

김치로부터 분리한 *Helicobacter pylori* 억제능 유산균 *Pediococcus pentosaceus* MD1의 흰쥐에 대한 반복투여독성 연구

이재준 · 이유미 · 장해춘 · 이명렬[†]

조선대학교 식품영양학과

Repeated-Dose Toxicity Study of *Pediococcus pentosaceus* MD1, an Anti-*Helicobacter pylori* Activity Lactic Acid Bacteria Isolated from *Kimchi*, in Rats

Jae Joon Lee, Yu Mi Lee, Hae Choon Chang and Myung Yul Lee[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 500-759, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate repeated-dose toxicity in male and female rats orally administered with *Pediococcus pentosaceus* MD1, an anti-*Helicobacter pylori* producing lactic acid bacteria isolated from *kimchi*. Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups, 10 animals in each group. The test article was administered once daily by gavage to rats at dose levels of 0, 500, 1,000 and 2,000 mg/kg for 4 weeks. No test article-related deaths and clinical findings in both sexes of rats during the study period were resulted. In addition, no differences were found between control and treated groups in body weight changes, food intake consumption and water consumptions. Hematological parameters, serum biochemical analysis and any other findings did not also show any significant or dose-dependent alterations. There were no alterations in absolute and relative organ weights by the administration of *Pediococcus pentosaceus* MD1. These results suggest that no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of *Pediococcus pentosaceus* MD1 is considered to be more than 2 g/kg in male and female rats.

Key words: anti-*Helicobacter pylori* producing lactic acid bacteria, oral repeated-dose toxicity, rat

서 론

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 1983년 Warren과 Marshall에 의하여 위장에서 *Campylobacter*와 유사한 세균이 발견된 이후(1), 소화성 궤양, 위염, 위선암 또는 mucosa associated lymphoid tissue 림프종 등의 중요한 유발인자로 알려져 있다(2).

*H. pylori*의 세균학적 특성은 그람 음성균으로 만곡형의 bacillary 형태를 갖는 것이 일반적이지만, 주위 환경에 따라 형태를 coccoid로 바꾸는 것으로 알려져 있고(3), 길이는 2.5~5.0 μm 이며, 폭은 0.5~1.0 μm 정도의 unipolar flagella가 있어서 운동성이 강하다(4). *H. pylori*의 특징적 성상은 위벽 상피세포의 군락을 형성하고, 강한 urease 활성을 이용하여 위점막의 혈장 삼출액이나 조직액내에 존재하는 요소를 암모니아와 중탄산염으로 분해하여 균주 주위를 알칼리화 함으로써 위내의 강한 산성조건에서도 살아갈 수 있어(5), 위 궤양 환자의 70~80%, 십이지장궤양 환자의 90% 이상이 *H.*

*pylori*균이 검출되는 것으로 알려졌다(6).

H. pylori 제균을 위하여 지금까지 다양한 약제를 사용하였는데 이들 항균제 치료는 부작용과 pH 상승으로 인한 *H. pylori*의 재감염 위험, 내성균의 출현, 고비용 등 여러 문제점이 지적되고 있다(7). 그러나 최근에는 *H. pylori*의 새로운 치료방법으로 비항생제성 물질에 대한 관심이 증가되고 있어서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 백리향(8), 중국차(9), cashew apple(10), 소목과 황련(4), 한약재 추출물(11), 애엽추출물(12), 유산균(13,14) 등 천연물의 *H. pylori*에 대한 억제활성이 연구 보고되었다. 그중에서 *H. pylori*에 직접적으로 작용하거나, 항생제에 의하여 수반된 임상적 부작용을 최소화시키면서, *H. pylori*의 치료역할을 할 수 있는 프로바이오틱 유산균(probiotics lactic acid)에 대한 관심이 모아지고 있다.

최근 유산균을 기능성 식품에 사용하기 위하여 잠재력을 평가하기 위한 프로바이오틱 유산균의 선발기준에 대한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 진행되고 있다(15,16). 프로

[†]Corresponding author. E-mail: mylee@mail.chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-7722, Fax: 82-62-225-7726

바이오텍 유산균으로서 가져야할 가장 중요한 특성은 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서 동물 장내에서 생존력이 커야하고(17-19), 대장균이나 살모넬라와 같은 유해 미생물의 생육 억제 능력이 커야 한다는 점이다(18,20). 현재 국내에서는 *H. pylori* 억제능을 갖는 유산균을 이용한 발효유가 개발되어 판매되고 있으나, 김치 유산균에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 김치 유산균은 아직 활용되고 있는 사례가 많지 않지만 우수한 프로바이오틱 유산균으로 사용될 수 있고 이에 대한 안정성과 기능성은 오랜 기간을 통하여 한국인의 식생활에 의하여 검증되었다고 볼 수 있다. 김치 유산균에 관한 안정성 검증에 관한 연구로는 Lee 등(21)이 김치로부터 분리한 exopolysaccharide 생성 유산균인 *Leuconostoc kimchii* GJ2에 대한 급성독성시험을 실시한 결과 이들 시료를 복강 및 경구로 1회 최고 용량으로 투여한 후 마우스에서 독성학적 변화를 관찰하였는데, 시료 물질 투여로 인한 어떠한 독성학적인 변화를 관찰할 수 없었다. 또한 맛있는 김치숙성에 관여하는 우수한 발효능, 박테리오 생성능 및 박테리오 생성 유도작용을 동시에 갖춘 김치발효 유량 종균으로 알려진 *Leuconostoc citrum* GJ7의 안전성 평가를 위해서 급성독성시험을 마우스를 가지고 실시한 연구에서도 이들 유산균은 저독성의 안전한 물질로 사료되는 것으로 보고하였다(22).

따라서 본 연구에서는 Son(23)이 김치로부터 분리·동정하여 장에 정착성이 우수하고 내산성, 인공위액, 인공담즙에 높은 저항성을 나타낸 *H. pylori* 억제능이 우수한 유산균 주로 선별된 *Pediococcus pentosaceus* MD1의 안전성을 평가하고자 식품의약품안전청 국립독성연구소 독성·약리·병리시험 표준작업지침서(I)(1999. 12)의 독성시험기준(24)에 따라 흰쥐에서 4주 반복투여에 의한 독성시험을 실시하였다.

재료 및 방법

H. pylori 억제능 유산균의 분리 및 시험물질

시험 유산균주로는 광주·전남 지역 김치에서 분리한 31종의 유산균주로부터 *H. pylori* 억제능이 우수한 유산균주인 *Pediococcus pentosaceus* MD1을 선별하여 시험에 사용하였다. 유산균 성장배지는 MRS(Difco Co., France)의 액체 혹은 고체배지를 사용하였다. 배양조건은 30°C incubator(Vision Co., Korea)에서 24시간 정치 배양하였다. 배양한 *Pediococcus pentosaceus* MD1(이하 시료라 함)을 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 배양액 중의 균체를 회수하여 최종적으로 시험에 사용할 생균을 얻었다. 이를 주사용 멸균증류수(중외제약 주식회사)에 투여용량을 고려하여 각 농도별로 용해하였다. 시험물질의 투여는 투여 개시 전 잘 현탁시킨 후에 금속제 경구 투여용 존대를 사용하여 위내에 직접 주입하였으며, 주사용 증류수를 대조물질로 사용하였다.

공시동물 및 사육환경

청정구역에서 생산된 Sprague-Dawley 계통의 특정병원균 부재 암 수컷 흰쥐 각각 5주령 50마리를 (주)대한바이오텍으로부터 구입하여 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. 실험은 온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 환기 회수는 시간당 10~18회, 조명은 12시간 명암주기(08:00~20:00), 조도는 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(280W×420L×170H mm) 케이지에 2마리씩 암수 각각 넣어 4주간 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안에 임상관찰 등을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였으며, 실험동물이 6주령이 될 때 시험을 실시하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사)를 자유 급여하였으며, 음수는 여과된 정제수를 자유 섭취시켰다.

시험군의 구성 및 투여용량의 설정근거

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군 분리를 실시하였다. 투여용량은 미국 환경보호청(US Environmental Protection Agency)에서 무해물질 분류 기준에 근거하여 설정하였다. 반복투여 독성시험에서 시험물질의 독성이 매우 적고 중독량을 정하기가 어려운 경우 투여량의 상한선은 기술적으로 투여할 수 있는 최대량으로 하는 것이 기본이어서, 암수 모두 최고 용량을 2,000 mg/kg으로 하고, 등비를 1/2로 하여 체중 kg 당 500, 1,000 및 2,000 mg을 설정하였으며, 투여용량은 경구투여 시는 10 g 당 0.2 mL를 넘지 않게 일정한 액량으로 시료물질의 각 농도가 들어가게 조제하여 투여액량을 결정하였는데 투여량은 투여직전 체중에 따라 산출하였다. 각 군의 동물 수는 모두 암수 각각 10마리로 하였다.

일반증상 및 사망동물의 관찰

시험기간 중 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상씩 일반상태의 변화, 중독 증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였고(25), 이상이 있었던 경우 증상의 종류, 발견 및 증상의 정도를 개별적으로 기록하였다. 모든 동물에 대하여 매일 폐사나 빈사상태를 살폈으며, 폐사동물이 발견되었을 경우에는 즉시 부검하여 사인을 규명하였다.

체중, 사료 및 물 섭취량 측정

모든 동물에 대하여 시료 투여 직전 및 투여 후 4주 동안 매주 일정한 시간에 1회 측정하였으며, 그리고 부검 당일 체중을 측정하였다. 사료 섭취량과 물 섭취량은 매주 3회 측정하여 산출하였다.

혈액학적 검사

부검전일 22시간 절식시킨 동물을 CO₂로 가볍게 마취시

킨 다음 복대정맥으로부터 전체혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA로 항응고 처리한 tube에 넣어 잘 보관한 다음 1시간 이내에 적혈구수(red blood cells, RBC), hematocrit치, 혈색소량(hemoglobin), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판(platelets), 망상적혈구수(reticulocytes), 백혈구수(white blood cells, WBC), 호중구(neutrophils), 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils), 림프구(lymphocytes) 및 단핵구(monocytes)의 백분율을 자동혈액측정기(Sysmax SE-9000, Japan)를 이용하여 측정하였다.

혈액생화학적 검사

부검전일 22시간 절식시킨 동물을 CO₂로 가볍게 마취시킨 다음 복대정맥으로부터 채혈한 후 혈액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리해서 얻은 혈청에 대하여 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), alkaline phosphatase(ALP), glucose(GLU), blood urea nitrogen(BUN), total cholesterol(TC), triglyceride(TG), total protein(TP) 및 creatinine(CRE)의 혈액생화학적 검사를 자동분석기(Hitachi-747, Hitachi Medical, Japan)를 사용하여 측정하였다.

부검 및 육안검사

시험기간 중 사망동물에 대해서는 발견 즉시 부검을 실시하여 육안검사를 하였으며, 시료물질 투여 후 28일째까지 생존한 동물은 CO₂로 마취시킨 후 방혈 치사시킨 다음 부검하여 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰한 후, 장기를 적출하고 절대중량을 측정한 다음 체중에 대한 상대중량을 계산하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0 P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석(one way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은

Tukey's test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 이루어졌다.

결과 및 고찰

사망률 및 일반증상

Pediococcus pentosaceus MD1을 4주간 경구 투여한 후 암수 흰쥐를 4주 동안 관찰한 결과 사망률은 Table 1에서와 같이 수컷은 2,000 mg/kg 투여군에서 14일째 1례가 사망하였으며, 암컷은 1,000 mg/kg 투여군에서 7일째 1례가 사망하였다. 본 실험결과에서 사망례가 용량 의존성이 없었고, 사망동물을 부검한 결과 암수 모두 폐에 이상물질로 추정되는 액체가 가득 차 있는 것으로 미루어 투여 도중 시험물질이 기도 내 역류에 의한 사망한 것으로 확인되었으며, 이는 사망의 원인이 시험물질에 의한 것이 아닌 투여실수에 의한 것으로 판단되었다. 또한 시험기간 동안 암수 흰쥐 모두 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 특이적인 임상증상은 관찰되지 않았다(Table 2).

체중변화, 사료섭취량 및 음수섭취량 변화

시험기간 동안 암수 모두 대조군과 저용량, 중간용량 및 고용량의 시험물질 투여군 모두에서 유의할 만한 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 3). 다만 고용량 시험물질을 투여한 2,000 mg/kg 투여군의 수컷 쥐의 경우 체중변화가 초기 146.64 g에서 투여 2일째 139.23 g으로 대조군 150.56 g보다 감소하였으나, 4일째부터는 대조군과 비슷하였으며 이러한 결과는 고용량 암컷 투여군에서도 동일하였다(data not shown). 사료섭취량의 경우 투여기간 동안 암수 모두 시험물질 투여군과 대조군 간에 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 4). 사료섭취량도 고용량 시료를 투여한 2,000 mg/kg 투여군의 수컷 쥐의 경우 투여 초기 14.49 g에서 투여 2일째 10.26 g으로 대조군 15.33 g보다 감소하였으나, 투여 3일째부터는 대조군과 비슷한 경향이 있었다(data not shown). 시험물질 고용량 투여군에서 투여 초기에 사료섭취량 감소

Table 1. Mortality of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal	Days after treatment						Final mortality	
			0	7	14	21	28	End		
Male	0	10	0/10 ²⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S ³⁾	0/10
	500	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	1,000	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	2,000	10	0/10	0/10	1/10	0/9	0/9	0/9	T.S	1/10
Female	0	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	500	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10
	1,000	10	0/10	1/10	0/9	0/9	0/9	0/9	T.S	1/10
	2,000	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S	0/10

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾Values are expressed as the numbers of dead animals/total numbers of animals.

³⁾T.S: terminal sacrifice.

Table 2. Clinical signs of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical Signs	Days after treatment				
			0	7	14	21	28
Male	0	NAD ²⁾	10	10	10	10	10
	500	NAD	10	10	10	10	10
	1,000	NAD	10	10	10	10	10
	2,000	NAD	10	10	10	9	9
Female	0	NAD	10	10	10	10	10
	500	NAD	10	10	10	10	10
	1,000	NAD	10	10	9	9	9
	2,000	NAD	10	10	10	10	10

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾NAD: no abnormalities detected.

Table 3. Body weight changes of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

(g)

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment				
		0	7	14	21	28
Male	0	146.56 ± 5.39 ^{2)NS3)}	195.10 ± 8.31	221.25 ± 7.26	251.08 ± 6.98	299.63 ± 10.98
	500	146.98 ± 7.23	193.29 ± 5.90	225.05 ± 6.13	253.48 ± 5.66	294.63 ± 11.02
	1,000	145.09 ± 5.87	196.10 ± 8.88	219.16 ± 6.98	248.58 ± 7.08	287.63 ± 7.92
	2,000	146.64 ± 9.23	192.99 ± 6.78	217.33 ± 4.56	249.95 ± 9.08	286.80 ± 6.99
Female	0	126.09 ± 6.89	146.19 ± 6.09	194.29 ± 7.08	223.08 ± 6.08	240.21 ± 11.32
	500	127.07 ± 5.05	142.10 ± 7.30	188.36 ± 6.58	224.14 ± 5.29	249.13 ± 7.98
	1,000	126.01 ± 6.03	144.73 ± 8.09	194.33 ± 4.90	220.38 ± 8.30	247.64 ± 8.80
	2,000	126.54 ± 7.08	139.23 ± 5.23	191.35 ± 9.01	225.75 ± 4.92	241.57 ± 10.98

¹⁾Rats were administered orally with sample a day for 28 days.

²⁾Values are expressed as means ± SE for nine to ten rats.

³⁾NS: not significantly different among groups.

Table 4. Daily food consumption of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

(g/day/rat)

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment			
		7	14	21	28
Male	0	19.32 ± 2.01 ^{2)NS3)}	22.48 ± 2.01	28.23 ± 3.01	30.21 ± 3.55
	500	19.09 ± 1.98	23.02 ± 1.09	27.95 ± 2.69	29.71 ± 2.65
	1,000	20.09 ± 1.09	21.99 ± 3.56	28.95 ± 4.02	31.23 ± 4.22
	2,000	19.43 ± 3.01	22.45 ± 3.00	27.21 ± 3.56	30.21 ± 2.09
Female	0	17.58 ± 3.11	19.20 ± 1.99	22.97 ± 2.69	25.75 ± 3.02
	500	16.09 ± 2.11	18.32 ± 3.01	21.64 ± 3.69	25.20 ± 4.28
	1,000	18.01 ± 1.09	19.48 ± 3.22	24.54 ± 2.05	23.01 ± 1.23
	2,000	17.22 ± 3.01	18.28 ± 2.99	22.60 ± 4.00	24.54 ± 5.01

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾Values are expressed as means ± SE for nine to ten rats.

³⁾NS: not significantly different among groups.

현상이 관찰되었는데 이는 고용량 시험물질 경구 투입에 의한 일시적인 사료섭취량 감소에 의한 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Lee 등(23)이 김치발효 유량 증균으로 알려진 *Leuconostoc citrum* GJ7 경구급성독성연구에서도 고용량 시험물질 투여 첫날 일시적 사료섭취량 감소현상을 보고한 결과와 유사한 경향이었다. 따라서 고용량 시험물질 투여 초기의 체중 감소현상은 사료섭취량 감소현상에 의하여 기인된 것으로 사료된다. 또한 암수 모두 시험물질 투여에 의한 수분섭취량에도 유의성 있는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다(Table 5).

혈액학적 및 생화학적 검사조건

혈액학적 및 생화학적 검사에 대한 측정 결과는 암수 모두 시험물질 투여군과 대조군 간에는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 6과 7). 혈액학적 및 생화학적 검사 결과 대조군과 시료투여군 모두 정상범위에 속하였으며, 용량 의존성은 보이지 않았다. 다만 혈액학적 검사결과 수컷 흰쥐의 경우 백혈구수와 림프구에 있어서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았지만, 용량 의존성으로 증가하는 경향을 보여 주었다. 이들 결과는 Kang 등(26)이 보고한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 이용한 4주 반복투여 독성시험에서의 혈

Table 5. Daily water consumption of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾ (mL/day/rat)

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment			
		7	14	21	28
Male	0	28.42±2.01 ^{2)NS3)}	26.78±3.26	26.33±2.14	27.23±2.14
	500	27.09±3.26	25.02±5.01	25.65±3.12	26.11±2.54
	1,000	26.23±5.01	29.78±2.18	27.26±4.95	27.31±2.15
	2,000	29.63±4.29	28.45±2.42	26.99±4.21	27.11±3.25
Female	0	22.58±3.19	21.20±2.10	22.01±2.15	23.03±2.63
	500	24.09±3.26	19.69±5.02	21.64±4.01	23.33±2.65
	1,000	25.23±2.85	21.51±3.95	23.08±1.98	23.36±1.25
	2,000	27.22±4.26	22.36±2.54	22.45±2.49	23.32±2.65

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾Values are expressed as means±SE for nine to ten rats.

³⁾NS: not significantly different among groups.

Table 6. Hematology of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	RBC (×10 ³ /μL)	9.31±3.12 ^{2)NS3)}	9.25±2.46	9.19±1.99	9.30±2.10
	Hemoglobin (g/dL)	14.35±1.29	14.12±0.92	14.80±1.09	14.51±1.01
	Hematocrit (%)	45.99±2.30	47.23±1.98	46.20±2.54	45.70±1.32
	MCV (fL)	60.29±3.01	59.08±2.46	62.13±3.08	61.11±3.01
	MCH (pg)	20.09±0.98	21.75±0.24	19.26±1.91	20.06±0.29
	MCHC (g/dL)	31.48±0.49	32.64±0.51	30.29±0.97	32.45±0.84
	Platelets (×10 ³ /μL)	894.26±112.32	901.91±120.87	887.79±139.40	906.23±151.24
	WBC (×10 ³ /μL)	8.06±2.09	8.12±2.21	9.34±1.46	10.62±3.24
	Reticulocytes (%)	1.84±0.91	1.82±0.52	1.86±0.42	1.90±0.70
	Neutropils (%)	6.53±1.96	6.69±2.78	6.77±1.52	6.81±2.42
	Eosinopils (%)	0.59±0.09	0.62±0.05	0.58±0.46	0.63±0.09
	Basophils (%)	0.04±0.02	0.03±0.01	0.04±0.03	0.02±0.02
	Lymphocytes (%)	88.03±3.69	92.50±9.06	93.54±7.87	97.59±8.46
	Monocytes (%)	0.49±0.05	0.51±0.04	0.52±0.06	0.50±0.08
Female	RBC (×10 ³ /μL)	6.97±2.21	7.16±3.07	7.03±2.44	6.99±1.87
	Hemoglobin (g/dL)	13.79±1.06	13.68±2.41	13.08±0.98	13.59±2.24
	Hematocrit (%)	42.45±3.01	44.04±4.12	43.21±1.71	42.18±1.85
	MCV (fL)	59.11±4.23	62.28±5.17	59.64±4.00	58.16±3.66
	MCH (pg)	19.43±1.01	19.92±1.47	20.26±2.80	19.87±2.35
	MCHC (g/dL)	30.26±2.11	29.13±1.52	30.71±1.94	31.73±2.54
	Platelets (×10 ³ /μL)	851.51±115.42	867.19±128.1	889.12±172.31	829.23±112.34
	WBC (×10 ³ /μL)	6.84±1.27	6.81±2.52	6.90±1.73	6.97±2.11
	Reticulocytes (%)	6.26±1.32	6.54±1.76	5.99±1.28	6.34±1.40
	Neutropils (%)	6.51±1.04	6.16±2.43	6.55±1.95	6.49±1.09
	Eosinopils (%)	0.49±0.05	0.51±0.04	0.52±0.02	0.48±0.01
	Basophils (%)	0.02±0.01	0.03±0.06	0.03±0.02	0.02±0.02
	Lymphocytes (%)	91.64±4.26	90.13±3.65	93.48±6.10	96.13±7.23
	Monocytes (%)	0.42±0.07	0.51±0.04	0.45±0.05	0.50±0.07

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾Values represent means±SE for nine to ten rats.

³⁾NS: not significantly different among groups.

액학적 기초 자료에서 보고한 범위와 유사하였다.

부검소견

실험동물을 부검 후 주요 장기의 육안적 소견을 관찰한 결과 Table 8에서와 같이 대조군과 시험물질 투여군에서 모든 개체는 장기의 유의성 있는 변화나 시험물질의 투여로 인한 용량 의존적인 특이할 만한 소견은 나타나지 않았다.

장기 중량

H. pylori 억제능을 지닌 유산균을 저용량, 중간용량, 고용량으로 암수 각각의 흰쥐에게 4주간 반복 투여 후 장기의 절대적 무게 및 상대적 무게비로 산출한 결과는 Table 9와 같다. 각 장기의 절대중량과 체중에 대한 상대중량을 측정된 결과, 투여 용량 의존적인 이상 변화는 관찰되지 않았다. 다만 비장의 경우 암수 모두 절대 및 상대중량이 시험물질 투여 수준이 증가할수록 증가하는 경향이었으나, 유의차는 없

Table 7. Levels of serum biochemical indices of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

Sex	Parameters	Dose (mg/kg)			
		0	500	1,000	2,000
Male	ALT (U/L)	35.21 ± 17.32 ^{2)NS3)}	39.23 ± 11.01	34.23 ± 12.74	38.11 ± 16.23
	AST (U/L)	158.85 ± 32.17	161.59 ± 42.31	164.08 ± 29.29	167.21 ± 26.27
	ALP (U/L)	115.20 ± 48.28	120.17 ± 50.56	131.14 ± 42.26	137.02 ± 31.21
	GLU (mg/dL)	94.01 ± 28.95	91.98 ± 46.23	101.84 ± 26.28	99.39 ± 28.23
	BUN (mg/dL)	11.42 ± 2.84	12.44 ± 3.24	11.90 ± 1.91	11.47 ± 3.20
	TC (mg/dL)	64.01 ± 9.18	63.21 ± 5.19	59.28 ± 9.32	64.23 ± 7.28
	TG (mg/dL)	84.21 ± 12.32	82.21 ± 10.87	89.08 ± 9.40	88.23 ± 11.24
	TP (g/dL)	6.14 ± 0.91	6.21 ± 0.52	6.31 ± 0.42	6.17 ± 0.70
	Albumin (mg/dL)	3.60 ± 0.96	3.22 ± 0.78	3.77 ± 0.52	3.81 ± 0.42
CRE (mg/dL)	0.59 ± 0.09	0.62 ± 0.05	0.58 ± 0.46	0.63 ± 0.09	
Female	ALT (U/L)	37.23 ± 11.21	39.21 ± 10.01	35.29 ± 9.23	38.23 ± 14.21
	AST (U/L)	152.29 ± 44.90	158.29 ± 35.08	155.87 ± 29.20	158.89 ± 28.08
	ALP (U/L)	109.21 ± 48.78	115.00 ± 34.56	117.21 ± 61.71	119.21 ± 28.85
	GLU (mg/dL)	94.11 ± 31.23	92.28 ± 41.53	90.21 ± 22.02	95.47 ± 19.60
	BUN (mg/dL)	10.90 ± 3.04	11.20 ± 1.87	11.47 ± 2.81	12.41 ± 3.85
	TC (mg/dL)	70.28 ± 7.11	70.13 ± 9.55	68.21 ± 5.94	59.23 ± 9.54
	TG (mg/dL)	86.26 ± 15.42	82.28 ± 18.1	89.12 ± 17.31	89.23 ± 12.34
	TP (g/dL)	5.92 ± 0.71	6.41 ± 0.52	6.10 ± 0.77	6.57 ± 0.41
	Albumin (mg/dL)	3.44 ± 0.32	3.64 ± 0.70	3.61 ± 0.28	3.54 ± 0.40
CRE (mg/dL)	0.51 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.55 ± 0.05	0.59 ± 0.02	

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾Values represent means ± SE for nine to ten rats.

³⁾NS: not significantly different among groups.

Table 8. Gross findings of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

Sex	Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
Thyroid gland	N.G.F. ²⁾	10 (100) ³⁾	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Brain	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Heart	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Liver	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Kidney	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Lung	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Spleen	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Adrenal gland	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Testes	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)				
Ovary	N.G.F.					10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)
Thymus	N.G.F.	10 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾N.G.F.: no gross finding.

³⁾Values are expressed as animal numbers (the percentage of animal numbers).

었다. 비장의 무게 증가는 생체 외 이물질을 반복 투여할 때 흔히 나타나는 소견으로, 비장무게의 증가는 오히려 면역 기능의 항진과 관련이 있는 것으로 추론하고 있다(27).

요 약

본 연구는 *H. pylori* 억제능을 지닌 김치 유래 유산균인 *Pediococcus pentosaceus* MD1을 가지고 케양 예방효과를 지닌 김치를 개발하기 위한 선행연구로서 독성평가 실험을 수행하고자 4주 반복 투여 독성시험을 실시하였다. 본 시험에서 설정한 최고 용량 투여군인 2,000 mg/kg에서도 일반증상관찰, 체중변화, 사료섭취량 및 물 섭취량을 측정된 결과,

모두에서 시험물질과 관련된 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 또한 혈액학적, 혈액생화학적 검사 및 장기의 육안적 관찰 및 장기 중량변화에서도 대조군과 유의성이 있는 차이를 보이는 항목이 없었으며, 모두 정상범위를 벗어나지 않아 시험물질에 기인하는 이상소견을 발견할 수 없었으므로, 최대 무해 용량은 2,000 mg/kg 이상일 것으로 추정되었다. 이상의 결과 4주 반복 투여 독성시험 결과 *H. pylori* 억제능을 지닌 유산균인 *Pediococcus pentosaceus* MD1은 저독성물질로 판정되었으며, 유산균이 기능성식품 소재로서의 안전성 확인을 통하여 소비자들에게 소화성 케양 예방효과를 지닌 안전하고 차별화된 경쟁력 있는 김치를 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 9. Absolute and relative organ weights of male and female rats treated orally with sample for 28 days¹⁾

Sex	Organs		Dose (mg/kg)			
			0	500	1,000	2,000
Male	Kidney L.	A.W. ²⁾	0.82±0.14 ^{4)NS3)}	0.85±0.45	0.79±0.37	0.81±0.49
		R.W. ³⁾	0.27±0.04	0.29±0.06	0.27±0.06	0.28±0.09
	R.	A.W.	0.83±0.14	0.84±0.15	0.81±0.10	0.82±0.24
		A.W.	0.28±0.03	0.29±0.02	0.28±0.04	0.29±0.01
	Heart	A.W.	0.86±0.09	0.95±0.13	0.82±0.19	0.86±0.17
		R.W.	0.29±0.04	0.32±0.03	0.29±0.02	0.30±0.02
	Spleen	A.W.	0.82±0.10	0.87±0.12	0.93±0.18	0.99±0.16
		R.W.	0.27±0.03	0.30±0.02	0.32±0.03	0.35±0.05
	Liver	A.W.	7.50±1.37	7.98±1.72	7.49±1.38	7.32±2.51
		R.W.	2.50±0.26	2.71±0.25	2.60±0.19	2.55±0.46
Female	Kidney L.	A.W.	0.64±0.13	0.62±0.16	0.64±0.22	0.61±0.09
		R.W.	0.27±0.03	0.25±0.02	0.26±0.06	0.25±0.01
	R.	A.W.	0.66±0.10	0.61±0.21	0.62±0.13	0.63±0.32
		R.W.	0.28±0.01	0.25±0.02	0.25±0.05	0.26±0.04
	Heart	A.W.	0.69±0.09	0.65±0.13	0.68±0.01	0.61±0.07
		R.W.	0.29±0.03	0.26±0.04	0.28±0.01	0.25±0.05
	Spleen	A.W.	0.81±0.03	0.81±0.02	0.85±0.05	0.86±0.04
		R.W.	0.31±0.02	0.33±0.02	0.34±0.02	0.36±0.02
	Liver	A.W.	6.01±0.64	5.99±0.62	6.21±1.02	6.14±0.50
		R.W.	2.50±0.26	2.40±0.28	2.51±0.36	2.54±0.23

¹⁾Rats were administered orally with sample once a day for 28 days.

²⁾A.W.: Absolute organ weight (g).

³⁾R.W.: Relative organ weights (%) were expressed as the percentage of organ weights to body weights.

⁴⁾Values are expressed as means±SE for nine to ten rats.

⁵⁾NS: not significantly different among groups.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 광주·전남김치산업육성사업(과제 번호: K950218010)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Warren JR, Marshall BM. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273-1275.
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Drentreich N, Sibley RK. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127-1131.
- Lee HS, Choe TB. 1997. Morphological conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid by environmental stress. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 240-247.
- Lee JJ, Kim SH, Chang BS, Lee JB, Huh CS, Kim TJ, Beak YJ. 1999. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Korean J Food Sci Technol* 31: 764-770.
- Mobely HL, Island MD, Hansinger RP. 1995. Molecular biology of microbial. *J Microbiol Rev* 59: 169-182.
- Kim BJ, Kang BH, Kim TH, Kim KW. 1997. Production and characterization of IgY specific to *Helicobacter pylori*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 612-616.
- Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. 1974. 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.
- Tabak M, Artmom R, Potasman I, Neeman I. 1996. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts infection. *J Appl Bacteriol* 80: 667-672.
- Cho YJ, Chu SS, Kim JH, Yoon SJ. 2005. Inhibition against and biological activity by rue extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 460-465.
- Kubo J, Lee JR, Kubo I. 1999. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Agric Food Chem* 47: 533-537.
- Yoon YS, Lee SH, Beak NI, Kim YH, Park CH. 2004. Inhibition of cell growth and urease activity of *Helicobacter pylori* by medicinal plant extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng* 19: 187-191.
- Park CE, Park CH. 2004. Inhibition of urease activity of *Helicobacter pylori* by *Artemisia asiatica* Nakai. *Korean J Biotechnol Bioeng* 19: 348-351.
- Kim SJ. 2005. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Food Culture* 20: 337-340.
- Jeong CH. 2001. Effects of fermented milk on *Helicobacter pylori* the infection in human stomach mucous. *J Korean Public Health Assoc* 27: 193-197.
- Gasser FE. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infection. *Bull Inst Pasteur* 92: 45-67.
- Park JG, Yun SY, Oh S, Shin JG, Baek YJ. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from Korean breast-fed infant. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1244-1247.
- Park HS, Lee SH, Uhm TB. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J*

- Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 433-440.
18. Paik HD, Jung MY, Jung HY, Kim WS, Kim KT. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J Food Sci Technol* 34: 73-78.
 19. Sim JH, Oh SJ, Kim SK, Baek YJ. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. *Korean J Food Sci Technol* 27: 101-104.
 20. Kim EA, Baick SC, Chung WH. 2002. A study on growth inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by lactic acid bacteria. *J Anim Sci Technol (Kor.)* 44: 491-498.
 21. Lee JJ, Lee YM, Chang HC, Lee MY. 2007. Acute toxicity of *Leuconostoc kimchii* GJ2, an exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from kimchi, in mice. *Korean J Life Sci* 17: 561-657.
 22. Lee JJ, Chang HC, Lee MY. 2007. Acute toxicity of *Leuconostoc citrum* GJ7 isolated from kimchi in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 534-539.
 23. Son JY. 2007. Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria harboring anti-*Helicobacter pylori* activity. *MS Thesis*. Chosun University.
 24. 식품의약품안전청. 1999. 국립독성연구소 독성·약리·병리 시험 표준작업지침서(I). 일반독성시험기준. p 179-226.
 25. Hayes AW. 1984. *Hayes Toxicology*. Raven press, New York. p 17-19.
 26. Kang BH, Kim YB, Lee HS, Kim YH, Im WJ, Ha CS. 2004. Background data on hematology, blood biochemistry and organ weights for 2 weeks and 4 weeks repeated-dose toxicity studies using Sprague-Dawley (SD) rats. *Korean J Lab Ani Sci* 20: 134-140.
 27. Lim DW, Kim DH, You DY. 1999. Effects of Kamiguibitang (KGT) on immunological control function. *J Orient Gynecol* 12: 253-280.

(2007년 5월 15일 접수; 2007년 6월 27일 채택)