배추는 대형 할인매장에서 구입하여 사용하였으며, 구입 후 즉시 냉장고에서 냉장보관 하여 구

입한지 2일 이내에 실험을 하였다. 분무 실험에 사용한 식초는 화이트식초를 사용하였으며, 침지 실험에 사용한 식초는 100% acetic acid(Dae jung chemicals & metals co., LTD)를 구입하여 증류수로 희석하여 사용하였다.

2. 배양 및 접종

본 실험에 사용된 균주는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. *E. coli*은 Luria-Bertani 배지 (LB)(1 L 당 trypton 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g; pH 7.0) 액체배지와 고체배지 (1 L의 LB배지에 agar 15g 첨가)를 사용하였다. Test tube 에 3ml씩의 LB 배지를 넣고 균을 접종시켜 37°C의 shaking incubator에서 180rpm으로 1일간 배양하였다.

Acetic acid 분무 실험에 사용한 *E. coli*은 LB 배지에서 overnight 자란 *E. coli* 10ml를 증류수 1L에 첨가한 접종액을 사용하였다. 7.5×7.5cm로 세절한 양배추 300g을 5분간 *E. coli*를 침지·접종하고 10분간 그물망에 방치하여 물기를 뺀 다음 사용하였다. 10%와 100%의 acetic acid 10 ml 씩 분무기로 분무하여 대장균의 살균효과를 확인하기 위해 분무 후 잘 섞어준 다음 각 시간마다 sample을 채취하여 plate에 접종하여 incubator에서 overnight하여 대장균의 수를 관찰하였다.

양배추 침지 실험에 사용한 *E. coli*는 LB배지에서 overnight 자란 *E. coli* 10 ml를 1L의 LB media에 접종하여 다시 37°C의 shaker에서 180rpm으로 shaking 하며 overnight 하였다. 1L의 LB media를 3000rpm에서 20분간 (2092×g, 20min) 원심분리 하여 상층액은 버리고 침전물을 증류수 5ml에 희석한 후 사용하였다. 10% acetic acid 1L와 3L에 대한 7.5×7.5cm로 세절한 양배추 300g의 *E. coli*의 살균 효과를 검색하기 위하여 *E. coli*을 접종한 양배추를 acetic acid용액에 침지시킨 후 각 시간마다 sample 채취 하여 plate에 접종한 후 37°C incubator에서 overnight 하여 *E. coli*의 수를 관찰하였다.

3. *E. coli* 수 측정

*E. coli*이 접종된 300g의 양배추에서 5g 채취하여 45ml의 증류수와 희석하여 LB agar에 100 μ L씩 분주하여 도말한 후 37°C에서 overnight 하여 colony forming unit(CFU)를 측정하였다. 각각의 측정은 3개 이상의 plate를 이용하여 3반복 하였다.

III. 결과 및 고찰

양배추의 세절 전 염소 세척은 양배추 내부까지 접하는 표면적이 제한되어 세절 후 염소세척으로 *E. coli*을 사멸할 수 있을 것으로 사료되어 세절 전 양배추 분무 및 침지 실험은 시행하지 않았다. 또한 자외선 소독으로 *E. coli*을 사

멸할 수 있을 것으로 사료되지만 자외선은 일정시간 동안 지속적으로 조사하여야 하나 세절기를 통과한 후 자외선 조사는 30초 이내로 충분한 조사시간을 줄 수 없었다. 또한 coleslaw 제조 공정상 세절된 양배추를 쌓았다가 한꺼번에 사용하므로 자외선의 적용은 불가능 하였다.

Coleslaw제조과정 중 미생물의 생육에 영향을 미칠 수 있는 성분인 식초를 이용하여 미생물 제어 가능성을 검토하였다. 최근에 보고되고 있는 바에 따르면 가축류의 위에서의 acidic condition에 내성이 생겨 인간의 위장과 같은 환경에서도 생존하는 *E. coli* O157:H7종이 생겨 많은 연구에서 논의 되고 있다(Diez-Gonzalez et al., 1998 and Hancock et al., 1999). *E. coli* O157:H7종에도 산성 환경에 내성이 있는 종과 내성이 없는 종으로 구분되지만 사멸률에 약간의 차이를 보일 뿐 두 종 모두 acetic acid에 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 식초는 pH를 변화시키므로 식초의 첨가는 미생물 사멸을 위하여 식초의 pH 저하효과를 이용하는 것이므로 식초의 pH를 측정하였다. 사용 식초는 공업용 식용식초 (10% acetic acid 함유)로 pH가 2.2였으며, 10% 식초용액 (w/w %)의 pH는 2.5 이었다. 따라서 식초를 사용한다면 낮은 pH에 의하여 *E. coli*이 사멸할 수 있을 것으로 사료 되므로 *E. coli*의 사멸 효과를 측정하였다.

*E. coli*을 접종한 양배추를 10% acetic acid 1L와 3L에 침지시킨 후 각 시간의 경과에 따른 *E. coli* 수의 변화를 조사하였다 (Fig. 1). *E. coli* 수는 10% acetic acid에 담근 직후부터 급격히 감소하기 시작하였다. 담근 직후에는 양

배추 표면에 붙어있는 *E. coli*이 acetic acid에 씻겨 떨어진 것으로 사료된다. 지속적으로 10% acetic acid에 침지시킬수록 *E. coli* 살균 효과가 있었으며, 30분 이후에는 *E. coli*이 2 log 이하로 감소하였다.

탁월한 *E. coli* 사멸효과를 보인 10% acetic acid의 잔류량을 점검하기 위하여 7.5×7.5mm으로 세절한 양배추 300g을 이용하여 잔류량을 측정하였다. 이때 60 mesh의 체를 사용하여 남아있는 수분을 제거하였다. 처음 300g의 양배추를 5분간 *E. coli* 접종액에 접종한 후의 무게는 평균 364g였으며, 그물망에서 10분간 방치 한 후의 무게는 평균 345g였다. 1 L의 10% acetic acid에 침지한지 5분 후 drain 후의 무게는 평균 348g, 3L의 10% acetic acid에서는 평균 360g이었다. (Table 1) 따라서 coleslaw생산 과정에서 10% acetic acid를 사용하여 세척할 경우 양배추 무게의 15-20%의 양만큼 잔류하게 된다. 이 양은 실제 coleslaw 생산 공정에서 최종 잔류하는 3%의 식초를 사용하는 공정에 비하여 상당량 남게 되므로 차후 새로 세척해야 하는 문제를 갖게 된다. 따라서 침지 했을 경우 생기는 잔류 식초를 남기지 않기 위해서 3%의 식초를 분무하는 공정을 연구하였다.

300g의 세절한 양배추에 10%와 100%의 acetic acid를 10ml 씩 분무기로 분무하여 *E. coli*의 살균효과를 측정하였다. 분무 후 잘 섞어준 다음 시간의 경과에 따른 *E. coli* 수를 측정하였다. 실험결과 10% acetic acid에서 *E. coli*은 1시간 후 완전히 사멸하였으며, 100% acetic acid에서는 *E. coli*이 15분 후 완전히 사멸되었다(Fig. 2). 따라서 acetic

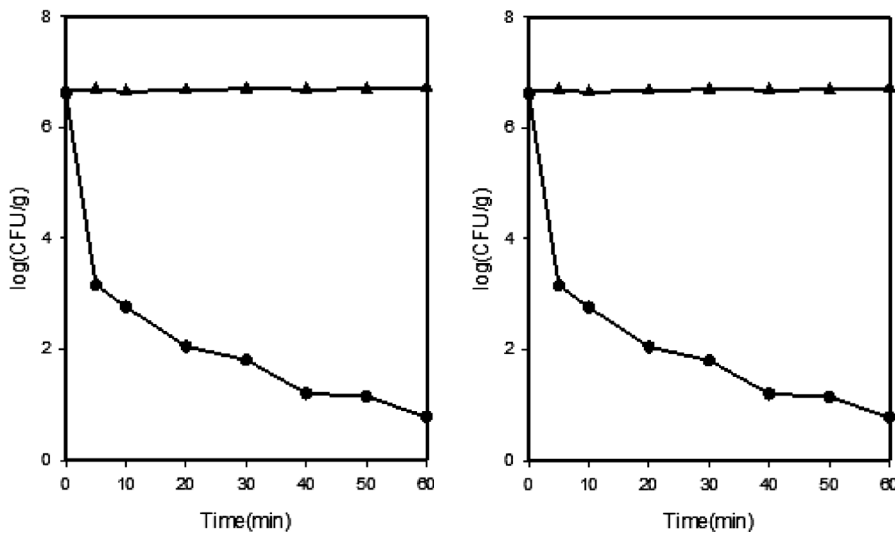


Fig. 1. Decreasing of *E. coli* by the soak in g of cabbage in 10% acetic acid. Panels: a, 1L of 10% acetic acid; and b, 3L of 10% acetic acid. Symbols: ▲ control; and ● 10% acetic acid.

Table 1. The weight of cabbage which soaked in 1 L, 3 L acetic acid.

	Cabbage (g)	After inoculation of <i>E. coli</i> (g)	Drainage for 10min (g)	Soak for 5min (g)
1 L	300.5±0.25	363.2±8.94	343.3±1.15	348.3±3.82
3 L	300.1±0.14	365.6±0.00	346.9±1.77	360.4±3.46

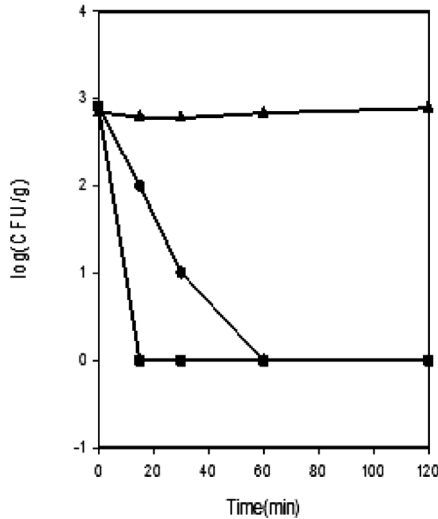


Fig. 2. Decrease of *E. coli* after treatment of acetic acid at 3% of cabbage weight and vinegar. Symbols: ▲ control; ● 10% acetic acid; and ■ 100% acetic acid.

acid의 첨가에 의한 *E. coli*의 사멸공정은 가능성이 있다. 그 효과도 탁월하며 공정을 더욱 단순화 시키면서 *E. coli*의 사멸을 기할 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험의 acetic acid를 이용한 spray treatment에 의한 연구방법은 *E. coli* O157:H7 종의 acidic condition에 대한 내성을 판단하는 대표적으로 활용 되는 방법이다(Buchanan et al., 1996; Berry et al., 2000).

양배추에 존재하는 *E. coli*의 식초에 의한 제거를 위하여 실제 공정에서 샐러드를 만들 때 사용하는 양의 식초를 분무기로 첨가하여 시간당 변하는 *E. coli* 수를 측정하였다(Fig. 3). 식초 처리 15분 후까지는 대조군과 비교하여 *E. coli* 수가 감소하였으나 그 이후에는 감소하지 않거나 완만하였다. 5% 식초의 경우 일반세균, *E. coli* 군, *E. coli*, 포도상구균에 대하여 최대 23.5, 58.9, 48.7, 36.9%의 감소율을 보이므로 이는 미생물의 번식을 완전히 저지시킬 수 없어 장기간의 저장은 불가능함을 보여준다.(Jung et al., 2006). 따라서 실제 coleslaw제조공정에서 사용하는 3%의 식초를 분무하였을 때 *E. coli* 수가 감소하여 *E. coli*에 관한 문제를 줄일 수 있겠지만 실제 공정상으로 이용되는 양의 식초만으로는 양배추에서의 문제를 완벽히 해결하기는 어렵다고 사료된다. 따라서 이 공정은 *E. coli*에 의한 오염이 적을 때 사용할 수 있으나, 오염이 심할 때에는 사용할 수 없다. 오염이 심한 경우 식초용액에 양배추를 침지하고 이후에 남은 과량의 식초를 세척하는 방법으로 공정을 만들어야 완벽한 살균효과를 얻을 수 있을 것이다. 초산 발효 중 유기산은 oxalic, malic, acetic, citric 및 succinic acid가 검출되며 이중 acetic acid가 가장 높음 함량인 것으로 보고되고 있으며 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가하는 경향이 있다고 알려져 있다(Shin et al., 2003). 따라서 10%의 acetic acid 보다 10% 산 함유 식초의 살균 효과가 떨어지는 것

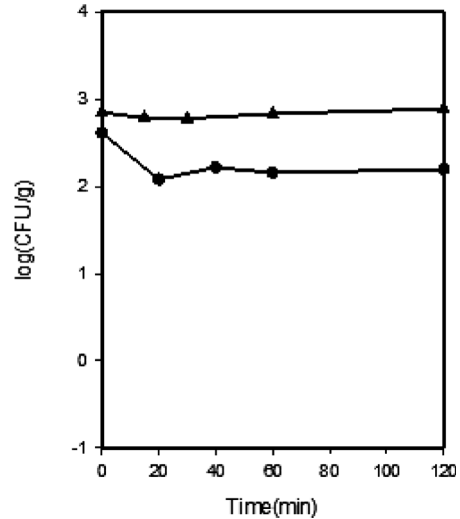


Fig. 3. Decrease of *E. coli* after treatment of vinegar at 3% of cabbage weight. Symbols: ▲ control; and ● vinegar.

은 acetic acid 외의 다른 산 성분들 및 식초에 있는 기타 성분에 의한 효과로 사료된다.

*E. coli*의 사멸은 단순히 산성에 의한 결과가 아닌 온도, 처리시간 등의 조건들과 acidic condition이 서로의 복합적인 상호 작용을 통해 영향을 받는다고 보고되었다(Conner et al., 1995). 따라서 식초에서의 acetic acid 성분의 함량을 증가시키게 되면 식초에 의한 *E. coli*의 사멸공정은 가능성이 있으며, 그 효과도 효율이 좋으며 공정을 더욱 단순화 시키면서 *E. coli*의 사멸을 기할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 결론

양배추는 Coleslaw의 주 원료로서 일반적인 세척만으로는 안전하지 않다. 왜냐하면 양배추는 단단한 껍질이 균일하지 않은 상태로 되어 있기 때문이다. Coleslaw 공정 과정 동안 10%의 acetic acid를 포함하고 있는 3ml의 식초가 100g양배추에 들어간다.

본 연구에서 식초를 양배추 coleslaw 생산에 있어서 발생하는 *E. coli* 수를 제어하는 데 사용하였다. 양배추를 10% acetic acid에 침지하였을 때 5분 후에는 10-3, 30분 후에는 10-6의 박테리아가 살아남았으며, 양배추 내에 15~20%의 10% acetic acid가 잔류하였다.

10%의 acetic acid를 양배추 무게의 3%를 분무하였다. 60분 후에 박테리아는 10-3 만큼 살아남았다. 양배추 무게의 3%의 식초는 10%의 산도를 나타내고 있으며 30분 동안 2/3가량의 박테리아가 감소하였다. 그러나 더 이상의 사멸은 관찰되지 않았다. *E. coli*에 의한 오염이 적을 때 사용할 수 있으나, 오염이 심할 때에는 사용할 수 없다. 오염이 심한 경우 식초용액에 양배추를 침지하고 이후에 과량의 식초를 세척하는 방법으로 공정을 만들어야 완벽한

살균효과를 얻을 수 있을 것이다.

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업 (과제번호 607003-05-3-SB120) (과제번호 308023-03-1-HD110) 과 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 20090101-081-109-001-04-00)의 지원에 의해 이루어진 것이다.

참고문헌

1. Berry, E.D., N.C. Catherine. 2000. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1493-1498.
2. Buchanan, R., S.G. Edelson. 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid to tolerance of stationary-phase cells. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 62(1): 4009-4013.
3. Conner, D.E., J.S. Kotrola. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 61(1): 382-385.
4. Diez-Gonzalez, F., T.R. Callaway, M.G. Kizoulis, J.B. Russell. 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Sci.* 281: 1666-1668.
5. Ha, Y.D., K.S. Kim. 2000. Civilization history of vinegar. *Food Ind. Nutr.* 5: 1-6.
6. Hancock, D.D., T.E. Besser, C. Gill, C.H. Bohach. 1999. Cattle, hay, and *E. coli*. *Sci.* 284: 51-53.
7. Hwang S.H., W.Y. Kwon, H.K. Kim., T.S. Kim., S.K. Kim., J.H. Choi, H.S. Pyo. 2010. Monitoring and risk assessment of disinfection by-products found in chlorinated drinking water in Korea. *J. Kor. Soci. Environ. Anal.* 1: 11-20.
8. Jung, S.W., J.H. Song, K.G. Lee, K.W. Hong, S.J. Lee. 2006. Inhibitory effects of temperature and vinegar against indicator organisms in raw fishes for sushi ingredient during chilled storage. *Food Engineer. Prog.* 10(3): 192-200.
9. Kim, H.W., H.D. Paik, W.S. Hong, J.Y. Lee. 2009. Overview of the management characteristics of food (livestock products) transportation systems on international- and national-level HACCP application. *Kor. J. Food Sci. Anim. Resour.* 29(4): 513-522.
10. Kim, H.Y., H.J. Kim. 2008. Applying vinegar as a disinfectant for lettuce in food service operations: a Focus evaluation of its physiological and sensory characteristics effects. *Kor. J. Food Cook. Sci.* 24(2): 228-235.
11. Kim, J.S., O.K. Bang, H.C. Chang. 2004. Examination of microbiological contamination of ready to eat vegetable salad. *J. Food Hyg. Safe* 9(2): 60-65.
12. Kim, J.W., S.H. Kim. 2005. Establishment of washing conditions for salad to reduce the microbial hazard. *Kor. J. Food Cook. Sci.* 21(5): 730-708.
13. Kim, K.Y., M.J. Nam, B.R. Nam, H.J. Ryu. 2010. Microbiological safety assessment to secure safety of food service in university. *J. Food Hyg. Safe* 25(1): 49-58.
14. Kim, Y.W. 2009. Ouallity changes in brined baechu cabbage using different types of polyethylene film, and salt content during storage. *Kor. J. Food Preserv.* 16(5): 605-611.
15. Shin, J.S., Y.J. Jeong. 2003. Change in the components of acetic acid fermentation of brown rice using raw starch digesting enzyme. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* 32(3): 3381-387.
16. Youn, K.S., S.D. Kim, H.D. Chung, Y.H. Choi. 2000. Clarification of apple vinegar by ultrafiltration and flux characteristics. *Kor. J. Soc. Agric. Chem. Biotechnol* 43(1): 24-28.