소목 추출물의 항균력 및 살균소독력

이진영* · 민경진

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Antimicrobial Activity and Bactericidal Activity of *Caesalpinia sappan* L. Extract

Jin Young Lee* and Kyung Jin Min

Department of Public Health Graduate School Keimyung University, Daegu, Korea

ABSTRACT

Antimicrobial activity and bactericidal activity of *Caesalpinia sappan* L. extracts were investigated against five food-borne pathogens, *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *B. cereus* and *L. monocytogenes*. Methanol extract of *Caesalpinia sappan* L. revealed antimicrobial activities against five pathogens. In particular, by paper disc diffusion the highest activity was shown against *L. monocytogenes*. Antimicrobial activities of methanol extracts showed the most potent activities, but hexane fraction had no activity. Fractions of ethyl acetate and butanol turned out to have higher antimicrobial activities against Gram(+) bacteria than Gram(-) bacteria. The minimum inhibitory concentration against five food-borne pathogens was 1.563 mg/ml on Gram(+) bacteria and 3.125 mg/ml on Gram(-) bacteria. The result of antimicrobial activity in a shaking flask method showed that bacterial growth rate fell by more than 99.999% at 3.125 mg/ml of methanol extract. The highest rate of viable reduction (99.998%) was shown at 0.781 mg/ml of methanol extract against *L. monocytogenes*. After five minutes of reaction between test strains and methanol extracts, the growth rates of five kinds of bacteria were reduced by more than 99.999% at a concentration of 100 mg/ml. Therefore, it is suggested that methanol extracts of *Caesalpinia sappan* L. can be developed as a natural sanitizer or disinfectant.

Key words: *Caesalpinia sappan* L., Antimicrobial activity, Bactericidal activity, Disinfectant

I. 서 론

식중독은 황색 포도상구균과 병원성 대장균 같은 병원성 미생물에 오염된 식품 원료를 사용하여 발생하는 경우도 있으나 적절한 살균 과정이 누락되었을 경우 작업자의 손이나 조리 기구로부터 교차 오염을 통하여 발생할 수도 있다.¹⁾ 균에 오염된 전처리 기구는 원부재료를 전처리할 때 교차 오염의 가능성이 있고,²⁾ 원재료, 조리 기구 및 조리 종사원의 손과 최종 조리음식간의 교차오염이 발생하는 것으로 보고되었다.³⁾ 이러한 교차오염으로 인한 세균

성 식중독을 예방하기 위해서는 식품 원료의 세척 및 살균 소독 등의 처리뿐만 아니라 식품과 접촉하는 모든 작업자, 용기 및 조리 기구에 대한 적절한 살균소독이 이루어져야 한다.⁴⁾ 또한 조리 후 항균비누를 사용하여 손을 씻은 경우 손 오염 감소에 확실한 효과를 나타내고,⁵⁾ 단체급식소 기구 등의 미생물 감소를 위해 살균소독제 처리가 필요한 것으로 보고되었다.⁶⁾

2002년 8월 식품위생법에 식품용 기구 및 용기 포장에 사용되는 살균소독제가 신설되어 모든 식품 가공업소 및 식품접객업소에서 사용되는 조리 기구, 용

*Corresponding author: Department of Public Health, Keimyung University, 1000 Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701 Korea, Tel: +82-53-580-5229, Fax: +82-53-580-5164, E-mail: kjm422@kmu.ac.kr
Received: 10 March 2011, Revised: 31 March 2011, Accepted: 18 April 2011

기·포장 등은 기준 및 규격이 인정된 ‘기구 등의 살균소독제’를 사용하도록 하고 있다. 또한 2003년 12월부터 식품위생법 제7조 2항 및 시행규칙 제4조에 따라 살균소독제 제품에 대하여 한시적 기준 및 규격 인정제도를 시행하게 되었으며,^{7,8)} 2008년 8월 식품의약품안전청 고시 제 2008-62호로 살균소독제에 대한 규격과 시험법을 식품첨가물의 기준 및 규격에 신설하게 되어 보다 체계적인 관리가 될 수 있는 기반이 마련되었다.⁹⁾

국내에 사용되고 있는 주요 살균소독제로는 염소계열, 요오드계열과 같은 화학 살균소독제로 살균소독력의 유효성을 가지고 널리 사용되고 있으나 악취, 금속 부식성과 피부에 대한 자극 등의 독성을 일으킬 수 있다. 최근 건강에 대한 관심과 식품의 안전성 및 식품 첨가물에 대한 인식이 높아지는 가운데, 인체에 해가 없는 천연물질의 식품첨가물과 항균물질의 검색을 위한 연구는 국내외적으로 활발하게 진행되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

항균 효과를 가진다고 알려진 한약재와 약용식물의 methanol 추출물을 한천배지 확산법으로 항균력을 측정하고, 그 중에서 항균 효과가 큰 소목을 대상으로 항균력과 살균소독력을 측정하였다.

소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 인도 말레이시아, 중국 남부 등의 열대 아시아에 분포하는 낙엽 관목의 콩과 식물이다. 목재는 단단하고, 심재는 밝은 홍색으로 약용으로 사용되며, 나무껍질과 열매에는 색소가 있어서 홍색 염료로 이용되기도 한다.¹³⁾ 지금까지 소목의 생리학적 활성 연구로는 혈관이완,¹⁴⁾ 면역강화,¹⁵⁾ 항염증,¹⁶⁾ 항균,^{17,18)} 항암작용,¹⁹⁾ 항바이러스^{20,21)} 등의 작용이 보고되었다.

이러한 작용을 가진 소목의 methanol 추출물을 이용하여 항균력을 알아보고, 병원성 미생물에 대한 살균소독력을 측정하여 천연 살균소독제로서의 개발에 기초 자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 2010년 5월 대구약령시에서 건조 상태의 재료를 구입하여 사용하였다. 항균활성을 비교하기 위해 천연 보존제로 시중에 판매되는 DF-100(grapefruit seed

extract)을 (주)에프에이뱅크로부터 구매하여 양성대조시료로 사용하였다.

2. 사용균주 및 배지

이 실험에 사용한 표준균주들은 Gram(-) 균주로써 *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311을, Gram(+) 균주로써 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 21772, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111를 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 분양 받아 사용하였다. 균의 증식과 항균력 측정을 위한 배지로는 Mueller Hinton agar(MHA)와 Tryptic Soy agar(TSA)를 사용하였다.

3. Methanol 추출물 및 용매 분획

분쇄한 시료에 5배량(W/V)의 methanol을 가하여 35°C에서 24시간씩 3회 진탕하여 추출하고, 여과하여 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 사용하였다. Methanol 추출물의 용매분획은 methanol 추출물에 일정량의 증류수를 가하여 현탁시키고 증류수와 동량의 n-hexane을 가하여 진탕하고 방치한 다음 분획 후 농축하여 n-hexane 분획을 얻었다. 남아있는 수용성층을 이와 같은 방법으로 chloroform, ethyl acetate 및 n-butanol을 첨가하여 순차 분획한 후 농축하여 각각 유기용매 분획 및 물 분획을 얻어 사용하였다.

4. 한천배지 확산법

소목 methanol 추출물의 항균성 검색은 paper disc (Ø6 mm)를 이용한 한천배지 확산법²²⁾으로 실험하였다. 공시균주를 Mueller Hinton broth(MHB)에 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 액을 McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석하였다. MHA에 희석한 균액을 멸균 면봉으로 도말하고, DMSO에 용해한 후 membrane filter(0.45 µm pore size, Millipore Corporation Bedford, U.S.A)로 제균시킨 추출물 30 µl를 paper disc에 흡수시킨 후 배지에 밀착시켰다. 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 disc 주위에 inhibition zone(mm)의 직경을 측정하였다. 소목 methanol 추출물의 최소성장억제농도 측정은 추출물을 DMSO에 용해하여 최고농도 50 mg/ml에서 0.195 mg/ml까지 2배씩 연속적으로 희석하였다.

MHA에 멸균 면봉으로 공시균주를 도말하고 각 단계의 희석 용액을 흡수시킨 paper disc를 평판배지 위에 놓고 37°C, 24시간 배양한 후 육안으로 관찰했을 때 미생물이 증식되지 않는 농도를 MIC (minimum inhibitory concentration)로 결정하였다.

5. 진탕 플라스크법

한국산업규격(KS) 항균기능 제품의 항균력 시험 방법 진탕플라스크법(KS-J-4206)으로 실험하였다.²³⁾ Tryptic Soy broth(TSB)에 공시균주를 접종하고, 37°C에서 24시간 배양한 균수가 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 개 되도록 희석 조정하여 1.0 ml씩 TSB가 들어있는 250 ml 용량의 멸균 삼각 플라스크에 접종한 것을 시험 용액으로 하였다. 소목 methanol 추출물을 멸균수로 희석한 것을 시험 시료로 하고, 대조 시료는 중화 용액을 사용하였다. 중화 용액은 sodium chloride 8.0 g, potassium chloride 0.2 g, disodium phosphate 1.44 g, sodium phosphate 0.24 g을 증류수 1000 ml에 녹인 후 멸균하여 사용하였다. 시험 용액에 시험 시료 3개와 대조 시료 3개를 넣어 균일하게 혼합한 삼각 플라스크를 37°C에서 120 rpm으로 24시간 진탕하였다. 접종 즉시 시험 시료와 대조 시료를 포함하고 있는 균액을 채취하여 TSA를 사용하여 균접종 초기 균수를 측정하였다. 배양 24시간 후 대조 시료 및 시험 시료를 포함하는 시험 용액을 채취하고 TSA를 사용하여 37°C 24시간 배양 후 균수를 확인하였다. 24시간 배양 후 대조 시료와 시험 시료의 균수 차이로 감소율을 계산하였다.

6. 살균소독력 시험

살균소독력 시험은 식품첨가물 공전 살균소독력 시험법²⁴⁾에 따라 살균소독제와 공시균주를 5분간 반응시켜 초기균수의 감소율(%)을 측정하였다. 시험관에 간접물질 1 ml 및 시험균주 현탁액 1 ml를 첨가하여 즉시 혼합하고, 20°C 항온수조에서 2분간 방치

한 후 시험 용액 8 ml를 첨가하여 혼합한 다음 20°C 항온수조에서 5분간 반응시켰다. 이 반응혼합액 1 ml를 취하여 중화제 8 ml와 물 1 ml가 들어있는 시험관에 넣고 20°C 항온수조에서 5분간 중화시켰다. 중화 완료 후 중화반응액 1 ml씩 2매의 페트리접시에 각각 넣고 TSA 배지를 가하여 배양한 집락수로부터 생균수 감소율을 계산하였다. 또한 살균소독력 시험과 동시에 검증시험을 수행하였다. 각 시험균과 시험용액 별로 다음의 식에 따라 생균수 감소율을 각각 계산하였다. 생균수 감소율이 99.999% 이상일 때 살균소독력이 있는 것으로 보았다.

$$\text{생균수 감소율(\%)} = \frac{N - 10Na}{N} \times 100$$

N : 시험균주 현탁액의 생균수(cfu/ml)

Na : 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수(cfu/ml)

III. 결과 및 고찰

1. Methanol 추출물의 항균활성

살균소독력 시험법에서 제시하는 5종의 표준균주에 대한 소목 methanol 추출물의 항균활성 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다. Methanol 추출물 50 mg/ml에서 항균활성은 모든 균에 대하여 나타났으며, 특히 Gram(+)균인 *S. aureus*, *B. cereus* 및 *L. monocytogenes*에서 각각 26 mm, 25 mm 및 29 mm로 강하게 나타났다. Gram(+)균 중에서도 *L. monocytogenes*에서 가장 높은 활성을 보였다. Shan 등²⁵⁾은 20가지 향신료와 26가지 약용식물의 추출물로 *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhimurium* 및 *L. monocytogenes*의 식중독균에 대한 항균활성 실험에서 *S. aureus*가 감수성이 가장 크고, *E. coli*가 가장 작은 것으로 보고하여 본 연구의 결과와 다른 양상을 보였다. 실험에 사용된 식물 추출물의 Gram(+)균에 대한 감수성이 Gram(-)균보다 크다는 결과^{25,26)}

Table 1. Antimicrobial activity of methanol extract of *Caesalpinia sappan* L. against pathogenic bacteria

	Microorganisms				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Caesalpinia sappan</i> L.	13*	26	25	15	29
DF-100	18	25	26	13	28

*Inhibition zone diameter (mm).

Fig. 1. Antimicrobial activity of methanol extract of *Caesalpinia sappan* L. against *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*.
1 : Blank (DMSO)
2 : Test (methanol extract of *Caesalpinia sappan* L., 50 mg/ml)
3 : Positive control (DF-100, 50 mg/ml)

와 같았다. Gram(+)균과 Gram(-)균의 세포벽의 주 성분은 뮤코펩티드(mucopetide)로 세포벽의 강인성을 유지하고 Gram(-)균의 세포벽에는 펩티드글리칸 성분 외에 당지질을 주성분으로 하는 외막이 존재한다. 이러한 차이로 Gram(+)균에서 보다 큰 항균활성이 나타나는 것으로 생각된다. 양성 대조군으로써 50 mg/ml 농도의 DF-100의 항균활성은 5종의 균 모두에서 활성을 나타내었고, Gram(+) 균주에서 소목 methanol 추출물과 유사한 활성을 보였다.

2. 유기용매 분획물별 항균활성

Methanol 추출물을 유기용매로 분획하여 얻은 분획물의 항균활성의 결과는 Table 2와 같다. 소목 methanol 추출물의 항 influenza 활성 측정 결과에서 hexane 분획물의 influenza virus 억제효과가 없다고 보고되었다.²⁰⁾ *B. cereus*에 대한 약간의 항균활성을 제외하고 n-hexane 분획물에 대한 활성이 나타나지 않는 것으로 보아 항균활성 성분은 극성에 가까운 물질로 생각된다. 국내산 약용식물 추출물에 대한 분획별 항균활성에서 ethyl acetate 분획물이 가장 강한 항균활성을 보였으나,²⁷⁾ 분획물별 항균활성 결과 butanol 분획물도 ethyl acetate 분획물 만큼 강한 항균활성을 가지는 것으로 보였다. 이것은 한약재의 채취시기, 채취장소, 추출 조건에 따라 성분의 차이가 있기 때문으로 생각된다.

3. 최소성장 억제 농도(MIC)

소목 methanol 추출물의 병원성 미생물에 대한 MIC 결과는 Table 3과 같다. *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhimurium* 및 *L. monocytogenes*에 대한 MIC는 각각 3.125 mg/ml, 1.563 mg/ml, 1.563 mg/ml, 3.125 mg/ml 및 1.563 mg/ml이었다. *S. aureus*와 *E. coli*에 대한 MIC는 1.6 mg/ml와 3.2 mg/ml로 최등²⁸⁾과 조 등²⁹⁾의 결과와 거의 유사한 것으로 나타났다.

4. 진탕 플라스크법에 의한 항균활성

진탕 플라스크법에 의한 항균활성 결과는 Table 4와 같다. *E. coli* 및 *S. typhimurium*에 대하여 3.125 mg/ml에서 99.999% 이상의 감소율을 보였고, *S. aureus*와 *L. monocytogenes*에 대하여 1.563 mg/ml에서, *B. cereus*는 6.25 mg/ml에서 99.999% 이상의

Table 2. Antimicrobial activities of each solvent fraction of *Caesalpinia sappan* L. against pathogenic bacteria

Microorganisms	Solvent fractions				
	Chloroform	Ethyl acetate	n-hexane	Butanol	Water
<i>E. coli</i>	12*	10	0	12	0
<i>S. aureus</i>	18	25	0	23	13
<i>B. cereus</i>	17	23	9	22	14
<i>S. typhimurium</i>	13	14	0	13	13
<i>L. monocytogenes</i>	19	28	0	29	14

*Inhibition zone diameter (mm).

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of methanol extract of *Caesalpinia sappan* L. against pathogenic bacteria

Microorganisms	Concentration (mg/ml)					
	6.25	3.125	1.563	0.781	0.391	0.195
<i>E. coli</i>	—	—	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	—	—	—	+	+	+
<i>B. cereus</i>	—	—	—	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	—	—	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	—	—	—	+	+	+

—: No growth, +: Growth.

Table 4. Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. using shake flask method against pathogenic bacteria

Microorganisms	Concentration (mg/ml)			
	6.25	3.125	1.563	0.781
<i>E. coli</i>	99.999±0.000*	99.999±0.000	99.917±0.004	99.658±0.015
<i>S. aureus</i>	100±0	99.999±0.000	99.999±0.000	99.992±0.000
<i>B. cereus</i>	99.999±0.000	99.994±0.000	99.894±0.003	94.447±0.640
<i>S. typhimurium</i>	99.999±0.000	99.999±0.000	99.988±0.000	99.237±0.018
<i>L. monocytogenes</i>	100±0	100±0	99.999±0.000	99.998±0.000

*Number represents reduction rate (%) at given concentration of methanol extract.

All values are mean of three observations.

Table 5. Reduction rate on viable count (cfu/ml) of pathogenic microorganisms of methanol extract of *Caesalpinia sappan* L.

Microorganisms	Concentration (mg/ml)		
	100	50	25
<i>E. coli</i>	99.999±0.000*	99.948±0.003	98.745±0.069
<i>S. aureus</i>	99.999±0.000	99.800±0.016	94.761±0.261
<i>B. cereus</i>	100±0	99.841±0.005	98.704±0.033
<i>S. typhimurium</i>	100±0	99.746±0.025	97.460±0.214
<i>L. monocytogenes</i>	100±0	100±0	99.085±0.077

*Number represents reduction rate (%) at given concentration of methanol extract.

All values are mean of three observations.

감소율을 보였다. 이것은 *B. cereus*를 제외하고 디스크 확산법을 이용한 최소성장 억제 농도 실험 결과와 같은 경향이다. 0.781 mg/ml에서 감소율을 비교하였을 경우 *L. monocytogenes*에 대하여 99.998%로 항균활성이 가장 높게 나타났다. 소목 methanol 추출물은 시험 균주 5종의 병원성 미생물에 대하여 항균력이 있음을 확인하였다.

5. 살균소독력

소목 methanol 추출물의 살균소독력 실험 결과는

Table 5와 같다. 균 감소율이 *L. monocytogenes*에 대해 50 mg/ml에서 균이 생육되지 않아 감소율 100%로 가장 높은 살균소독력을 보였다. *B. cereus*와 *S. typhimurium*에 대해서 100 mg/ml에서 균이 생육되지 않았고, *E. coli*와 *S. aureus*에서 99.999% 감소율을 나타냈다. 미생물 5종 모두에서 100 mg/ml에서 생균수 감소율이 99.999% 이상으로 살균소독력이 있는 것으로 확인되었다. Gram(-)균이 Gram(+)균보다 살균소독제에 대해 감수성이 높은 것으로 알려져 있지만 본 살균소독력 시험결과에서 *E. coli*보다 *S.*

*aureus*에서 살균소독력이 낮은 것은 *E. coli*는 peptidoglycan층에서 교차결합하는 두 tetrapeptide의 가교가 비교적 간단한 구조인데 반해서 *S. aureus*는 복잡한 3차 구조로 되어 있고 일부 살균소독제 성분과 결합하여 세포벽에 유효성분의 침투를 어렵게 하기 때문에 공시균주 및 식품분리균주 모두 제어가 어렵다고 보고된 것과 관련이 있는 것으로 생각된다.³⁰⁾ 또한 살균소독력이 항균활성과 다른 경향을 보이는 것은 항균활성과 살균소독력에 작용하는 소목 methanol 추출물의 농도와 반응 시간의 차이 때문으로 생각된다.

실제 법적으로 인정을 받은 살균소독제는 in vitro에서 살균력을 인정받았으나 실제 현장에서는 그 정도의 효과를 거두지 못한다는 보고,⁴⁾ 같은 속(genus) 균주라 하여도 종(species)에 따라 소독제에 대한 활성이 다르다는 보고,^{31,27)} 살균소독력 시험법에서 제시하는 표준균주와 식품으로부터 분리한 식중독균의 감수성의 차이에 대한 보고³²⁾를 감안할 때 식중독 예방을 위한 실질적인 상품화를 위해서는 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

IV. 요약 및 결론

소목(*Caesalpinia sappan* L.) methanol 추출물의 5종의 식중독균에 대한 항균활성과 살균소독력을 한천배지 확산법으로 측정 한 결과에서 50 mg/ml에서 모든 균에 대하여 항균활성을 보였으며, *L. monocytogenes*에 대해 가장 높은 활성을 보였다. Methanol 추출물의 항균활성은 현재 시판되고 있는 천연 보존제 DF-100와 유사한 수준으로 나타났다. 소목 methanol 추출물의 유기용매 분획물과 물 분획물의 항균활성을 조사한 결과에서 n-hexane 분획물을 제외한 대부분의 분획물에서 항균활성이 나타났다. ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물이 다른 분획물에 비해 Gram(+) 균주에 대한 항균 활성이 높았다. 5종의 미생물에 대한 methanol 추출물의 최소성장 억제농도 측정결과에서 Gram(+) 균주에 대한 MIC는 1.563 mg/ml였고, Gram(-) 균주에 대한 MIC는 3.125 mg/ml였다. 진탕 플라스크법에 의한 항균활성 결과에서 *E. coli*, *S. typhimurium* 및 *S. typhimurium*에 대하여 3.125 mg/ml에서 균 감소율 99.999%를 나타냈고, *S. aureus*, *L. monocytogenes*

의 균 감소율이 99.999%를 나타내는 농도는 1.536 mg/ml였다. 살균소독력 결과는 100 mg/ml에서 5종의 균에 대하여 99.999% 이상의 감소율을 나타냈으며, *L. monocytogenes*에 대한 항균활성과 살균소독력이 가장 강한 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 소목 methanol 추출물이 균주에 따라 활성에 차이는 있지만 식중독 균에 대하여 항균활성과 살균소독력이 있는 것으로 조사되어 천연 살균소독제로서 개발이 가능할 것으로 생각되며, 식중독 예방을 위한 실질적인 상품화를 위하여 식품에서 분리한 균들과 실제 작업환경들을 고려한 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

참고문헌

1. Mok CK, Lee NH. Distribution of ultraviolet intensity and uv leaking of commercial uv sterilizers used in restaurants. *Korean J Food Sci Technol.* 2008; 40(2): 228-233.
2. Park HK, Kim KL, Shin HW, Kye SH, Yoo HC. Evaluation of microbiological hazards of cooking utensils and environment of mass catering establishments. *J Food Hyg Safety.* 2000; 15(4): 315-323.
3. Bae HJ. Analysis of contamination of bacteria from raw materials, utensils and workers' hands to prepared foods in foodservice operations. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2006; 35(5): 655-660.
4. Park HK, Park BK, Shin HW, Park DW, Kim YS, Cho YH, Lee KH, Kang KJ, Jeon DH, Park KH, Ha SD. Evaluation of Effectiveness of Sanitizers and Disinfectants used in domestic food processing plants. *Korean J Food Sci Technol.* 2005; 37(6): 1042-1047.
5. Park JY, Kim JS, Kim JG. A study on the hand washing awareness and practices of food-service employees and the load of index microorganism on the hands. *J Environ Health Sci.* 2010; 36(2): 95-107.
6. Lee YS, Ha JH, Lee SH, Kim YS, Kim HI, Choi HC, Jeon DH, Lee YJ, Ha SD. Evaluation of effect of sanitizers and disinfectants against microorganisms on surfaces of food utensils of institution food service. *J BET Research Institute.* 2007; 3(1): 55-68.
7. Kang KJ. Korean disinfectants/sanitizers for food safety. *Food Science and Industry.* 2005; 38(3): 99-106.
8. Kim HI, Lee KH, Kwak IS, Eom MO, Jeon DH,

- Sung JH, Choi JM, Kang HS, Kim YS, Kang KJ. The establishing test method of bactericidal activity and the evaluating of Korean disinfectants/sanitizers efficacy. *Korean J Food Sci Technol.* 2005; 37(5): 838-843.
9. KFDA. Korean Food Code. Korean Food and Drug Administration, Seoul, Korea; 2008.
 10. Oh DH, Ham SS, Park BK, Ahn C, Yu JY. Antimicrobial activities of natural medicinal herbs on the food spoilage or foodborne disease microorganisms. *Korean J Food Sci Technol.* 1998; 30(4): 957-963.
 11. Son DH, Lee SI, Chung YG. Antioxidative of medicinal plants on pathogenic bacteria. *J Korean Soc Hygienic Sciences.* 2001; 7(2): 103-108.
 12. Xu W, Qu W, Kunlun H, Feng G, Yang J, Zhao H, Luo YB. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 2007; 45: 126-133.
 13. Kwon HJ, Kim YH, Nam KW, Kim SK, Bang IS, Han MD. Antibacterial activities of *Caesalpinia sappan* L. extract and structural analysis of its related brazilin. *Kor. J. Microbiol Biotechnol.* 2010; 38(1): 105-111.
 14. Xie YW, Ming DS, Xu HX, Dong H, But PP. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. *Life Science.* 2000; 67: 1913-1918.
 15. Choi SY, Yang KM, Jeon SD, Kim JH, Khil LY, Chang TS, Moon CK. Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice. *Planta Med.* 1997; 63: 456-458.
 16. Jeong IY, Jin CH, Park YD, Lee HJ, Choi DS, Byun MW, Kim YJ. Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L. in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J Food Sci Nutr.* 2008; 13: 253-258.
 17. Woldemichael GM, Singh MP, Maiese WM, Timmermann BN. Constituents of antibacterial extract of *Caesalpinia paraguariensis* burk. *Z. Naturforsch.* 2003; 58: 70-75.
 18. Lim MY, Jeon JH, Jeong EY, Lee CH, Lee HS. Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria. *Food Chem.* 2007; 100: 1254-1258.
 19. Lee JS, Kim JH, Kim YG. Anticancer effects of *Caesalpinia sappan* extracts on oral carcinoma and osteosarcoma cells. *J. Kor. Oral and Maxillofac Surg.* 2007; 33(6): 583-590.
 20. Kang HM. HPLC analysis of anti-influenza viral components of the methanol extract of *Caesalpinia sappan* L. *Bull. Nat. Sci., Yonjin University.* 1999; 4(1): 179-195.
 21. Chiang LC, Chiang W, Lui MC, Lin CC. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob. Chemother.* 2003; 52: 194-198.
 22. Korea Centers for Disease Control & Prevention, Korean National Institute of Health. Standard methods for antimicrobial susceptibility testing. Korea Centers for Disease Control & Prevention, Korean National Institute of Health, Seoul, Korea; 2008.
 23. Ministry of Knowledge Economy, Korean Agency for Technology and Standards Testing methods for antibacterial activity of antibacterial functional products part1 Shake flask method. Ministry of Knowledge Economy, Korean Agency for Technology and Standards, Seoul, Korea; 2008.
 24. KFDA. Food additive code. Test method of bactericidal Activity. Korea Food & Drug Administration. Seoul, Korea; 2008.
 25. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J Food Microbiol.* 2007; 117: 112-119.
 26. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology.* 1998; 26: 118-122.
 27. Shin DH, Kim MS, Han JS. Antimicrobial effects of ethanol extracts from some medicinal herbs and their fractionates against food-born bacteria. *Korean J Food Sci Technol.* 1997; 29(4): 808-816.
 28. Choi I, Chang HS, Yun YM, Um JC. Antimicrobial Activity of Medicinal Herbs against *Staphylococcus aureus* and *salmonella gallinarum*. *Kor. J. of Microbiol. Biotechnol.* 2002; 30(2): 177-183.
 29. Cho JY, Choi I, Hwang EK. Antimicrobial activity of extracts from medicinal herbs against *Escherichia coli*. *Korea J Vet Res.* 2003; 43(4): 625-631.
 30. Kim HI, Jeon DH, Kang KJ, Eom MO, Sung JH, Kang HS, Kwak HS, Kwon KS, Lee YJ. Comparative Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Korean Foods to Commercially Available Sanitizers/Disinfectants. *Korean J Food Sci Technol.* 2007; 39(1): 104-107.

31. Lee KU, Ju YR, Park MS, Oh KS, Kang YS, Lee KJ, Lee YJ. Evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants using in Korea. *The Report of National Institute of Health*. 1994; 31(1): 60-71.
32. Kang HS. Potnecy of some disinfectants on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Seoul, Korea University; 2006.