

2007年 2月

碩士學位 論文

항암활성 및 *Helicobacter pylori* 억제능
유산균의 분리와 특성 규명

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

李 栗

항암활성 및 *Helicobacter pylori* 억제능
유산균의 분리와 특성 규명

*Isolation and characterization of lactic acid bacteria showing
anti-cancer activity and anti-Helicobacter pylori*

2007年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

李 栗

항암활성 및 *Helicobacter pylori* 억제능
유산균의 분리와 특성 규명

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2006年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 栗

李 栗의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 _____ 印

委 員 조선대학교 교수 _____ 印

委 員 조선대학교 교수 _____ 印

2006 年 11 月

朝鮮大學校 大學院

목 차

<i>ABSTRACT</i>	VI
<i>LIST OF TABLE</i>	III
<i>LIST OF FIGURE</i>	V
제 1 장 서 론.....	1
제 2 장 실험재료 및 방법.....	4
제 1 절 <i>Helicobacter pylori</i> 억제 활성을 가진 유산균주의 분리	4
1. 사용균주 및 배양	4
2. <i>Helicobacter pylori</i> 억제 유산균주의 분리	4
3. <i>Helicobacter pylori</i> 억제 유산균주의 동정	5
4. <i>Helicobacter pylori</i> 억제 활성	8
5. <i>Helicobacter pylori</i> urease활성 억제 효과	9
제 2 절 <i>Helicobacter pylori</i> 의 억제 활성을 가진 유산균주의 특성	10
1. 배양시간에 따른 생육도	10
2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도	10
3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도	10
제 3 절 분리균주의 장내 생존성 및 안전성	11
1. 내산성 및 인공위액 저항성	11
2. 인공담즙 저항성	11
3. 분리균주의 용혈성 검사 (Hemolysis test)	13

제 4 절 분리균주의 유해균주에 대한 항균 spectrum	14
제 5 절 분리균주의 <i>in vitro</i> 항암 효과	15
1. 세포 배양	15
2. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정	15
제 3 장 결과 및 고찰	16
제 1 절 <i>Helicobacter pylori</i> 억제 활성을 가진 유산균주의 분리	16
1. <i>Helicobacter pylori</i> 억제 유산균주의 분리	16
2. <i>Helicobacter pylori</i> 억제 유산균주의 동정	16
3. <i>Helicobacter pylori</i> 억제 활성	26
4. <i>Helicobacter pylori</i> 의 urease활성 억제 효과	28
제 2 절 <i>Helicobacter pylori</i> 억제 활성을 가진 유산균주의 특성규명	31
1. 배양시간에 따른 생육도	31
2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도	31
3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도	32
제 3 절 분리균주의 장내 생존성 및 안전성	36
1. 내산성 및 인공위액 저항성	36
2. 인공담즙 저항성	39
3. 분리균주의 용혈성 검사 (Hemolysis test)	44
제 4 절 분리균주의 유해균주에 대한 항균 spectrum	46
제 5 절 분리 균주의 <i>in vitro</i> 항암 효과	48
제 4 장 결 론	53
제 5 장 참고문헌	56

LIST OF TABLE

Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification of 16S rRNA.....	6
Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strains WH1, SI3, BU1 and NO1	18
Table 3. Sugar utilization characteristics of the isolated strains WH1, SI3, BU1 and NO1	20
Table 4. Inhibition activity of the isolated 4 strains against other microorganisms by using the direct method	47
Table 5. Inhibition activity of the culture supernatants of the isolated 4 strains against other microorganisms by using the disk assay	48

LIST OF FIGURE

Figure 1. 16S rRNA gene sequencing procedure for the isolate from Kimchi	7
Figure 2. Gram staining of the isolated strain.....	19
Figure 3. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain WH1	21
Figure 4. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain SI3	22
Figure 5. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain BU1	23
Figure 6. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain NO1	24
Figure 7. Phylogenetic relationship between <i>Lb. sakei</i> WH1, <i>Lb. sakei</i> SI3, <i>Lb. curvatus</i> BU1, <i>Lb. plantarum</i> NO1 and other related bacteria based on 16S rRNA gene sequence	25
Figure 8. Inhibition activity of the LAB against <i>H. pylori</i> KCCM41756	27
Figure 9. Inhibition of <i>H. pylori</i> on urease activity by LAB culture supernatant 10% (v/v) addition	30
Figure 10. Inhibition of <i>H. pylori</i> on urease activity by LAB culture supernatant 20% (v/v) addition	31

Figure 11. Growth curves of <i>Lb. sakei</i> WH1, <i>Lb. sakei</i> SI3, <i>Lb. curvatus</i> BU1 and <i>Lb. plantarum</i> NO1 in MRS broth at 30°C	34
Figure 12. Effect of NaCl of the growth medium on the growth of <i>Lb. sakei</i> WH1, <i>Lb. sakei</i> SI3, <i>Lb. curvatus</i> BU1 and <i>Lb. plantarum</i> NO1.....	35
Figure 13. Effect of initial pH of the growth medium on the growth of <i>Lb. sakei</i> WH1, <i>Lb. sakei</i> SI3, <i>Lb. curvatus</i> BU1 and <i>Lb. plantarum</i> NO1	36
Figure 14. Acid tolerance of the isolate LAB in 0.05M sodium phosphate (pH 3.0)	38
Figure 15. Viability of the isolate LAB in the artificial gastric juice (pH 3.0)	39
Figure 16. Bile resistance of the isolate LAB against 0.3% oxgall.....	42
Figure 17. Bile resistance of the isolate LAB against 0.5% oxgall	43
Figure 18. Bile resistance of the isolate LAB against 0.3% oxgall after treatment for 2 h in artificial gastric juice of pH 3.0	44
Figure 19. Hemolysis test of the isolate LAB	46
Figure 20. MTT assay of the culture supernatants of the isolate LAB against BJ foreskin normal cell and AGS gastric carcinoma cell	52

ABSTRACT

*Isolation and characterization of lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* and anti-cancer activity*

Lee, Youl

Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

To evaluate the inhibitory effect of kimchi lactic acid bacteria on *H. pylori* and AGS gastric cancer cell. The inhibitory effects of 31 strains among lactic acid bacteria(LAB) isolated from Kimch on *H. pylori* were tested and 4 strains of LAB have been selected as the strain which possess the strong inhibitory effect against *H. pylori* KCCM 41756. Culture supernatants of 4 strains of LAB have a strong inhibitory activity on the urease activity of *H. pylori* KCCM 41756. The four selected strains were identified and named as *Lactobacillus sakei* WH1, *Lactobacillus sakei* SI3, *Lactobacillus curvatus* BU1, *Lactobacillus plantarum* NO1 based on biologic test and 16S rRNA sequences determination. Acid and bile tolerance of these four selected strains were investigated. The result of viability test in artificial gastric juice and bile the isolate showed high viability($10^8 \sim 10^9$ CFU/ml) in 0.05M sodium phosphate buffer(pH 3.0), artificial gastric juice and 0.3%, 0.5% oxgal solution. Hemolysis was used in 7% horse blood contain blood agar plate and streaking after incubated 48hr at 37°C, 5% CO₂. But hemolysis

dosen't indicate a zone of clearing in the blood agar in the area surrounding a lactic acid bacteria colony. This study was also carried out to investigate the antimicrobial and anticancer activities of 4 strains of LAB. Four strains of LAB showed relatively wide range of antimicrobial activity against gram-positive bacteria including *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 19113, *Curtobacterium sp.* Cf3 and gram-negative bacteria including *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* O-157. Cytotoxicity of human foreskin normal cell BJ and inhibition ratio of human gastric cancer cell AGS in adding of the culture supernatants from the 4 strains of LAB were measured by MTT assay. The culture supernatants from the 4 strains of LAB exert the significant anticancer activity as well as the safety of normal cell. The isolated four LAB from kimchi should be applied to various foods, and be used as adjuncts in cancer therapy.

제 1 장 서 론

Helicobacter pylori(이하 *H. pylori*)는 만성 활동성 위염, 위십이지장궤양의 원인균이며, 위암과 위점막연관 림프 조직형 위림프종의 중요 인자로 인식되고 있는 균이다(28, 30, 34, 46). *H. pylori*는 1982년 Warren과 Marshall이 위염환자의 위 점막 점액층에서 최초로 분리해서 배양하는데 성공하였다(2). 1994년 World Health Organization(WHO)에서는 *H. pylori*를 위암의 제 1군 발암 인자로 규정한 이후 *H. pylori*의 중요성이 더욱 부각되었으며(34) *H. pylori*의 병리학적 위장질환에 대한 발병 기전을 밝히기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다. *H. pylori*의 세균학적 특성은 그람 음성균으로 만곡형의 bacillary 형태를 갖는 것이 일반적이지만, 주위 환경에 따라 형태를 coccoid로 바꾸는 것으로 알려져 있고(18), 길이는 2.5 ~ 5.0 μm 이며, 폭은 0.5 ~ 1.0 μm , 30 μm 정도의 unipolar flagella가 있어서 운동성이 강하다(30). *H. pylori*의 특징적 성상은 위벽 상피세포에 군락을 형성하고, urease를 생성하는 것이다. Urease는 *H. pylori*가 위내 강한 산성의 환경에서도 균 주변의 pH를 중성으로 유지하면서 생존할 수 있도록 한다(6, 30, 34, 46). *H. pylori*의 감염은 개발도상국에 많으며 10세까지 약 50%가 감염되어 영유아기에 감염률이 높은 반면 선진국에서는 영유아기는 적으나, 나이가 많아질수록 점차 증가되어 약 70%의 유병률을 나타낸다(4). *In vivo*에서의 일반적인 *H. pylori*의 제균 방법은 크게 4가지로 구분된다. Bismuth (BIS) 제제를 근간으로 하는 3중 요법, proton pump inhibitor (PPI) 를 근간으로 하는 3중 요법, ranitidine bismuth citrate (RBC) 를 근간으로 하는 3중 요법 그리고 BIS를 근간으로 하는 3제 요법에 PPI를 추가 하는 4중 요법 등을 사용하고 있다(25, 26, 35). 위의 약제를 사용한 제균에는 어느 정도 성공을 거두고 있으나, 항생제를 장기간 투여하는 것은 이에 따른 항생제 내성을 갖는 새로운 균주가 나타나고 사용한 약물에 의한 부작용이 있기 때문에 다른 접근 방식이 요구 되었다(29). 따라서 *H. pylori*에 직접적으로 작용하거나, 항생제와 수반된 임상적 부작용을 최소화 시키면서 *H. pylori*에 대한 치료 역할을 할 수

있는 프로바이오틱 유산균에 관심이 모아지게 되었다.

유산균은 당류를 발효해서 50% 이상 젖산을 생성하는 세균으로, 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물이다. 음식물뿐만 아니라 포유동물의 구강과 소화관, 토양 등 자연계에 널리 분포하고 있다. 또한 식품의 보존과 관능적 특성에도 중요한 역할을 하며, 텍스트란의 제조 및 아미노산, 비타민의 미생물 정량에도 이용되는 등 인간생활에 유익한 균주이다(12, 33, 39, 40). 1908년에 불가리아의 생화학자인 메치니코프가 유산균 발효유 섭취에 의한 불노장수설을 주장한 이후 그 효능이 과학적으로 입증되었다(32). 유산균이 건강에 좋다는 인식이 확산되면서 유산균 함유 식품을 통하여 건강을 유지하고, 질병을 예방하려는 노력이 증대되었다. 또한 유산균 관련제품에 대하여 관심이 집중되고 소비가 증가하였다. 최근 유산균을 기능성 식품에 사용하기 위하여 잠재력을 평가하기 위한 프로바이오틱 유산균의 선발기준에 대한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 진행되고 있다(11, 26, 43). 프로바이오틱 유산균으로서 가져야 할 가장 중요한 특성은 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 동물 장내에서 생존력이 커야 하고(19, 21, 23) 대장균이나 살모넬라와 같은 유해 미생물의 생육 억제 능력이 커야 한다는 점이다(9, 21). 유산균과 그 대사산물로부터의 효과로는 장내 균총의 개선(24, 38), 장내 부패균의 억제효과(5, 21, 37), *H. pylori* 억제효과(3, 6, 8, 31), 항암활성(10, 44), 항산화 작용(16) 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 특히 *Lactobacillus* sp.에 속하는 유산균의 배양액을 사람이나 실험용 동물에게 음용시켰을 때 *H. pylori*를 억제하는 효과가 있다는 보고가 발표되었다(31). 현재 국내에서는 *H. pylori*를 억제하고 항암활성을 갖는 유산균을 이용한 발효유와 김치와 같은 발효 식품 이외에도 다양한 유산균 함유 건강 기능성 식품 및 의약품이 개발되거나 판매되고 있다. 또한 앞으로 식품업계에 있어서도 유산균을 첨가하므로 항균활성과 항암활성 등 신기능성을 가진 새로운 식품 개발을 할 수 있을 것으로 기대된다(11, 43). 국내외에서 *H. pylori*억제와 항암활성에 대한 연구는 날로 증가하고 있다. 그러나 지금까지 유산균이 갖는 *H. pylori*억제와 항암효과, 프로바이오틱 유산균으로서의 역할에 관한 연구는 유발효 식품을 대상으로 한 것이 대부분이며 김치 유산균에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 김치 유산균

은 아직 활용되고 있는 사례가 많지 않지만 우수한 프로바이오틱 유산균으로 사용될 수 있고 이에 대한 안전성과 기능성은 오랜 기간을 통해 한국인의 식생활에 의해 검증되었다고 하겠다. 선행되어진 김치 유산균에 기능에 관한 실험들을 보면 거의 유제품 유산균과 비슷한 것을 알 수 있다(5, 10). 이에 따른 더 많은 비교 연구가 필요하지만 김치 유산균이 유제품 기원의 유산균과 비슷한 기능을 갖는다면 김치는 유제품에 들어 있지 않은 phytochemicals을 많이 함유하고 있기에 항암 음식으로써 또는 다른 기능성 증진 식품으로서 김치의 가치는 대단히 높다고 할 수 있다.

본 연구는 항 *H. pylori*활성과 항암 작용이 있는 신규 김치 유산균을 탐색하고 그 특성을 규명하고자 하였다. 따라서 김치 유산균으로부터 *H. pylori*의 생육 억제능을 조사하고, 이와 함께 암세포 증식 억제활성을 가지며 그 외에도 probiotics lactic acid bacteria로서의 효과를 검토하기 위하여 기초적인 생리활성, 용혈성 여부 확인에 대한 안전성, 장내생존 가능성 여부, 유해미생물 억제에 의한 정장 효과 유무를 조사하였다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 *Helicobacter pylori* 억제 활성을 가진 유산균주의 분리

1. 사용균주 및 배양

본 실험에서의 *H. pylori*는 한국미생물보존센터에서 분양받은 KCCM 41756DMF 사용하였다. *H. pylori*의 배양에는 10% horse serum(Gibco Co., USA)을 첨가한 brucella(BD Co., France) 와 BHI(BD Co., France)를 이용 하였다. 배양조건은 CO₂ incubator에서 37°C, 10% CO₂ 조건으로 24시간 미호기적으로 배양하였다.

시험 유산균주로서는 광주·전남 지역 김치에서 분리한 31종의 유산균주로부터 *H. pylori*억제 작용이 우수한 4종의 유산균주를 선별하여 실험에 사용하였다. 유산균 성장배지는 MRS(Difco Co., France)의 액체 혹은 고체배지를 사용하였다. 배양조건은 30°C incubator(Vision Co., Korea)에서 24시간 정지 배양하였다.

2. *Helicobacter pylori* 억제 유산균주의 분리

김치 유산균을 분리하기 위해서 광주·전남 지역의 가정집, 명가 식당, 유명 사찰 등에서 최적으로 발효된 김치를 수집하여, 수집 후 김치 내 유산균총이 변하지 않게 즉시 내용물 전체를 마쇄하고, 여과 후 적정 배율로 희석하였다. Lactobacilli MRS(Difco Co., France) 배지에 24시간 이상 배양하여 2% CaCO₃(Calcium Carbonate, Amresco Inc., USA)가 첨가된 MRS 배지에 tooth picking하여 투명환을 형성하고, gram(Gram stain kit BD Co., USA) 양성, catalase(Biomérieux., France) 음성인 집락을 유산균으로 잠정 분리하였다. 분리 균주의 *H. pylori*의 성장 억제력 여부는 paper disk법을 이용하였다(3, 47).

3. *Helicobacter pylori* 억제 유산균주의 동정

분리된 김치 유산균 중 *H. pylori* 억제능을 보이는 유산균은 그람염색(Gram stain kit, BD Co., USA)을 비롯한 형태학적 특성, API kit(50CHL, Biomérieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 16S rRNA 염기서열 분석을 위한 분리균으로부터의 genomic DNA 추출은 Genome DNA kit(Q-Biogene, USA)을 사용하였다. 분리균의 동정을 위한 16S rRNA 증폭용 primer는 유산균속 특이적 primer들을 사용하였다(Table 1). PCR은 Palmcycler(Corbett Reaserch, Australia)을 사용하여 수행하였다. 온도조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 수행하고 95°C 30초, 61°C 30초, 72°C 1분 30초의 과정을 30회 반복한 후, 72°C 10분간 post-elongation을 실행하였다. PCR에 의하여 증폭된 단편은 Qiaquick gel extraction kit(Qiagen Co., Germany)을 사용하여 회수한 후 pGEM-T easy vector(Promega Co., USA)에 ligation하였다. *E. coli* TG1을 숙주세포로 사용하여 형질전환 하였으며, 항생제(ampicillin, 50 µg/mL)가 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 12시간 평판배양하였다. LBAP 고체배지에 형성된 colony는 50 µg/mL의 ampicillin이 함유된 LB 액체배지에 37°C에서 12시간 진탕배양하여 Qiaprep spin miniprep kit(Qiagen Co., Germany)으로 plasmid DNA를 추출하였다. 재조합 plasmid는 제한효소 *EcoRI* (TaKaRa Co., Japan)으로 digestion하여 삽입된 단편의 크기를 확인한 후 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 상동성 검사는 Gene Bank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program(20)에 의해 실행하였다.

Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification of 16S rRNA

<i>Primers</i>	<i>Oligonucleotide sequences(5' → 3')</i>
<i>LeuP</i>	Forward : GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
	Reverse : GACCCGGGAACGTATTCACCGCGGC

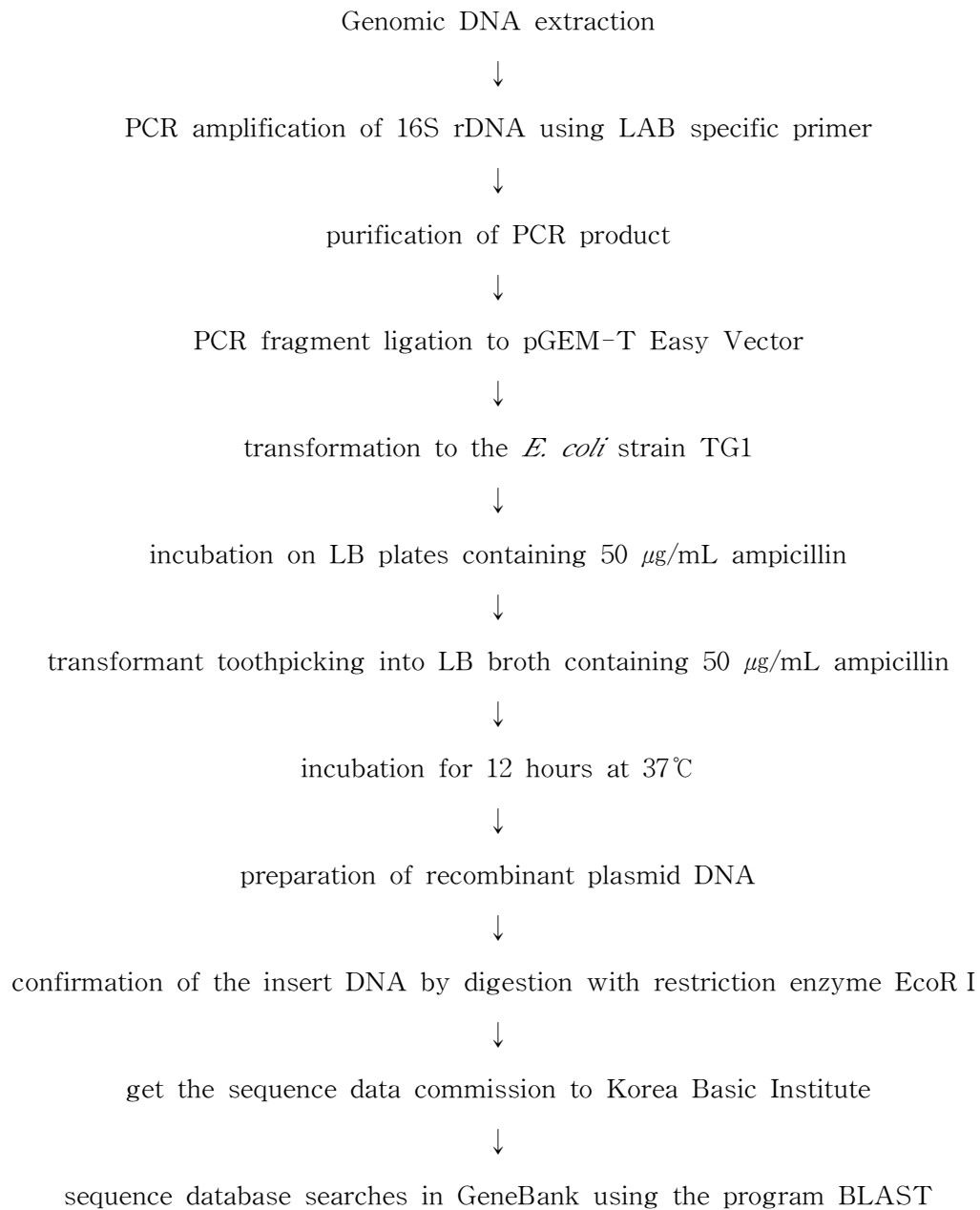


Figure 1. 16S rRNA sequencing procedure for the isolate from Kimchi

4. *Helicobacter pylori* 억제 활성

김치에서 분리된 유산균의 *H. pylori* 성장 억제력을 조사하기 위하여, 10% horse serum(Gibco Co., USA)이 첨가된 brucella(Difco Co., France) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 37°C, 10% CO₂ incubator(Astec Co., Japan)를 사용하였다. 미호기적인 조건을 맞추어주기 위해 Lacker(Vision Co., Korea)를 사용하여 교반배양 하였다. Brucella 평판배지에 *H. pylori*를 2배 희석하여 400 µL를 분주하여 도달한 다음 멸균된 paper disk(Advantec Co., Japan)를 올리고 유산균 농축 배양 상정액을 각각 100 µL씩 분주하였다. CO₂ incubator에서 37°C, 10% CO₂ 조건으로 24시간 미호기적으로 배양하여 disk 주위의 억제환의 생성유무를 확인한 후 억제환을 측정하였다. 이때 MRS배지 성분 중 sodium acetate, tween 80과 같은 성분이 *H. pylori*의 생육을 억제할 수 있다는 Midolo 등(1995)과 Coconnier 등(1998)의 보고를 참고하여(31, 36), 본 실험에서는 위의 두 가지 성분을 제외한 1 L당 proteose peptone NO.3 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 10 g, dextrose 20 g, ammonium citrate 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, manganese sulfate 0.05 g, dipotassium phosphate 2 g의 변형 MRS를 조제하여 사용하였다. 변형된 MRS에서 배양된 유산균 배양액을 원심분리(9,950×g, 5 min, 4°C)하여 0.45 µm filter(Milipore Co., USA)로 여과한 배양액을 동결건조 한 후 농축하여 사용하였다. 대조구는 유산균을 접종하지 않은 변형 MRS배지를 사용하였다.

5. *Helicobacter pylori*의 urease 활성 억제 효과

김치에서 분리된 유산균의 *H. pylori*의 억제능을 조사하기 위하여 urease inhibition activity를 측정하였다. *H. pylori*를 BHI(Difco., France) 액체배지에 계대배양 후 5 mL *H. pylori*배양액을 원심분리 (9,950×g, 10 min, 4°C)하여 phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척 후 PBS를 가하여 5 mL로 맞추었다. BHI액체 배지에 PBS로 세척 후 현탁하여 준비된 *H. pylori* 배양액을 2% (v/v) 접종하였다. MRS 액체배지에서 30°C로 24 시간 배양한 각각의 유산균을 원심분리 (9,950×g, 5 min, 4°C)하여 0.45 μm filter (Milipore Co., USA)로 여과한 배양액을 각각 10% (v/v), 20% (v/v)를 *H. pylori*에 첨가하여 37°C, 10% CO₂ incubator에 24 시간 배양하였다(5). Urea 액체배지에 *H. pylori*와 유산균 배양 상징액이 첨가된 배양액을 5% (v/v)를 접종 후 3 시간 동안 30분 간격으로 3번씩 A₅₆₀(Ultro spec 2100pro, Amersham Bioscience Co., England)에서 흡광도 변화를 측정하였다. 대조군으로는 urea 액체배지에 유산균 배양 상징액을 첨가하지 않고 *H. pylori*만 접종하여 배양한 것으로 하였다(6, 7, 22, 31).

제 2 절 *Helicobacter pylori* 억제 활성을 가진 유산균주의 특성

1. 배양시간에 따른 생육도

분리균주의 배양시간에 따른 생육도를 조사하기 위하여 30℃에서 24시간 전배양한 분리균주를 MRS배지에 1% (v/v) 접종하여 40시간 정지 배양하면서 매 4시간마다 A₆₀₀에서 흡광도를 측정하였다.

2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도

배지의 초기 NaCl 농도가 분리균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NaCl을 0, 1, 3, 5, 7% (v/v)가 함유된 MRS배지에서 접종하여 30℃에서 24시간 정지 배양한 후 A₆₀₀에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 실험은 3회 반복하여 평균값을 내었다.

3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

배지의 초기 pH가 분리균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 1.0 N NaOH 또는 1.0 N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 10.0으로 보정한 MRS액체 배지에 분리균주를 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정지배양한 후 A₆₀₀에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 실험은 3회 반복하여 평균값을 내었다.

제 3 절 분리균주의 장내 생존성 및 안전성

1. 내산성 및 인공위액 저항성

분리균주의 산 저항성 시험으로 우선 단순 산성 pH에 대한 내성의 측정은 1.0 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정한 0.05 M sodium phosphate에서 시행하였다(26). 인공위액 하에서의 저항성은 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액을 조제하여 실시하였다. 인공위액의 조제는 Kobayashi 등의(29) 방법을 변형하여 1.0 N HCl로 pH 3.0으로 조정한 MRS 액체배지에 pepsin (Sigma Co., USA)을 1,000 unit/mL 되도록 첨가하였다. 분리균주를 MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 30°C에서 24 시간 배양한 후 원심분리 (9,950×g, 5 min, 4°C)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 다음 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액을 각각 상정액과 동량으로 첨가하여 30°C에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후 0.05 M sodium phosphate용액과 인공위액으로 처리된 유산균을 멸균수로 10 배씩 $10^1 \sim 10^7$ 배 까지 희석한 후 잘 혼합한 후 고체배지에 100 μ L 도말하여 배양하였다. 30°C에서 48시간 배양 후 형성된 colony의 수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 비교하였다. 대조군으로는 분리균주를 MRS에 배양한 후 (30°C, 24시간) 측정된 생균수로 하였다.

2. 인공담즙 저항성

인공담즙의 조제는 MRS 액체배지에 0.45 μm filter (Milipore Co., USA)로 여과 제균된 oxgall (Sigma Chemical Co., USA) 용액을 0.3%, 0.5%가 되도록 첨가하였다. 분리균주의 인공담즙에 대한 내성은 인공위액에서 2시간 동안 배양한 배양액을 각각 원심분리(9,950 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 다음 인공 담즙액을 상정액과 동량으로 첨가한 후 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 생균수를 측정하여 인공담즙에 대한 저항성을 비교하였다. 대조군으로는 분리균주를 MRS에서 배양한 후 (30 $^{\circ}$ C, 24시간) 측정된 생균수로 하였다.

3. 분리균주의 용혈성 검사 (*Hemolysis test*)

김치로부터 분리된 유산균주 4종이 *H. pylori*에 대하여는 생육 억제활성이 있으나 인체에 대하여는 용혈성 독성이 없음을 증명하기 위하여 적혈구의 파괴 또는 분해되는 현상인 용혈성 여부를 검사하였다. Blood agar base(OXOID., England)를 멸균 후에 7% horse blood(OXOID., England)를 첨가하고 평판배지를 만들어서 분리균주 4종을 streaking 한 후 30℃에서 48시간 배양하여 균체 주위에 투명환의 생성여부로 용혈성을 판단하였다.

제 4 절 분리균주의 유해균주에 대한 항균 spectrum

H. pylori 생육 억제활성을 가진 분리 유산균주를 30℃에서 24시간 계대 배양한 후 100 mL MRS 액체배지에 1% 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (9,950xg, 20 min)하여 0.45 um membrane filter로 제균하였다. 제균한 배양 상정액을 조항균물질로 사용하였고, 이의 항균활성은 diamatic caliper (Mitutoyo Co., Japan)로 측정하였다.

분리유산균주의 항균물질 생산여부를 조사하기 위하여 균체를 직접 가하는 direct method(42)와 조항균물질을 paper disk에 가하여 생육 억제환을 관찰하는 paper disk assay(41)를 병행하였다. Direct method는 유해균주를 최종 농도가 1%가 되도록 접종하여 도말하였다. 여기에 직경 5 mm로 구멍을 내고 그 구멍에 분리 유산균주를 soft-agar에 함유시켜 넣어 30℃에서 24시간 배양하여, 유해균주에 대한 저해환을 검토하면서 항균생성력의 여부를 관찰하였다.

Paper disk assay는 유해균주를 최종농도가 1%가 되도록 접종하여 도말하였다. 여기에 상기의 방법으로 제조한 조항균 물질을 paper disk (diameter 8.00 mm, Advantec Co., Japan)에 점적하였다. 이를 30℃에서 24시간 배양하여, 유해균주에 대한 저해환을 검토하면서 항균생성력의 여부를 관찰하였다. 분리된 유산균의 항균물질 생산능 검증용 유해균주로는 *Escherichia coli* O-157 외 9종의 gram 양성 및 음성균주를 사용하였다.

제 5 절 분리균주의 *in vitro* 항암 효과

1. 세포배양

인체 위암 세포주 AGS는 100 units/mL의 penicilin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하였으며 종양세포와 대조군으로 사용한 인체 포낭 정상 세포주 BJ는 100 units/mL의 penicilin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM을 사용하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합한 다음 6~7일 마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

2. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase 작용을 받아 MTT에 의하여 생성되는 dark blue formazan의 양을 측정하는 방법이다 (10). Dark blue formazan의 생산량은 대사적으로 활성이 있는 살아있는 세포수와 거의 비례하는 것으로 알려져 세포의 생육과 분화를 측정하는데 아주 효과적으로 사용되고 있다. 배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 2×10^4 cells/mL가 되도록 100 μ L씩 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂배양기에서 세포를 부착시킨 후 유산균 배양 상징액을 일정양으로 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT용액 20 μ L를 첨가하여 동일한 배양조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 이때 생성된 formazan결정을 DMSO 200 μ L에 녹여서 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 유산균 배양 상징액 무첨가구를 100%로 하여 상대적인 세포 성장률을 구하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 *Helicobacter pylori* 억제 활성을 가진 유산균주의 분리

1. *Helicobacter pylori* 억제 유산균주의 분리

가정집, 사찰 및 명가에서 식용되는 김치 중 맛이 가장 좋은 최적기의 김치를 수집하여 마쇄하였다. 마쇄한 김치를 멸균수로 적정 배율 희석하여 MRS 평판배지에서 48시간 배양하였다. 2% CaCO₃가 함유된 MRS 고체배지에 tooth pick하여 투명환을 형성하고 catalase음성, gram 양성인 colony를 유산균으로 잠정적으로 분리하였다. *Helicobacter pylori* KCCM 41756에 대하여 생육을 억제시키는 유산균주를 paper disk법을 이용하여 분리하였으며, 이들 중 *H. pylori*억제능이 우수한 4종을 선별하였다. 이 분리균주를 동정하기 전까지 편의상 WH1, SI3, BU1, NO1으로 명명하였다.

2. *Helicobacter pylori* 억제 유산균주의 동정

*H. pylori*를 억제하는 분리 유산균주 WH1, SI3, BU1, NO1의 생태학적, 배양학적 특성 및 당대사능을 통한 생화학적 특성, 그리고 16s rRNA 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 특성을 살펴보았다. 분리균주 4종을 MRS액체배지에 접종하여 24시간 혐기 배양하고 gram 염색을 하여 광학현미경으로 관찰한 결과 (Table 2, Fig. 2) 분리균주 WH1, SI3, BU1, NO1은 그람양성의 간균이었고 colony는 4종 모두 둥근형이었다. 표면은 BU1이 약간 거칠었고 WH1, SI3, NO1은 부드러웠으며 WH1, SI3, BU1은 크림색을 NO1는 연한 노란 빛을 나타내었다. 생화학적 특성으로 API 50 CHL kit을 통한 분리균주의 당대사능을 검토한 결과는 Table 3에 나타내었다. 분리균주의 16s rRNA 염기

서열 분석을 통한 균주동정을 위하여 분리균주 4종으로부터 chromosomal DNA를 추출하고 primer Leup를 통해 특정부위의 DNA를 PCR에 의해 증폭하였다. WH1은 1,001 bp를, SI3은 1,383 bp를, BU1은 1,380 bp를, NO1은 1,379 bp의 16s rRNA 염기서열을 결정한 후 읽어진 16s rRNA 염기서열을 통하여 분자생물학적 동정을 시행하였다 (Fig. 3, 4, 5, 6). 분리균주 WH1, SI3, BU1, NO1은 각각 *Lactobacillus sakei* AB183697 99%, *Lactobacillus sakei* AY204895 99%, *Lactobacillus curvatus* AY204894 99%, *Lactobacillus plantarum* AY675256 99%의 상동성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 분리균주 WH1은 *Lactobacillus sakei* WH1, SI3은 *Lactobacillus sakei* SI3, BU1은 *Lactobacillus curvatus* BU1, NO1은 *Lactobacillus plantarum* NO1로 각각 명명하였으며 Fig. 7에서 16s rRNA 염기서열을 기초로 하여 분리균주들의 다른 bacteria와의 계통 발생론적 관계를 나타내었다.

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strains WH1, SI3, BU1 and NO1

<i>Characteristics</i>	<i>WH1</i>	<i>SI3</i>	<i>BU1</i>	<i>NO1</i>
Gram-stain	+	+	+	+
Morphology	rod	rod	rod	rod
Colony	circular	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	rough	smooth
Colony color	white color	white color	milk color	yellow color
Colony opacity	opaque	opaque	opaque	opaque

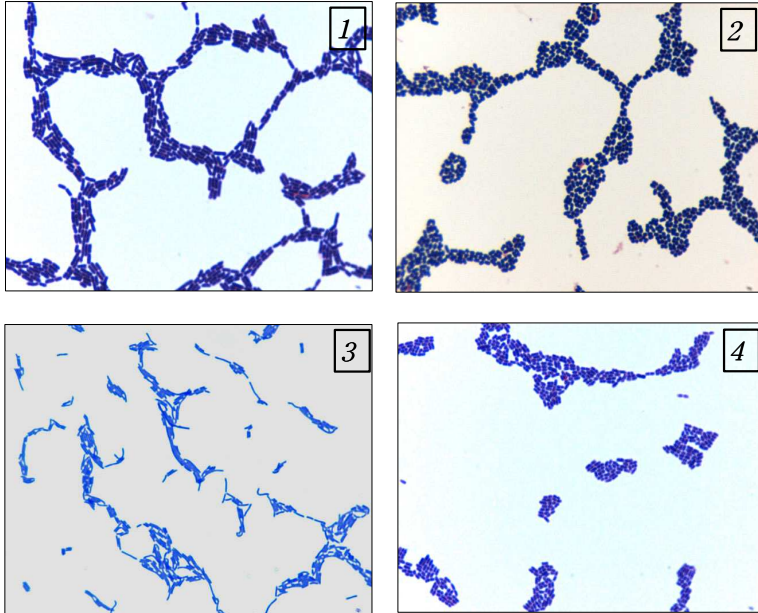


Figure 2. Gram staining of the isolated strain

1. Isolated strain WH1, 2. Isolated strain SI3
3. Isolated strain BU1, 4. Isolated strain NO1

Table 3. Sugar utilization characteristics of the isolated strains WH1, SI3, BU1 and NO1.

<i>Reaction</i>	<i>WH1</i>	<i>SI3</i>	<i>BU1</i>	<i>NO1</i>	<i>Reaction</i>	<i>WH1</i>	<i>SI3</i>	<i>BU1</i>	<i>NO1</i>
control	-	-	-	-	Esculine	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	Salicine	-	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	Cellobiose	+	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	Maltose	+	-	+	+
L-Arabinose	+	+	-	+	Lactose	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	Melibiose	+	+	-	+
D-Xylose	-	-	+	-	Saccharose	+	+	-	+
L-Xylose	-	-	-	-	Trehalose	-	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	Inuline	-	-	-	-
β -Methyl-xyloside	-	-	-	-	Melezitose	-	-	+	+
Galactose	+	+	+	+	D-Raffinose	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	Amidon	-	-	+	-
D-Fructose	+	+	+	+	Glycogene	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	β -Gentiobiose	-	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	D-Turanose	-	-	-	+
Dulcitol	-	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	D-Tagatose	-	-	+	-
Mannitol	-	-	-	+	D-Fucose	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	+	L-Fucose	-	-	-	-
α - Methyl-D-mannoside	-	-	-	+	D-Arabitol	-	-	-	+
α -Methyl-D-Glucoside	-	-	+	-	L-Arabitol	-	-	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	Gluconate	+	+	+	+
Amygdaline	-	-	+	+	2 keto-gluconate	-	-	-	-
Arbutine	-	-	+	+	5 keto-gluconate	-	-	-	-

Incubation at 30°C for 48 hours

+ : positive reaction, - : negative reaction

1	CATGCTCCGG CCGCCATGGC GGCCGCGGGA ATTCGATTGA CCCGGGAACG TATTCACCGC	60
61	GGCNTGCTGA TCCGCGATTA CTAGCGATTG CGGCTTCATG TAGGCGAGTT GCAGCCTACA	120
121	ATCCGAACTG AGAATGGTTT TAAGAGATTA GCTAAACCTC GCGGTCTTGC AACTCGTTAT	180
181	ACCATCCATT GTAGCACGTG TGTAGCCCAG GTCATAAGGG GCATGATGAT TTGACGTCGT	240
241	CCCCACCTTC CTCCGGTTTG TCACCGGCAG TCTCACTAGA GTGCCCAACT AAATGCTGGC	300
301	AACTAGTAAT AAGGGTTGCG CTCGTTGCGG GACTTAACCC AACATCTCAC GACACGAGCT	360
361	GACGACAACC ATGCACCACC TGTCACCTTG TCCCGAAGG GAAAGCTCTA TCTCTAGAGT	420
421	GGTCAAAGGA TGTCAAGACC TGGTAAGGTT CTTGCGTTG CTTCGAATTA AACCACATGC	480
481	TCCACCGCTT GTGCGGGCCC CCGTCAATTC CTTTGAGTTT CAACCTTGCG CAACCTGCG	540
541	CCAGGCGGAG TGCTTAATGC GTTAGCTGCG GCACTGAAGG GCGGAAACCC TCCAACACCT	600
601	AGCACTCATC GTTTACGGCA TGGACTACCA GGGTATCTAA TCCTGTTTGC TACCCATGCT	660
661	TTCGAGCCTC AGCGTCAGTT ACAGACCAGA CAGCCGCCTT CGCCACTGGT GTTCTTCCAT	720
721	ATATCTACGC ATTTACCCGC TACACATGGA GTTCCACTGT CCTCTTCTGC ACTCAAGTTT	780
781	CCCAGTTTCC GATGCACTTC TTCGGTTGAG CCGAAAGCTT TCACATCAGA CTTAAGAAAC	840
841	CGCCTGCGCT CGCTTTACGC CCAATAAATC CGGACAACGC TTGCCACCTA CGTATTACCG	900
901	CGGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGTGCTTT CTGGTTGGAT ACCGICACTA CCTGATCAGT	960
961	ACTATCAGAT ACATTCTCTC NACANAGAGT TTACGATCGA A 1001	

Figure 3. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain WH1

1 GACCCGGGAA CGTATTCACC GCGGCATGCT GATCCGCGAT TACTAGCGAT TCCGGCTTCA 60
61 TGTAGCGGAG TTGCAGCCTA CAATCCGAAC TGAGAATGGT TTTAAGAGAT TAGCTACCTC 120
121 GCGGICTCGC AACTCGTTGT ACCATCCATT GTAGCACGTG TGTAGCCCAG GTCATAAGGG 180
181 GCATGATGAT TTGACGTCGT CCCACCTTC CTCCGGTTTG TCACCGGCAG TCTCACTAGA 240
241 TCTCACTAGA GTGCCCAACT TAATGCTGGC AACTAGTAAT AAGGGTTGCG CTCGTTGCGG 300
301 GACTTAACCC AACATCTCAC GACACGAGCT GACGACAACC ATGCACCACC TGTCACTTTG 360
361 TCCCGAAGG GAAAGCTCTA TCTCTAGAGT GGTCAAAGGA TGTCAAGACC TGGTAAGGTT 420
421 CTTCGCGTTG CTTCGAATTA CTCGAATTA TCCACCGCTT GTGCGGGCCC CCGTCAATTC 480
481 CTTTGAGTTT CAACCTTGCG GTCGTACTCC CCAGGCGGAG TGCTTAATGC GTTAGCTGCG 540
541 GCACTGAAGG GCGGAAACCC TCCAACACCT AGCACTCATC GTTTACGGCA TGGACTACCA 600
601 GGGTATCTAA TCCTGTTTGC TACCCATGCT TTCGAGCCTC AGCGTCAGTT ACAGACCAGA 660
661 CAGCCGCCTT CGCCACTGGT GTTCTTCCAT ATATCTACGC ATTCACCGC TACACATGGA 720
721 GTTCCACTGT CCTCTTCTGC ACTCAAGTTT CCCAGTTTCC GATGCACTTC TTCGGTTGAG 780
781 CCGAAGGCTT TCACATCAGA CTTAAGAAAC CGCCTGCGCT CGCTTTACGC CCAATAAATC 840
841 CGGACAACGC TTGCCACCTA CGTATTACCG CGGCTGCTGG CACGTAGTTA GCCGTGGCTT 900
901 TCTGGTTGGA TACCGTCACT ACCTGATCAG TTACTATCAG ATACATTCTT CTCCAACAAC 960
961 CTCCAACAAC AGAGTTTTAC GATCCGAAAA CCTTCTTAC TCACGCGGCG TTGCTCCATC 1020
1021 AGACTTTCGT AGACTTTCGT AGACTTTCGT CCATTGTGGA AGATTCCCTA CTGCTGCCTC 1080
1081 CCGTAGGAGT CTGGGCCGTG TCTCAGTCCC AGTGTGGCCG ATTACCCTCT CAGGTCGGCT 1140
1141 ATGCATCAG GTCTTGGTGA GCCTTTACCT CACCAACTAA GCGGGTCCAT CCTAAAGTGA 1200
1201 TAGCCGAAAC CATCTTCAA CCCTACACCA TCGGGTGTTA GGTTTTATGC GGTATTAGCA 1260
1261 TCTGTTTCCA AATGTTATCC CCCACTTTAG GGCAGGTTAC CCACGTGTTA CTCACCGTCC 1320
1321 CGCCACTCAC TCAAATGTTT ATCAATCAGG AGCAAGCTCC TTCAATCTAA ACGAGAGTGC 1380
1381 GTT 1383

Figure 4. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain SI3

1	GACCCGGGAA CGTATTCACC GCGGCATGCT GATCCGCGAT TACTAGCGAT TCCGGCTTCA	60
61	TGTAGGCGAG TTGCAGCCTA CAATCCGAAC TGAGAATGGT TTTAAGAGAT TAGCTAAACC	120
121	TCGCGGTCTC GCGACTCGTT GTACCATCCA TTGTAGCACG TGTGTAGCCC AGGTCATAAG	180
181	GGGCATGATG ATTTGACGTC GTCCCCACCT TCCTCCGGTT TGTCACCGGC AGTCTCACTA	240
241	GAGTGCCCAA CTAAATGCTG GCAACTAGTA ATAAGGGTTG CGCTCGTTGC GGGACTTAAC	300
301	CCAACATCTC ACGACACGAG CTGACGACAA CCATGCACCA CCTGTCACTT TGTCCCCGAA	360
361	GGGAAAGCTC TATCTCTAGA GTGGTCAAAG GATGTCAAGA CCTGGTAAGG TTCTTCGCGT	420
421	TGCTTCGAAT TAAACCACAT GCTCCACCGC TTGTGCGGGC CCCCCTCAAT TCCTTTGAGT	480
481	TTCAACCTTG CGGTCGTA CTCCAGGCGG AGTGCTTAAT GCGTTAGCTG CGGCACGAA	540
541	CCTCCAACAC CTAGCACTCA TCGTTTACGG CATGGACTAC AGGGTATCTA ATCCTGTTTG	600
601	CTACCCATGC TTTCGAGCCT CAGCGTCAGT TACAGACCAG ACAGCCGCCT TCGCCACTGG	660
661	TGTTCTTCCA TATATCTACG CATTTCACCG CTACACATGG AGTTCCACTG TCCTCTCTG	720
721	CACTCAAGTT TCCCAGTTTC CGATGCACTT CTCGGTTGA GCCGAAGGCT TTCACATCAG	780
781	ACTTAAGAAA CCGCCTGCGC TCGCTTTACG CCCAATAAAT CCGGACAACG CTTGCCACCT	840
841	ACGTATTACC GCGGCTGCTG GCACGTAGTT AGCCGTGGCT TTCTGGTTGG ATACCGTCAC	900
901	TACCTGATCA GTTACTATCA AATACGTTCT TCTCCAACAA CAGAGTTTTA CGATCCGAAA	960
961	ACCTTCTTCA CTCACGCGGC GTTGCTCCAT CAGACTTTCG TCCATTGTGG AAGATTCCCT	1020
1021	ACTGCTGCCT CCCGTAGGAG TCTGGGCCGT GTCTCAGTCC CAGTGTGGCC GATTACCCTC	1080
1081	TCAGGTCGGC TATGCATCAC GGTCTTGGTG AGCCTTTACC TCACCAACTA ACTAATGCAC	1140
1141	CGCGGGTCCA TCCTAAAGTG CCATCTTTCA ACCTTGCACC ATGCGGTGCT AGGTTTTATG	1200
1201	CGGTATTAGC ATCTGTTTCC AAATGTTATC CCCCCTTTA GGGCAGGTTA CCCACGTGTT	1260
1261	ACTCACCCGT CCGCCACTCA CTCAAATGTT AGCAAGCTTC TTCAATCTAA CGAGAGTGCG	1320
1321	TTGACTTGC ATGTATTAGG CACGCCGCAA TCGAATCCC GCGGCCGCCA TGGCGGCCGG	1380

Figure 5. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain BUI

1	AACGAACTCT GGTATTGATT GGTGCTTGCA TCATGATTTA CATTGAGTG AGTGGCGAAC	60
61	TGGTGAGTAA CACGTGGGAA ACCTGCCCAG AAGCGGGGGA TAACACCTGG TAATACCGCA	120
121	TAACAACTTG GACCGCATGG TCCGAGCTTG AAAGATGGCT TCGGCTATCA CTTTTGGATG	180
181	GTCCCGCGGC GTGTTAGCTA GATGGTGGGG TAACGGCTCA CCATGGCAAT GATACGTAGC	240
241	GATACGTAGC CGACCTGAGA GGGTAATCGG CCACATTGGG ACTGAGACAC GGCCCAAAC	300
301	CCTACGGGAG GGAATCTTCC ACAATGGACG AAAGTCTGAT GGAGCAACGC CGCGTGAGTG	360
361	AAGAAGGGTT TCGGCTCGTA AACTCTGTT GTTAAAGAAG AACATATCTG AGAGTAACTG	420
421	TTCAGGTATT GACGGTATTT AACCGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG	480
481	TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAT TTATTGGGCG TAAAGCGAGC TAAAGCGAGC	540
541	TAAAGCGAGC GCAGGCGGTT TTTAAGTCT GATGTGAAAG CCTTCGGCTC AACCGAAGAA	600
601	GTGCATCGGA AACTGGGAAA CTTGAGTGCA GAAGAGGACA GTGGAACCTC ATGTGTAGCG	660
661	GTGAAAAGCG TAGATATATG GAAGAACC AGTGGCGAAG GCGGCTGTCT GGTCTGTAAC	720
721	TGACGCTGAG GCTCGAAAAGT GCTCGAAAAGT ATGGGTAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG	780
781	TAGTCCATAC CGTAAACGAT GAATGCTAAG TGTGGAGGG TTTCCGCCCT TCAGTGCTGC	840
841	AGCTAACGCA TTAAGCATTG CGCCTGGGGA GTACGGCCGC AAGGCTGAAA CTCAAAGGAA	900
901	TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCTA CGCGAAGAAC	960
961	CTTACCAGGT CTTGACATAC TATGCAAATC TAAGAGATTA GACGTTCCCT TCGGGGACAT	1020
1021	GGATACAGGT GGTGCATGGT TGTCGTCAGC TCGTGTCTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG	1080
1081	CAACGAGCGC AACCCCTTATT ATCAGTTGCC AGCATTAAAGT TGGGCACTCT GGTGAGACTG	1140
1141	CCGGTGACAA ACCGGAGGAA GGTGGGGATG ACGTCAAATC ATCATGCCCC TTATGACCTG	1200
1201	GGCTACACAC GTGCTACAAT GGATGGTACA ACGAGTTGCG AACTCGCGAG AGTAAGCTAA	1260
1261	TCTCTTAAAG CCATTCTCAG TTCGGATTGT AGGCTGCAAC TCGCCTACAT TCGCCTACAT	1320
1321	GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCATGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGGTC	1379

Figure 6. 16S rRNA gene sequence of the isolate strain NOI

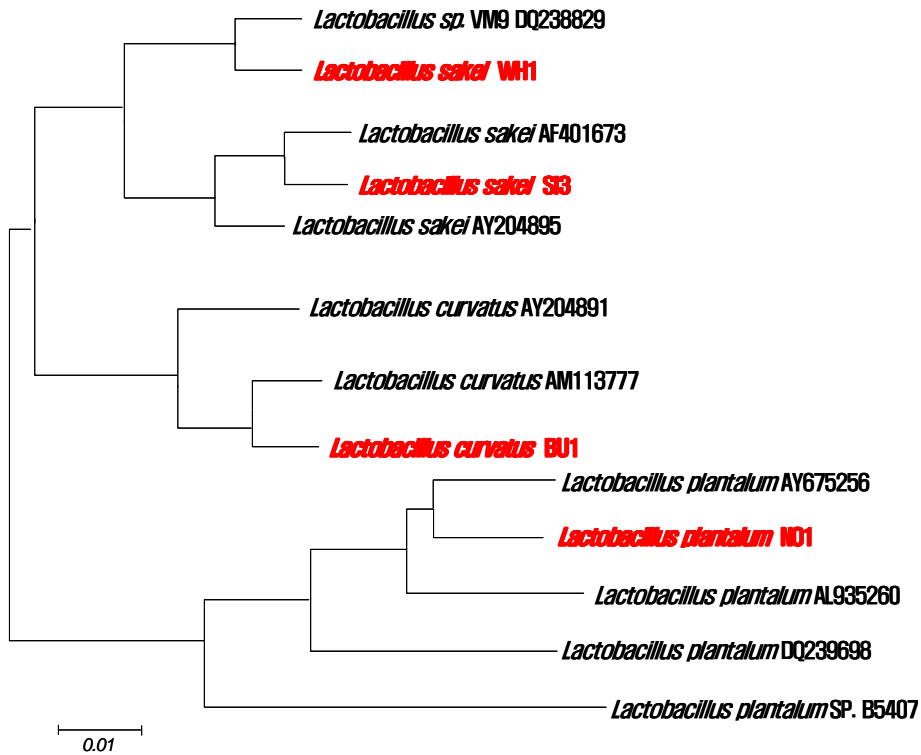


Figure 7. Phylogenetic relationship between *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei*. SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1 and other related bacteria based on 16s rRNA gene sequence

3. *Helicobacter pylori* 억제 활성

분리균주 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1의 *H. pylori*에 대한 억제력을 확인하기 위하여 *H. pylori*를 10% horse serum이 함유된 brucella 액체배지에 37°C, 10% CO₂ incubator에서 교반배양하여 고체배지에 도말 후 제균된 농축 배양액을 paper disk에 100 µL 가하여 실험한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 각 disk주변의 억제환을 측정하여 분리유산균의 *H. pylori*억제력을 판단할 수 있었다. 분리유산균 4종 중 *H. pylori* KCCM 41756에 대한 가장 큰 억제환을 나타낸 것은 *Lb. plantarum* NO1으로 억제환의 크기는 20.63 mm 였다. 다음이 *Lb. sakei* WH1 16.86 mm, *Lb. curvatus* BU1 16.31 mm, *Lb. sakei* SI3 16.11 mm의 순서로 억제환을 나타냈다. 억제활성은 동일 균종에서도 균주에 의한 차이가 있었으며 이것은 균에 의하여 생성되는 항균물질의 생성능력 차이에서 기인된 것으로 판단된다.

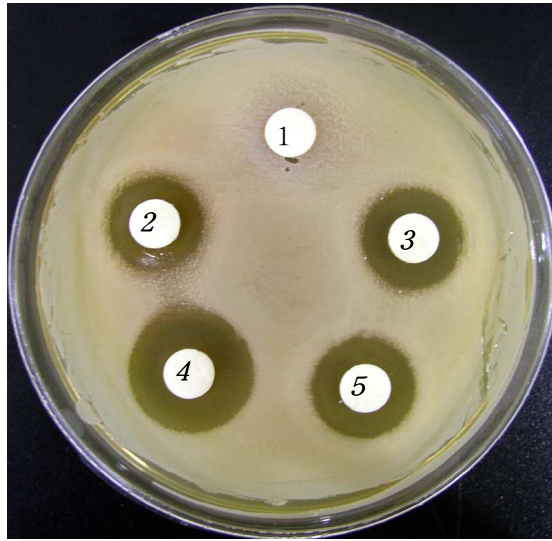


Figure 8. Inhibition activity of concentrated culture supernatant of LAB against H. pylori KCCM41756

Incubation in brucella 10% horse serum plate at 37°C and 10% CO₂ for 24 hours

1. control
2. *Lb. sakei* SI3
3. *Lb. curvatus* BU1
4. *Lb. plantarum* NO1
5. *Lb. sakei* WH1

4. *Helicobacter pylori*의 urease 활성 억제효과

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 주목할 만한 것으로서 다량의 urease (urea aminohydrolase) 생성능력이 보고되었다(6). 이 urease는 pH를 상승시켜 위액의 강한 산성 조건에서도 *H. pylori*가 살수 있도록 도와주는 것으로 알려져 있다(7, 28). 이와 같이 *H. pylori* 생존율은 요소 분해효소에 의해서 생성되는 암모니아 존재 시 증가한다. 따라서 urease의 활성 저해능 실험을 통하여 *H. pylori*의 억제효과를 간접적으로 측정하였다. *H. pylori*를 BHI (Difco., France) 액체배지에 계대배양 후 5 mL 배양액을 원심분리 (9,950×g, 10 min, 4°C)하여 균체를 PBS(phosphate buffer saline)로 2회 세척 후 PBS를 가하여 동량 5 mL로 맞추었다. BHI액체 배지에 PBS로 세척 후 다시 동량의 PBS로 현탁하여 준비된 *H. pylori* 배양액을 2% (v/v) 접종하고 제균된 유산균 배양 상징액을 각각 *H. pylori*가 2% 접종된 배양액에 10%, 20% 첨가 후 37°C, 10% CO₂ incubator에서 24시간 교반 배양한 것을 urea 액체배지 2 mL에 위의 배양액 100 µL씩 넣어 30분 간격으로 3시간동안 A₅₆₀에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 9와 Fig. 10에 나타내었다. *H. pylori* 배양액에 10% 유산균 배양 상징액 첨가 시에는 *Lb. plantarum* NO1가 *H. pylori*의 urease 활성 억제력이 가장 컸고 다음이 *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. sakei* WH1 순서였다. Urease 활성 억제력이 가장 큰 *Lb. plantarum* NO1과 가장 작은 *Lb. sakei* WH1의 urease 활성 억제력 차이는 30% 이상으로 나타났다. *H. pylori* 접종 배양액에 20% 유산균배양 상징액 첨가 시에도 *Lb. plantarum* NO1의 urease 활성 억제력이 가장 크게 나타났고, 다음이 *Lb. curvatus* BU1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. sakei* WH1 순서였다. Urease 활성 억제력이 가장 큰 *Lb. plantarum* NO1과 가장 작은 *Lb. sakei* WH1의 urease 활성 억제력 차이는 60% 이상임을 확인할 수 있었다. *H. pylori*에 대한 urease 활성 억제력은 10% 유산균배양 상징액일 때 보다 20% 유산균배양 상징액일 때가 2배 이상 향상되는 것을 확인하였다. 유산균 배양 상징액 첨가량이 많을수록 *H. pylori*의 urease 억제 효과가 큰 것을 알 수 있었고 Bae, Eun-ah 등(8)의 보고에 따르면 이러한 결과는 *H. pylori*의 생육을 억제하는 기작이 요소분해효소의 활성 억제 때문이라고 유추된다.

이상과 같은 분리균주 배양 상정액의 *H. pylori* urease활성에 대한 억제작용이 단순히 유산균 배양 상정액의 낮은 pH 영향 이라고 판단될 수 있다. 4 분리 유산균 중 *Lb. plantarum* NO1의 경우 그 배양 상정액의 pH가 3.767로 분리 유산균 중 가장 낮은 배양 상정액의 pH를 갖으면서도 가장 높은 urease억제 활성을 나타내었다. 이 결과만 본다면 유산균 배양 상정액에 의한 urease억제 활성 요인이 유산균 배양 상정액의 낮은 pH 때문이라고 사료될 수 있다. 그러나 Fig. 10과 같이 배양 상정액의 pH가 *Lb. curvatus* BU1보다 낮은 *Lb. sakei* WH1(pH 4.048) 보다 *Lb. curvatus* BU1(pH 4.176)이 더 높은 urease억제 활성을 가지는 것으로 나타났다. 또한 *Lb. sakei* SI3(pH 4.039)에 대해서도 *Lb. sakei* SI3 보다 *Lb. curvatus* BU1(pH 4.176)이 더 높은 urease억제 활성을 가지는 것으로 나타났다. 위의 결과로 보아 유산균 배양 상정액에 의한 urease 억제 활성 요인에는 유산균 배양 상정액의 낮은 pH 영향과 함께 urease 활성 억제능을 갖는 물질이 urease억제 활성에 복합적으로 작용하였을 것으로 사료되어진다.

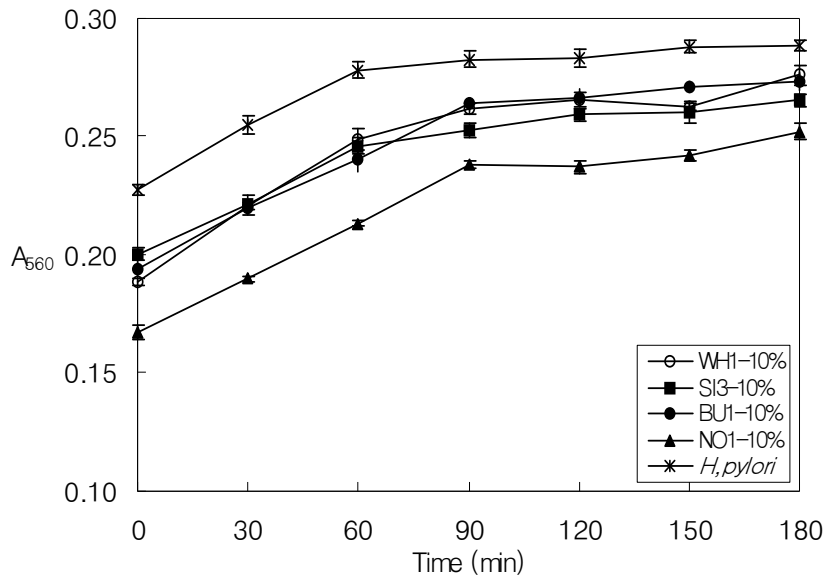


Figure 9. Inhibition of *H. pylori* on urease activity by LAB culture supernatant 10% (v/v) addition

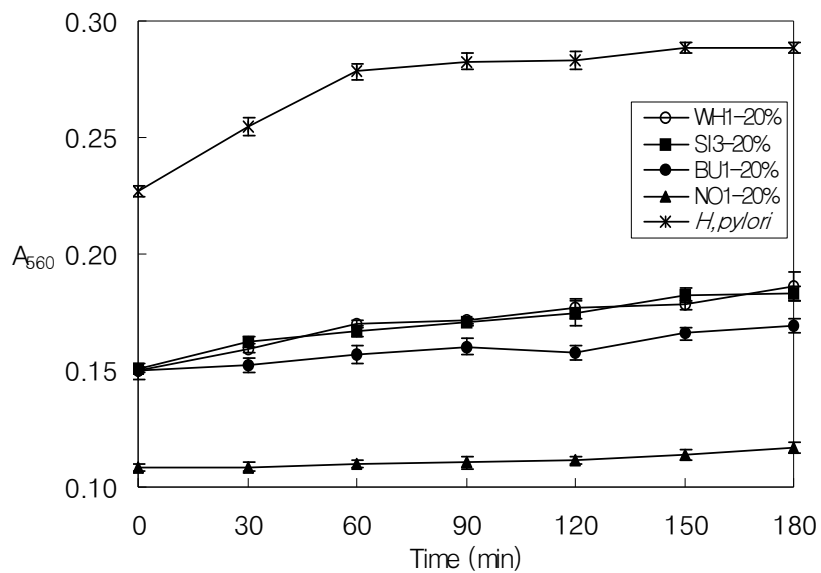


Figure 10. Inhibition of *H. pylori* on urease activity by LAB culture supernatant 20% (v/v) addition

제 2 절 *Helicobacter pylori* 억제 활성을 가진 유산균주의 특성

1. 배양시간에 따른 생육도

분리균주 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1을 30°C에서 40시간 정지배양하면서 매 4시간마다 흡광도를 측정하여 배양시간에 따른 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. Fig. 11과 같이 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1은 4시간부터 16시간까지 대수적으로 증가하였고 16~20시간에서 생육도가 최대가 되었으며 그 이후에는 정지기로 들어가는 것을 관찰할 수 있었다. *Lb. plantarum* NO1은 4시간부터 24시간까지 대수적으로 증가하였고 24시간에서 생육도가 최대가 되었으며 그 이후에는 정지기로 들어가는 것을 관찰할 수 있었다.

2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도

NaCl이 균주 성장에 미치는 영향을 검토하기 위해 MRS 액체배지에 NaCl을 0, 1, 3, 5, 7%가 되게 첨가하여 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. Fig. 12와 같이 4균주 모두 NaCl농도 0%에서 3%범위에서 A₆₀₀: 5.0 이상을 나타내어 생육도가 왕성하였다. 분리균주 중 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1은 0~5% NaCl에서 0% NaCl 함유 MRS배지에서의 생육도의 60%를 나타내었으나 배지 내 7% NaCl 농도에서는 급격히 생육도가 감소하여 배지 내 0% NaCl에 비하여 25%의 생육도를 나타내어 0~5% NaCl 범위에서 내염성을 나타내었다. *Lb. plantarum* NO1은 배지 내 NaCl 1%이상 농도부터 급격히 생육도가 떨어지는 양상을 보여 다른 3종의 균주보다 내염성이 낮음을 알 수 있었다.

3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

1.0 N NaOH 또는 1.0 N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 10.0으로 보정한 MRS 액체배지에 30℃에서 24시간 정치배양하여 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. Fig. 13과 같이 분리균주 4종 모두 pH 5.0에서부터 pH 10.0까지의 범위에서 잘 생육하였으나 pH 6.5 이하 pH 10.0 이상에서는 급격히 감소하는 생육도를 나타내었다. 분리균주의 최적 pH는 *Lb. sakei* WH1, *Lb. curvatus* BU1은 pH 6.5로 나타났고, *Lb. sakei* SI3는 pH 6.0 으로, *Lb. plantarum* NO1은 pH 7.0으로 나타났다.

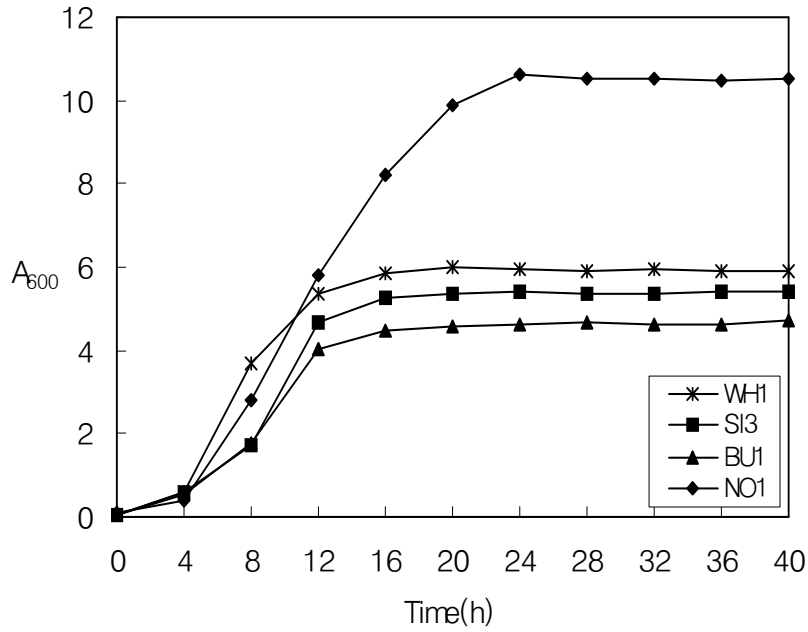


Figure 11. Growth curves of *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1 and *Lb. plantarum* NO1 in MRS broth at 30°C

All values were mean \pm S.E.(n=3)

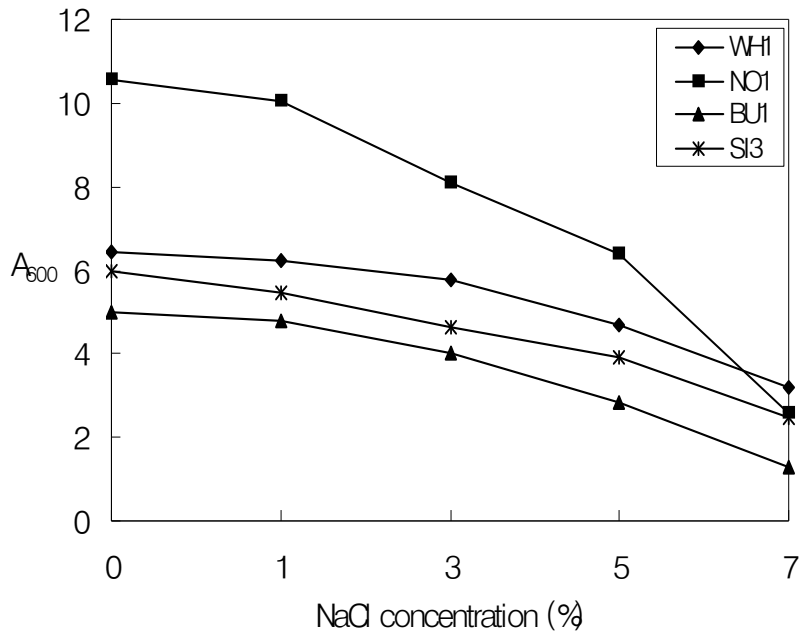


Figure 12. Effects of NaCl of the growth media on the growth of Lb. sakei WH1, Lb. sakei SI3, Lb. curvatus BU1 and Lb. plantarum NO1

Incubation in MRS broth containing 0~7% NaCl at 30°C for 24 hours

All values were mean ± S.E.(n=3)

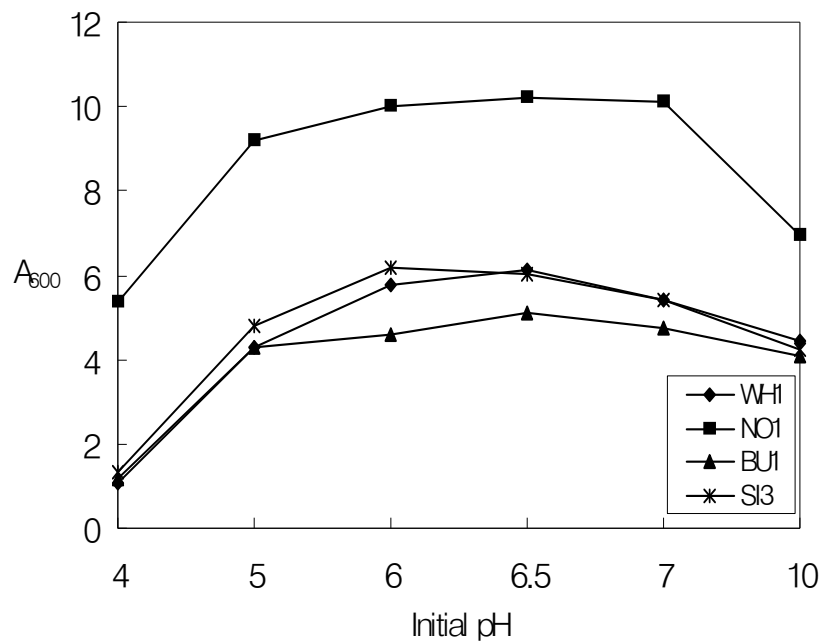


Figure 13. Effects of initial pH of the growth media on the growth of Lb. sakei WH1, Lb. sakei SI3, Lb. curvatus BU1 and Lb. plantarum NO1

Incubation in MRS broth to adjust the pH 4~10 at 30°C for 24 hours

All values were mean \pm S.E.(n=3)

제 3 절 분리균주의 장내 생존성 및 안전성

1. 내산성 및 인공위액 저항성

유산균이 인체에서 정상작용을 하기 위해서는 구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여 생존해야 한다. 따라서 4종의 분리 균주 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1에 대하여 단순 산성 pH에 대한 내성을 측정하기 위하여 pH 3.0으로 조정한 0.05 M sodium phosphate 용액과 위액에 대한 내성을 알아보기 위하여 pepsin (1,000 unit/mL)이 함유된 인공위액을 제조하여 저항성 시험을 실시하였다. 내산성 및 인공위액 저항성 여부는 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수 측정은 3회 반복 실험하여 측정된 결과를 평균치로 나타내었다. 그 결과 Fig. 14와 Fig. 15에 나타난 바와 같이 *Lb. sakei* WH1과 *Lb. curvatus* BU1보다 WH1과 *Lb. plantarum* NO1과 *Lb. sakei* SI3이 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 초기균수 (10^9 CFU/mL)의 90% 이상의 생균수를 유지하며 90% 이상의 높은 산저항성을 나타낸 반면, *Lb. sakei* WH1과 *Lb. curvatus* BU1은 초기균수 ($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL) 70% 이상의 생균수를 유지하는 산저항성을 나타내었다. 이는 위에서 생존하여 장으로 이동할 수 있다는 가능성을 제시한 결과라 할 수 있겠다. 순수한 위액의 pH는 pH 1.4~2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 되지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인해 위의 pH가 높아진다는 것을 고려한다면 생존율은 더욱 높아질 것으로 사료된다. 지금까지 산에 대한 강한 내성을 지니므로써 프로바이오틱 유산균으로 기능을 할 수 있는 유산균들이 많이 연구되어졌다. 그러나 이들 균들의 분리원이 동물의 장이나 분변에서 분리한 것이거나 식품에서 분리한 경우도 대부분 발효유제품에서 분리한 것이다. 김치에서 분리한 유산균의 경우는 이 등 (13)의 보고가 있지만 인공위액 처리 시 초기 균수 10^9 CFU/mL에서 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL을 나타내며 대체로 1~2 log cycle 감소하여 비교적 낮은 생존율을 보였으나 본 실험에서의 분리 유산균 중 *Lb. plantarum* NO1과 *Lb. sakei* SI3는 강한 산성 환경하에서도 비교적 높은 생존율을 보여 프로바이오틱 유산균으로서의 가능성이 보여 진다.

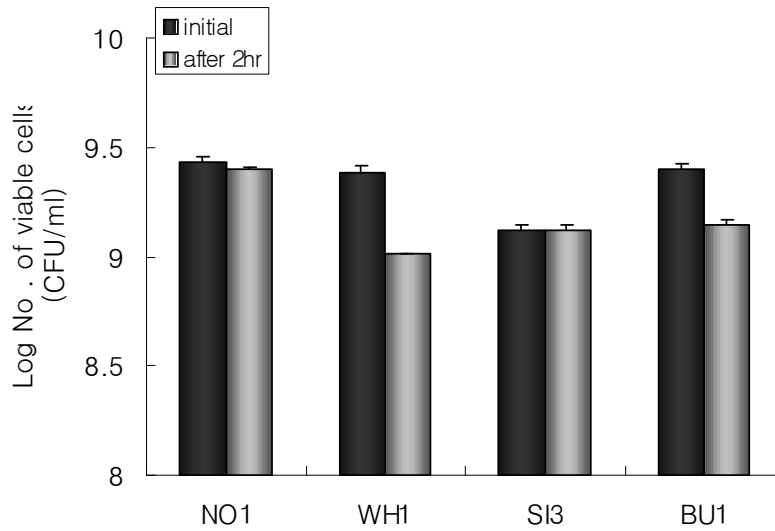


Figure 14. Acid tolerance of the isolate LAB in 0.05M sodium phosphate (pH 3.0)

All values were mean \pm S.E.(n=3)

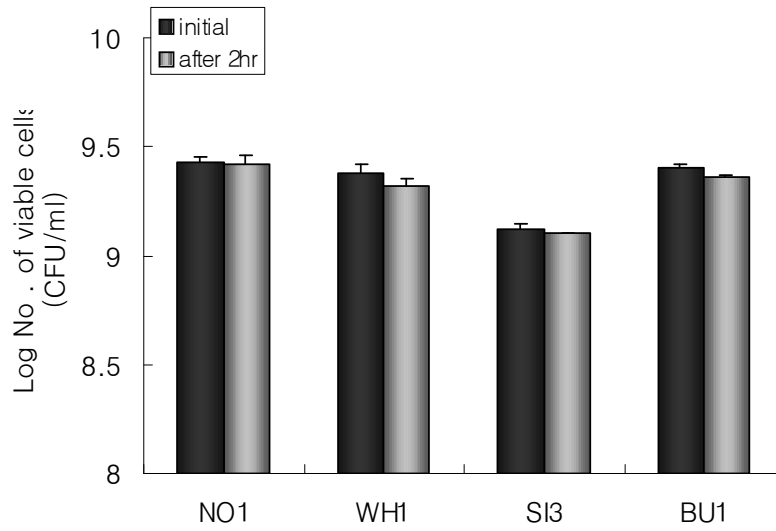


Figure 15. Viability of the isolate LAB in the artificial gastric juice (pH3.0)

All values were mean \pm S.E.(n=3)

2. 인공담즙 저항성

4종의 분리 균주 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1은 인공위액에서의 높은 생존율로 인해 위를 통과하여 장으로 이동할 수 있을 것으로 예측하였다. 위를 거쳐 장에 도달하기 위해서는 그 전에 췌장과 십이지장을 통과하게 되는데, 이 부위에서는 담즙액이 분비된다. 따라서 최종적으로 장내로 들어오기 위해서는 담즙액에 대한 내성 또한 갖추어야 할 중요한 특성이다. Gilliland 등은 probiotics생균이 가져야 할 담즙액에 대한 내성은 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다고 보고한 바 있다(13). 실제로 probiotics 생균으로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도 (0.6 g/L)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다(21).

인공담즙에 대한 저항성을 측정하기 위하여 분리균주 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1의 인공위액 처리 전 배양액과 인공위액 저항성 시험을 거친 배양액을 각각 0.3% (v/v)와 0.5% (v/v) oxgall이 함유된 MRS에 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 저항성 여부는 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정한 것을 평균치로 나타내었다. 그 결과 0.3%의 oxgall함유 인공담즙에서 분리균주 4종 모두 초기균수 ($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL)를 유지하며 초기균수의 90~100%의 높은 생존을 나타내었고(Fig. 16), 0.5% oxgall에서도 분리균주 4종 모두 초기균수 ($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL)를 유지하면서 90% 이상의 높은 생존율을 보였다(Fig. 17). 우리의 소화기는 위를 통과하여 장으로 도달하기 때문에 이와 동일한 조건에서 실험하기 위하여 pepsin (1,000 unit/mL)에서 2 시간 처리 후 0.3% oxgall에서 24 시간 처리하여 생존율을 확인하였다. Fig. 18과 같이 분리균주 4종은 인공위액 처리 후 초기균수의 70~90%이상의 높은 생존율을 보였다. 정 등 (46)이 보고한 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3이 인공위액에서의 저항성이 높은 반면 인공담즙에서의 생존율이 6%로 나타난 점에 비하면 본 연구에서의 분리균주 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1은 90%의 높은 내담즙성의 기능을 가졌다고 볼 수 있다. 위암이나 만성위염의 원인 균인 *H. pylori*를 억제하기 위해서는 위속의 강한 산성 환경에서도 생존해야하므로 이를 억제하기 위해서는 유산균 역시

산에 대한 높은 생존율을 가져야 한다. 본 연구에서 분리된 균주 4종은 이러한 요건을 만족시키고 동시에 장내로 이동한 후에도 정상작용의 기능을 수행할 수 있다는 점에서 타 연구에서의 결과와 차별화 될 수 있다.

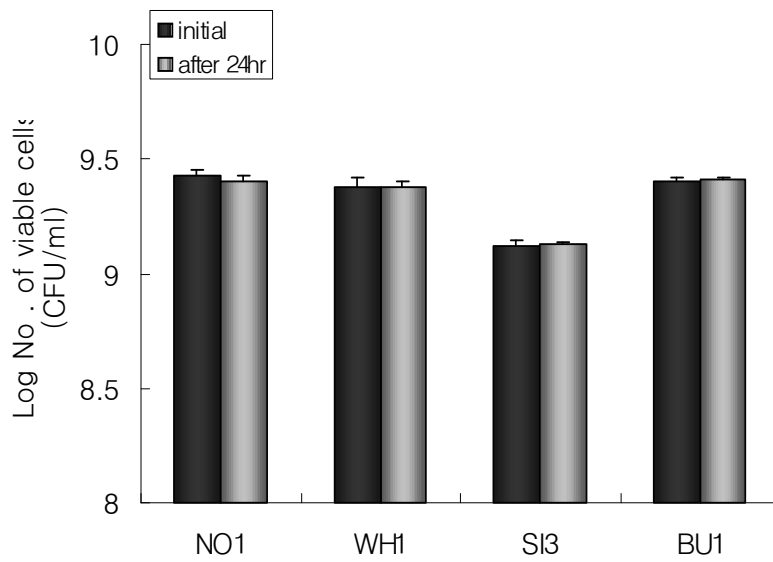


Figure 16. Bile resistance of the isolate LAB against 0.3% oxgal

All values were mean \pm S.E.(n=3)

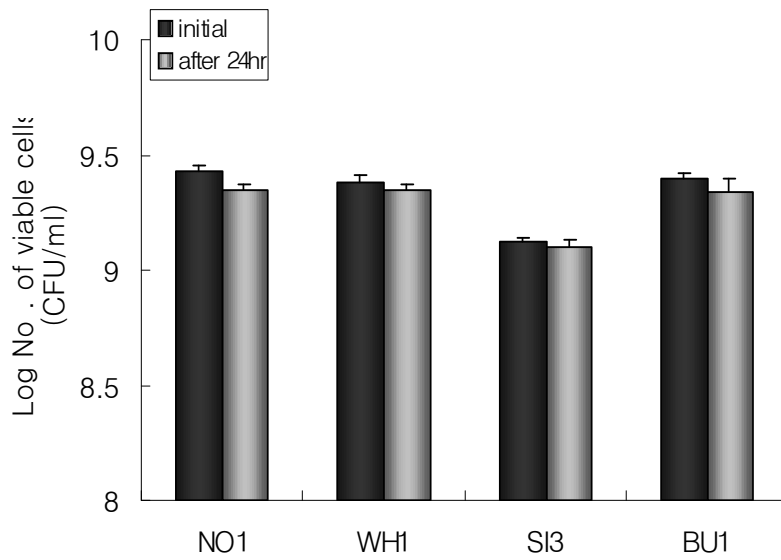


Figure 17. Bile resistance of the isolate LAB against 0.5% oxgall

All values were mean \pm S.E.(n=3)

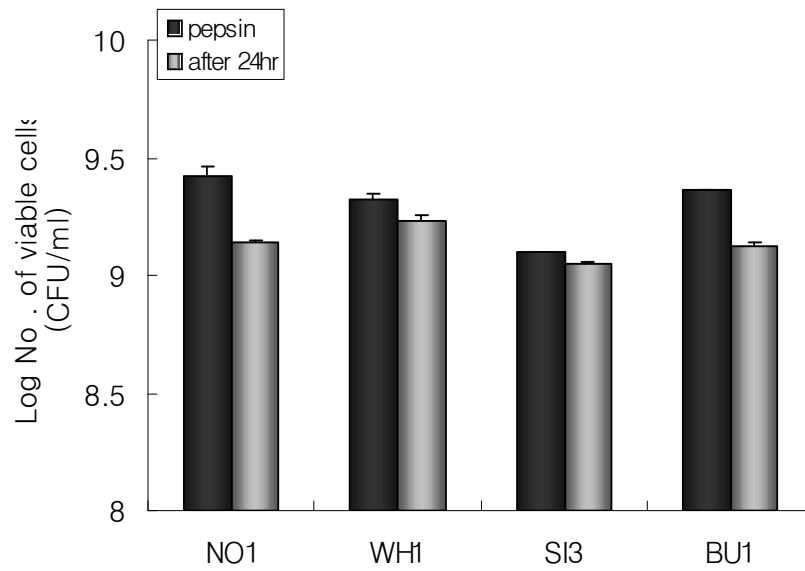


Figure 18. Bile resistance of the isolate LAB against 0.3% oxgall after treatment for 2 hours in artificial gastric juice of pH 3.0

All values were mean \pm S.E.(n=3)

3. 분리균주의 용혈성(Hemolysis)

용혈은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는 비정상적인 작용이다 (1). 생체내 용혈은 주로 비장, 간장, 골수세포 내피계 세포에서 일어난다. 용혈 결과 적혈구의 산소운반 기능이 없어져 생체내에 치명적인 결과를 가져온다. 본 연구에서는 김치로부터 분리된 *H. pylori*억제 유산균이 유해균에는 활성이 있으나 인체에는 무독함을 증명하기 위하여 용혈성 검사를 시행한 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 분리균주 4종 모두 용혈성검사에서 균체주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환을 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않았으므로 분리균주를 적용한 probiotics로의 안전성을 입증하였다.

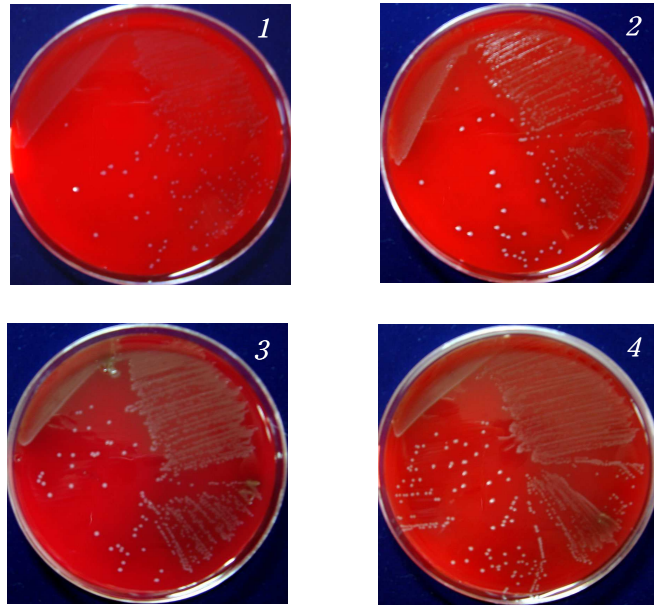


Figure 19. Hemolysis test of the isolate LAB

7% horse blood in blood agar base plate at 37°C 5% CO₂ for 48 hr

1. *Lb. sakei* WH1, 2. *Lb. sakei* SI3, 3. *Lb. curvatus* BU1, 4. *Lb. plantarum* NO1

제 4 절 분리균주의 유해균주에 대한 항균 spectrum

식품오염 미생물중 여러 gram 양성 및 gram 음성균을 지시균으로 하여 4종의 분리 유산균의 항균활성을 조사하기 위하여 균체를 직접 가하는 direct method(43)와 조항균물질을 paper disk(42)에 가하여 paper disk assay를 시행한 결과를 각각 Table 4와 Table 5에 나타내었다. Table 4에서 보는 바와 같이 direct method에서는 4종의 분리 유산균 모두 *Escherichia coli* O-157 외 9종의 공시균주에 대하여 넓은 항균활성을 보였다. 특히 4종의 분리 유산균 모두 *Curtobacterium sp.* Cf3와 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에 대해서는 강한 항균활성을 보였다. Table 5의 paper disk assay에서는 4종의 분리 유산균이 일부 공시균주에 대해서는 항균활성이 없으나 *Salmonella typhimurium* ATCC 19430과 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853에서 항균활성을 보였다. 특히 4종의 분리 유산균 모두 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 대해서는 강한 항균활성을 보였다. 분리 유산균 중 *Lb. plantarum* NO1은 direct method에서는 *Streptococcus faecalis* ATCC 29212와 *Escherichia coli* O-157에서 각각 13 mm, 16 mm의 억제환을 보이며 다른 분리 유산균보다 더 뛰어난 억제효과를 보였고 paper disk assay에서도 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 외 4종의 공시균주에서도 강한 항균활성을 나타냄으로써 분리 유산균 중 가장 강력한 항균력을 나타내었다. 이상의 결과는 식품가공의 이용에 있어서 유산균체나 그 배양 상정액을 이용하여 통조림식품에서의 포자 형성균의 제어나 발효유, 발효알콜음료, 유제품 등 여러 가지 식품 및 사료에 천연보존제로 사용함으로써 저장성 향상뿐만 아니라 열 처리량 감소에 의한 영양적 가치, 맛, 조직 감 향상 및 저온성 균, 병원성 균 그리고 부패미생물의 제어에도 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Inhibition activity of the isolated 4 strains against other microorganisms by using the direct method

Group	Sensitive indicator	Inhibition activity			
		NO1	WH1	BU1	SI3
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	++	++	++	++
	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	++	+	+	+
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	+	+	+	+
Gram(+)	<i>Micrococcus luters</i> ATCC 9341	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	++	++	++	+
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	++	++	++	++
	<i>Curtobacterium sp.</i> Cf3	++++	++++	++++	++++
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	++	++	++	++
Gram(-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+++	+++	+++	+++
	<i>Escherichia coli</i> O-157	+++	++	++	++

(Degree of clarity of clear zone by growth inhibition(mm): 7.85~10.75: +, 10.76~13.65: ++, 13.66~16.55: +++, 16.56~19.43: ++++)

Table 5. Inhibition activity of the culture supernatants of the isolated 4 strains against other microorganisms by using the disk assay

Group	Sensitive indicator	Inhibition activity			
		NO1	WH1	BUI	SI3
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+++	+++	+++	+++
	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	+++	+	+	-
Gram(+)	<i>Micrococcus luters</i> ATCC 9341	++	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	-	-	-	-
	<i>Curtobacterium sp.</i> Cf3	++	-	-	-
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	+++	++	+	++
Gram(-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+++	++	+	++
	<i>Escherichia coli</i> O-157	+++	+	-	+

(Degree of clarity of clear zone by growth inhibition(mm): 8.5~10.2: +, 10.3~11.9: ++, 12~13.59: +++, no clear zone: -)

제 5 절 분리균주의 *in vitro* 항암 효과

유산균에 대한 항암 효과는 1962년 Bogdanov 등이 *Lactobacillus gulgarius*에서 Sarcoma 180과 Ehrchinoma 57에 의한 복수암에 효과가 있는 물질을 분리한 이후 많은 연구가 이루어지고 있다(17). 그러나 우리가 쉽게 접할 수 있는 발효식품 중 특히, 김치에 존재하는 유산균의 항암 기능성에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 본 논문에서는 김치에서 분리한 4종의 분리 유산균 배양 상정액을 정상 및 종양세포에 처리한 후 MTT assay를 실시하여 그 생존율을 조사하였다. 유산균 배양 상정액을 처리하지 않은 구의 생존율을 100%(대조구)로 하고, 유산균 배양 상정액 처리 구의 정상 및 종양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존률을 구하여 4종의 분리 유산균에 의한 정상세포 BJ의 세포독성과 위암세포 AGS의 항암활성을 관찰하였다.

Fig. 20에 나타난 결과와 같이 정상세포 BJ와 위암세포 AGS에서의 유산균 배양 배지인 MRS broth의 첨가량이 5 μ L부터 세포 증식 저하에 다소 영향이 있음이 나타났다. 이러한 결과는 *in vitro* 실험 특성상 각 세포에 대한 유산균 배지 성분의 삼투압에 의한 세포증식 저하작용이 일어난 것으로 사료되어진다. 즉 본 실험에서는 정상세포 BJ와 위암세포 AGS에 대한 세포증식 저하에 MRS broth사용에 의한 배지 삼투압작용이 있음을 고려하여 정상세포 BJ와 위암세포 AGS에 대한 각각의 분리 유산균 배양 상정액의 첨가량도 최대 6 μ L가 넘지 않도록 하였다.

정상세포 BJ에서는 4종의 분리 유산균 배양 상정액의 첨가 시 4균주 모두 낮은 세포 성장 저해율을 나타내어 BJ에 대한 분리 유산균의 세포독성이 거의 없음을 나타내었다. 4종의 분리 유산균 중에서는 *Lb. curvatus* BU1의 배양 상정액을 정상세포 BJ에 대하여 3 μ L~6 μ L 첨가 시 최대 90%가 넘는 세포 생존력을 보여 정상세포 BJ에서의 세포독성이 가장 적게 일어남을 보여주었다. *Lb. sakei* WH1과 *Lb. sakei* SI3는 정상세포 BJ에 대하여 각각 그 배양 상정액을 3 μ L~6 μ L첨가 시 80% 이상의 정상세포 BJ에 대한 생존력을 보였고, *Lb. plantarum* NO1은 1 μ L~4 μ L첨가 시 70% 정도의 정상세포 BJ에 대한 생존력을 나타내었다.

위암세포 AGS에 대한 생육 억제 활성을 측정한 결과(Fig. 20) 분리 유산균 배양

상징액의 첨가량이 증가될수록 살아있는 위암세포 AGS의 수가 정상세포 BJ보다 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 4종의 분리 유산균 중 뛰어난 위암세포 AGS 생육 억제 활성을 나타낸 것은 *Lb. plantarum* NO1으로 1 μ L~4 μ L첨가 시 최대 81%의 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. *Lb. sakei* WH1과 *Lb. sakei* SI3의 위암세포 AGS에 대한 생육 억제 활성은 각각 그 배양 상징액을 3 μ L~6 μ L를 위암세포 AGS에 첨가 시 최대 69%, 79%의 억제력을 보였고 *Lb. curvatus* BU1은 3 μ L~ 6 μ L첨가 시 최대 50%의 위암세포 AGS 억제 활성을 보였다. 따라서 4종의 분리 유산균 배양 상징액의 첨가가 정상세포인 BJ의 생육에는 큰 영향을 미치지 않으면서 위암세포인 AGS에는 특이적으로 세포 생육을 크게 저해시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 4종의 분리 유산균의 배양물이 안전하면서도 강력한 항암활성을 지니고 있음을 잘 나타내는 결과이다.

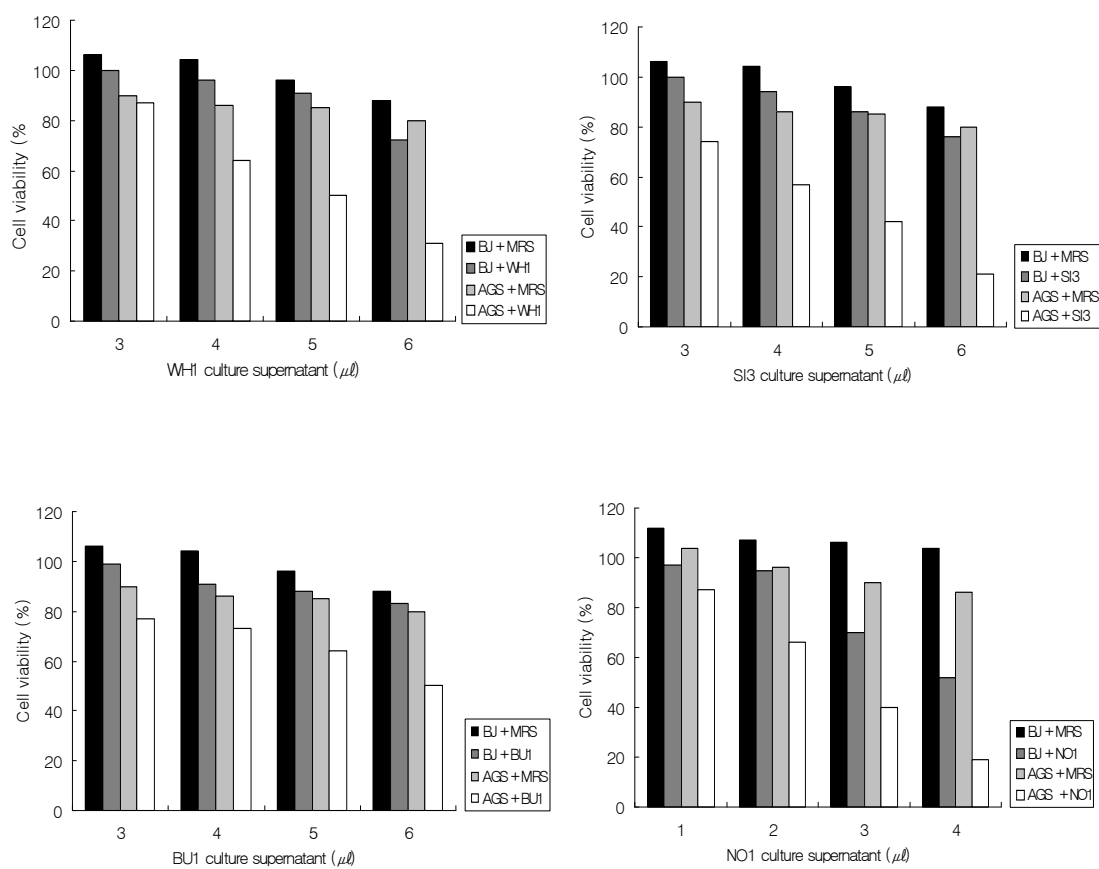


Figure 20. MTT assay of the culture supernatants of isolate LAB against BJ foreskin normal cell, AGS gastric carcinoma cells

MRS: Lactic acid bacteria culture broth

WH1: *Lb. sakei* WH1, SI3: *Lb. sakei* SI3, BU1: *Lb. sakei* BU1, NO1: *Lb. sakei* NO1

제 4 장 결 론

본 연구에서는 *H. pylori* 억제 활성과 항암활성이 우수한 유산균을 김치로부터 분리하여 urease 활성 저해, 장내 생존성 여부, 용혈여부에 의한 안전성, 유해미생물에 대한 생육억제능력, MTT assay를 통한 항암활성을 확인 하였다. 선별된 유산균은 Gram 염색을 비롯한 형태학적 특성과 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열을 통하여 동정한 결과 각각 *Lb. sakei* 2종, *Lb. curvatus* 1종, *Lb. plantarum* 1종으로 동정되었으며 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1으로 명명하였다. 선별된 유산균의 *H. pylori* 억제능을 규명하기 위하여 paper disk assay를 시행하여 억제환을 측정 한 결과 분리균주 4종 모두 *H. pylori* 생육을 억제하는 것으로 나타났고, 그 중 억제환이 가장 큰 것은 *Lb. plantarum* NO1이었다. *H. pylori*가 다른 세균과 달리 강한 산성조건인 위장에서 서식할 수 있는 것은 이 균주가 urease라는 효소를 생성하기 때문인데, 이 효소는 위내 요소를 분해하여 암모니아와 CO₂를 발생시켜 균체 주위를 알칼리성으로 만들어 위내 *H. pylori*의 생존을 가능하게 도와주는 역할을 한다. Urease의 활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있기 때문에 분리균주의 urease 활성 억제능을 측정하였다. 4종의 분리 유산균 배양 상징액을 *H. pylori* 2% 접종 배양액에 대하여 첨가량을 10%, 20%로 조정하여 urease 활성 억제 효과를 측정 한 결과 10% 유산균 배양 상징액 첨가구에서 보다 20% 유산균 배양 상징액 첨가구에서 urease 활성 억제 효과가 5배 이상 크게 나타났다. 10%와 20% 유산균 배양 상징액 첨가구 모두에서 선별 유산균 중 *Lactobacillus plantarum* NO1이 강한 urease 억제활성을 가짐을 확인할 수 있었다. Urease 활성 저해력이 가장 큰 *Lb. plantarum* NO1과 가장 작은 *Lb. sakei* WH1의 urease 활성 저해력 차이는 30% 이상으로 나타났다.

H. pylori 활성을 억제하는 유산균의 장내 생존성 여부 확인을 위하여 내산성, 인공 위액 및 인공담즙에서 처리한 결과 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate buffer와 인공 위액에서 2시간 처리한 후에도 4종의 선별 유산균 모두 초기균수($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL)를

유지하면서 높은 저항성을 나타내었다. 뿐만 아니라 oxgall 농도 0.3%와 0.5%의 인공담즙에서 24시간 처리한 후에도 3균주 모두 초기균수($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL)를 유지하였으며, 인공담즙 저항성 시험의 경우 위액에서 생존 시 위를 통과하여 장으로 이동할 것임을 고려하여 인공위액에서 생존한 균주를 동일조건인 인공담즙에서 처리하였을 때에도 4균주 모두 초기균수를 유지하면서 담즙에 대해서도 높은 저항성을 나타내었다. 이 결과로 인해 본 연구에서 분리한 4종의 *H. pylori* 억제 유산균 *Lb. sakei* WH1, *Lb. sakei* SI3, *Lb. curvatus* BU1, *Lb. plantarum* NO1은 장내 생존하면서 probiotics로서 작용할 수 있을 것임을 확인하였다. 동시에 위내에서도 효과적으로 *H. pylori*를 억제할 수 있을 것으로 기대되어 진다. 김치로부터 분리된 4종의 유산균이 *H. pylori* 억제에는 활성이 있으나 인체에는 무독함을 증명하기 위하여 용혈성 여부를 실험하였다. 그 결과 분리 유산균 4종 모두 균체주위에 용혈이 일어나서 생기는 투명환을 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않았으므로 인체에 안전하다는 것을 간접적으로 확인하였다.

분리 유산균 생균자체와 본 균주가 생산하는 조항균 물질의 항균 spectrum을 조사한 결과 *Bacillus* 속, *Streptococcus* 속, *Micrococcus* 속, *Staphylococcus* 속 등의 gram 양성세균에 대해서 효과가 있었을 뿐 아니라 gram 음성세균인 *Salmonella* 속, *Pseudomonas* 속, *Escherichia* 속에 대해서도 강한 항균력을 보여주었다. 분리 유산균 중 *Lb. plantarum* NO1은 direct method에서는 *Streptococcus faecalis* ATCC 29212와 *Escherichia coli* O-157에서 각각 13mm, 16mm의 억제환을 보이며 다른 분리 유산균보다 더 뛰어난 억제효과를 보였고, paper disk assay에서도 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 외 4종의 공시균주에서도 강한 항균활성을 나타냄으로써 분리 유산균 중 가장 강력한 항균력을 나타내었다. 이러한 결과는 분리 유산균이 *H. pylori*뿐만 아니라 다른 유해 미생물에 대해서도 뛰어난 억제효과가 있음을 보여주어 특정 균주에 대해서만이 아닌 보다 효과적인 항균활성을 가짐을 확인한 것이다.

분리 유산균주의 정상세포 BJ에 대한 세포독성과 위암세포 AGS에 대한 항암활성을 조사한 연구에서는 분리 유산균 배양 상징액의 첨가가 정상세포인 BJ의 생육에는 큰 영향을 미치지 않으면서 위암세포인 AGS에는 특이적으로 생육을 크게 저해 시키는

것으로 나타났다. 정상세포 BJ에서는 4종의 분리 유산균 배양 상징액의 첨가에도 4균주 모두 높은 세포성장을 나타내어, BJ에 대한 분리 유산균의 세포독성이 거의 없음을 나타내었다. 4종의 분리 유산균 중에서는 *Lb. curvatus* BU1이 정상세포 BJ에 대하여 최대 90%가 넘는 세포 생존력을 보여 정상세포 BJ에서의 세포독성이 가장 적게 일어남을 보여주었다. 위암세포 AGS에 대한 생육 억제 활성을 측정한 결과 분리 유산균 배양 상징액의 첨가량이 증가될수록 살아있는 위암세포 AGS의 수가 정상세포 BJ보다 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 4종의 분리 유산균 중 뛰어난 위암세포 AGS 생육 억제 활성을 나타낸 것은 *Lb. plantarum* NO1으로 최대 81%의 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. 이상의 항암성 결과는 정상세포의 생육에는 크게 영향을 미치지 않으면서 위암세포인 AGS의 생육을 크게 저하시킴으로써 효과적인 항암효능을 나타내는 식품 및 의약품의 소재 개발 가능성을 제시하게 되었다.

지금까지 김치로부터 분리된 유산균을 통한 *H. pylori* 억제활성과 함께 항암활성을 가지며 probiotics의 기능을 할 수 있는 가능성을 보았다. 앞으로의 연구를 통해서선 별 유산균이 어떤 작용에 의해서 *H. pylori*활성을 억제하고 항암활성을 가지는지 그 메커니즘을 밝혀내고 물질을 규명하는 추가적인 연구 수행이 요구된다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. 박석돈, 김주섭, 차승훈. *Vibrio Vulnificus* 세포용해소에 의한 마우스 독혈증시 Cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 변화. 대한피부과학회지 36(1):23-29(1998)
2. 이광호. *Helicobacter pylori* 감염의 세균학적 특성. 대한의사협회지 1997;40:1154
3. 정후길, 김응률, 전선락. *Helicobacter pylori*생육을 특이적으로 억제하는 유산균 선발. J. Micro 2001;37(2):151-157
4. 최종영, 박충상, 양영상, 박수현, 채현석, 최명규, 정인식, 박두호, 김부성 : 한국에서의 *Helicobacter pylori*감염의 유병률. 대한내과학회지 1995;47
5. Adams. M. R, Hall C. J. Growth inhibition of food-born pathogens by lactic acid and their mixtures. International. J. Food Sci. Technol. 23:287-292
6. B. R. Won, E. H. Song, G. H. Kang, M. W. Chang and Y. H. Yoon. Inhibitory Effect of *Lactobacillus heiviticus* CU631 on urease and vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori* J. Anim. Sci & Technol(kor) 2001;43(6):931-940
7. C. E. Park, C. H. Park. Inhibition of urease activity of *Helicobacter pylori* by artemisia asiatica nakai korean J. Biotechnol Bioeng. 2004;19(5):348-351
8. E. A. Bae, D. H. Kim, and M. J. Han. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Bifidobacterium spp* J. Microbiol. Biotechnol. 2000;10(4):532-534
9. E. A. Kim, S. C. Baick, W. H. Chung. A study on growth inhibition of *Escherichia coli* and Salmonella typhimurium by lactic acid bacteria. Korean. J. Anim, Sci & Technol. 2002;44(4):491-498

10. E. R. Kim, B. M. Jung, J. Y. Kim, S. Y. Kim, H. K. Jung, H. J. Lee, H. N. Chun. Basic physiological activities of *Bifidobacterium infantis* Maeil-K9 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 selected by anticarcinogenic activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2003;31(4):348-354
11. Gasser, F. E. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infection, *Bull. Inst. Pasteur.*, 1994;92:45-67
12. Gilliland, S. E. Acidophilus milk products : A review of potential benefits to consumers, *J. Dairy Sci.*, 1989;72:2483-2494
13. Gilliland, S. E., Staley, T.E. and Bush, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 1984;67:3045-3051
14. Gonzalez, S. N. Apella. M. C. Romero, N. C and Oliver. Inhibition of enteropathogens by *Lactobacillus* strains used in fermented milk. *J. Food protect* 1993;56(9):773-776
15. H. S. Cheigh. Biogenic components and physiological functionality of Kimchi. 영남대학교 부설 생활과학 연구소
16. H. S. Kim and J. S. Ham. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* 2003;23(2):186-192
17. H. S. Lee., S. H. Park., H. K. Chung., T. B. Choe. Antitumor effect of cell wall component purified from *Lactobacillus plantarum*. *KK. J. Gen. Eng.* Vol.5. 1993.
18. H. S. Lee and T. B. Choe. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid by environmental Stress. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997;25(3):240-247
19. H. S. Park, S. H. Lee, and T. B. Uhm. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27(3), 433-440(1998)

20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. (2006)
21. Hyun-Dong Paik, Min-Yong Jung, Hwang-Young Jung, Won-Seok Kim and Kee-Tae Kim. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. Korean J. Food Sci. Technol. 34(1):73-78(2002)
22. J. H. Kang and M. S. Lee. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by *Enterococcus faecium* GM-1 J. Microbiol. 51:629-636(2005)
23. Jae-Hun Sim, Se-Jong Oh, Sang-Kyo Kim and Young-Jin Baek. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. Korean J. Food Sci. Technol. 27(1):101-104(1995)
24. J. G. Kim, J. S. Yoon. Changes of index microorganisms and lactic acid bacteria of korean fermented vegetables (Kimchi) during the ripening and fermentation-part 1. Kor. J. Env. Hlth., Vol. 31, No. 1, pp 79-85(2005)
25. J. M. Kim, J. S. Kim, H. C. Jung. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from korean patients in 2003. 대한소화기학회지 44:126-135(2004)
26. Jong-Gil Park, Suk-Young Yun, SeJong Oh, Jung-Gul Shin and Young-Jin Bark. Probiotic Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 Isolated from Korean Breast-Fed Fufant Korean. J. Food Sci Technol. 35(6):1244-1247(2003)
27. J. S. Kim, M. J. Bail and K. H. Rhee. Purification of the Urease of *Helicobacter pylori* and Production of Monoclonal Antibody to the Urease of *Helicobacter pylori*. Korean J. Soc. Microbiol. 23:17-26(1988)
28. Jung Mogg. Kim. M. D. Current Research on the virnlence Factors of *Helicobacter pylori*. 대한 소화기학회지41:77-86(2003)
29. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic

- resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* 29:691-698(1974)
30. Lee. J. J., S. H. Kim B. S. Chang, J. B. Lee, C. S. Huh, T. J. Kim and Y. J. Beak. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *kor. J. Food Sci. Technol*:31:764-770(1999)
31. M. H. Coconnier, V. Lievin, E. Hemery, A. Servin. Antagonistic Activity against *Helicobacter* Infection In Vitro and In Vivo by the Human *Lactobacillus acidophilus* Strain Lb. *APPLIED AND ENVIRONMENT. MICROBIOLOGY.* 4573-4580(1998)
32. Metchnikoff, E. The prolongation of life, Arno press, New York, 1908
33. M. S. Shin, J. J. Lee, S. H. Na, H. S. Bae, C. S. Huh and Y. J. Baek. Characteristics of *Bifidobacterium spp.* Isolated from Korean Feces for Probiotics. *Korean. J. Sci.* 20:(4)273-282(1998)
34. N. O. Kim, J. G. Kim, J. H. Kim. Risk factors of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic Korean population. *대한내과학회지* : 제59권 제 4 호 2000
35. N. Y. Kim. The Effect of Antibiotic Resistance on the Eradication of *Helicobacter pylori*. *대한소화기학회지* 47:82-86(2006)
36. P. D. Midolo, J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo and M. L. Grayson. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 1995, 79, 475-479(1995)
37. Piard J. C. and Desmazeud , M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait.* 72:113(1992)
38. Shin-Ho Lee, Myung-Ja No. Viability in Artificial Gastric and Bile Juice and Antimicrobial Activity of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(6):617-622(1997)

39. Speck, M. L. Interactions among *Lactobacilli* and Man. *J. Dairy Sci.*, 59:336-343 (1976)
40. Stiles, M. E. and Hastings, J. W. Bacteriocin producing by lactic acid bacteria : potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.*, 2:24(1991)
41. Tagg, T. R., and Mcgiven, A. R. Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol.* 21:943, 1971
42. Tagg, T. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria, 1976.
43. Tamine, A. Y. and Robinson, R. K. In Yoghurt : science and technology, 2nd Ed, CRC Press, N. Y., pp.358-360(1999)
44. W. H. Yoon, Y. M. Na, and C. H. Kim. Antimicrobial and Antitumoral Activities of *Candida kefir* TFP 7 Isolated from Tibetan Fermented Milk. KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR. Vol. 23. No. 1, pp. 80-85(2003)
45. Won-Bok Chung, Won-Seok Soe, Jae-Young Cha and Young-Su Cho. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for Probiotics Production from Korean Dongchimi. Korean Journal of Food Preservation. 10(3):406-410(2003)
46. Young-Je Cho, Sung-Sook Chu, Jeung-Hoan Kim and So-Jung Yoon. Inhibition against *Helicobacter pylori* and Biological Activity by Rue Extracts. J. Korean Soc Food sci Nutr34(4):460-465(2005)
47. Y. S. Yoon, S. H. Lee, N. I. Beak, H. Y. Kim and C. H. Park. Inhibition of Cell Growth and Urease Activity of *Helicobacter pylori* by Medicinal Plant Extracts. Korean. J. Biotechnol Bioeng. 19(3):187-191(2004)

감사의 글

졸업을 앞두고 2년이라는 대학원 생활을 돌이켜보니 지나온 시간들이 참 길고도 짧았던 것 같습니다. 항상 최선을 다하려고 노력했지만 뒤 돌아 보니 조금은 아쉽고 후회가 남습니다. 부족한 저를 늘 곁에서 따뜻하게 지켜봐 주시고 아껴주신 모든 분께 감사드립니다. 저에게는 대학원 생활이 저 스스로를 더욱 가꾸고 발전 할 수 있게 한 소중한 시간들이었습니다.

지금에 오기까지 학문적 지도뿐만 아니라 저의 미래에 있어 큰 꿈과 희망을 심어주시고 아낌없이 격려해주신 장해춘 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 부족한 제 논문을 꼼꼼하게 심사해주시고 세심하게 지도 해주신 이명렬 교수님과 김복희 교수님께도 감사드리며, 지금까지 큰 가르침과 충고를 아끼지 않으신 서화중 교수님, 노희경 교수님, 김경수 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

가족보다도 더 많은 시간을 함께하며 서로 힘이 되 주었던 우리 실험실 식구들!! 항상 조언을 아끼지 않으시고 삶의 방향을 알려주시는 실험실의 든든한 큰언니이자 스승님이신 은주언니, 친언니같이 건강을 항상 염려해주시는 짝꿍 지윤언니, 여린 것 같지만 야무지고 능력 많은 우리 장미언니, 친구 같은 편안함과 따뜻함을 주신 효주언니와 유란언니, 옆에 있는 것만으로도 힘이 되어준 사랑하는 동기 지용이, 이제는 어엿한 사회인이 된 든직한 정길오빠, 귀염둥이 웰빙 삼총사 지혜, 현경이, 이제 제법 대학원생티가 나는 실험실 막내 은실에게도 너무 고맙습니다. 다들 꼭 성공해서 더욱 행복하길 바랍니다.

항상 힘이 되어주고 웃음을 주는 내 측근 길진이, 아영이, 진희, 소현이, 민정이, 은정과와 굳은 일 마다 앓고 도와주는 교회 식구들, 대학원 동기 유미와 인혜에게도 감사의 마음을 전합니다.

격려를 아끼지 않으시고 든든한 후원자가 되어주신 친지분들에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 언제나 힘이 되어준 든직한 우리 오빠와 힘든 상황에서도 딸의 뒷바라지에 혼신을 다하시고 아낌없는 사랑을 주신 이 세상에서 가장 사랑하고 또 사랑하는 부모님께 이 논문을 바칩니다. 오늘의 작은 열매에 자만하지 않고 계속 정진하면서 모든일에 도움이 되는 삶을 살아가겠습니다. 감사합니다.

