pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 4, pp. 336~340 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.4.336

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Escherichia coli O157:H7에 감염된 마우스에 대한 정향 추출물의 항균효과

이수미[1] · 손송이[2] · 이후장[1,2]*

[1]경상대학교 보건대학원 환경보건학과, [2]경상대학교 수의과대학 · 동물의학연구소

Antimicrobial Activity of *Flos Syzygii Aromatici* Extracts against Mice Infected with *Escherichia coli* O157:H7

Soo-Mi Lee[1], Song Ee Son[2], and Hu Jang Lee[1,2]*

[1]*Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health, Gyeongsang National University, Chinju, Korea*
[2]*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, Korea*

(Received May 19, 2017/Revised June 3, 2017/Accepted July 9, 2017)

ABSTRACT - The present study evaluated the antibacterial effect of *Flos syzygii Aromatici* methanolic extracts (FSAE). In addition, the effectiveness of FSAE against *Escherichia coli* O157:H7 infection was studied using ICR female mice. At 24 h after incubation of *E. coli* O157:H7, FSAE at the concentration of 0.269 ($p < 0.05$), 0.538 ($p < 0.001$) and 1.075 mg/mL ($p < 0.001$) significantly inhibited the growth of *E. coli* O157:H7 compared to the control group. After single challenge with *E. coli* O157:H7, forty female ICR mice were divided into four experimental groups which were orally administered with saline (control), 0.538 (group 1), 1.075 (group 2) and 2.15 mg/mL (group 3) of FSAE, respectively. On the 3rd day, the number of fecal *E. coli* O157:H7 in group 2 ($p < 0.05$) and group 3 ($p < 0.01$) was significantly decreased compared to that in the control group. On the 7th day post-treatment, the number of fecal *E. coli* O157:H7 in all FSAE-treated groups was significantly decreased compared to that in the control group (group 1, $p < 0.05$; group 2 and 3, $p < 0.001$). According to the results of the present study, administration of FSAE to mice can reduce the severity of *E. coli* O157:H7 infection. Therefore, the current study suggests that FSAE could be a good candidate for the treatment of enteric infections in domestic animals.

Key words : *Flos syzygii Aromatici*, Antibacterial Activity, *E. coli* O157:H7

최근 우리 경제의 급속한 발달로 집단급식이나 외식문화의 확산으로 인한 식중독의 발생건수나 규모가 점점 대형화되고 있다. 2016 식품의약품 통계연보에 따르면, 국내에서 발생하고 있는 세균성 식중독의 발생원인 중 병원성 대장균이 발생 건수와 환자수에 있어서 제일 높은 비중을 차지하고 있는 것으로 나타나 있다[1].

병원성 대장균의 인체감염은, 덜 익힌 고기 혹은 오염된 샐러드와 같은 신선제품의 섭취, 오염된 음용수 섭취, 그리고 비위생적인 생활을 통해 사람과 사람사이에 직접적인 전파를 통해 발생하는 것으로 알려져 있다[2].

Escherichia coli O157:H7 (*E. coli* O157:H7)은 시가 톡신-생성 대장균(Shiga toxin-producing *E. coli*)의 일종으로 낮은 균량으로도 감염을 일으킬 수 있고, 오염된 우유, 육류, 유제품 그리고 신선제품들과 같은 다양한 제품들에 의해 인체 감염이 일어날 수 있기 때문에 식품위생에 있어서 주요한 문제로 인식되어지고 있다[3,4].

미국의 경우, 매년 *E. coli* O157:H7에 오염된 식품에 의해 63,000명의 환자가 발생하고 있으며, 이 중 2,138명이 병원에 입원하고, 20여명이 사망하고 있는 것으로 보고되고 있다[5]. 우리나라의 경우, 식중독 통계 자료에 따르면, 2012~2016년 동안 발생한 세균성 식중독 중 병원성 대장균이 전체 발생 건수의 11.9%를 차지하였으며, 전체 발생 환자수의 25%를 차지하고 있는 것으로 나타났다[6].

최근, 항생물질과 살생물제에 대한 내성균들이 먹이사슬을 통해 확산되고 있어, 인류의 건강을 위협하고 있다[7]. 살생물제의 내성기전은 항생물질과 유사한 것으로 알려져 있으며, 항생물질과 살생물제에 대한 교차 내성을 갖는 병원성 세균들이 출현하고 있다[8].

2015년 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링에 따르면[9],

*Correspondence to: Hu Jang Lee, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 52828, Korea
Tel: 82-55-772-2352, Fax: 82-55-772-2308
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

가축 및 도축장 도체로부터 채취한 시료에서 분리한 균주들에 대한 항생제 감수성검사를 실시한 결과, 대장균의 내성률은 소, 돼지 모두에서 테트라사이클린이 각각 43.7%와 71.6%로 가장 높았으며, 분리된 대장균 균주들의 3종 이상의 항생제에 대한 다제내성률은, 소, 돼지 그리고 닭에서 각각 분리한 균주의 18.4% (38/206), 73.4% (160/218), 84.7% (160/189)로 나타났다. 또한, 최근에 식품보존제에 대한 저항성 세균에 대한 많은 연구들이 보고되고 있다. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, 그리고 일부 *Bacillus* spp.는 가공식품의 보존제로 사용되는 nisin에 대해 저항성을 갖는 것으로 보고되었으며[10], *E. coli* O157:H7이 식품의 산미료 혹은 보존제로 사용되는 구연산에 대해 저항성을 갖는 것으로 보고되었다[11].

오늘날, 전 세계적으로 항생물질과 식품 보존제에 대한 내성균의 출현에 따른 위해를 최소화하고 기존의 항생물질과 합성 식품보존료를 대체하기 위해 천연물들에서 항균활성 물질을 탐색하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[12-14].

향신료의 일종인 정향(*Flos syzygii Aromatici*)은 정향나무(*Eugenia caryophyllata* Thumb)의 꽃봉오리를 말린 것으로서 오래 전부터 유럽의 각국에서 각종 육류와 야채요리에 널리 이용되고 있으며, 우리나라에서도 본래의 향미 강화, 나쁜 향미 억제, 방충 및 곰팡이 방제 등의 목적으로 널리 이용되고 있다[15]. 최근까지, 정향의 항균효과에 관한 많은 연구가 이루어져왔다[16-18].

정향추출물을 이용한 식중독균에 대한 항균효과에 관한 많은 연구들이 진행되었으나, 정향추출물의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균효과 및 *E. coli* O157:H7 감염 실험동물에 대한 치료효과에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 정향추출물을 이용하여 식중독균인 *E. coli* O157:H7에 대한 항균활성 및 *E. coli* O157:H7에 감염된 마우스에서의 치료효과를 평가하고자 하였다.

Materials and Methods

공시제제

정향은 동물생리활성자원은행(진주)으로부터 구입하여, 세척하여 건조한 후, 세절하여 분말화하였다. 추출은 Kim 등[19]의 방법을 변형하여 사용하였으며, 추출용매는 Lee 등(2004)[20]의 연구결과를 참고하여 메탄올을 사용하였다. 분말화한 정향 100 g에 메탄올 1,000 ml을 가한 다음, 교반하면서 24시간 동안 실온에서 추출한 다음, 상층액을 모아 회전증발농축기(N-1000S, EYELA Co, Tokyo, Japan)를 이용하여 메탄올을 제거하고, 감압 농축하였다. 이후에, 농축액을 여과지(Whatman No. 1)를 이용하여 여과한 다음, 여과액을 동결건조기(LABCONCO, Kansas, MO, USA)를 이용하여 동결 건조하였다. 회수율은 13.7%이었다.

*In vitro*에서의 항균시험을 위해, 정향 동결건조분말 2 g를 10 ml 증류수에 용해시켜 0.2 μm syringe filter (Corning Costar, USA)로 여과한 다음, 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 마우스 접종시험에서는 정향 추출물(FSAE)을 여러 농도로 하여 군별로 마우스에 경구로 투여하였다.

사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주, *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895)은 농림축산검역본부(김천)로부터 분양받아 사용하였다. *E. coli* O157:H7을 blood agar (Komed, Korea)에서 배양하여 증식여부를 확인한 후, Tryptic Soy Broth (TSB, Difco BRL, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

마우스 접종시험에서는, *E. coli* O157:H7을 TSB (Difco BRL, USA)에 접종하여 shaking incubator를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 2,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음, phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 PBS에 재부유하여 균수를 1.0×10^6 CFU/ml로 하여 마우스 개체(체중평균, 26.4 ± 1.5) 당 catheter (Zonde, 18G)를 이용하여 0.5 ml씩 경구로 접종하였다.

항균력 시험

한천배지를 이용한 한약재 추출물에 대한 항균력 검색에서 FSAE 시료에 대하여 dilution test를 통해 시간 경과에 따른 *E. coli* O157:H7에 대한 증식억제 효과를 측정하였다. 125 ml 삼각 플라스크에, 30 ml TSB, *E. coli* O157:H7을 10^6 CFU/ml 농도로 희석한 배양액 0.1 ml, 그리고 FSAE의 최종농도가 0.269, 0.538 그리고 1.075 mg/ml이 되도록 가하여 37°C에서 24시간동안 배양하면서 4, 8, 16 그리고 24시간에 각각 생균수를 측정하였다. FSAE의 농도는 본 연구에 앞서 수행한 FSAE의 *E. coli* O157:H7에 대한 최소억제농도(0.269 mg/ml)와 최소살균농도(1.075 mg/ml)를 참고하여 설정하였다. 생균수 측정은 배양액 시료 0.1 ml을 채취하여 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco BRL, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 형성된 집락수를 구한 다음, 세균의 생존율을 다음 공식에 의해 구하여 나타내었다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{각 농도별 시간대별 집락수}}{\text{각 농도별 0시간에서의 집락수}} \times 100$$

실험동물

5주령, 평균체중 19 ± 1.4 g의 Specific Pathogen Free (SPF) ICR 마우스 암컷 40마리를 (주)샘타코 (오산)로부터 구입하여, SPF 마우스임을 확인하기 위한 미생물학적 검사를 실시하여 특정 병원체가 없는 것을 확인한 후, 실험에 사용하였다. 마우스는 대조군과 실험군 각각 10마리씩

을 임의로 선택하여 케이지에 분리하여, 1주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. SPF 상태를 유지하기 위해 음수, 사료, 깔짚 등은 모두 고압멸균 후 사용하였으며, 사육온도와 습도는 각각 22 ± 1.0°C과 50 ± 10%로 하였으며, 12시간 간격으로 조명을 조절하였으며, 환기는 자동으로 조절되는 실험동물 사육장치((주)쓰리샤인, 대전)에서 사육하였다.

마우스 접종 및 약제투여

대조군과 실험군 모두에 대하여, *E. coli* O157:H7을 1×10^7 CFU/ml로 함유하도록 PBS에 현탁시켜 이 용액 0.5 ml를 경구 투여하여 공격 접종을 한 후, 대조군에는 증류수를 투여하였고, 실험군은 각각 0.538, 1.075 그리고 2.15 mg/ml의 FSAE를 catheter (Zonde, 18G)를 이용하여 0.5 ml씩 경구로 1일 1회로 하여 7일 동안 투여하였다. 음용수와 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

마우스 분변 중 *E. coli* O157:H7 균수의 변화

E. coli O157:H7을 접종한 마우스에 대하여, 대조군은 증류수를, 그리고 실험군은 각각 군별로 0.538, 1.075 그리고 2.15 mg/ml의 FSAE를 투여하면서, 투약 후, 1, 3, 5, 그리고 7일에 각 군의 마우스로부터 분변을 채취하였다. 채취한 마우스의 분변을 0.85% 생리식염수에 십진 희석하고, xylose lysine desoxycholate agar (XLD, Difco BRL, USA)를 사용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 집락수를 측정하여, colony forming unit (CFU)/g feces로 환산하여 나타내었다.

통계학적 분석

결과에 대한 통계적 처리는 Sigma plot (Systat Software Inc., USA)을 이용하여 Student's t-test로 실시하였으며, $p < 0.05$일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

Results and Discussion

항균력 시험

Fig. 1은 한천배지를 이용하여 다양한 FSAE 농도에서 *E. coli* O157:H7에 대한 항균력 시험 결과를 나타낸 것이다.

FSAE 처리 후 4시간째에는, 1,075 μg/ml을 처리한 군에서 무처리 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 *E. coli* O157:H7의 생존율이 감소하였다($p < 0.01$). FSAE 처리 후 8시간째에는, 538 ($p < 0.05$)와 1,075 μg/ml ($p < 0.01$)을 처리군 군들에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 *E. coli* O157:H7의 증식을 억제하는 것으로 나타내었다. FSAE 처리 후 16시간째에는, 538 ($p < 0.01$)와 1,075 μg/ml ($p < 0.001$)을 처리군 군들에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 *E. coli* O157:H7의 생존율

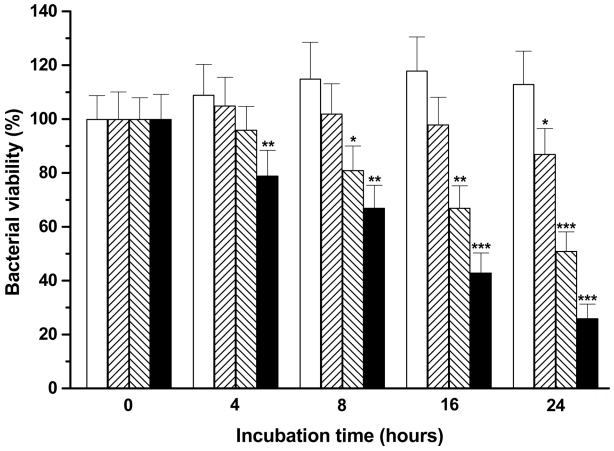

Fig. 1. The inhibition effect of *Flos Syzygii Aromatici* methanolic extracts against *E. coli* O157:H7. □, control group treated with phosphate buffer solution (PBS); ▨, the group treated with 269 μg/ml (MIC) of *Flos Syzygium Aromatici* methanolic extract (FSAE); ▧, the group treated with 538 μg/ml (2 × MIC) of FSAE; ■, the group treated with 1,075 μg/ml (MBC) of FSAE. All experiments were independently done in triplicate. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{**}p < 0.001$, compared to control.

이 감소하여 FSAE의 높은 증식억제 효과를 나타내었다. FSAE 처리 후 24시간째에는, 모든 처리군이 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 *E. coli* O157:H7에 대한 증식억제 효과를 보였다(269 μg/ml, $p < 0.05$; 538 μg/ml, $p < 0.001$; 1,075 μg/ml, $p < 0.001$).

Lee와 Stein[21]은 오매, 오미자, 그리고 황련의 메탄올 추출물 합제(5 : 2 : 3)를 이용하여, *E. coli* O157:H7에 대한 증식억제 효과를 조사한 결과, 배양 후 18시간까지 대조군에 비해 감소하는 결과를 나타내었으나, 통계적으로는 유의한 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 이 등[22]은 마늘 물추출물을 이용하여 *E. coli* O157:H7에 대한 증식억제 효과를 조사한 결과, 마늘 물추출물을 24 mg/ml의 농도로 첨가한 경우, 배양 후 8시간부터 24시간까지 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하는 결과를 나타내었다고 보고하였다($p < 0.01$). 또한, Park[18]은 정향의 건조분말을 액체배지에 0.1~0.3%로 첨가한 후, *E. coli* O157:H7를 48시간 동안 배양한 결과, 정향 분말을 0.1~0.3%로 첨가한 모든 군들에서 무첨가 대조군과 비교하여 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 FSAE의 *E. coli* O157:H7에 대한 증식억제 효과는 앞서 언급한 선행연구들의 결과와 비교하여 매우 뛰어난 것으로 나타났다. 정향에 함유된 대표적인 생리활성 물질인 eugenol, chavicol, β-caryophyllene, kaempferol, flavonoid류와 eugeniin, 1-desgalloyleugeniin 등의 tannin류, 일부 수용성 페놀성 물질들이 메탄올과 같은 극성에 가까운 유기용매에 쉽게 용출되는 것으로 알려져 있다[23]. 따라서 본 연구에서 FSAE가 *E. coli* O157:H7에 대해 강한 항

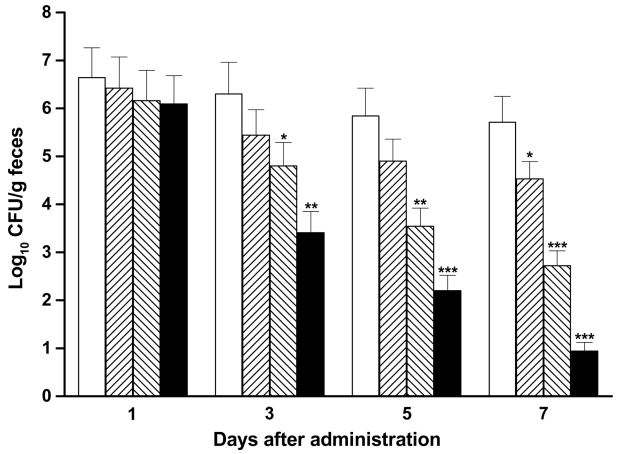

Fig. 2. Fecal *E. coli* O157:H7 counts in each mouse group during the experiment (means ± SD, n = 10). □, control group treated with phosphate buffer solution (PBS) (n = 10); ▨, the group treated with 538 μg/ml (2 × MIC) of *Flos Syzygii Aromatici* methanolic extract (FSAE) (n = 10); ▧, the group treated with 1,075 μg/ml (MBC) of FSAE (n = 10); ■, the group treated with 2,150 μg/ml (2 × MBC) of FSAE (n = 10). $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, compared to control.

균활성을 보인 것은 FSAE에 항균활성이 강한 다양한 생리활성 물질들이 다량으로 함유되어 강한 항균력을 보인 것으로 사료된다.

마우스 분변 중 *E. coli* O157:H7의 검출

Fig. 2는 마우스에 *E. coli* O157:H7을 공격 접종한 후, FSAE를 0.538, 1.075 그리고 2.15 mg/ml의 농도로 7일 동안 경구 투여하면서, 마우스의 분변을 채취하여 *E. coli* O157:H7 균수의 경시적 변화를 관찰한 것을 나타낸 것이다. FSAE 투여 후 3일째에는 1.075 ($p < 0.05$)와 2.15 mg/ml ($p < 0.001$)을 투여한 군들의 경우, 무처리 대조군과 비교하여 유의성 있게 *E. coli* O157:H7 균수가 감소하였다. FSAE 투여 후 5일째에는 1.075 ($p < 0.01$)와 2.15 mg/ml ($p < 0.001$)을 투여한 군들의 경우, 무처리 대조군과 비교하여 유의성 있게 *E. coli* O157:H7 균수가 감소하는 결과를 나타내었다. FSAE 투여 후 7일 째에는 FSAE를 투여한 모든 군들에서 무처리 대조군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 *E. coli* O157:H7 균수가 감소하는 결과를 나타내었다(2 × MIC 투여군, $p < 0.05$; MBC와 2 × MBC 투여군, $p < 0.001$).

Cha 등[24]은 *E. coli* O157:H7을 감염시킨 마우스에 황련, 감초, 오미자, 산수유 합제(1 : 1 : 1: 1, w/w)를 열수추출한 추출물을 7일 동안 10% 농도로 음수에 혼합하여 투여한 결과, 분변 중의 *E. coli* O157:H7의 균수가 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다고 보고하였다($p < 0.01$). 또한, Itelima와 Agina[25]는 여러 가지 식물의 에탄올 추출물을 3 mg/kg body weight의 농도로 *E. coli* O157:H7을 감염시킨 랫드에 매일 경구 투여한 결과, 마늘과 생강 추출물을 투여한 군의 경우 각각 투여 후 5일째와 7일째에 분변으로부터 *E. coli* O157:H7이 검출되지 않았다고 보고하였다. 앞선 연구결과들에서 투여용량을 고려할 경우, 본 연구에서 사용한 FSAE의 *E. coli* O157:H7에 감염된 마우스에 대한 치료효과가 Cha 등[24]의 한약재 합제보다 뛰어났으며, Itelima와 Agina[25]의 마늘과 생강의 에탄올 추출물과는 유사한 치료효과를 보였다.

결론적으로, 본 연구에 사용된 FSAE는 *E. coli* O157:H7에 대하여 강력한 항균활성과 *E. coli* O157:H7에 감염된 마우스에 대하여 뛰어난 치료효과를 나타내었다. 따라서 향후, FSAE에 대하여 가축에 있어서 *E. coli* O157:H7 감염증 치료를 위한 치료제와 식품보존제로써의 적용연구와 안전성 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구는 정향추출물의 *E. coli* O157:H7에 대한 항균효과와 *E. coli* O157:H7 감염 마우스에 대한 치료효과를 평가하기 위해 수행되었다.

정향 메탄올 추출물(FSAE)을 이용하여 *E. coli* O157:H7에 대한 항균효과 확인 시험을 수행한 결과, 배양 후 24시간째에, FSAE를 첨가한 모든 군들에서 *E. coli* O157:H7의 생존율이 무투여 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하는 결과를 보여(0.269 mg/ml, $p < 0.05$; 0.538과 1.075 mg/ml, $p < 0.001$), FSAE가 *E. coli* O157:H7의 증식억제 효과가 뛰어난 것으로 확인되었다. 또한, *E. coli* O157:H7을 감염시킨 마우스에 FSAE를 경구로 투여한 결과, 투여 후 3일째에, FSAE를 1.075 ($p < 0.05$)와 2.15 mg/ml ($p < 0.01$)로 투여한 군들에서 대조군과 비교하여 분변내 *E. coli* O157:H7의 균수가 유의성 있게 감소하였으며, 투여 7일째에는, 모든 FSAE 투여군들에서 대조군과 비교하여 *E. coli* O157:H7의 균수가 통계적으로 유의성 있게 감소하였다(0.538 mg/ml, $p < 0.05$; 1.075와 2.15 mg/ml, $p < 0.001$). 이상의 연구결과로부터, FSAE를 *E. coli* O157:H7에 감염된 마우스에 경구로 투여할 경우, 감염증상을 완화 시킬 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Ministry of Food & Drug Safety: 2016 Food & Drug Statistical Yearbook. II. Food and Nutrition. 8. Foodborne outbreaks. Ministry of Food & Drug Safety, Cheongju, pp. 230-231 (2016).
2. Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P. and Frankel, G.: Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol*., **12**, 2385-2397 (2010).

3. Paik, I.K. and Han, T.H.: Comparison of detection of *Escherichia coli* O157 between culture after acid treatment and polymerase chain reaction after enrichment. *Korean J. Lab. Med*., **22**, 331-335 (2002).
4. Coffey, B., Rivas, L., Duffy, G., Coffey, A., Ross, R.P. and Mcauliffe, O.: Assessment of *Escherichia coli* O157:H7-specific bacteriophages e11/2 and e4/1c in model broth and hide environments. *Int. J. Food Microbiol*., **147**, 188-194 (2011).
5. Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. and Griffin, P.M.: Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg. Infect. Dis*., **17**, 7-15 (2011).
6. Food Safety Korea. Foodborne disease statistics: year/cause substance. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoning Stat.do?menu_no=519&menu_grp=MENU_GRP02. Accessed April 28, 2017.
7. Capita, R. and Alonso-Calleja, C.: Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., **53**, 11-48 (2013).
8. Poole, K.: Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol*., **92**(Suppl), 55S-64S (2002).
9. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Animal and Plant Quarantine Agency and National Institute of Food & Drug Safety Evaluation: 2015 Monitoring of antimicrobial resistance and use for livestock and animal products. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Animal and Plant Quarantine Agency, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Seoul, pp. 1-2 (2015).
10. Hoover, D.G. and Hurst, A.: Nisin. *In Antimicrobials in Foods*, 2nd Ed. (Davidson, P.M. and Branen, A.L. eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 369-394 (1993).
11. Bjornsdottir, K., Breidt, F. Jr. and McFeeters, R.F.: Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol*. **72**, 660-664 (2006).
12. Mani, F., Damasceno, H.C., Novelli, E.L., Martins, E.A. and Sforcin, J.M.: Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J. Ethnopharmacol.,* **105**, 95-98 (2006).
13. Hughey, V.L. and Johnson, E.A.: Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and foodborne disease. *Appl. Environ. Microbiol*., **53**, 2165-2170 (1987).
14. Sui, J., Cao, L. and Lin, H.: Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against Listeria monocytogenes and preliminary evaluation of its potential for food preservation. *J. Sci. Food Agric*., **91**, 1946-1950 (2011).
15. Park, C.S.: Antibacterial acitivity of edible plant against pathogenic bacteria. *Korean J. Postharvest Sci. Technol*., **5**, 89-96 (1998).
16. Nzeako, B.C., Al-Kharousi, Z.S. Al-Mahrooqui, Z.: Antimicrobial activities of clove and thyme extracts. *Sultan Qaboos Univ. Med. J*., **6**, 33-39 (2006).
17. Park, C.S. and Choi, M.A.: Effect of clove (*Eugenia caryophyllata* Thumb) on the survival of *Listeria momocytogenes* and *Salmonella typhimurium* during cold storage. *Korean J. Soc. Food Sci*., **13**, 602-608 (1997).
18. Park, C.S.: Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by clove (*Eugenia Caryophyllata* Thumb). *Korean J. Soc. Food Sci*., **14**, 9-15 (1998).
19. Kim, J.D.: The growth inhibiting effect of *E. coli* KCTC 1039 by combination of natural products bearing antioxidant capacity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*., **17**, 490-496 (2002).
20. Lee, O.H., Jung, S.H., Son, J.Y.: Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **33**, 494-499 (2004).
21. Lee, J.H. and Stein, B.D.: Antimicrobial activity of a combination of *Mume Fructus*, *Schizandrae fructus*, and *Coptidis rhizoma* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O111, and O157 and its effect on shiga toxin releases. *Foodborne Pathog. Dis*. **8**, 643-646 (2011).
22. Lee, S.Y., Nam, S.H., Lee, H.J., Son, S.E., Lee, H.J.: Antimicrobial activity of aqueous garlic extract against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Hyg. Saf*., **30**, 210-216 (2015).
23. Park, C.S. and Choi, M.A.: Effect of clove (*Eugenia caryphyllata* Thumb) on the survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* during cold storage. *Korean J. Food Sci. Technol*., **13**, 602-608 (1997).
24. Cha, C.N., Lee, Y.E., Son, S.E., Park, E.K., Choi, H., Kim, S., Lee, H.J.: Antimicrobial activity of sodium chlorate and Korean herbal extracts against mice infected with *Escherichia* coli O157:H7. *J. Food Hyg. Saf*., **27**, 81-86 (2012).
25. Itelima, J.U. and Agina, S.E.: *In vivo* antimicrobial activity of plant species on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into albino rats. *World J. Microbiol*., **1**, 2-8 (2014).