

어성초의 화학적 특성과 휘발성 향기성분 추출물의 항균효과

신성의 · 서두석¹ · 정길록 · 차월석*

조선대학교 생명화학공학과, ¹보광어성초영농조합법인

Received January 16, 2006 / Accepted March 9, 2006

Chemical Characterization and Antibacterial Effect of Volatile Flavor Concentrate from *Houttuynia cordata* Thunb. Sung-Euy Shin, Doo-Suk Suh¹, Ding Jilu and Wol-Suk Cha*. Department of Biochemical Engineering, Chosun University, ¹Pokwang Usungcho Farm Association corporation – For developing natural antibacterial agents from *Houttuynia cordata* Thunb., antibacterial effects of volatile flavor component using various bacterial sp. were tested. Extraction from *Houttuynia cordata* Thunb. by using SDE (Simultaneous steam Distillation-Extraction) showed strong antibacterial activities against *Vibrio* and *Bacillus* genus, such as *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Bacillus cereus*, and *B. subtilis*. Then chemical compositions of leaf and stem were analyzed. The contents of crude protein, lipid, and ash in stem were less than those of leaf, but fiber contents were higher than those of leaf. Among the amino acids, aspartic acid, glutamic acid, glycine, and arginine were higher than those of other amino acids. Linolenic acid, linoleic acid, oleic acid, and palmitic acid were major fatty acids. Major minerals of *Houttuynia cordata* Thunb. were potassium, calcium, phosphorus, magnesium, iron, zinc, and copper. Especially, in the case of potassium, it was highest.

Key words – Chemical characterization, antibacterial effect, volatile flavor, *Houttuynia cordata* Thunb.

서 론

식물 추출물이 항균활성을 갖고 있다는 사실은 이미 오래 전부터 알려져 왔는데 그 중에서 대표적인 것이 바로 향신료 들이다[8,19]. 마늘의 항균활성 물질은 allicin으로서 -SH group 효소의 저해인자로 작용한다고 밝혀졌고[12], 양파 추출물은 aflatoxin을 생성하는 *Aspergillus flavus*와 *Asp. parasiticus*의 증식을 저해하고[5], 정향은 *Candida albicans*, *Escherichia coli* 등에 살균효과가 있는 것으로 알려졌다.

어성초(*Houttuynia cordata* Thunb.)는 흔히 약모밀, 삼백 초라 불리우는 다년생 초본의 야생약초로서 따뜻하고 습지 인 곳에서 잘 자라며, 지역에 따라 약간의 차이는 있으나 보통 4월경에 싹이 트고 6-8월경에 꽃이 피며, 특유의 독특한 비린내를 나타내는 생리활성물질들을 함유하고 있어 이노, 진통, 지혈 등의 다양한 약리작용이 있는 것으로 알려지면서 오래전부터 생약제로 이용되어 왔다[16].

또한 임질, 폐렴, 무좀, 악창 등에 효능이 있는 것으로 알려진[17] 어성초 성분 중 decanoyl acetaldehyde와 강력한 이노효과를 가진 quercitrin과 iso-quercitrin은 대장균, 곰팡이, 무좀균 및 임균에 대하여 강한 항균활성이 있는 것으로 알려 지면서[9] 최근에는 엑기스 및 발효 착즙액 등의 여러 가지 제품으로 판매되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내에 많이 자라고 있는 어성초 약초를 이용한 천연항균제의 개발을 위한 방안으로 어성초

의 화학적 성분조성을 분석하고 15종의 병원성 균주에 대한 휘발성 향기성분의 항균활성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 어성초는 전남 보성군 벌교읍 대포리 보광 어성초농장에서 재배한 것으로 잎과 줄기가 온전한 것을 구입하여 증류수에 깨끗이 씻은 후 물기를 제거하고 polyethylene film으로 밀봉한 후 -20℃에서 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

일반성분 분석

일반성분 분석은 AOAC법[1]에 의해 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 micro kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 직접 회화법, 조섬유는 Henneberg Stohmann 개량법으로 각각의 함량을 측정하였다.

유리아미노산 분석

유리아미노산 분석은 어성초 시료 20 g에 75% ethanol 200 ml를 가하여 homogenizer로 균질화 시키고 이를 환류 냉각장치에 연결하여 80℃에서 40분간 가열한 뒤, 이를 Büchner funnel을 사용하여 여과하였고 남은 고형물은 75% ethanol 50 ml로 3회 세척하여 다시 여과하였다. 위의 여과액을 모두 합하여 vacuum evaporator로 감압건조하여 ethanol을 완전 증발시킨 다음 ethyl ether 50 ml로 3회에 걸쳐 재추출하였다. Ether 층을 회수하여 vacuum evaporator로

*Corresponding author

Tel : +82-62-230-7218, Fax : +82-62-232-2474

E-mail : wscha@chosun.ac.kr

감압건조 시켜 잔류의 ether을 제거한 후 0.2 M citrate buffer (pH 2.2)을 가하여 일정량 되게 정용하여 시료용액으로 사용하였다. 아미노산의 형광 유도체화를 위해 Edman's Reagent인 PITC (phenylisothiocyanate)을 사용하였으며, 이들 유도체를 분리하기 위해 3.9×150 mm Pico·Tag® column을 사용하여 Table 1과 같이 내부 표준법으로 정량하였다.

지방산 분석

지방산의 분석은 Bligh와 Dyer법[4]에 따라 어성초 시료 50 g에 Folch용액(chloroform : methanol = 2 : 1) 150 ml를 혼합하여 blender를 사용하여 2분 동안 균질화하고 chloroform 50 ml를 가하여 30초 동안 교반한 후 다시 증류수 50 ml를 넣고 30초 동안 교반하여 균질화 하였다. 이 균질액을 Buchner 여과기로 여과한 후 chloroform층 만을 취하여 감압 농축하여 지질을 얻었다. 상기의 지질 100 mg을 0.5 N NaOH 4 ml를 가하고 95℃의 water bath에서 20분간 검화시켰다. 14% BF₃/CH₃OH와 n-heptane를 각각 5 ml씩 차례로 넣어 추출하고 n-heptane층을 무수 Na₂SO₄로 탈수한 다음 여과하여[2] GC 주입용 시료로 사용하였으며 methylester의 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 1. Operating conditions for the analysis of free amino acid by HPLC

Instrument: Waters Associate				
Column: Pico·Tag® Column (3.9×150 mm, 4 μm)				
Detector: Waters 441 UV Detector				
Wave length: 254 nm				
Injection volume: 10 μl				
Standard concentration: 0.123 μmole/ml				
Mobile phase:				
A: Sodium acetate 20 g				
Triethyl amine 600 μl (0.05%)				
Milli Q quality water 1 l				
Adjusted to pH 6.4 with phosphoric acid				
Mixed above solution with acetonitrile (94:6, v/v)				
B: 60% acetonitrile				
Gradient Table				
Time	Flow	%A	%B	Curve
Initial	1.0	100	0	*
10:00	1.0	54	46	5
10:50	1.0	0	100	6
11:00	1.5	0	100	6
14:00	1.5	0	100	6
14:50	1.5	100	0	6
20:50	1.5	100	0	6
21:00	1.0	100	0	6

Table 2. Operating conditions for the analysis of fatty acid methylesters by gas chromatography

Instrument: Varian mode 3400
Column: DB Wax capillary column (30 m×0.32 mm I.D. 0.25 μm film thickness)
Detector: F.I.D.
Injector temperature: 210℃
Detector temperature: 240℃
Column temperature: 165℃ (1 min)-2℃/min-200℃ (1.5 min)
Split ratio: 50:1
Injection volume: 1.0 μl
Carrier gas: N ₂
Flow rate: 20 ml/min

무기성분 분석

무기성분의 분석은 어성초 시료를 습식분해법[22]으로 분해하여 증류수로 정용하고 여과하여 검액으로 사용하였다. 각 무기성분의 정량은 원자흡광도계(Varian Model SpectrAA-300A)[20]를 사용하였으며 인의 정량은 molybdenum blue 흡광도법으로 비색정량 하였다.

휘발성 향기성분의 추출

휘발성 향기성분의 추출은 어성초 마쇄한 시료 500 g을 증류수 1.5 l에 취하고 di-ethyl ether 100 ml로 변형 제작된 Likens와 Nickerson형 SDE장치(Simultaneous Distillation-Extraction)를 이용하여 2시간 동안 추출하였다. 상기 조작은 전체 시료 1.85 kg을 모두 소모할 때까지 반복하고, 이때 추출된 휘발성 향기성분의 수율을 조사하기 위하여 내부표준 물질로서 100 ppm 4-decanol 100 μl를 첨가하였으며 추출물은 질소가스를 이용해 25 ml로 농축하였다.

항균활성의 검색

휘발성 향기성분에 대한 항균활성 조사에는 15종의 병원성 균주를 사용하였다. 실험에 사용된 배지로는 세균의 활성에는 tryptic soy broth (TSB)를 사용하였고, 항균활성 측정에는 Mueller-Hinton agar (Difco)를 사용하였는데 *Vibrio parahaemolyticus*와 *Vibrio vulnificus*와 같은 호염성 세균에는 3% NaCl가 첨가된 배지를 사용하였다.

항균활성은 Kirby-Bauer disk 확산법에 따라 측정하였다. 어성초의 휘발성 향기성분 추출물에 포화시킨 멸균된 여지 disk (8.0 mm in diameter, 1.0 mm in thickness, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)는 1×10⁸ CFU/ml로 조정된 각 병원성 균주 배양액을 0.1 ml씩 균일하게 도포한 배지를 37℃에서 18시간 배양하였다. 이때 ether에 포화시킨 disk를 대조구로 사용하였다. 배양 후 농축물의 각 병원성 균주에 대한 항균활성은 disk 주변 배지의 clear zone의 크기로 결정하였다.

결과 및 고찰

일반성분

어성초의 일반성분을 분석한 결과 Table 3과 같이 수분, 조단백질, 조지방, 조회분은 전체적으로 잎에 많이 함유되어 있는 반면 조섬유는 줄기 부분이 8.74%로 잎 보다 더욱 많이 함유되어 있었다. 이러한 결과는 보성지역에서 재배한 어성초를 분석한 Cho[7]등과 Kim[15]등의 결과와 비슷한 경향이 었으나 그 구체적 함량에서는 약간의 차이를 보였다.

유리아미노산 함량

Table 4에서와 같이 잎에서 9종의 유리아미노산이 8.19 mg/100 g 검출되었으며 glutamic acid의 함량이 1.68 mg/100 g으로 가장 많았고 그 다음으로 aspartic acid 1.40 mg/100 g, arginine과 alanine이 1.36 mg/100 g으로 많았다. 잎에서의 유리아미노산의 함량은 glutamic acid, alanine, arginine, aspartic acid, proline, cysteine, glycine, phenylalanine, valine의 순으로 높게 나타났다. 줄기에서는 8종의 유리아미노산이 cysteine, alanine, glutamic acid, valine, proline, aspartic acid, phenylalanine, histidine의 순으로 잎에서보다 높은 총 8.81 mg/100 g의 함량을 보였다.

잎에 함유된 유리아미노산의 함량은 전체적으로 Hwang [11]등의 glutamic acid, aspartic acid, leucine, proline, valine의 순으로 높은 분석결과와 일치하는 경향이였으나 함량에서 어느 정도 차이가 있었다. 줄기에는 asparagine이 가장 많이 함유되어 있고 그 다음으로 valine, proline, alanine 의 순으로 함유되어 있다고 보고한 Cho[7] 등의 유리아미노산 분석 결과와는 많은 차이를 보였다. 이는 분석대상의 재배지역과 재배환경 및 분석재료의 건조조건 등 여러 요소의 차이 때문에 발생된 것으로 사료된다.

지방산 조성

지방산 조성을 알아본 결과 Table 5와 같았다. 포화지방산은 잎과 줄기에서 각각 29.61%와 38.64%로 줄기에서 더욱 많이 나타났지만 불포화지방산은 잎과 줄기에서 각각 64.29%와 61.01%이었다. 총체적으로 불포화지방산이 포화지방산보다 함량이 약 2배 정도 많이 나타났는데 Cho[7] 등과

Table 3. Proximate composition of *Houttuynia cordata* Thunb (%)

Composition	Leaf	Stem
Moisture	80.74	78.26
Crude protein	3.13	1.85
Crude lipid	2.21	0.86
Crude ash	3.05	2.03
Crude fiber	3.96	8.74

Table 4. Free amino acid content of *Houttuynia cordata* Thunb (mg%)

Free amino acid	Leaf	Stem
Asp	1.40	0.32
Glu	1.68	0.88
Ser	ND	ND
Gly	0.49	0.13
His	ND	ND
Arg	1.36	ND
Thr	ND	ND
Ala	1.36	0.89
Pro	1.02	0.74
Tyr	ND	ND
Val	0.05	0.81
Met	ND	ND
Cys	0.53	4.90
Ile	ND	ND
Phe	0.30	0.14
Lye	ND	ND
Total	8.19	8.81

ND: Not Detected

Table 5. Fatty acid composition of total lipid in *Houttuynia cordata* Thunb (area %)

Fatty acid	Leaf	Stem
Pelargonic (9:0)	0.21	0.29
Capric (10:0)	4.35	1.92
Lauric (12:0)	0.04	0.47
Myristic (14:0)	1.32	1.48
Pentadecylic (15:0)	1.00	0.89
Palmitic (16:0)	16.78	20.95
Heptadecanoic (17:0)	0.23	0.24
Stearic (18:0)	1.30	1.46
Arachidic (20:0)	1.41	0.50
Behenic (22:0)	0.31	0.95
Tricosanoic (23:0)	1.27	6.02
Lignoceric (24:0)	1.39	3.47
Saturated fatty acid	29.61	38.64
Myristoleic (14:1)	0.28	0.31
Palmitoleic (16:1)	4.26	1.30
Oleic (18:1)	7.57	7.95
Linoleic (18:2)	12.42	24.07
Linolenic (18:3)	39.76	27.38
Unsaturated fatty acid	64.29	61.01

Kim[15] 등도 동일한 결과를 보고한 바가 있었다. 잎과 줄기에서 linolenic acid (C_{18:3})의 함량이 가장 많았고, 그 다음으로 잎에서는 palmitic acid (C_{16:0}), linoleic acid (C_{18:2}), 줄기에서는 linoleic acid (C_{18:2}), palmitic acid (C_{16:0})의 순으로 높게 나타났다.

무기성분 함량

어성초 무기성분은 잎과 줄기에서 K가 가장 많았고, 그 다음으로 잎에서는 Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, 줄기에서는 Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu의 순으로 함량이 높게 나타났는데(Table 6) Hwang[10], Kim[15] 및 Cho[7] 등의 결과를 분석하여 종합해볼 때 어성초의 무기성분은 부위에 관계없이 전체적으로 K, Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu의 순으로 많이 함유되어 있는 경향이 있다. 또한 잎에서는 Ca, Mg, Fe의 함량이 높지만 줄기에서는 K, P, Zn, Cu의 함량이 잎보다 높음을 알 수 있었다.

휘발성 향기성분의 항균활성

어성초 휘발성 향기성분의 농축물이 15종의 병원성 세균에 대한 저해효과는 Table 7과 같았다. 그 결과 *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*와 같은 Gram 음성세균인 *Vibrio* 속과 *B. cereus*, *B. subtilis*와 같은 Gram 양성세균인 *Bacillus* 속에 대해서는 강한 항균활성을 나타내었다.

또한 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Shigella dysenteriae*, *Corynebacterium xerosis*, *Listeria monocytogenes*와 같은 종들에 대해서 상당한 정도의 저해효과를 나타내었으며, 반면 *Escherichia coli* O157, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*와 같은 종들은 어성초 휘발성 향기성분 농축물에 저항성을 가지는 것으로 나타났다.

Kim[15] 등은 어성초의 neutral fraction 추출물이 Gram 양성세균중에서 *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, Gram 음성세균중에서는 *Pediococcus cerevisiae*에 대해 높은 활성을 보였고 gram 양성세균인 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 대해서는 양호한 항균활성, Gram 음성세균인 *E. coli* 에 대해서는 항균활성 나타나지 않았다고 보고하였다.

하지만 Kang[14] 등은 Prep-HPLC로 분획한 분획물 중 decanal, endobornyl acetate, fenchene, decanoic acid가 함유된 분획물과 어성초 특유의 비린내와 관련된 화합물 decanoyl acetaldehyde[9]가 함유된 분획물이 gram 음성균인 *E. coli*와 식중독의 원인균으로 중요시되는 *Y. enterocolitica*에 대해서 강한 항균활성을 보였고, gram 음성균인 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 대해서 약한 활성이나 전혀 항균활성이 나타나지 않았다고 보고한 결과와는 많이 상이하였다.

Table 6. Mineral content of *Houttuynia cordata* Thunb

Mineral element	(mg%)	
	Leaf	Stem
Ca	234.17	209.54
P	52.64	80.03
Mg	83.44	66.83
K	780.31	881.58
Fe	5.06	4.67
Cu	0.09	0.13
Zn	0.48	0.56

Table 7. Antibacterial activities of volatile flavor components from *Houttuynia cordata* Thunb. against test strains

Strains	Source	Diameter of inhibition zone (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC11778	19
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	16
<i>Corynebacterium xerosis</i>	ATCC9755	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	-
<i>Escherichia coli</i> O157	E32511	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15313	14
<i>Salmonella typhi</i>	Isolates	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC9752	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	14
<i>Vibrio cholerae</i> O-1	Isolates	19
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC27519	16
<i>Vibrio vulnificus</i>	Isolates	16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Isolates	-

이는 SDE를 이용한 추출물중 조성성분들의 복합항균활성과 Prep-HPLC로 분획한 분획물중 정제성분들의 단일항균활성의 차이에서 비롯된 것이라 사료되며, 앞으로 기타의 chromatography로 정제한 분획물들의 항균활성에 대한 연구와 정확한 투여농도의 산출에 대한 연구가 계속 필요할 것으로 사료된다.

요 약

SDE연속추출장치로 추출, 농축한 어성초 휘발성 향기성분 추출물이 15종의 병원성 세균에 대한 항균활성을 측정한 결과는 다음과 같았다. 어성초의 추출물은 주로 *Vibrio*와 *Bacillus*속의 세균들에 대해 강한 항균활성을 나타냈고, *S. aureus*와 *epidermidis*, *S. dysenteriae*, *C. xerosis*, *L. monocytogenes*에도 비교적 높은 활성을 나타냈다. 하지만 *E. coli*, *S. typhi*, *E. cloacae*, *Y. enterocolitica*와 같은 세균들은 어성초 휘발성 향기성분 농축물에 저항성을 가지는 것으로 나타났다. 어성초의 잎과 줄기에 대한 일반성분 중 수분, 조단백질, 조지방, 조회분은 잎에 많이 함유되어 있고 조섬유는 줄기에 많이 함유되어 있었다. 잎에서 9종의 유리아미노산이 검출되었고, 줄기에서는 8종의 유리아미노산이 총 8.81 mg/100 g으로 더욱 많이 검출되었다. 지방산조성을 분석한 결과 잎과 줄기에 linolenic acid (C18:3), linoleic acid (C18:2), palmitic acid (C16:0)이 다량 함유되어 있다. 무기성분 중 잎과 줄기에서 K의 함량이 가장 많았고 Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu의 순으로 많이 함유되어 있었다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 전통식품 첨단화 인력양성 사업단 산학협력연구비(NURI)의 지원을 받아 연구되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis 15th ed. Association of official analysis chemists. Washington DC. USA.
2. AOCS. 1973. Official and tentative method 3rd ed. American oil chemists society. Chicago. USA.
3. Bae, K. H. and J. H. Byun. 1987. Screening leaves of higher plants for antibacterial action. *Kor. J. Pharmacol.* **18**, 1-24.
4. Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Bio. Physiol.* **37**, 911.
5. Briozzo, J., L. Nunez, J. Chirife, L. Herszage and M. D'Aquino. 1989. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 69-75.
6. Cappuccino, J. G. and N. Sherman. 1987. *Microbiology a laboratory manual*. pp. 75. The benjamin. Cummings Publishing Company.
7. Cho, Y. S., Y. T. Kim, M. Y. Shon, S. H. Choi, Y. S. Lee and K. I. Seo. 2000. Comparison of chemical compositions of *Houttuynia cordata* Thunb. cultivated from different local area. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **7**, 108-112.
8. Framtling, R. A. and G. S. Bulmer. 1978. *In vitro* of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* **70(2)** 397-405.
9. Gardner, H. W., D. L. Dornbos and A. E. Desjardins. 1990. Hexanal, trans-2-hexenal and trans-2-nonenal inhibit soybean, *Glycine max*, seed germination. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1316-1320.
10. Hwang, J. B., M. O. Yang and H. K. Shin. 1997. Survey for approximate composition and mineral content of medicinal herbs. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 671-679.
11. Hwang, J. B., M. O. Yang and H. K. Shin. 1998. Survey for amino acid of medicinal herbs. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 35-41.
12. Johnson, M. G. and R. H. Vaughn. 1969. Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Appl. Microbiol.* **17(6)** 903-5.
13. Kang, J. M., I. H. Cha, Y. K. Lee and H. S. Ryu. 1997. Identification of volatile essential oil, and flavor characterization and antibacterial effect of fraction from *Houttuynia cordata* Thunb. I. Identification of volatile essential oil compounds from *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 209-213.
14. Kang, J. M., I. H. Cha, Y. K. Lee and H. S. Ryu. 1997. Identification of volatile essential oil, and flavor characterization and antibacterial effect of fraction from *Houttuynia cordata* Thunb. II. Flavor characterization and antibacterial effect of fraction from *Houttuynia cordata* Thunb. by Prep-HPLC. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 214-221.
15. Kim, K. Y., D. O. Chung and H. J. Chung. 1997. Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* Thunb.. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 400-406.
16. Kwun, J. A. 1998. About *Houttuynia cordata* Thunb. *Korean Oriental Drug.* **2**, 218-221.
17. Medicinal Plant Society. 1981. *Special medicinal plant*. pp.120. Jinmyong Publishers Inc. Korea.
18. Paik, S. B. and Y. S. Oh. 1990. Original articles : Screening for antifungal medicinal plants controlling the soil borne pathogen, *Pythium ultimum*. *Kor. J. Mycol.* **18**, 102-108.
19. Park, S. S. 1977. Studies on the constituents and their biological activities of *Ixeris sonchifolia* Hance. (1). *Korean Biochem. J.* **10**, 241-252.
20. Perkin-Elmer Corporation. 1986. *Analytical methods for atomic absorption spectrometry*. Norwak Com.
21. Sharma, A., G. M. Tewari, A. J. Shrinkhande, S. R. Padwal-Desai and C. Bandyopadyay. 1979. Inhibition of aflatoxin producing fungi by onion extracts. *J. Food Sci.* **44**, 1545.
22. Woo, S. J. and S. S. Ryoo. 1983. Preparation method for atomic absorption spectrophotometry of food samples: Comparison of dry, wet and aqua-regia methods. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **15**, 225-230.
23. Zaika, L. L. 1988. Spices and herbs, their antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safety* **9**, 97.