

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)로부터 *Helicobacter pylori* Urease Inhibitor의 분리 및 특성

양성우 · 호진녕 · 이유현 · 신동훈 · 홍범식 · 조홍연[†]

고려대학교 생명공학원

Isolation and Characterization of *Helicobacter pylori* Urease Inhibitor from *Rubus coreanus* Miquel

Sung Woo Yang, Jin Nyoung Ho, Yoo Hyun Lee, Dong Hoon Shin,
Bum Shik Hong and Hong Yon Cho[†]

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

A *Helicobacter pylori* urease inhibitor from *Rubus coreanus* Miquel has been isolated and partially characterized for aiming to prevent *H. pylori* growth and decrease harmful accumulation of ammonia in human gastric mucosa. We screened urease inhibitory activities in 519 extracts library prepared by solvent extraction from 173 kinds of edible plants, medicinal herbs, herbs and seaweeds using a colorimetric urease assay system. As results of primary and secondary screening, 70% acetone extract of *Rubus coreanus* Miquel was selected as potent candidate, showing about 24% inhibitory activity. The acetone extract was sequentially partitioned into RCE/RCW1 and RCB/RCW2 layers with ethyl acetate and butanol. The major active component in RCW2, water layer from butanol fractionation was revealed to be peptidic or proteinous substance by inhibitory activity determination after pronase digestion and periodate oxidation. RCW2-IIIc α was isolated by sequential column chromatography on DEAE-Toyopearl 650C, Butyl-Toyopearl 650M and Sephadex LH-20. The isolated urease inhibitor, RCW2-IIIc α , was highly pure proteinous substance with molecular weight of 13 kDa by high-performance gel permeation liquid chromatography. RCW2-IIIc α has about 5 times higher inhibitory activity than 70% acetone extract, showing high stability against heat treatment and peptic digestion.

Key words: *Helicobacter pylori*, *Rubus coreanus* Miquel, urease inhibitor

서 론

*Helicobacter pylori*는 위염 및 위궤양 환자의 위점막 생검조직으로부터 발견된 이래(1) 이들 병인의 일차적 인자로서 주목을 받고 있다. 이 균은 그람음성, 미호기성으로 강한 운동성을 갖고 있으며 위 점막과 점액의 강한 산성환경에서 서식하면서도 생육최적 pH는 7.0 내외에 위치하고 있다(2). 이러한 생태학적 특성은 *H. pylori* urease(urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5)에 의해 생성된 암모니아가 위점막의 서식처를 중화시키기 때문에 밝혀져 있으며(3,4), *H. pylori*는 균체의 생산 단백질 중 약 6%를 차지할 정도로 urease 생성능이 매우 강할 뿐만 아니라 이 균의 urease는 기질인 요소에 대한 친화도가 다른 세균이나 식물의 urease보다 20배 이상 높다(5,6). *H. pylori* urease는 1차적으로 인체 위점막의 혈장 삼출액이나 조직액내에 있는 요소를 분해하며, 위점막에 암모니아를 축적함으로써 직접 또는 간접적으로 위점막의 손

상을 초래하여 위염이나 위궤양을 유발시키는 것으로 알려져 있다(7,8). 현재까지 이 세균을 제거하기 위한 방법들이 amoxicillin 등의 항생물질들(9-11), omeprazole 등의 proton pump inhibitors(12-14), acetohydroxamic acid 등의 urease 저해제들(15-19) 및 백신(20) 등을 중심으로 단독으로 처리하거나 2종 이상의 물질을 군별 또는 군간으로 복합처리하는 요법들이 시도되고 있지만(21-24), 약제 내성균의 출현과 함께 세균율은 85% 내외를 나타내고 있고 제균제 복용자의 50% 정도가 변비, 발진, 역류성 식도염 등의 부작용을 보이는 것으로 보고되어 있다(25-28).

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과에 속하는 낙엽 관목으로 높이가 3 m에 이르고 줄기에 흰가루가 덮여 있는 것이 특징이다. 열매는 동글고 7~8월에 적색으로 익지만 수확시에는 흑색으로 변하며, 산기슭 양지바른 곳에 자생하고 지리적으로는 우리나라의 전역, 일본, 중국에 분포한다. 보간신(補肝腎), 명목(明目), 이뇨제의 효능이 있고 강장, 수렴, 빈

[†]Corresponding author. E-mail: hych@korea.ac.kr
Phone: 82-2-923-8731, Fax: 82-2-3290-3429

뇨를 치료한다고 알려져 있으며 그 사용법으로는 미성숙과를 물에 넣고 달여서 복용하거나 술에 담가 복용해 오고 있다(29). 복분자의 성분에 관한 연구는 잎의 phenolic 화합물로 4종의 가수분해성 탄닌과 4종의 플라보노이드를 분리, 동정하였으며(30), 열매의 탄닌 화합물로 가수분해성 탄닌인 sanguiin H-4와 H-6를 동정하였고(31), terpenoids 성분에 관한 연구(32) 등이 이루어져 있다. 복분자의 생리활성에 관한 연구로는 열매 polyphenol의 superoxide anion radical 소거작용과 xanthine oxidase 억제작용(33), 항암활성(34), 항균활성(35), 항산화활성(36) 등이 보고되고 있다.

본 연구에서는 *H. pylori*의 위내 생존에 있어 필수적인 urease의 inhibitor를 개발함으로써 균의 생육을 억제시키고 urease에 의한 암모니아성 질환을 예방할 수 있는 천연urease inhibitor를 소재화시키기 위해 173종의 식용생물자원에서부터 추출한 519점의 추출물을 대상으로 urease 저해활성을 검색하였다. 그 결과 복분자를 최종 시료로 선정하고, 기능성식품 또는 의약품 중간원료의 용도개발을 위한 기초연구의 일환으로 복분자의 acetone 추출물로부터 저해물질을 분리한 후 용도 개발을 위한 저해물질의 일부 성질을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 양념채소류를 비롯한 식용식물, 약용식물, 향신료, 해조류 등의 시료는 생산지, 계절 및 성숙도를 확인한 후 구입하였으며, 선정시료인 복분자는 전라남도산으로 건조한 완숙 복분자를 경동시장 소재 J한약상에서 구입하였다. 이들 시료는 식품으로 상용해 온 시료를 edible plants로, 생약재로 이용되고 있는 시료를 medicinal herbs로, 서양 향시료를 herbs로 구분, 분류하였다. Urease 저해물질의 정제에 사용한 수지 중 DEAE-Toypearl 650C, Butyl-Toypearl 650M은 Tosoh사(Tokyo, Japan)제품을, Sephadex LH-20은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 HPLC column인 Waters Protein-Pak 60SW는 Waters사(Milford, MA, USA)제품을 각각 사용하였다.

사용 균주 및 배지

Urease 생산에 사용한 균주는 *Helicobacter pylori*의 urease cluster gene이 cloning 된 pTZ 19R plasmid를 형질전환시킨 *E. coli* BL21(37)를, 배지는 최종농도 2 μM NiCl_2 가 첨가된 LB배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였다.

Urease의 조제

상기의 *E. coli* BL21을 LB배지 100 mL이 들어있는 500 mL baffle 삼각플라스크를 사용하여 37°C, 240 rpm에서 회전진탕배양하였으며, 생육도(A_{600}) 0.5~0.6에서 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 4시간 동안 배양하고 상법에 따라 회수하여 제

척한 균체를 1 mM EDTA, 0.01% 2-mercaptoethanol이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁시켰다. 현탁균체를 Ultrasonic Processor(Sonics & Materials Inc., Model: VC130, CT, USA)로 amplitude 40%, pulse 5초, elapsed time 5초의 조건에서 10분 처리한 다음 14,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 사용 전까지 -70°C에서 보관하면서 *H. pylori* urease 저해활성성분 검색용 조효소액으로 사용하였다.

시료 추출물 조제

시료 추출물의 조제는 구입한 시료를 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 동결건조한 시료에 적당량의 증류수를 넣고 5,000 rpm에서 5분, 6,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer(IKA Labortechnik Co., Ultra-Turex T50, Germany)로 파쇄한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출물(Fr. 1)로 하였다. 침전물은 동결건조하여 수분을 완전히 제거한 다음 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, 열수 순으로 2시간 동안 환류추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 hexane추출물(Fr. 2), acetone추출물(Fr. 3), methanol추출물(Fr. 4), 열수추출물(Fr. 5)을 조제하였다.

Urease 저해 활성성분 검색용 assay 계

Urease 저해활성은 urea로부터 방출된 암모니아가 phenol/nitroprusside와 alkaline hypochlorite에 의해 indophenol로 전환되는 양을 정량하는 assay계를 변형하여 다음과 같이 측정하였다(38). 0.5 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 10 μL , 시료 추출물(1 mg/mL) 10 μL 와 조효소액 20 μL 를 37°C에서 5분 preincubation시킨 후 0.5 mM urea solution 40 μL 를 가하여 37°C에서 20분간 incubation한 다음 phenol/nitroprusside reagent(5 mg sodium nitroprusside와 1 mL phenol을 물 100 mL에 용해시킨 시약) 1 mL와 alkaline hypochlorite(0.5 g sodium hydroxide와 0.5 mL sodium hypochlorite을 물 100 mL에 용해시킨 시약) 1 mL을 가하여 동일 온도에서 30분간 반응시켜 A_{590} 에서 흡광도를 측정하고 식에 따라 % 저해활성으로 환산하였다.

Urease 1 unit(U)는 37°C에서 분당 1 μmol urea를 가수분해시키는데 요구되는 효소의 양으로 정의하였다.

Inhibitory activity of *H. pylori* urease (%) =

$$[1 - (As - As') / (Ac - Ac')] \times 100$$

As : 시료 추출물을 첨가한 표준반응계의 흡광도

As' : 상기 표준반응계(As)의 조효소액을 열변성 효소로 대체한 반응계의 흡광도

Ac : 시료 추출물을 첨가하지 않은 표준반응계의 흡광도

Ac' : 상기 표준반응계(Ac)의 조효소액을 열변성 효소로 대체한 반응계의 흡광도

Pronase 처리물 및 periodate 산화물의 조제

활성획분(RCW2) 20 mg을 10 mM CaCl_2 가 함유된 50 mM

Tris-HCl buffer(pH 7.5) 50 mL에 용해시킨 후 2 mg의 pronase를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응정지를 위해 5분간 가열한 후 원심분리하여 침전을 제거한 다음 상등액을 투석, 동결건조하여 pronase 소화물을 조제하였다.

RCW2 20 mg을 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 50 mL에 녹인 후 50 mM sodium metaperiodate를 가한 혼합물을 4°C 암소에서 3일간 교반, 방치한 다음 잔여 periodate를 제거하기 위해 반응액에 ethylene glycol 5 mL을 첨가한 후 투석하고, 비투석 획분을 약 10 mL까지 농축하였다. 이 농축액에 NaBH₄ 20 mg을 가하여 실온에서 12시간 교반하여 환원시킨 후 중화, 투석하고 비투석 획분을 동결건조하여 periodate 산화물을 조제하였다.

저해활성물질의 분리

건조 복분자 3 kg을 10배 부피의 70% acetone으로 저온에서 2주 동안 3회 추출한 후 감압 농축하여 얻은 추출물(RC)을 상법에 따라 ethyl acetate와 butanol을 사용하여 ethyl acetate/DW layer(RCE/RCW1)와 butanol/DW layer(RCB/RCW2)로 순차 분획하였다. 활성이 가장 높은 RCW2 획분으로부터 DEAE-Toyoparl 650C ion exchange column chromatography, Butyl-Toyoparl 650M hydrophobic column chromatography 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 사용하여 저해활성물질을 분리하였다.

분리 물질의 순도결정 및 분자량 측정

분리물질의 순도결정과 분자량 측정은 Waters Protein-Pak 60SW(7.8×300 mm) column과 50% methanol을 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 HPLC(Young-Lin M 680, Seoul, Korea)에서 수행하였으며, 분자량 결정을 위해 bradykinin(MW: 1,060), aprotinin(MW: 6,500), cytochrome c(MW: 12,400), ribonuclease A(MW: 13,700)를 표준물질로 사용하였다.

결과 및 고찰

Urease 저해활성 검색

*H. pylori*의 생육과 urease 산물인 암모니아에 의한 위점막 손상을 억제함으로써 위염 및 위궤양을 예방할 수 있는 천연 urease 저해활성물질을 소재화시키고자 하였다. 식용식물, 약용식물, 허브 및 해조류 총 173종으로부터 극성도에 따라 계통추출한 추출물 865점 중 수용성인 냉수추출물(Fr. 1), methanol추출물(Fr. 4), 열수추출물(Fr. 5) 519점을 대상으로 *H. pylori* urease 저해활성을 검색하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 식용식물, 약용식물, 허브 등 135종 중 미나리를 비롯하여 17종이 저해활성을 나타내지 않았으며, 추출물별로는 methanol 추출물에서 광범위하고도 높은 저해활성을 나타내었고 품종별에서는 서양향신료, 건강채소류, 양념채

소류, 약용식물, 죽류식물, 차류식물 등의 순으로 저해활성이 높은 경향을 나타내었다. 한편 해조류는 38종 중 갈색대마디말 외 2종이 저해활성을 보이지 않았고 추출용매의 영향은 methanol에서 높은 저해활성을 나타내었으나 녹조류, 홍조류, 갈조류 등 해조류군별 저해활성 차이는 관찰할 수 없었다(Table 2). 상기에서 1차 검색한 시료들 중 저해활성이 비교적 높았던 구기자, 녹차, 두충, 복분자, 보리, 치자, 쑥, 질경이 등을 대상으로 냉수, 열수, methanol, 70% methanol, acetone, 70% acetone을 추출용매로 사용하여 추출한 후 각 추출물의 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Table 3에서와 같이 복분자 70% acetone 추출물이 24.8%의 가장 높은 저해활성을 나타내었으며 용매별 영향은 acetone, 냉수, methanol, 열수, 70% methanol, 70% acetone 순으로 높은 경향을 보였다. *H. pylori* urease저해제는 fluorofamide(15,39), aceto-hydroxamic acid(15,40) 등의 urease 저해기능만을 가진 물질과 rabeprazole(41), lansoprazole(42) 등의 proton pump 저해기능을 동시에 갖는 물질들로 구분할 수 있으나 이들 모두 합성 물질이고 천연urease 저해활성물질은 *Euphorbia decipiens*로부터 1종만이 보고되어 있는 실정이다(43).

유기용매분획 및 활성본체 확인

복분자 70% acetone 추출물 함유 urease 저해활성물질을 용이하게 분리 정제할 목적으로 ethyl acetate와 butanol 순으로 유기용매분획을 실시하였다. 저해활성 20.2%를 보인 70% acetone 대량추출물(RC)을 유기용매분획한 결과 ethyl acetate층(RCE)과 물층(RCW1)은 각각 4.2%와 28.6%의 저해활성을, butanol층(RCB)과 물층(RCW2)은 각각 6.6%와 32.5%의 저해활성을 나타냄으로써 극성이 매우 높은 물질이 저해활성에 관여하고 있음을 알 수 있었다. 또한 저해활성물질은 저분자 비극성물질이 아닌 중·고분자 극성물질인 단백질, 펩타이드, 다당류 등일 가능성이 높았다. 이에 따라 저해활성물질의 본체를 예비적으로 확인함으로써 효율 높은 정제를 수행하기 위해 RCW2 획분을 pronase와 periodate로 처리하였다. 당부분과 단백질부분을 각각 소화시킨 후 활성증감을 검토한 결과 pronase소화에 의해 1.2%, periodate산화에 의해 23%의 저해활성을 보임으로써 활성본체가 다당류가 아닌 단백질성 물질로 추정되었다.

저해활성물질의 분리

복분자 70% acetone 추출물질의 유기용매 분획물 중 가장 높은 urease 저해활성을 보인 RCW2에 함유되어 있는 물질을 분리하기 위해 다음과 같이 column chromatography를 실시하였다.

DEAE-Toyoparl 650C ion exchange chromatography : 건조 RCW2 획분을 증류수에 용해시킨 다음 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)로 평형화된 DEAE-Toyoparl 650C column(Cl⁻ form, 3.8×40 cm)에 흡착시킨 후 0, 0.5, 1, 1.5, 2 M NaCl이 함유된 동일 완충용액을 단계적

Table 1. Urease inhibitory activities of water (hot & cold) and methanol fractions extracted from edible plants, medicinal herbs and herbs

Scientific name	Inhibitory activity (%)			Scientific name	Inhibitory activity (%)		
	Fr. 1 ¹⁾	Fr. 4 ²⁾	Fr. 5 ³⁾		Fr. 1	Fr. 4	Fr. 5
<i>Zingiberis Rhizoma</i>	3.2	3.6	4.1	<i>Benincasa cerifera</i> Savi	2.7	3.7	5.5
<i>Allium tuberosum</i> Rottler	1.8	1.3	5.3	<i>Arachis hypogaea</i>	1.7	6.4	7.4
<i>Allium cepa</i> L.	5.0	1.3	ND	<i>Paonia suffruticosa</i>	6.2	12.5	8.3
<i>Pipper nigrum</i> L.	ND ⁴⁾	1.4	1.7	<i>Oenanthe siolonifera</i>	5.4	2.6	3.4
<i>Alli Bulbus</i>	2.6	3.3	4.2	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	4.9	4.6	4.9
<i>Allium fistulosum</i>	1.3	2.6	1.6	<i>Poria cocos</i> Wolf.	11.2	9.9	6.8
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	ND	ND	ND	<i>Allium tuberosum</i>	8.8	7.0	6.2
<i>Capsella burs-apastoris</i> Medicus	6.4	7.7	ND	<i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	13.2	9.0	2.7
<i>Brassica juncea</i> Cosson	ND	ND	ND	<i>Spinacia oleracea</i> L.	6.0	6.0	5.6
<i>Oenanthe Decumbens</i> Kpol.	ND	ND	ND	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner	ND	2.1	2.4
<i>Ixeris dentata</i>	3.5	4.6	3.8	<i>Evodia officialis</i>	8.0	10.2	4.3
<i>Sedum sarmentosum</i>	ND	ND	ND	<i>Pinus koraiensis</i>	12	14.6	9.9
<i>Aralia elata</i> seemann	ND	1.2	1.9	<i>Sasamorha purpurascens</i>	4.4	6.1	9.6
<i>Zantho xylum</i> piperitum	2.3	1.2	3.1	<i>Penilla sikokiana</i>	3.7	7.1	8.6
<i>Perilla frutescens</i> Britton	1.4	1.8	1.8	<i>Sesamum indicum</i>	4.5	5.6	8.8
<i>Allium tuberosum</i> L.	2.2	2.7	2.5	<i>Phaseolus angularis</i>	6.8	6.6	7.6
<i>Physalis franchetii</i> Masters	2.1	1.7	1.4	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	7.9	2.8	1.0
<i>Capsicum annuum</i>	2.8	1.1	ND	<i>Coix lacryma-jobi</i> L.	ND	1.6	1.1
<i>Perilla japonica</i>	1.3	1.5	1.5	<i>Diospyros kaki</i>	4.8	4.0	3.3
<i>Pimenta dioicalis</i>	ND	ND	ND	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	ND	ND	ND
<i>Anisum vulgave</i> Gaetn.	ND	1.7	ND	<i>Glycine max</i>	6.8	5.2	6.6
<i>Ocimm Basilicum</i> L.	ND	ND	ND	<i>Cassia tora</i>	2.8	4.9	3.9
<i>Laurus nobilis</i>	2.3	1.1	ND	<i>Lycium chinense</i>	13.8	12.5	10.2
<i>Carum carvi</i>	1.8	2.5	2.9	<i>Citrus unshiu</i>	4.3	2.0	1.7
<i>Elettaria cardamomum</i>	ND	ND	ND	<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	ND	0.9	1.1
<i>Apium graveolens</i> L.	1.4	1.3	1.8	<i>Camellia sinensis</i>	10.6	17.5	21.4
<i>Allium schoenoprasum</i>	ND	1.6	ND	<i>Astragalus membranaceus</i>	3.5	4.0	4.2
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	2.4	2.7	2.6	<i>Angelica gigas</i>	4.0	7.7	6.5
<i>Eugenia caryophyllate</i>	1.2	1.4	ND	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	3.7	4.8	4.0
<i>Coriandrum sativum</i>	ND	ND	ND	<i>Eucommia ulmoides</i>	8.2	11.1	16.1
<i>Cuminum cyminum</i>	1.6	2.2	2.5	<i>Polygoatum japonicum</i>	1.0	1.8	1.3
<i>Anethum graveolens</i>	ND	ND	ND	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	3.2	3.3	1.8
<i>Foeniculum vulgare</i>	1.2	1.5	ND	<i>Perilla frutescens</i>	3.6	4.2	5.9
<i>Trigonella foenun-graecum</i>	ND	ND	ND	<i>Pseudocymodonia sinensis</i>	5.5	7.8	6.2
<i>Armoracia rusticana</i>	ND	1.8	1.6	<i>Taraxacum platycarpum</i>	ND	ND	ND
<i>Myristica fragranas</i> Houtt	ND	ND	ND	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonia</i>	2.0	8.8	7.4
<i>Citrus limonium</i>	1.3	1.2	1.2	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.	1.6	1.2	1.8
<i>Brassica alba</i>	1.2	1.5	1.9	<i>Hordeum vulgare</i> L.	11.3	19.3	17.3
<i>Nougen kazra</i>	2.5	2.8	2.1	<i>Eriobotrya japonica</i>	7.3	12.4	8.1
<i>Origanum hortensis</i>	ND	1.8	ND	<i>Morus alba</i>	6.7	7.5	6.0
<i>Myristica fragranas</i> Houtt	1.5	2.1	ND	<i>Rubus coreanus</i>	18.2	20.4	15.8
<i>Origanum vulgare</i> L.	1.5	2.4	1.8	<i>Comus officinalis</i>	4.2	7.5	6.1
<i>Capsicum annuum</i>	2.4	1.3	2.0	<i>Nelumbo nucifera</i>	5.2	4.3	5.7
<i>Petroselinum crispum</i>	3.3	4.6	3.7	<i>Acatopanax sessiliflorum</i>	2.8	3.4	2.6
<i>Chilicon carne</i>	ND	ND	ND	<i>Schizandra chinensis</i>	10.5	8.0	6.7
<i>Capsicum annuum</i> L.	1.6	1.3	2.3	<i>Zea mays</i>	10	9.3	8.5
<i>Papaver somniferum</i>	ND	ND	ND	<i>Citrus junos</i>	7.1	6.7	8.8
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3.2	4.9	2.8	<i>Coix lacryma-jobi</i>	2.0	4.1	3.7
<i>Salvia officinalis</i>	1.2	1.6	1.6	<i>Akebia quinata</i>	3.2	4.3	2.9
<i>Crocus sativus</i>	1.6	1.8	1.4	<i>Ginkgo biloba</i>	11.2	8.0	6.7
<i>Satureja hortensis</i>	5.6	6.2	5.7	<i>Panax ginseng</i>	2.2	4.1	7.7
<i>Illicium verum</i> Hooker	2.7	5.9	4.8	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	3.4	9.4	6.7
<i>Artemisia dracuculus</i>	3.7	13.5	10.2	<i>Adeophora tryphilla</i>	1.9	3.0	4.4
<i>Curcuma longa</i> L.	1.3	2.5	1.4	<i>Plantago asiatica</i> L.	22	15.2	18.2
<i>Thymus vulgaris</i>	1.5	1.7	1.2	<i>Gardenia jasminoides</i>	17.9	18.2	11.3
<i>Brassica oleracea</i>	ND	1.3	ND	<i>Cichorium intybus</i> L.	4.3	6.4	2.3
<i>Valerianella locusta</i>	ND	ND	ND	<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth	5.3	5.9	0.6
<i>Raphanus sativus</i> L.	1.3	1.2	1.4	<i>Poncirus trifoliata</i> RAF.	6.0	1.7	4.4
<i>Paphanus acanthiformis</i>	ND	1.6	1.1	<i>Trihosanthes kirilowii</i> Max.	1.2	1.9	2.7
<i>Brassica oleracea</i> L.	2.6	1.9	2.0	<i>Juglas sinensis</i>	2.3	2.7	1.9
<i>Hemerocallis fulva</i>	ND	2.2	ND	<i>Cucubita moschata</i>	ND	1.3	ND
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	ND	ND	ND	<i>Mentha</i> spp.	ND	ND	ND
<i>Halymeria acuminata</i>	1.5	1.1	1.3	<i>Brassica alba</i>	3.2	3.8	2.9
<i>Sargassum thunbergii</i>	1.9	ND	ND	<i>Polygonum multiflorum</i>	7.8	10.6	5.3
<i>Plocanium telfairae</i>	8.0	9.7	10.0	<i>Cucurbita moschata</i>	3.4	6.6	11.2
<i>Euryale ferox</i>	4.4	5.9	3.6	<i>Artemisia asiatica</i>	17.8	18.4	12.4
<i>Ipomoea batas</i> L.	2.8	2.2	3.2	<i>Triticum aestivum</i>	2.3	4.2	4.3
<i>Disopyrus kaki</i>	3.9	4.2	5.6				

The inhibitory activities were measured and calculated by colorimetric method described in Materials and Methods.

¹⁾Fr. 1: Cold water extract, ²⁾Fr. 4: Methanol extract, ³⁾Fr. 5: Hot water extract.

⁴⁾ND: Not detected.

Table 2. Urease inhibitory activities of water (hot & cold) and methanol fractions extracted from seaweeds

Scientific name	Inhibitory activity (%)		
	Fr. 1 ¹⁾	Fr. 4 ²⁾	Fr. 5 ³⁾
<i>Galaxaura fastigia</i>	8.3	7.3	2.1
<i>Grigatina tenella</i>	2.4	2.3	2.0
<i>Hypnea charoides</i>	6.6	2.3	5.2
<i>Gelidium amansii</i>	3.5	7.7	8.2
<i>Bangia atropurea</i>	5.8	9.2	10.5
<i>Porohyra suborbiculate</i>	2.0	2.3	2.9
<i>Porohyra tenera</i>	ND ⁴⁾	1.3	1.3
<i>Pachymeniopsis dilatata</i>	3.2	5.5	6.5
<i>Halymeniopsis dilatata</i>	1.6	1.3	ND
<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	5.2	3.3	4.7
<i>Amphyra dilate</i>	5.8	8.0	5.8
<i>Gracilaria textorii</i>	1.4	1.3	1.8
<i>Chondria crassicaulis</i>	4.3	3.7	4.4
<i>Acrosorium polyneurum</i>	2.3	1.2	2.3
<i>Chondrus cocellatus</i>	11.2	12.9	11.2
<i>Meristotheca papulosa</i>	ND	2.1	2.7
<i>Cladophora wrightiana</i>	ND	ND	ND
<i>Ecklonia cava</i>	1.1	1.8	ND
<i>Pelvetia wrightii</i>	1.0	1.6	2.0
<i>undrania pinnatifida</i>	1.5	1.3	1.6
<i>Endarachne binghamiae</i>	2.1	2.4	2.0
<i>Hizilia fusiforme</i>	2.5	2.4	2.6
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	ND	ND	ND
<i>Hypericum erectum</i>	1.5	1.4	2.4
<i>Carpopeltis angusta</i>	ND	2.0	2.8
<i>Schizymenia dubyi</i>	1.2	1.6	1.8
<i>Sargassum fulbellum</i>	1.3	1.5	1.1
<i>Campylaeophora hypnaeoides</i>	2.0	1.2	3.1
<i>Gelidium amansii</i>	1.1	ND	ND
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	ND	ND	1.3
<i>Sargassum tortile</i>	ND	1.5	1.0
<i>Laminaria japonica</i>	2.7	3.4	3.9
<i>Ishige okamurai</i>	ND	ND	ND
<i>Pelvetia wrightii</i>	ND	1.6	1.0
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	2.2	1.3	2.3
<i>Codium latum</i>	1.1	1.9	ND
<i>Codium divaricatum</i>	1.2	1.7	ND
<i>Codium fragile</i>	3.9	2.5	3.0

The inhibitory activities were measured and calculated by colorimetric method described in Materials and Methods.

¹⁾Fr. 1: Cold water extract, ²⁾Fr. 4: Methanol extract, ³⁾Fr. 5: Hot water extract.

ND: Not detected.

Table 3. Urease inhibitory activities of water (hot & cold), acetone and methanol fractions extracted from samples selected by first screening

Selected sample	Inhibitory activity (%)					
	Fr. I ¹⁾	Fr. II ²⁾	Fr. III ³⁾	Fr. IV ⁴⁾	Fr. V ⁵⁾	Fr. VI ⁶⁾
<i>Lycium chinense</i>	14.1	14.2	13.8	16.0	8.5	16.4
<i>Camellia sinensis</i>	12.2	22.4	18.1	23.3	12.9	23.7
<i>Eucommia ulmoides</i>	9.8	17.5	14.4	18.5	11.0	19.3
<i>Rubus coreanus</i>	20.1	21.4	19.8	24.0	19.5	24.8
<i>Hordeum vulgare</i> L.	12.6	17.2	10.7	17.6	9.4	18.0
<i>Gardenia jasminoides</i>	18.3	14.4	16.8	19.0	12.5	19.6
<i>Artemisia asiatica</i>	10.6	14.1	19.2	19.5	13.7	20.2
<i>Plantago asiatica</i> L.	23.4	21.6	18.9	23.0	19.3	23.5

The inhibitory activities were measured and calculated by colorimetric method described in Materials and Methods.

¹⁾Fr. I: Cold water extract, ²⁾Fr. II: Hot water extract, ³⁾Fr. III: Methanol extract,

⁴⁾Fr. IV: 70% methanol extract, ⁵⁾Fr. V: Acetone extract, ⁶⁾Fr. VI: 70% acetone extract.

으로 용출시켜 5개의획분들(RCW2-I, II, III, IV, V)로분획하고 각각의저해활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 1 M NaCl에서 용출된 RCW2-III 획분이 54.9%로 가장 높은저해활성을 나타냄으로써 저해활성물질은 비교적 강한이온성 물질임을 알 수 있었다.

Butyl-Toyopearl 650M hydrophobic column chromatography: DEAE-Toyopearl 650C의 획분들 중 높은저해활성을 보인 RCW2-III를 유안으로 30%까지 포화시키고 30% 포화유안이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 Butyl-Toyopearl 650M column(1.6×30 cm)에 주입한 후 30%에서 0%의 포화유안 직선농도구배를 사용하여 용출시킨 후 3개의 획분(RCW2-IIIa, RCW2-IIIb, RCW2-IIIc)으로 분획하였다(Fig. 2). 용출획분을 농축하고 증류수로 투석한 후 저해활성을 측정한 결과 직선농도구배상 0% 포화유안용액의 농도범위에서 용출된 RCW2-IIIc가 69.5%로 가장 높은 활성을 보임으로써 저해

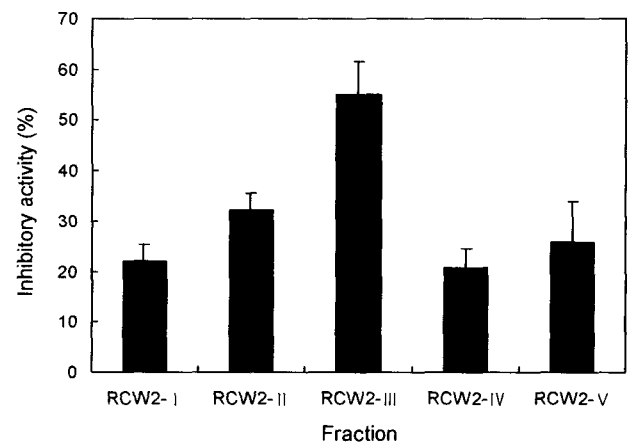


Fig. 1. Urease inhibitory activities of fractions eluted from DEAE-Toyopearl 650C column chromatography.

After applying RCW2, DEAE-Toyopearl 650C column (Cl⁻ form, 3.8×40 cm) was washed with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and then eluted stepwisely with 0 M~2 M NaCl. RCW2-I: 0 M NaCl fraction, RCW2-II: 0.5 M NaCl fraction, RCW2-III: 1 M NaCl fraction, RCW2-IV: 1.5 M NaCl fraction, RCW2-V: 2 M NaCl fraction.

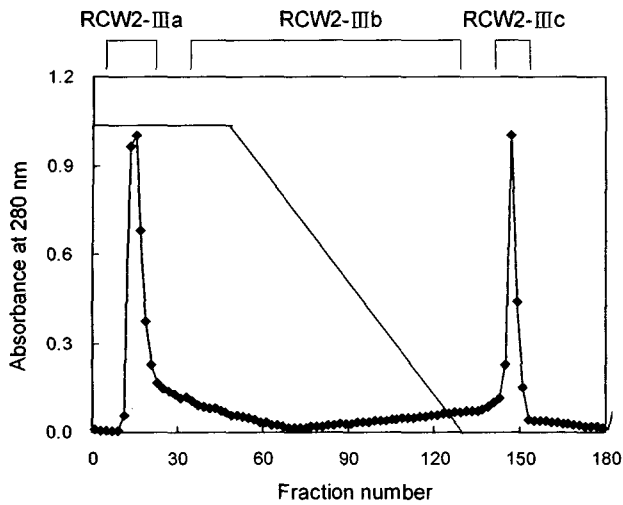


Fig. 2. Elution pattern of Butyl-Toyopearl 650M column chromatography.
After applying RCW2-III fraction, Butyl-Toyopearl 650 M column was washed with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 30% saturated ammonium sulfate and then eluted with linear gradient of 30%~0% saturated ammonium sulfate solution. Fractions of 3 mL were collected and assayed for protein and inhibitory activities.

활성물질은 소수성이 낮은 물질임을 나타내었다.

Sephadex LH-20 column chromatography : 20% ethanol로 평형화된 Sephadex LH-20 column(1.8×100 cm)에 20% ethanol로 용해시킨 활성획분(RCW2-IIIc)을 주입하고 12 mL/hr의 유속으로 1 mL씩 용출시킨 후 3개의 획분(RCW2-IIIc α , RCW2-IIIc β , RCW2-IIIc γ)으로 분획하고(Fig. 3), 각 획분의 저해활성을 측정된 결과 RCW2-IIIc α 의 획분이 97.2%의 저해활성을 보임으로써 70% acetone 추출물의 20.4%와 butanol 분획 물질(RCW2)의 32.%에 비해 각각 약 4.8배

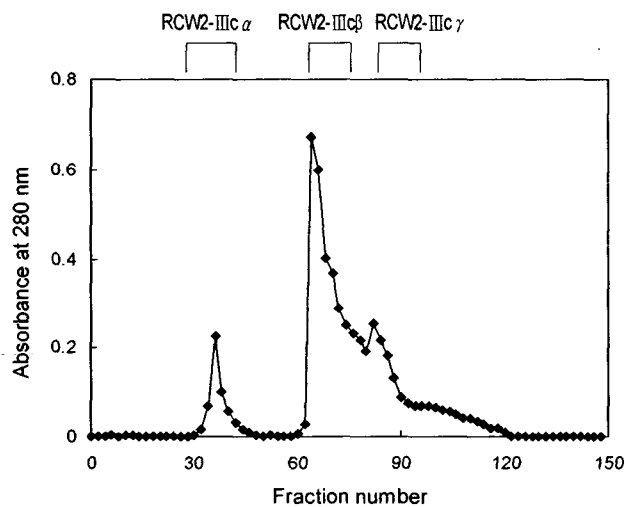


Fig. 3. Size exclusion column chromatography of RCW2-IIIc by Sephadex LH-20.
RCW2-IIIc was applied to a column (1.2×94.4 cm) and eluted with 20% methanol at a flow rate of 0.3 mL/min. Fractions of 1 mL were collected and assayed for protein and inhibitory activities.

와 3배 저해활성이 증가함을 알 수 있었다.

분리물질의 순도 및 분자량

상기의 open column chromatography들을 사용하여 분리 정제한 물질, RCW2-IIIc α 의 순도를 확인하기 위하여 HPLC에서 gel permeation chromatography를 수행한 결과 Fig. 4의 용출패턴과 같이 좌우 대칭인 단일피크를 나타냄으로써 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 용출된 RCW2-IIIc α 는 비교적 순도가 높은 물질임을 알 수 있었다.

정제물질의 분자량을 측정하기 위해 동일한 HPLC 조건에서 정제물질의 분자량을 표준 단백질들과 비교 측정된 결과 정제물질은 분자량 약 13 kDa의 단백질성 저해활성물질로 판명되었다(Fig. 4). Ahmad 등(43)이 *Euphobia decipiens*로부터 분리한 분자량 612의 urease 저해활성물질을 비롯하여 현재까지 밝혀진 urease 저해제는 저분자물질로 고분자 단백질성 물질이 저해물질로 보고된 바는 없다. 또한 상기 천연저해물질과 pyrocatechol(44), allicin(45) 등 천연유래 유기합성물질들은 *H. pylori* urease가 아닌 jack bean urease를 대상으로 저해활성을 검토, 보고하였다.

분리물질의 안정성

복분자 내 함유된 *H. pylori* urease 저해 단백질성 물질을 기능성식품용 중간원료로 소재화하기 위해 고려되어야 할 사항인 열에 대한 안정성과 위내 단백질분해효소들에 대한 가수분해내성을 정제물질, RCW2-IIIc α 와 RCW2를 대상으로 검토하였다. 열에 대한 안정성을 확인하기 위해 대상시료(1 mg/mL)를 각각 50~90°C 범위에서 20분 열처리한 후 저해활성을 측정된 결과 대상시료 모두 50~70°C 범위에서는 활성이 감소되지 않았지만 정제물질과 RCW2를 90°C에서 20분 처리 시 각각 94%와 82%로 활성이 감소되었다(Fig. 5).

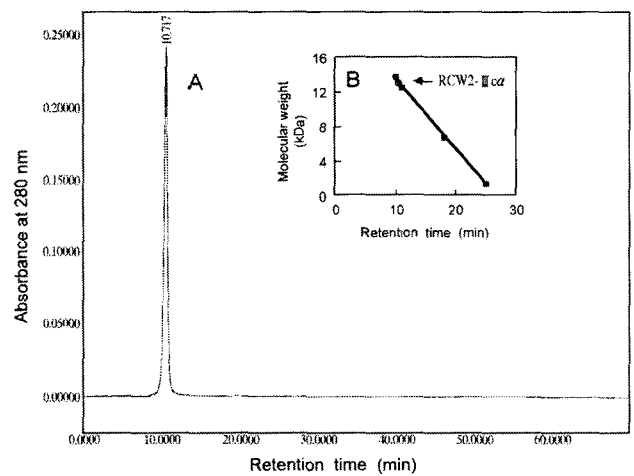


Fig. 4. Molecular weight determination of RCW2-IIIc α by high-performance gel permeation liquid chromatography.
The elution profile (A) and the molecular weight determination (B) of the isolated RCW2-IIIc α are shown. The protein standards (■) in order of decreasing molecular weight were: ribonuclease A, 13,700; cytochrome c, 12,400; aprotinin, 6,500; and bradykinin, 1,060.

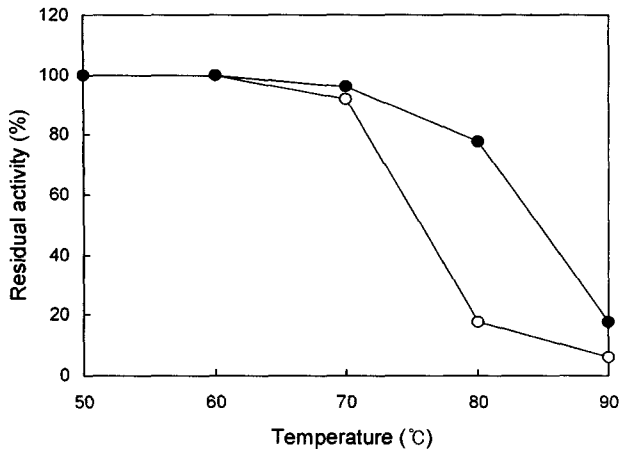


Fig. 5. Effects of temperature on the stability of RCW2 and RCW2-IIIc alpha.

The crude preparation, RCW2 (●) and the isolated inhibitor, RCW2-IIIc alpha (○) were treated at various temperature for 20 min and the residual activity was assayed. Samples were prepared at concentration of 1 mg/mL D.W.

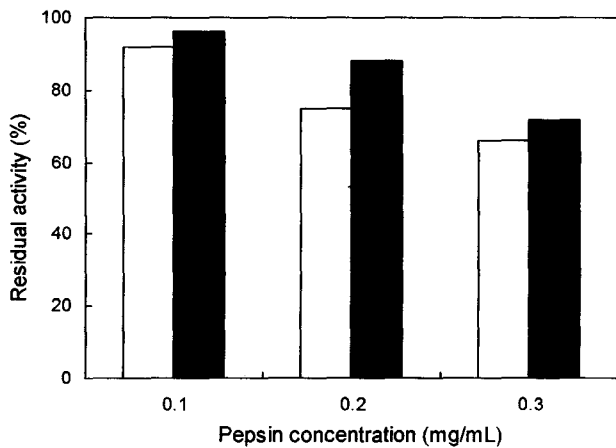


Fig. 6. Effects of pepsin on the digestion of RCW2 and RCW2-IIIc alpha.

The crude preparation, RCW2 (■) and the isolated inhibitor, RCW2-IIIc alpha (□) were incubated in 50 mM Britton-Robinson buffer (pH 2.0) containing pepsin of 0.1~0.3 mg/mL the Britton-Robinson buffer at 37°C for 20 min and the residual activity was assayed. Samples were prepared at concentration of 1 mg/mL D.W.

한편 전형적인 위 단백분해효소인 pepsin을 농도(0.1~0.3 mg/mL)에 따라 대상 시료를 처리하고 저해활성의 감소여부를 측정된 결과(Fig. 6), 효소처리에 의해 농도 의존적으로 활성은 감소하였으나 0.3 mg/mL의 처리에 의해서도 정제물질은 66%, RCW2는 72%의 잔존활성을 보였다. 따라서 본 연구를 통하여 복분자로부터 분리된 저해활성물질은 고분자 단백질임에도 불구하고 비교적 높은 안정성을 보임으로써 *H. pylori* urease 저해활성 물질의 소재화 가능성을 나타내었다.

요 약

위염과 위궤양의 일차적 발병인자로 알려진 *Helicobacter*

*pylori*의 생육을 억제하고 urease 산물인 암모니아의 축적에 의한 위점막 손상을 완화시킬 목적으로 복분자로부터 *H. pylori* urease 저해물질을 분리정제하고 소재화와 관련된 일부 성질을 규명하였다. 양념채소류, 차류, 죽류, 건강채소류 등의 식용식물, 약용식물, 허브 및 해조류, 총 173종으로부터 극성도에 따라 계통추출한 수용성인 냉수추출물(Fr. 1), methanol 추출물(Fr. 4), 열수추출물(Fr. 5) 519점을 대상으로 *H. pylori* urease 저해활성을 검색하였다. 1차 및 2차 저해활성 검색 결과 복분자의 70% acetone추출물이 약 24%의 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, 이 추출물을 ethyl acetate와 butanol을 사용하여 ethyl acetate/DW layer(RCE/RCW1)와 butanol/DW layer(RCB/RCW2)로 순차 분획한 후 활성획분인 RCW2 내의 활성분체를 확인할 목적으로 periodate oxidation과 pronase digestion을 실시한 결과 펩타이드 또는 단백질성 물질로 판명되었다. 저해활성물질을 DEAE-Toyoppearl 650C, Butyl-Toyoppearl 650M 및 Sephadex LH-20 순의 column chromatography에 의해 분리정제되었다. 분리 urease 저해물질, RCW2-IIIc alpha는 HPLC의 gel permeation chromatography에 의해 비교적 순도 높은 분자량 약 13 kDa의 단일 물질임이 확인되었다. 저해활성물질은 열에 안정성을 보이는 내열성 단백질을 알 수 있었고 위내 단백분해효소인 pepsin에도 가수분해 저항성을 나타냄으로써 기능성식품의 소재로 높은 소재화 적성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 고려대학교 특별연구비에 의해 수행되었습니다.

문 헌

1. Waren JR, Marshall B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273-1275.
2. McGowan CC, Cover TL, Blaser MJ. 1996. *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications. *Gastroenterology* 110: 926-938.
3. LAbigne A, de Reuse H. 1996. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect Agents Dis* 5: 191-222.
4. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbial Rev* 10: 720-741.
5. Eaton KA, Morgan DR, Krakowak S. 1989. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotics piglets. *Infect Immune* 57: 1119-1125.
6. Ferro RL, Hazeel SL, Lee A. 1988. The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium. *Infect Immune* 56: 2994-2996.
7. Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BL. 1988. *Campylobacter pylori* and gastric and peptic ulcer disease. *Gastroenterol* 96: 615-625.
8. Barer MR, Elliott TSJ, Berkeley D, Thomas JE, Eastham EJ. 1988. Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J Clin Pathol* 41: 597-604.
9. Isomoto H, Inoue K, Furusu H, Nishiyama H, Shikuwa S,

- Omagari K, Mizuta Y, Murase K, Murata I, Kohno S. 2003. Lafutidine, a novel histamine H₂-receptor antagonist, vs lansoprazole in combination with amoxicillin and clarithromycin for eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8: 111-119.
10. Gschwantler M, Dragosics B, Wurzer H, Brandstatter G, Weiss W. 1998. Eradication of *Helicobacter pylori* by a 1-week course of famotidine, amoxicillin and clarithromycin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10: 579-582.
 11. Ahuja V, Dhar A, Bal C, Sharma MP. 1998. Lansoprazole and secnidazole with clarithromycin, amoxicillin or pefloxacin in the eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. *Aliment Pharmacol Ther* 12: 551-555.
 12. Parente F, Sainaghi M, Sangaletti O, Imbesi V, Maconi G, Anderloni A, Bianchi Porro G. 2002. Different effects of short-term omeprazole, lansoprazole or pantoprazole on the accuracy of the (13)C-urea breath test. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 553-557.
 13. Silva FM, Zaterka S, Eisig JN, Chehter EZ, Chinzon D, Laudanna AA. 2001. Factors affecting *Helicobacter pylori* eradication using a seven-day triple therapy with a proton pump inhibitor, tinidazole and clarithromycin, in Brazilian patients with peptic ulcer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 56: 11-16.
 14. Mirshahi F, Fowler G, Patel A, Shaw G. 1998. Omeprazole may exert both a bacteriostatic and a bacteriocidal effect on the growth of *Helicobacter pylori* (NCTC 11637) *in vitro* by inhibiting bacterial urease activity. *J Clin Pathol* 51: 220-224.
 15. Ohta T, Shibata H, Kawamori T, Iimuro M, Sugimura T, Wakabayashi K. 2001. Marked reduction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by urease inhibitors, acetohydroxamic acid and flurofamide, in Mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 728-733.
 16. Ito Y, Shibata K, Hongo A, Kinoshita M. 1998. Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Pharmacol* 345: 193-198.
 17. Pope AJ, Toseland CD, Rushant B, Richardson S, McVey M, Hills J. 1998. Effect of potent urease inhibitor, fluoro-famide, on *Helicobacter sp.* *in vivo* and *in vitro*. *Dig Dis Sci* 43: 109-119.
 18. Otake S, Morikawa T, Tsuchiya M, Imamura L, Kobashi K. 1994. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by hydroxamic acid derivatives. *Biol Pharm Bull* 17: 1329-1332.
 19. Phillips K, Munster DJ, Allardyce RA, Bagshaw PF. 1993. Antibacterial action of the urease inhibitor acetohydroxamic acid on *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 146: 372-373.
 20. Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. 2001. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 19: 523-563.
 21. Hawkey CJ, Atherton JC, Treichel HC, Thjodleifsson B, Ravic M. 2003. Safety and efficacy of 7-day rabeprazole- and omeprazole-based triple therapy regimens for the eradication of *Helicobacter pylori* in patients with documented peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 1065-1074.
 22. Chaudhuri S, Chowdhury A, Datta S, Mukhopadhyay AK, Chattopadhyaya S, Saha DR, Dhali G, Santra A, Nair GB, Bhattacharya S, Berg DE. 2003. Anti-*Helicobacter pylori* therapy in India: differences in eradication efficiency associated with particular alleles of vacuolating cytotoxin (*vacA*) gene. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 190-195.
 23. Hsu CC, Chen JJ, Hu TH, Lu SN, Changchien CS. 2001. Famotidine versus omeprazole, in combination with amoxicillin and tinidazole, for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 921-926.
 24. Louw JA, van Rensburg CJ, Hanslo D, Grundling HD, Girdwood AH, Marks IN. 1998. Two-week course of pantoprazole combined with 1 week of amoxicillin and clarithromycin is effective in *Helicobacter pylori* eradication and duodenal ulcer healing. *Aliment Pharmacol Ther* 12: 545-550.
 25. Crespo A, Suh B. 2001. *Helicobacter pylori* infection: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Arch Pharm Res* 24: 485-498.
 26. Laheij RJ, Rossum LG, Jansen JB, Straatman H, Verbeel AL. 1999. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection—a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 857-864.
 27. Huang JQ, Hunt RH. 1999. Treatment after failure: the problem of "non-responders". *Gut* 45 (suppl 1): 14-144.
 28. Megraud F. 1997. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 11 (suppl 1): 43-53.
 29. Chi HJ. 1999. *Health foods from herbs*. 1st ed. Seoul National University, Seoul. p 68-69.
 30. Lee MW. 1995. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 39: 200-204.
 31. Pang KC, Kim MS, Lee MW. 1996. Hydrolyzable tannins from the fruits of *Rubus coreanum*. *Kor J Pharmacogn* 27: 366-370.
 32. Bensky D, Andrew G. 1993. *Chinese herbal medicine materia medica*. Eastland Press, Washington. p 388.
 33. Lee YA, Lee MW. 1995. Tannins from *Rubus coreanum*. *Kor J Pharmacogn* 26: 27-30.
 34. Wedge DE, Meepagala KM, Magee JB, Smith SH, Huang G, Larcom LL. 2001. Anticarcinogenic activity of strawberry, blueberry, and raspberry extracts to breast and cervical cancer cells. *J Med Food* 4: 49-51.
 35. Ryan T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. 2001. Antibacterial activity of raspberry cordial *in vitro*. *Res Vet Sci* 71: 155-159.
 36. Zafrilla P, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. 2001. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry jams. *Agric Food Chem* 49: 3651-3655.
 37. Lee KK, Son JS, Chang YJ, Kim SU, Kim KH. 1998. Separate expression and *in vitro* activation of recombinant *Helicobacter pylori* urease structural subunits. *J Microbiol Biotechnol* 8: 700-704.
 38. Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39: 971-974.
 39. Pope AJ, Toseland CD, Rushant B, Richardson S, McVey M, Hills J. 1998. Effect of potent urease inhibitor, fluoro-famide, on *Helicobacter sp.* *in vivo* and *in vitro*. *Dig Dis Sci* 43: 109-119.
 40. Star RA, Gillin AD, Parikh VJ, Sands JM. 1993. The urease inhibitor acetohydroxamic acid is transported by the urea pathway in rat terminal IMCD. *Am J Physiol* 265: 385-390.
 41. Park JB, Imamura L, Kobashi K. 1996. Kinetic studies of *Helicobacter pylori* urease inhibition by a novel proton pump inhibitor, rabeprazole. *Biol Pharm Bull* 19: 182-187.
 42. Nagata K, Takagi E, Satoh H, Okamura H, Tamura T. 1995. Growth inhibition of *Ureaplasma urealyticum* by the proton pump inhibitor lansoprazole: direct attribution to inhibition by lansoprazole of urease activity and urea-induced ATP synthesis in *U. urealyticum*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2187-2192.
 43. Ahmad VU, Hussain J, Hussain H, Jassbi AR, Ullah F, Lodhi

- MA, Yasin A, Choudhary MI. 2003. First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. *Chem Pharm Bull* 51: 719-723.
44. Kot M, Zaborska W. 2003. Irreversible inhibition of jack bean urease by pyrocatechol. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18: 413-417.
45. Juszkiexicz A, Zaborska W, Sepiol J, Gora M, aborska A. 2003. Inactivation of jack bean urease by allicin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18: 419-424.

(2004년 2월 6일 접수; 2004년 5월 24일 채택)