

# 국산 아카시나무(*Robinia pseudoacacia*) 벌꿀로부터 분리한 Abscisic acid의 생리활성

김세건 · 홍인표 · 우순옥 · 장혜리 · 한상미\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

## Physiological Activities of Abscisic Acid Isolated from Honey of Black Locust (*Robinia pseudoacacia*) in Korea

SeGun Kim, InPyo Hong, SoonOk Woo, HyeRi Jang and SangMi Han\*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

(Received 11 February 2016; Revised 14 April 2016; Accepted 15 April 2016)

### Abstract

Pathogenic effects associated with *Helicobacter pylori* infection include peptic ulcer. Eradication of *H. pylori* by triple therapy often results in emerging resistance of *H. pylori*. Thus there is a need to seek alternative treatments. The aim of this study was to estimate abscisic acid (ABA) isolated from honey of Black Locust (*Robinia pseudoacacia*) in Korea. The anti-*H. pylori* activity of ABA was the minimum inhibitory concentrations (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and postantibiotic effect (PAE). The MIC and MBC of ABA were  $2.7 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$  and  $6.9 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ , respectively. The PAE of ABA was highest at  $32 \times \text{MIC}$  concentrations for 8.5 hr. We determined that ABA may be the potential lead phytochemical constituents with anti-*H. pylori* activity. The acacia honey in Korea could be useful chemopreventive agents for peptic ulcer in *H. pylori*-infected individuals

Key words: Black Locust honey, Abscisic acid, *Helicobacter pylori*, Antibacterial

### 서론

벌꿀은 예로부터 천연 감미료로 이용했을 뿐만 아니라 풍부한 영양학적 기능과 의약적 효능으로 한방과 민간요법으로도 사용되고 있다. 탄수화물이 주성분인 벌꿀은 과당 및 포도당을 포함한 당류(70~80%), 수분(18~20%), 단백질, 아미노산, 미네랄, 유기화합물 등으로 구성되어 있다(Chang *et al.*, 1988). 벌꿀은 밀원

에서 유래된 유기화합물에 따라 항균, 항산화, 프로바이오틱(prebiotic) 및 피부 보습 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Truchado *et al.*, 2009; Israili, 2014; Can *et al.*, 2015). 밀원에 따라 아카시아꿀, 밤꿀, 마누카꿀, 유채꿀, 메밀꿀 등으로 나뉘며 색, 향기, 맛 등이 각기 다르며, 이들 밀원의 토양 등 서식환경에 따라서도 다르게 나타난다(Kim and Lee, 1996). 지금까지 알려진 벌꿀의 유기화합물은 phenolic acids

\*Corresponding author. E-mail: sangmih@korea.kr

(caffeic acid, gallic acid, cinnamic acid, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid), flavonoids (isorhamnetin, kaempferol, quercetin, apigenin, luteolin, chrysin, pinobanskin, rutin)와 같은 페놀성 화합물들이 주로 알려져 있다(Gasić; *et al.*, 2014; Can *et al.*, 2015). 뉴질랜드 마누카꿀로부터 분리된 methylglyoxal, methyl syringate 등은 항균활성 물질로 가장 널리 알려진 성분이다(Kato *et al.*, 2012). 또한 벌꿀의 항산화 효능은 밤꿀의 quinoline alkaloids (kynurenic acid, -2-carboxylic acid) 성분, 세리비아의 잡화꿀과 크로아티아의 버드나무꿀에서 분리한 abscisic acid (ABA) 성분에서 기인한다고 보고하였다(Truchado *et al.*, 2009). 주로 토마토, 감자, 양배추와 같은 채소에서 확인되는 ABA는 식물호르몬으로서 식물의 대사과정 중 기공개폐의 조절, 개화, 구근의 발아억제, 측아의 성장저해 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2015). 그러나 아직까지 국내에서 생산되는 벌꿀에서 ABA에 대한 성분 분석에 대한 보고는 없었다. 또한 ABA는 체내에서 포도당 항상성(glucose homeostasis)을 조절하며(Ameri *et al.*, 2015), 인간 호중구(neutrophils)에서 superoxide anion의 발생과 elastase의 활성을 저해시켜 항염효과를 나타낸다고도 알려져 있다(Leu *et al.*, 2012).

최근, 국내에서도 벌꿀의 생리활성과 함께 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 국내 소비자 기호에 가장 적합한 향과 맛을 갖고 있는 아카시아벌꿀의 항균력을 검정하고자 하였다. 본 연구진에서는 아카시아꿀이 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과를 갖고 있는 것으로 확인하였으며, 아카시아꿀에서 ABA 성분을 분리하고 동정한 바 있다(Kim *et al.*, 2015). 그람음성균인 *H. pylori*는 위궤양 환자의 위장관벽에서 처음 발견된 이후 만성위염, 위궤양 및 위암의 원인균으로 밝혀졌으며, 항생제를 이용하여 균을 제거하면 궤양 증세도 치유되는 것으로 보고되어 있다(Goodwin & Armstron 1990; Torres *et al.*, 2000; Kusters *et al.*, 2006). 따라서 *H. pylori*에 대한 예방 및 치료의 중요성이 매우 크다고 할 수 있으나, 기존 항생제에 대한 내성균의 출현, 어린아이들에서의 감염에 대한 적용의 어려움 등 항생제를 이용한 치료가

부적절하다는 문제가 야기되고 있다(Romano *et al.*, 2008). 이러한 문제를 극복하기 위하여 우수한 항균활성을 갖는 천연물을 중심으로 *H. pylori*에 대한 항균활성을 갖는 성분을 탐색하고자 하는 연구가 활발하다.

본 연구에서는 *H. pylori*에 감수성이 있는 것으로 확인된 아카시아꿀로부터 분리한 ABA의 *H. pylori*에 대한 항균력을 검정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시시료

시험에 사용한 시료는 Fig. 1과 같이 2014년 채밀한 아카시아벌꿀로부터 *H. pylori*에 대해 항균력이 가장 강한 분획을 얻어 ABA를 분리 정제하여 시험에 사용하였다. 국내산 아카시아꿀 15kg에 ethyl acetate를 넣고 교반기를 사용하여 30분간 3회 반복 추출한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거하고 ethyl acetate 추출물 13g을 수득하였다. 얻어진 추출물 13g을 ODS로 충전된 컬럼(5×60cm)에 넣고 전개용매를 20% methanol에서 100% methanol의 기울기 조건으로 용출시킨 후 TLC를 실시하여 화합물의 극성이 유사한 8개의 소분획(AHF1~8)을 얻었다. 이 중 AHF5 분획을 silica gel이 충전된 컬럼(1.5×50cm)에 methylene chloride:methanol:water=90:15:10(하층)를 이동상으로 하여 화합물 1(16.8mg)을 분리하였다(Kim *et al.*, 2015). 분리한 화합물 1의 순도 확인을 위해 UPLC를 실시한

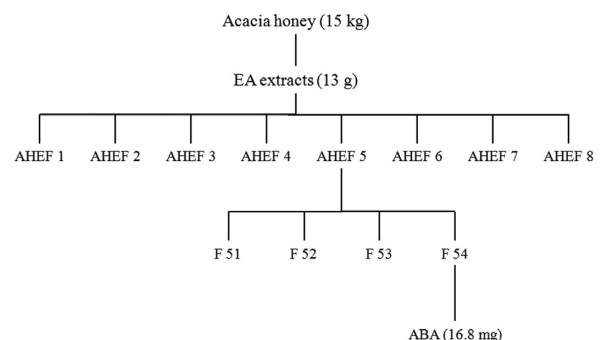


Fig. 1. Fractionations of acacia honey.

결과 단일 peak를 보였으며, 단일물질인지 확인해 보기 위해 LC-ESI-mass spectrum을 통해 분자량을 측정하였으며, 순수한 단일물질로 분리되었음을 확인할 수 있었다(Kim *et al.*, 2015).

### H. pylori 배양

위 및 십이지장 궤양 원인균인 *H. pylori*(ATCC 43526) 한국미생물보존센터(KCCM, 서울)로부터 구입하여 사용하였다. 균의 배양은 5% horse serum(MB cell, 서울)을 첨가한 Trypticase soy broth(TSB, BD, Franklin Lakes NJ, 미국) 배지를 사용하여 미호기 조건을 유지하기 위하여 Anaerobe Container System(BD)를 넣은 chamber에서 37°C 조건으로 배양하였다.

### Non-peroxide 반응

벌꿀의 항균작용은 삼투(Osmotic effect), 강산(Acidity), 그리고 과산화수소(Hydrogen peroxide)에 기인하는 것으로 알려져 있다(Molan, 1992). 그러나 벌꿀을 이용하여 식의약소재로 사용하게 될 경우엔 당에 의한 삼투효과 및 산에 의한 항균력은 벌꿀의 희석에 의해 기대하기 어렵다. 벌꿀의 희석 후에도 항균력을 유지할 수 있는 방법은 벌꿀 내 존재하는 항균성분 또는 과산화수소 반응에 의한 것이다. 따라서 본 연구에서는 아카시아벌꿀의 항 *H. pylori* 효과가 벌꿀 내 존재하는 항균성분인지 과산화수소반응에 의한 것인지를 알아보기 위하여 non-peroxide 반응 후 항균력을 측정하였다. Non-peroxide 반응은 catalase(Sigma-Aldrich, MO, 미국)를 이용하였다. Catalase 반응액은 5600U/ml 조제한 후 최종 농도가 25%(w/v)가 되도록 아카시아 꿀에 첨가하였다(Molan, 1992).

### 항균 활성 분석

아카시아꿀 용매분획 추출물에 대한 *H. pylori* 항균력 검정은 디스크 확산법을 이용하였다(Spooner & Sykes 1972; National Committee for Clinical Laboratory Standards 1992). 시험 하루 전에 *H. pylori*를 전 배양한 후  $1 \times 10^7$  cells/mL의 농도로 조정 하여 TSA(BD)배지

에 100 $\mu$ L를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한다. 멸균된 paper disc(8mm, Advantec, 일본)에 프로폴리스 시료 30 $\mu$ L(1 $\mu$ g/ml stock in 20% DMSO)를 흡수시킨 후 용매가 모두 휘발 된 다음에 도말한 배지 위에 올린다. Anaerobe Container System을 넣은 chamber서 37°C 조건으로 16시간 배양한 다음 디스크 주위의 생육 저지 환(clear zone) 크기를 측정한다.

### 최소성장억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

액체배지 희석법을 사용하여 *H. pylori*에 대한 최저 성장억제농도를 구하였다. 아카시아꿀과 ABA시료는 멸균 증류수로 희석한 후 무균 여과하여 액체배지 희석법에 준하여 단계적으로 희석하였다(Wu and Hancock, 1999). 각각의 시험균주를 액체배지에서 전 배양한 후 접종 균의  $2 \times 10^6$  CFU/well이 되도록 조절하여 ABA 시료와 함께 18시간 동안 배양한 후, 육안 및 현미경으로 균의 성장을 관찰하였고, 흡수파장 540nm에서 흡광도 (Molecular device spectramax M2e, 캐나다)를 측정하여 순수배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도로 결정하였다.

### 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ABA 시료를 시험균주에서 사용하는 액체배지로 희석한 후 액체배지희석법에 따라 단계적으로 희석한 후  $2 \times 10^6$  CFU/well이 되도록 조절한 *H. pylori* 균주에 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 각각의 배양액 100 $\mu$ l를 새로운 배지에 접종하여 24시간 동안 배양한 다음 흡광도 (540nm)를 측정하여 증식이 일어나지 않은 농도를 최소살균농도로 나타내었다(Holla *et al.*, 2012).

### 항균력 지속 시간(Postantibiotic effect, PAE) 측정

시험균주에 대한 ABA의 살균력 지속시간을 측정하기 위하여  $1 \times 10^8$  CFU/ml로 조절된 균주에 1, 2, 4, 8, 16 그리고  $32 \times$  MIC값 농도로 각각 ABA와 함께 1시

간 동안 배양한 후 원심분리와 배지 희석법을 사용하여 ABA 성분을 제거하였다(Lowdin *et al.*, 1993) 이후 새로운 배지로 교환하여 배양기에서 배양하며 2시간 간격으로 균수를 측정하였다. 이때 PAE 수치가 클수록 항균 지속 효과가 우수하다고 할 수 있으며, PAE를 구하는 식은 아래와 같다.

$$PAE=T-C$$

T: ABA를 처리한 시험구에서 1 log<sub>10</sub>까지의 생육에 걸리는 시간

C: 무처리구에서 1 log<sub>10</sub>까지의 생육에 걸리는 시간

## 결과 및 고찰

### *H. pylori*에 대한 ABA의 항균효과

*H. pylori*와 같은 병원성 세균에 의한 질병 치료에 있어 항생제의 오남용으로 인한 내성균주 출현은 의약적으로 매우 큰 문제를 야기한다. 이러한 문제를 줄일 수 있는 방안으로 기존항생제를 대체할 수 있는 천

연항생제 개발에 대한 요구가 증가하고 있다(Kusters *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2008). 천연물질인 벌꿀, 프로폴리스, 봉독 등과 같은 양봉산물은 비 항생제로 병원성 세균 감염 예방과 치료제로 접근이 시도되고 있다. 벌꿀은 의료용 소재로서 뉴질랜드, 남미, 유럽국가에서 사용되고 있으며, 다양한 밀원으로부터 채집되는 벌꿀은 밀원과 지역 등 조건에 따라 성분이 달라짐에 따라 항균효과에 차이를 보이는 것으로 알려져 있다(Kato *et al.*, 2012; Gasić *et al.*, 2014; Can *et al.*, 2015). 그러나 국내에서 채집되는 벌꿀에 대한 성분 연구는 미흡한 실정이다. 최근 국내 양봉농가에서 채집한 아카시아꿀이 *H. pylori*에 대해 항균력을 갖고 있는 것으로 확인되었으며 밀원에서 유래된 것으로 예측되는 ABA 성분을 분리 동정하였다(Kim *et al.*, 2015).

본 연구에서는 국내에서 생산되는 아카시아꿀에 대한 *H. pylori* 항균활성을 측정하여 천연항생제 소재로서의 사용 가능성을 검토하였다. Table 1에서 아카시아꿀과 non-peroxide 아카시아꿀 그리고 용매 분획

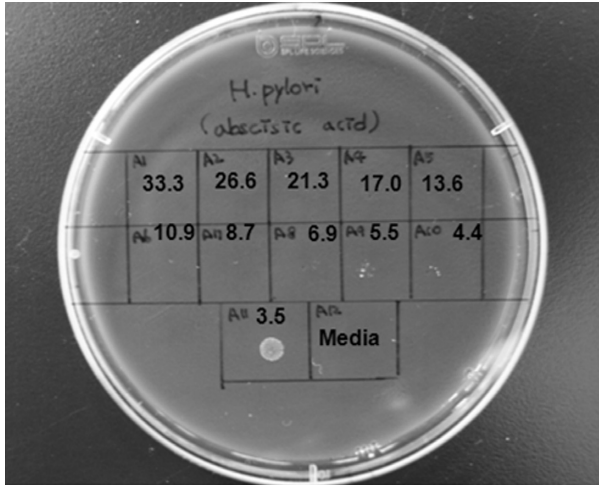
**Table 1.** Zone diameter of inhibition of the various solvent extracts and fractions of acacia honey against *Helicobacter pylori*

Test samples	Diameter of zones of inhibition (mm) <sup>a</sup>	
	Concentration of test samples (% v/v)	
	10	20
Crude acacia honey	- <sup>b</sup>	9.2±5.8
Non-peroxide honey	-	8.8±0.9
Hexane extracts	-	-
Dichloromethane extracts	-	9.1±5.5
EA extracts	8.5±3.1	12.6±8.0
Acetone extracts	-	-
Butanol extracts	-	-
AHEF 1	-	12.9±7.8
AHEF 2	9.1±0.6	13.2±6.7
AHEF 3	10.5±3.6	13.7±9.1
AHEF 4	12.5±6.3	15.1±6.5
AHEF 5	16.0±5.7	20<
AHEF 6	10.5±4.9	16.0±6.5
AHEF 7	-	8.8±2.8
AHEF 8	-	-
F 51	11.3±4.8	14.4±7.1
F 52	12.3±6.5	15.1±6.7
F 53	13.5±2.3	15.5±6.5
F 54	20<	20<

<sup>a</sup>Mean of triplicate assay ± standard deviation; <sup>b</sup>Zone diameter ≤ 8mm.

**Table 2.** MIC and MBC values of ABA isolated acacia honey against *Helicobacter pylori*

	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
ABA	2.7 ± 1.3	6.9 ± 1.9
Amoxicillin	10.9 ± 5.5	39 ± 7.5



**Fig. 2.** MIC of ABA against *Helicobacter pylori*.

물의 *H. pylori* 항균활성을 측정하였다. 아카시아꿀은 물론 non-peroxide 아카시아꿀에서도 *H. pylori*에 대한 항균력을 갖고 있어 당류에 의한 항균작용 뿐만 아니라 항균력에 관여하는 성분이 존재하는 것으로 추정할 수 있었다. 비극성에서 극성 용매 순으로 아카시아 꿀을 추출하여 *H. pylori*에 대한 항균력을 측정하고 에틸아세테이트 추출물에서 가장 효과적이었다 (Table 1). 에틸아세테이트 추출물을 8개의 분획으로 나누어 항균력을 측정하고 그 중에서 가장 높은 항균력을 보인 AHEF 5 분획물을 다시 4개의 분획으로 나누어 4번째 분획인 F 54에서 10%의 농도에서 저지환이 20mm 이상으로 확인되었다. ABA는 가장 높은 항균력을 보인 F 54로부터 분리 정제되었다.

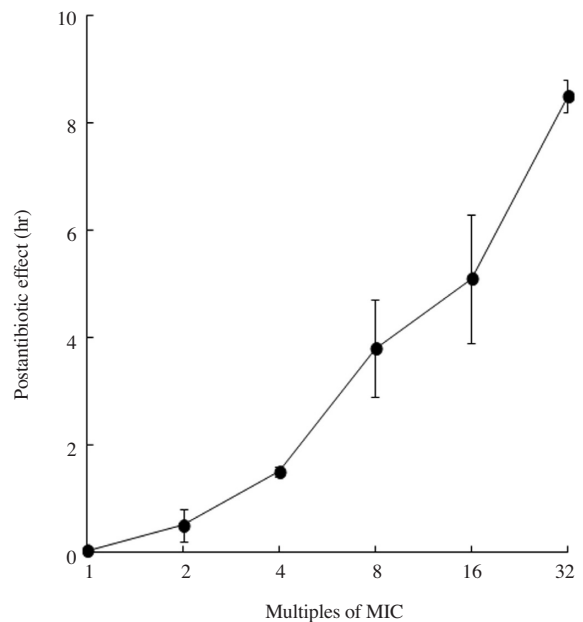
**ABA의 *H. pylori*에 대한 최소성장억제농도 및 최소 살균농도**

ABA의 최소성장억제농도는 흡광도를 이용하여 측정하였으며, 최소살균농도는 고체배지에 배양하여 균이 자라지 않는 최저농도로 하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 ABA의 최소성장억제농

도는 2.7 ± 1.3 µg/ml로 양성대조구로 사용한 amoxicillin 보다 *H. pylori*에 대해 낮은 농도에서도 균의 성장을 억제하는 것으로 확인되었다. 최소살균농도 역시 6.9 ± 1.9 µg/ml 농도 이하에서도 *H. pylori* 균을 사멸시키는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과들로 미루어 국내에서 채집되는 아카시아꿀 성분 중에 하나인 ABA는 *H. pylori*에 대한 항균효과에 관여하는 성분으로 사료되었다.

**ABA의 항균력 지속시간**

*H. pylori*균에 대한 ABA의 항균력 지속시간(PAE)을 측정하였다. ABA 제거 후 2시간 간격으로 균수를 측정하고 Fig. 2와 같이 *H. pylori*균에 대해 우수한 항균력 지속 활성을 가지는 것으로 확인 할 수 있었다. PAE 수치가 클수록 항균력 지속 효과가 우수한 것으로 8 × MIC ABA 농도로 처리했을 경우 3.8 시간, 32 × MIC에서는 8.5시간으로 우수한 항균력 지속시간을



**Fig. 3.** Postantibiotic effect of ABA on *Helicobacter pylori*.

갖고 있었다.

이처럼 만성위염, 위궤양 및 위암의 원인균인 *H. pylori*균에 대해 강한 항균력과 항균력 지속시간이 길은 ABA는 천연물질로서 기존의 화학제를 대체 할 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다. 무엇보다도 벌꿀은 비타민과 무기물이 풍부한 천연감미료로서 다양한 식품 소재로 사용할 경우 만성위염이나 위궤양의 효과적인 예방 및 치료효과를 나타낼 것으로 사료된다. 앞으로 국내에서 생산되는 아카시아벌꿀에 대한 다양한 효능 구명과 함께 생리활성을 갖는 성분들에 대한 연구가 더 많이 이루어져야 할 것이다.

## 적 요

국내에서 채밀한 아카시아꿀의 밀원으로부터 유래된 ABA 성분을 분리 동정하여 만성위염과 위궤양 등의 원인균으로 알려진 *H. pylori*균에 대한 항균효과를 측정하였다. 항균력은 최소성장억제농도와 최소살균농도 그리고 항균력 지속시간으로 측정하였다. ABA의 최소성장억제농도는  $2.7 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ , 최소살균농도는  $6.9 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ 로 강한 항균력을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 항균력 지속시간에 있어서도  $8 \times \text{MIC}$  ABA 농도로 처리했을 경우 3.8 시간,  $32 \times \text{MIC}$ 에서는 8.5시간으로 우수한 항균력 지속시간을 갖고 있었다. 국내에서 최초로 확인된 아카시아나무 꿀에서 식물로부터 유래된 물질 ABA는 *H. pylori*균에 강한 항균력 뿐만 항균력 지속시간이 우수한 성분으로 확인되었다. 따라서, 향후 아카시아나무 꿀의 품질관리 및 지표 물질로 ABA 성분의 활용이 가능하며, 위궤양 및 위염 예방에 효과적인 다양한 식품 소재로 아카시아꿀이 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 공동연구 국책기술개발사업(과제번호: PJ01083701)의 지원에 의해 수행된 결과입니다.

## 인 용 문 헌

- Ameri, P., S. Bruzzone, E. Mannino, G. Sociali, G. Andraghetti, A. Salis, M.L. Ponta, L. Briatore, G.F. Adami, A. Ferraiolo, P.L. Venturini, D. Maggi, R. Cordera, G. Murialdo and E. Zocchi. 2015. Impaired increase of plasma abscisic Acid in response to oral glucose load in type 2 diabetes and in gestational diabetes. PLoS One 10: e0115992.
- Can, Z., O. Yildiz, H. Sahin, E.A. Turumtay, S. Silici and S. Kolayli. 2015. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. Food Chem. 180: 133-141.
- Chang, H.G., M.K. Han and J.G. Kim. 1988. The Chemical Composition of Korean Honey. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 631-636.
- Dong, T., Y. Park and I. Hwang. 2015. Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. Essays Biochem. 58: 29-48.
- Gasić, U., S. Kečkeš, D. Dabić, J. Trifković, D. Milojković-Opsenica, M. Natić and Z. Tešić. 2014. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. Food Chem. 145: 599-607.
- Goodwin, C.S. and J.A. Armstrong. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (Campylobacter pylori). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 1-13.
- Holla, G., R. Yeluri, and A.K. Munshi. 2012. Evaluation of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of nano-silver base inorganic anti-microbial agent (Novaron®) against streptococcus mutans. Contemp. Clin. Dent. 3: 288-293.
- Israilli, Z.H. 2014. Antimicrobial properties of honey. Am. J. Ther. 21: 304-323.
- Kato, Y., N. Umeda, A. Maeda, D. Matsumoto, N. Kitamoto and H. Kikuzaki. 2012. Identification of a novel glycoside, leptosin, as a chemical marker of manuka honey. J. Agric. Food Chem. 60: 3418-3423.
- Kim, E.S. and C.O. Lee. 1996. Comparison of Quality Attributes of Korean Native-Bee Honey and Foreign-Bee Honey by K/Na Ratio. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 672-679.
- Kim, S.G., I.P. Hong, S.O. Woo, H.J. Jung, H.R. Jang and S.M. Han. 2015. Isolation of Abscisic Acid from Honey of Black Locust (*Robinia pseudoacacia*) in Korea. J. Api. 30: 287-292.
- Kusters, J.G., A.H. van Vliet and E.J. Kuipers. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin. Microbiol. Rev. 19: 449-490.
- Lee, J.H. 2014. ABA Signal Transduction Pathway in Plants: ABA Transport, Perception, Signaling and Post-Translational Modification. Journal of Life Science 24: 196-208.
- Leu, Y.L., T.L. Hwang, P.C. Kuo, K.P. Liou, B.S. Huang and

- G.F. Chen. 2012. Constituents from *Vigna vexillata* and their anti-inflammatory activity. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 9754-9768.
- Löwdin, E., I. Odenholt-Tornqvist, S. Bengtsson and O. Cars. 1993. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2200-2205.
- Molan, P.C. 1992. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5-28.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Tentative Guideline M26-T*. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Romano, M, M. R. Iovene, M.I. Russo, R. Salerno, D. Cozzolino, A.P. Pilloni, M.A. Tufano, D. Vaira and G. Nardone. 2008. Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J. Clin. Pathol.* 61: 1112-1115.
- Spooner, F.D. and G. Sykes. 1972. Laboratory assessment of antibacterial activity. In Norris JR, Ribbons DW. *Methods in Microbiology*, vol 7B. Academic Press, London, UK. p 52-150.
- Torres, J.I., G. Pérez-Pérez, K.J. Goodman, J.C. Atherton, B.D. Gold, P.R. Harris, A.M. la Garza, J. Guarner and O. Muñoz. 2000. A comprehensive review of *Helicobacter pylori* the natural history of infection in children. *Arch. Med. Res.* 31: 431-469.
- Truchado, P., I. Martos, L. Bortolotti, A.G. Sabatini, F. Ferreres and F.A. Tomas-Barberan. 2009. Use of quinoline alkaloids as markers of the floral origin of chestnut honey. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5680-5686.
- Wu, M. and R.E. Hancock. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 274: 29-35.