*Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*
Vol. 36, No. 2, 106–114(2008)

# *Helicobacter pylori* 억제능 김치 유산균의 분리와 특성 규명

이율 · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과

**Isolation and Characterization of Kimchi Lactic Acid Bacteria Showing Anti-*Helicobacter pylori* Activity. Lee, Youl and Hae Choon Chang***. *Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea* – One bacterium, which showed strong antagonistic activity against *H. pylori* KCCM 41756, was isolated from kimchi. The strain NO1 was designated as *Lactobacillus plantarum* NO1 based on Gram staining, biochemical properties, and 16S rRNA gene sequencing. The culture medium (2~4 μg/ml) of *Lb. plantarum* NO1 reduced (40~60%) the urease activity of *H. pylori* KCCM 41756. *Lb. plantarum* NO1 inhibited the binding of *H. pylori* to human gastric cancer cell line, AGS cells, by more than 33%. *Lb. plantarum* NO1 exhibited high viability (maintained initial viable cell count of $10^9$ CFU/ml) in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 3.0) for 2 h, in artificial gastric juice for 2 h and in 0.3%, 0.5% oxgall for 24 h. Hemolysis phenomena did not observed when *Lb. plantarum* NO1 was incubated in the blood agar media. We concluded that *Lb. plantarum* NO1 can be a good candidate as a probiotic, harboring anti-*H. pylori* activity.

**Key words:** Lactic acid bacteria, *Lactobacillus* sp., *H. pylori*, kimchi

## 서 론

*Helicobacter pylori*는 만성 활동성 위염, 위십이지장궤양의 원인균이며, 위암과 위점막연관 림프 조직형 위림프종의 중요 인자로 인식되고 있는 균이다[9, 26]. 1994년 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 *H. pylori*를 위암의 제 1군 발암 인자로 규정한 이후 *H. pylori*의 중요성이 더욱 부각되었으며 *H. pylori*의 병리학적 위장질환에 대한 발병기전을 밝히기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다[13]. *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[1,32]. *In vivo*에서의 일반적인 *H. pylori*의 제균 방법은 크게 4가지로 구분되어, 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 등이 사용되고 있다[10]. 이와 같이 약제를 사용한 제균 방법은 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 되고 있다[13]. 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.

1908년에 불가리아의 생화학자인 메치니코프가 유산균 발효유 섭취에 의한 불노장수설을 주장한 이후 유산균을 기능성 식품에 사용하기 위하여 프로바이오틱 유산균의 선발에 대한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 진행되고 있다[5]. 프로바이오틱 유산균으로서 가져야할 가장 중요한 특성은 GRAS(generally recognized as safe) 미생물로서 동물 장내에서 생존력이 커야 하고[6] 대장균이나 살모넬라와 같은 유해 미생물의 생육 억제 능력이 커야 한다는 점이다[7]. 유산균과 그 대사산물의 효과는 장내 균총의 개선[4], 장내 부패균의 억제효과[11], *H. pylori* 억제효과[3, 8, 14], 항암활성[20] 등으로 보고되고 있다. 특히 *Lactobacillus* sp.에 속하는 유산균의 배양액을 사람이나 실험용 동물에게 음용시켰을 때 *H. pylori*를 억제하는 효과가 있다는 보고가 발표되었다[29]. 현재 국내에서는 *H. pylori*를 억제하는 유산균을 이용한 발효유를 비롯한 다양한 유산균 함유 건강 기능성 식품이 개발되거나 판매되고 있다. 지금까지 유산균이 갖는 *H. pylori* 억제와 프로바이오틱 유산균에 관한 연구는 유발효 식품 유래 유산균에 관한 것이 대부분이며 김치 유산균에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 김치 유산균은 아직 활용되고 있는 사례가 많지 않지만 우수한 프로바이오틱 유산균으로 사용될 수 있고 이에 대한 안전성과 기능성은 오랜 기간을 통해 한국인의 식생활에 의해 검증되었다고 하겠다.

본 연구는 김치로부터 항 *H. pylori*활성이 있는 신규 김치 유산균을 탐색하고 그 특성을 규명하여 우수한 *H. pylori* 억

*Corresponding author
Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-234-7452
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

제능 프로바이오틱 유산균주를 개발하고자 하였다. 따라서 김치로부터 분리된 유산균의 *H. pylori*성장 억제능, urease inhibition activity, 용혈성 여부에 따른 안전성, 장내생존 가능성, 유해미생물 억제능 등의 특성을 조사하였다. 또한 분리 유산균이 *H. pylori*가 위벽세포에 부착하는 것을 억제하고 나아가 감염된 *H. pylori*를 탈착시킬 수 있는 기능을 규명하여, 향후 발효식품에서뿐 아니라 *H. pylori*와 관련된 위장질환 예방 및 치료에 이용될 수 있는 기능성 유산균으로서의 가능성을 제시 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 김치 유산균의 분리 및 동정

김치 유산균을 분리하기 위해서 광주 · 전남 지역의 가정집, 식당, 유명 사찰 등에서 최적으로 발효된 김치를 총 17종 수집하였다. 수집된 김치시료는 마쇄하고 여과 후 적정 배율로 희석하였다. 희석액은 Lactobacilli MRS(Difco Co., France) 배지에 도말후 24시간 이상 배양하였다. 배양 후 형성된 콜로니는 2% $CaCO_3$가 첨가된 MRS 배지에 tooth picking하여 투명환을 형성하는 균주를 선별하고 gram염색(BD Co., U.S.A)을 하여 현미경하에서 형태학적 특성을 관찰하였다. 선별된 균주들 중 *H. pylori*에 대해 항균활성을 보이는 균주를 재선별하여 catalase test(Biomérieux Co., France) 및 50CHL API kit(Biomérieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성과 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 최종 동정하였다.

### *H. pylori* 생육 저해 활성 측정: paper disk assay

*H. pylori* KCCM 41756을 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받아 10% horse serum(Gibco Co., U.S.A)이 첨가된 brucella(Difco Co., France) 액체배지에 1% 접종하여 37°C, 10% $CO_2$ incubator(Astec Co., Japan)에서 미호기적으로 배양하였다. 유산균을 배양할 때 MRS배지 성분 중 sodium acetate와 tween 80과 같은 성분이 *H. pylori*의 생육을 저해할 수 있다는 Midolo 등과 Coconnier 등의 보고를 참고하여[7, 23], 본 실험에서는 위의 두 가지 성분을 제외한 변형 MRS를 조제하여 사용하였다. Brucella 액체배지에서 24시간 동안 배양된 *H. pylori*를 brucella 액체배지에 희석하여 600 nm에서 흡광도를 1.5로 맞춘 후 이 중 300 μl를 취하여 brucella 평판배지에 도말하였다. *H. pylori*가 도말된 brucella 평판배지에 멸균된 paper disk(diameter 8.00 mm, Advantec Co., Japan)를 올리고 pH가 보정되지 않은 유산균 배양 상징액과 1 N NaOH를 이용하여 pH를 4.2로 보정한 유산균 배양 상징액을 각각 다른 brucella 평판배지에 50 μl씩 두 번 나누어 총 100 μl를 paper disk에 분주하였다. $CO_2$ incubator에서 37°C, 10% $CO_2$ 조건으로 24시간 미호기적으로 배양하여 disk 주위의 억제환의 생성유무를 확인한 후 억제환의 크기를 caliper(Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 3회 이상 측정하였다.

### 항 *H. pylori* 활성 김치유산균 배양액의 준비

*H. pylori*에 대해 항균활성을 나타내는 분리 유산균을 30°C에서 24시간 전 배양한 후 100 ml MRS 액체배지에 1% 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(9,950×g, 10 min)하여 0.45 μm membrane filter(Advantec Inc., U.S.A)로 제균하였다. 배양액은 배양 후 pH를 보정하지 않고 그대로 사용하는 경우와 1 N NaOH 또는 5 N HCl을 이용하여 pH 4.2 또는 pH 3.8로 보정하여 배양 상징액을 준비하는 경우로 하여, 이를 각각 제균한 후 동결건조하여 50 mM Tris-HCl(pH 8.3)에 녹여 사용하였다. 이때 분리균주의 항*H. pylori* 활성을 같은 속(*Lactobacillus* sp.)의 다른 유산균들과 비교하기위해 *Lb. sakei* SI3[22]와 *Lb. rhamnosus* GG[2]의 배양액을 분리균주와 동일한 조건으로 처리하여 사용하였다.

### *H. pylori* urease 억제 활성 측정

김치에서 분리된 유산균의 *H. pylori* urease 억제활성(urease inhibition activity)을 측정하였다[1, 32]. *H. pylori* KCCM 41756을 brain heart infusion(BHI, Difco Co., France) 액체배지 5 ml에 2회 계대배양 후 *H. pylori* 배양액을 원심분리(9,950×g, 10 min, 4°C)하여 상징액을 제거 후 phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척하고, 동량의 PBS를 가하여 현탁 시킨 후 이를 BHI 액체배지에 2%(v/v) 접종하였다. 여기에 준비된 김치유산균 배양액을 각각 2, 4 μg/ml 농도로 첨가하여 37°C, 10% $CO_2$ incubator에서 24시간 동안 미호기적으로 배양한 후 이를 새로운 urea broth(BD Co., U.S.A)에 5%(v/v) 접종하여 30°C에서 3시간 동안 반응시키면서 30분 간격으로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 urea broth에 분리 유산균 배양 상징액을 첨가하지 않고 *H. pylori*만 접종하여 배양한 것으로 하였으며 모든 실험은 3회 반복 시행하였다.

### *H. pylori*의 탈착 반응

인간의 위세포에 부착된 *H. pylori*를 김치유산균 배양액 첨가에 의하여 탈착시키는 *H. pylori*탈착 반응실험을 시행하였다[17, 18]. *H. pylori*의 탈착 반응에 사용한 인간의 위세포는 배양이 용이한 위암 세포주를 사용하였다. 위암 세포주 AGS ATCC CRL-1739를 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovin serum이 함유된 RPMI 1640(Hyclone Co., U.S.A.)에 배양하였다. 일주일에 2~3회 새로운 배지로 바꾸어주고 배양 6~7일 후 PBS로 세척하고, 0.05% trypsin-0.02% ethylene diamine tetraacetic acid를 가하여 부착된 세포를 분리하고 이를 원심분리하여 회수한 후 이를 동배지로 현탁하여 37°C, 5% $CO_2$배양기에서 계대

배양하면서 실험에 사용하였다. Falcon 96 well plate (Falcon Co., U.S.A)를 사용하여 AGS ATCC CRL-1739를 $6\times10^4$ cells/ml의 농도로 100 μl씩 각각 well에 분주하여 37°C, 5% $CO_2$배양기에서 24시간동안 전배양하여 well내에서 monolayer을 형성하게 하였다. 24시간동안 전배양된 *H. pylori* KCCM 41756를 BHI액체배지에 2배 희석하여 준비된 AGS의 monolayer에 100 μl 첨가하여 37°C, 10% $CO_2$ 미호기적인 조건으로 2시간 동안 배양하여 *H. pylori*를 AGS에 부착 시켰다. 여기에 유산균 배양액을 0, 7, 14, 21, 28, μg/ml 농도로 첨가하여 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 유산균 배양액 처리에 의하여 AGS에 부착되었다가 떨어져 나온 *H. pylori*는 각 well당 200 μl의 PBS를 첨가하여 2회 세척하여 제거한 후, 100 μl씩의 urea broth를 첨가하여 *H. pylori*의 urease activity를 측정함으로서 AGS에 부착되어 잔존하는 *H. pylori*를 측정하였다.

### 내산성 및 인공위액 저항성

분리균주의 산 저항성은 단순 산성 pH에 대한 내성과 체내 소화관 조건과 유사한 인공위액 내성시험을 실시하여 확인하였다. 단순 산성 pH에 대한 내성은 pH 3.0으로 조정한 0.05 M sodium phosphate 용액을 사용하였다[12, 26]. 인공위액의 조제는 Kobayashi 등[16]의 방법을 변형한 것으로 1 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정한 MRS 액체배지에 pepsin(Sigma Co., U.S.A.) 1,000 units/ml를 첨가하여 사용하였다. MRS 액체배지에서 30°C 24시간 배양된 균주를 원심분리(9,950×g, 5 min)하여 회수한 다음 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액 또는 제조된 인공위액을 각각 초기 배양액과 동량으로 첨가하여 현탁한 후 30°C에서 2시간 반응하였다. 2시간 반응 후 생균수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 비교하였다.

### 인공담즙 저항성

실험균주의 인공위액 처리전 배양액과 인공위액 저항성 시험을 거친 배양액을 각각 0.3%, 0.5%(v/v) oxgall이 함유된 인공담즙에 대한 저항성을 실험하였다. 인공담즙의 조제는 MRS 액체배지에 0.45 μm filter(Milipore Co., U.S.A.)로 여과 제균된 oxgall(Sigma Co., U.S.A.) 용액을 0.3%, 0.5%로 첨가하여 사용하였다[12, 30]. 유산균 배양액은 원심분리(9,950×g, 5 min)하여 상징액을 제거하고 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 조제된 인공담즙액을 제거한 배양 상징액과 동량 첨가하여 이를 현탁 시킨 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 생균수{colony forming unit(CFU)/ml}를 측정하여 인공담즙에 대한 저항성을 비교하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회씩 수행하였으며, SPSS 12.0.1(Statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 평균값과 표준편차범위로 나타내었다. 결과는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 Tukey (T)-test에 의하여 실행하였다. 통계적 유의성은 $P<0.05$를 기준으로 하였다.

### 항균활성 측정

분리 유산균의 항균활성은 균체를 직접 가하는 direct method[24]를 사용하여 항균활성을 1차 확인 후, 배양 상징액을 paper disk에 가하여 생육 저해환을 관찰하는 paper disk assay[19]를 사용하여 항균활성을 측정하였다. 먼저 direct method를 사용하여 유해균주를 $10^5$~$10^6$ CFU/ml 농도로 LB 고체배지에 도말하여 여기에 직경 5 mm로 구멍을 내고 그 구멍에 분리균주를 soft-agar에 함유시켜 넣어 30°C에서 24시간 배양한 후 유해균주에 대한 생육 저해환을 조사하여 항균활성 유무를 관찰하였다. Paper disk assay는 유해균주를 $10^5$~$10^6$ CFU/ml 농도로 LB 고체배지에 도말하여 여기에 분리 유산균을 제균한 배양 상징액 100 μl를 paper disk(Advantec Co., Japan)에 점적하였다. 이를 30°C에서 24시간 배양하여 disk 주위의 유해균주에 대한 생육저해환의 크기를 측정하였다. 분리 유산균의 항균활성 실험에 사용된 유해균주는 *Escherichia coli* O-157 ATCC 43895를 포함한 총 9종의 gram 양성 및 음성균주의 ATCC(American Type Culture Collection) 공시균주를 사용하였다. 사용한 공시균주는 Table 1에 나타내었다.

### Hemolysis test

분리 유산균이 *H. pylori*에 대하여는 생육 억제활성이 있으나 인체에 대하여는 용혈성 독성이 없음을 확인하기 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 분리 유산균을 streaking 한 후 30°C에서 48시간 배

**Table 1. Antimicrobial activity of *Lb. plantarum* NO1.**

| Group | Indicator | Activity |
|---|---|---|
| Gram (+) | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | +++ |
| | *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 | - |
| | *Streptococcus mutans* ATCC 25175 | ++ |
| | *Micrococcus luteus* ATCC 13513 | ++ |
| | *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 | - |
| | *Listeria monocytogenes* ATCC 19113 | - |
| Gram (-) | *Salmonella typhi* ATCC 19430 | +++ |
| | *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 | +++ |
| | *Escherichia coli* O-157 ATCC 43895 | +++ |

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degre of clarity of clear zone by growth inhibition: +; 7.85~10.75 mm, ++; 10.76~13.65 mm, +++; 13.66~16.55 mm, ++++; 16.56~19.43 mm, -; no inhibition zone.

양하여 균체 주위에 투명환의 생성여부로 용혈성을 판단하였다. 용혈을 일으키는 양성반응 대조군으로는 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### *H. pylori* 억제 유산균주의 분리 및 동정

김치로부터 분리된 31종의 유산균 중 paper disk assay를 통한 *H. pylori* 생육억제 활성 실험에서 *H. pylori* KCCM 41756에 대하여 가장 뚜렷하고 커다란 생육억제환을 나타내는 1종의 유산균을 최종 선발하였다. MRS 고체배지에서 분리균주의 집락은 연노랑색의 둥근 모양으로 집락표면은 매끈한 형태를 나타내었다. 선발된 분리균주는 그람양성의 간균으로 catalase 음성이었으며, 50CHL API kit을 통한 분리균주의 대사능 실험 결과 *Lactobacillus plantarum*과 높은 유사성을 나타내었다(data not shown). 분리균주의 16S rRNA 염기서열(1,379 bp) 분석결과 *Lactobacillus plantarum* AY675256과 99%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 이상의 결과로부터 분리된 균주는 최종 *Lactobacillus plantarum* NO1로 명명하였다.

### *H. pylori* 생육 저해 활성

유산균의 *H. pylori*생육저해 기능은 유산균이 생성하는 *H. pylori*에 대한 항균물질과 젖산에 의한 낮은 pH 등의 복합적인 작용이라고 알려지고 있다[20, 29]. Modified MRS배지에서 유산균 배양 후 배양 상징액에 의한 *H. pylori* 생육저해능을 paper disk법으로 관찰하였다(Fig. 2). 실험 유산균 3종 중 *H. pylori* KCCM 41756에 대한 *Lb. plantarum* NO1의 억제환의 크기는 21.83±0.29 mm 였으며 이때 균체 배양액의 pH는 약 pH 3.8였다. *Lb. rhamnosus* GG는 17.32±0.31 mm, *Lb. sakei* SI3는 16.11±0.12 mm의 저해환을 나타내었으며(Fig. 2-A) 이때 균체 배양액의 pH는 각각 약 pH 3.9, pH 4.0이었다. 이러한 결과가 단순한 pH의 영향인지 알아보기 위하여 유산균 배양 상징액을 모두 pH 4.2로 보정하여 동일한 pH하에서 *H. pylori*저해 활성을 관찰하였을 때 *Lb. plantarum* NO1의 억제환의 크기는 15.72±0.29 mm였으며 *Lb. rhamnosus* GG 13.47±0.25 mm, *Lb. sakei* SI3 10.35±0.31 mm의 순서로 저해환을 나타내었다(Fig. 2-B). 대조구로서 5 N HCl을 사용하여 pH 4.2로 보정된 MRS 배지의 억제환은 Fig. 2-B-①에서 보여지는바와 같이 투명환이 아닌 뿌연 저해환을(14.15±0.35 mm) 나타내었다. 유산균 배양액의 pH보정 시 pH 4.2 보다 높은 pH로 보정한 경우는 모든 실험구에서 *H. pylori*생육 저해 활성이 거의 나타나지 않아(data not shown) 보정 pH는 pH 4.2로 정하였다. *H. pylori*저해 활성은 낮은 pH 일수록 더 강한 저해활성을 나타내었다. 그러나 모든 실험구에서 동

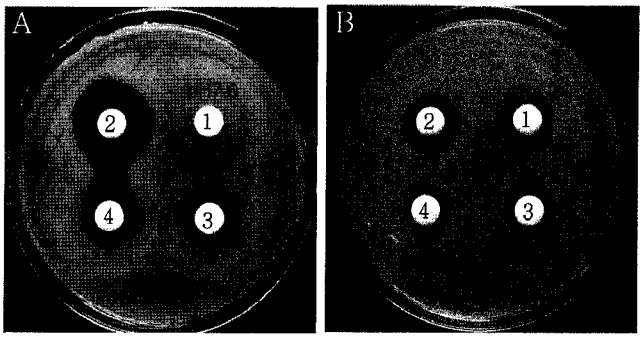


**Fig. 2. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *H. pylori* KCCM41756.** A. culture supernatant without pH-adjusted. B. culture supernatant with pH-adjusted (pH 4.2). 1; control (MRS), 2; *Lb. plantarum* NO1, 3; *Lb. rhamnosus* GG, 4; *Lb. sakei* SI3.

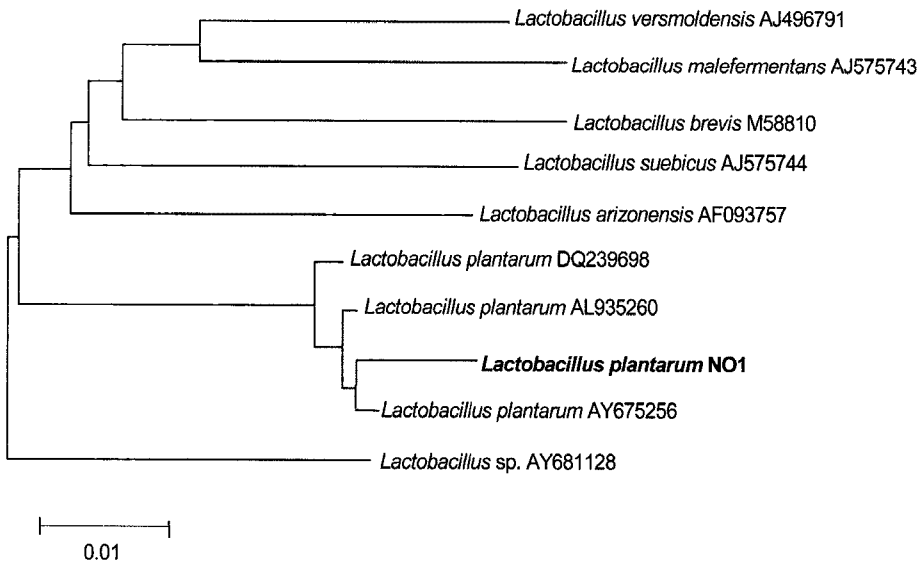


**Fig. 1. Phylogenetic relationship between *Lactobacillus plantarum* NO1 and other related bacteria based on 16S rRNA sequence.**

일한 pH(pH 4.2)로 보정한 실험에서 유산균에 따라 *H. pylori*저해 활성능이 다르다는 것을 알 수 있었으며, 특히 *Lb. plantarum* NO1의 *H. pylori*저해력이 가장 큰 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 유산균의 *H. pylori*생육 저해 활성은 유산균이 생산하는 *H. pylori*생육 저해능 항균물질과 함께 산에 의한 낮은 pH의 복합적 작용임을 확인할수 있었고 *H. pylori*에 대한 항균물질은 pH 4.2 이하의 낮은 pH의 조건에서 그 항균작용이 더 안정되게 나타남을 알수있었다.

### *H. pylori* urease 억제 활성

*H. pylori*가 분비하는 urease는 위액의 강한 산성 조건에서도 pH를 상승시켜 *H. pylori*가 살 수 있도록 도와주는 것으로 알려져 있다[1, 32]. 따라서 유산균의 *H. pylori* urease의 활성 저해능은 *H. pylori*의 생육 억제효과를 간접적으로 측정할 수 있는 척도가 된다. *H. pylori* 배양액에 유산균 배양액을 2 μg/ml 농도로 첨가 시에는 *Lb. plantarum* NO1이 *H. pylori*만 배양한 구간에 비하여 평균 약 40% 이상 더 높은 urease 활성 억제력이 나타났고 *Lb. rhamnosus* GG와 *Lb. sakei* SI3은 약 30% 이상의 더 높은 urease 활성 억제력을 나타내었다(Fig. 3). *H. pylori* 배양액에 유산균 배양액을 4 μg/ml 농도로 첨가 시 에는 *Lb. plantarum* NO1의 urease 활성 억제력이 유산균 배양액 무첨가 때보다 평균 약 60% 이상 더 높게 나타났고, *Lb. rhamnosus* GG(59%), *Lb. sakei* SI3(49%) 순으로 *H. pylori*활성 억제 활성 차이를 보였다(Fig. 4). Urease 활성 억제력이 가장 큰 *Lb. plantarum* NO1과 가장 작은 *Lb. sakei* SI3의 urease 활성 억제력 차이는 10% 이상임을 확인할 수 있었다. 유산균 배양액의 *H. pylori*에 대한 urease 활성 억제력은 유산균 배양액을 2 μg/ml 농도로 첨가 때보다 4 μg/ml 농도로 첨가 시 약 1.5~2배 이상 향상되는 것을 확인하였다.

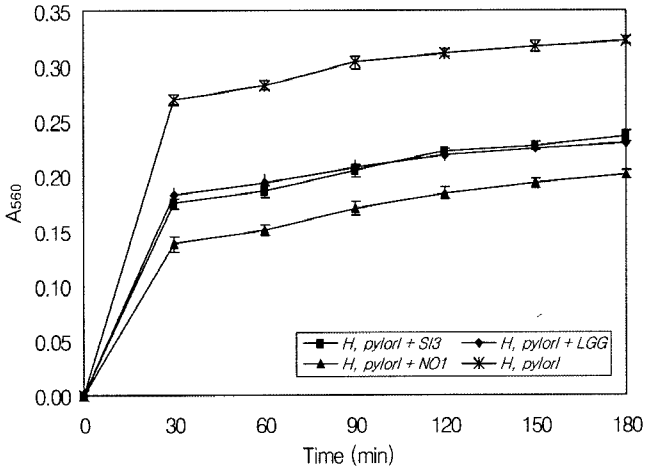


**Fig. 3. Inhibition of *H. pylori* on urease activity in the presence of 2 μg/ml of bacterial culture medium.** All values were means ± SD of three independent experiments.

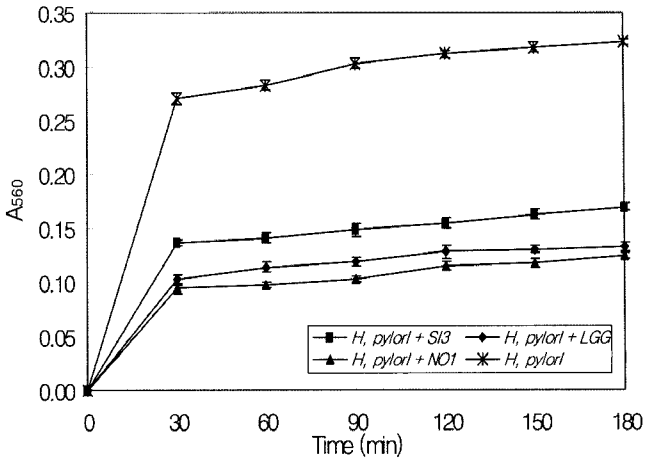


**Fig. 4. Inhibition of *H. pylori* on urease activity in the presence of 4 μg/ml of bacterial culture medium.** All values were means ± SD of three independent experiments).

### *H. pylori*의 탈착 반응

최근 *H. pylori*의 세균학적 특성을 고려하여 *H. pylori*가 위점막에 부착하는 것을 방지하기 위하여 3'-sialyllactose 등의 항부착 물질을 투여하는 새로운 *H. pylori*제균 치료법들이 대두되고 있다[27]. *H. pylori*가 위점막에 부착하는 것을 억제하는 것이 감염 치료의 관점에서 의미가 있다면 부착을 저해하는데서 더 나아가 유산균 배양액을 처리하여 위벽 세포에 이미 부착된 *H. pylori*를 탈착시킬 수 있다면 *H. pylori* 제균 치료로서 응용이 가능 할 것이다. Probiotics에 의한 병원성 미생물의 부착억제 효과는 크게 네가지 작용기작에 의해 나타난다고 보고되고 있다[21]. (1) 젖산과 같은 산 생성에 의한 장관 내 pH의 저하, (2) 병원성 미생물에 직접적으로 작용하는 항균물질의 작용, (3) 병원성 미생물과 부착세포 결합 및 수용부위에 대한 경합, 그리고 (4) 부착세포에 대한 면역기능 자극이 그것이다.

이러한 관점에서 위세포에 부착된 *H. pylori*에 유산균 배양액을 처리하여 위암세포주인 AGS ATCC CRL-1739에 부착된 *H. pylori*탈착이 가능한지를 알아보았다. AGS에 *H. pylori*를 먼저 부착시킨 후, *H. pylori*가 부착된 AGS세포 배양액에 *Lb. plantarum* NO1과 *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. sakei* SI3의 배양액을 0, 7, 14, 21, 28 μg/ml 농도로 각각 첨가하여 2시간 동안 처리 후 위세포에서 탈착되지 않고 잔존하는 *H. pylori*양을 *H. pylori*의 urease activity로 측정하였다. *H. pylori*가 부착된 AGS 세포에 유산균 배양액을 7~28 μg/ml 농도로 첨가 시 *Lb. plantarum* NO1은 33~44% *Lb. rhamnosus* GG는 29~36%, *Lb. sakei* SI3는 22~34%의 탈착효과를 나타내었다(Fig. 5-A). 즉 인간 위세포에 부착되어있던 *H. pylori*의 탈착능이 가장 높은 *Lb. plantarum* NO1과 *Lb. rhamnosus* GG의 *H. pylori* 탈착능 차이는 평균 5% 이상 이였고, *Lb. sakei* SI3와는 9% 이상의 탈착능 차이를 나타냄을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 우수한 프

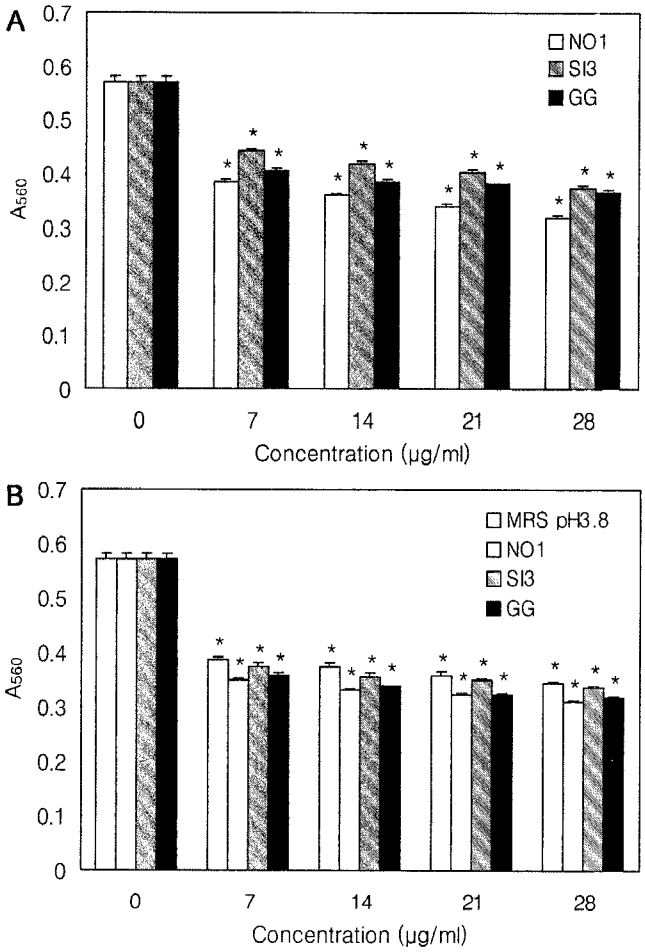


**Fig. 5. Detachment of *H. pylori* from AGS in the presence of bacterial culture medium.** All values were means ± SD of three independent experiments. Significant differences were compared with control of $^{*}P<0.05$ by T-test.

로바이오틱스로 보고되어[2] 시판 요구르트 종균으로 널리 사용되는 *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. sakei* SI3 및 *Lb. plantarum* NO1에 대해 위세포로부터의 *H. pylori*탈착능을 비교하였을때 *Lb. plantarum* NO1이 가장 높은 *H. pylori*탈착능을 나타냄을 알 수 있었다.

Fig. 5-B에서는 *H. pylori*탈착능에 미치는 유산균 배양액의 pH 영향을 조사하였다. 3종의 유산균 중 *H. pylori*탈착능이 가장 우수하지만 가장 낮은 pH를 나타내는 *Lb. plantarum* NO1의 배양후 pH인 pH 3.8로 각각의 유산균 배양액을 보정하여 유산균 배양액의 위세포로부터 *H. pylori*탈착능을 측정하였다. 이때 대조구로는 pH 3.8로 조정된 MRS 액체배지를 사용하였다. *H. pylori*가 부착된 AGS 세포에 pH 3.8로 보정된 유산균 배양액을 7~28 μg/ml 농도로 첨가 시 *Lb. plantarum* NO1은 36~45%, *Lb. rhamnosus* GG는 35~44%, *Lb. sakei* SI3는 34~41%의 *H. pylori*탈착효과를 보였다. 이로부터 동일한 pH(pH 3.8)에서도 *H. pylori*탈착능은 *Lb. plantarum* NO1이 가장 뛰어남을 알 수 있었다. MRS 액체배지의 pH가 6.8이면 *H. pylori* 탈착능은 관찰되지 않았으나(data not shown), pH 3.8로 보정된 MRS 액체배지는 (Fig. 5-B-▨) *H. pylori*가 위세포에 부착된 정도를 약 32~40%정도 감소시키는 효과를 나타내었다. 이는 낮은 pH의 영향으로 *H. pylori* 생육저해작용이 일어난다는 보고들과 [20, 28] 일치하며, 본 연구에서 *H. pylori* 생육저해 활성 실험 결과(Fig. 2)와도 일치하는 결과이다. 이상의 연구 결과로부터 *Lb. plantarum* NO1 배양액에 의한 AGS위암세포에서 *H. pylori*를 탈착시키는 현상은 낮은 pH의 작용과 더불어 *Lb. plantarum* NO1 배양액의 *H. pylori*에 대한 항균작용에 의한 복합적인 작용임을 알 수 있었다.

### 장내 생존 가능성

유산균이 프로바이오틱스로 정장작용의 효능을 발휘하기 위해서는 일단 소화관 내에서 생존하여야 한다. 따라서 구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액과 십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다. *Lb. plantarum* NO1의 산 저항성을 검토한 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 MRS 배지에서 30°C, 24시간 동안 배양된 분리균주는 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액이나 인공위액(pH 3.0)에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 생균수 $4.0\times10^{9}$, $4.2\times10^{9}$ CFU/ml를 유지하며 약 99% 이상의 생존율을 나타내어 높은 내산성을 보였다(Fig. 6-A, B). 이는 위에서 생존하여 장으로 이동할 수 있는 가능성을 제시한 결과라 할 수 있다. 순수한 위액의 pH는 1.4~2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 되지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인하여

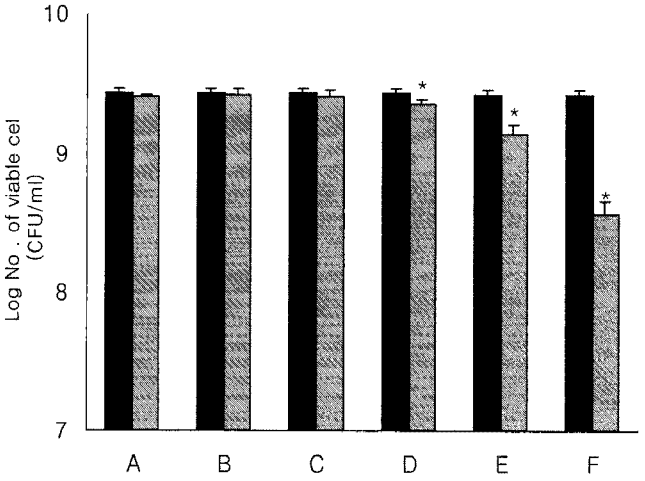


**Fig. 6. Acid and bile tolerance of *Lb. plantarum* NO1.** All values were means ± SD of three independent experiments. Acid tolerance of *Lb. plantarum* NO1 in 0.05 M sodium phosphate A; artificial gastric juice of pH 3.0, B; Bile tolerance of *Lb. plantarum* NO1 against 0.3%, C; 0.5%, D; oxgall and 0.3%, E; 0.5%, F; oxgall after treatment for 2 h in artificial gastric juice of pH 3.0. Cells were precultured in MRS medium at 30°C for 24 h (■) → treated in test solution (▨). Significant differences were compared with control of $^{*}P<0.05$ by T-test.

위의 pH가 높아진다는 것을[31] 고려한다면 생존율은 더욱 높아질 것으로 생각된다.

인공담즙에 대한 내성은 실제로 프로바이오틱스 생균으로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도(0.6 g/l)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다[25]. 0.3%와 0.5% oxgall의 인공담즙 내성 실험에서 *Lb. plantarum* NO1은 각각 생균수 $3.9\times10^9$, $3.5\times10^9$ CFU/ml를 유지하였다(Fig. 6-C, D). 섭취된 유산균은 실제로 위를 통과하여 장으로 이동되는 것임을 고려하여 분리균주를 인공위액에서 2시간 처리한 후, 0.3% oxgall의 인공담즙을 처리하였을 때 *Lb. plantarum* NO1은 생균수 $1.4\times10^9$ CFU/ml를 나타내어 생존율 97% 이상을 유지하여 높은 담즙액 저항성을 나타내었으며(Fig. 6-E), 0.5% oxgall의 인공담즙을 처리하였을 때는 생균수 $5.6\times10^8$ CFU/ml를 나타내어 생존율 90%이상으로 0.3%의 인공담즙을 처리하였을 때 보다 생균수 약 7% 감소현상을 보였다(Fig. 6-F). 정 등[6]이 보고한 동치미에서 분리한 유산균이 인공위액에서 저항성이 높은 반면 인공담즙에서의 생존율이 6%로 나타난 점에 비하면 본 연구에서의 분리균주 *Lb. plantarum* NO1은 높은 내산성의 기능을 지니면서 동시에 담즙에 대한 저항성을 나타내어 프로바이오틱스로 활용될 수 있는 기능을 갖추었다고 할 수 있다.

### 항균활성 측정

Table 1에서 보는 바와 같이 *Lb. plantarum* NO1의 항균활성은 *Escherichia coli* O-157 ATCC 43895외 5종의 공시균주에 대하여 나타났으며, 특히 *Salmonella typhi* ATCC 19430과 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* O-157 ATCC 43895와 같은 유해세균에 대해서 강한 항균활성을 나타내었다. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 19113에 대해서는 항균활성이 관찰되지 않았다. 유해미생물에 대한 우수한 항균활성을 보이는 *Lb. plantarum* NO1의 이러한 특성은 *H. pylori*저해라는 특수한 기능뿐 아니라 정장용 프로바이오틱스로 활용 될 수 있는 우수한 특성으로 기대된다.

### Hemolysis test

용혈작용은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는 비정상적인 작용이다[15]. 생체 내 용혈현상은 주로 비장, 간장, 골수세포 내 피계 세포에서 일어난다. 용혈 결과 적혈구의 산소운반 기능이 없어져 생체내에 치명적인 결과를 가져온다. *Lb. plantarum* NO1은 Fig. 7의 용혈성검사에서 균체주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환을 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않았다. 대조군으로 사용한 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113은 균체주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환을 생성하여 용혈반응을 일으켜 유해균주임을 나타내었다. 유산균은 GRAS 등급 미생물로 안전하고 유익한 균종임이 이미 밝혀져 있으나[24, 28] 본 연구에서는 김치로부터 분리된 신규한 *Lb. plantarum* NO1이 유해균에 대하여 항균작용은 있으나 용혈성과 같은 유해 작용이 전혀 없음을 검증하였다.

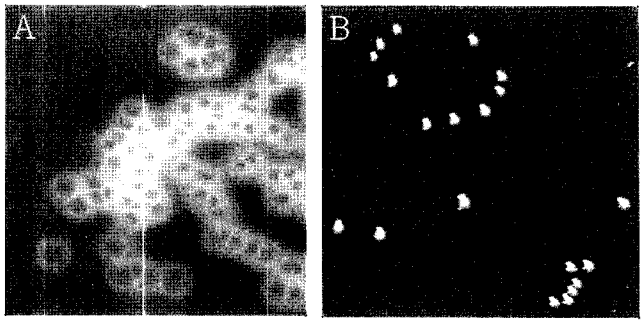


**Fig. 7. Hemolysis test of *Lb. plantarum* NO1.** A. *Listeria monocytogenes* ATCC 19113, B. *Lb. plantarum* NO1.

## 요 약

김치로부터 강력한 *H. pylori* 생육 저해활성을 보이는 균주를 분리, 동정하여 *Lb. plantarum* NO1으로 명명하였다. *Lb. plantarum* NO1은 *H. pylori*뿐만 아니라 그람 양성균 및 그람 음성균들에 넓은 범위의 저해활성을 나타내었다. *Lb. plantarum* NO1의 배양 상징액을 *H. pylori* 배양액에 첨가한 후 *H. pylori*의 urease 활성을 측정한 결과 *Lb. plantarum* NO1의 강한 urease 억제활성(40~60% 저하)을 확인할 수 있었다. AGS위암 세포주에 *H. pylori*를 부착시킨 후 *Lb. plantarum* NO1의 배양액을 첨가하여 AGS세포에서 *H. pylori*탈착능을 측정한 결과 *Lb. plantarum* NO1은 유산균 배양액 무첨가보다 33% 이상 높은 *H. pylori* 탈착능을 나타내었으며, 비교구로 사용된 *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. sakei* SI3에 비해 더 우수한 *H. pylori*탈착능을 나타내었다. 분리균주의 장내 생존성 여부 확인을 위하여 내산성, 인공위액에서 2시간동안 처리한 결과 *Lb. plantarum* NO1이 초기균수($10^9$ CFU/ml)를 유지하면서 높은 저항성을 나타내었다. Oxgall 농도 0.3%와 0.5%의 인공담즙에서 24시간 처리한 후에도 초기균수($10^9$ CFU/ml)를 유지하였다. 뿐만 아니라 인공위액에서 생존한 균주를 연속적으로 인공담즙으로 처리하였을 때에도 높은 생존율($10^8$~$10^9$ CFU/ml)를 유지하였다. *Lb. plantarum* NO1의 용혈성 반응 유무 결과 용혈반응이 일어나지 않았으므로 인체에 안전하다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 본 연구에서 김치로부터 분리한 *H. pylori*억제 유산균 *Lb. plantarum* NO1은 장내에 생존 가능성도 높으며,

동시에 위에서 효과적으로 *H. pylori*를 억제 할 수 있을 것으로 기대되어진다.

## REFERENCES


1. 정후길, 김응률, 전선락. 2001. *Helicobacter pylori*의 생육을 특이적으로 억제하는 유산균 선발. 한국미생물학회. **37**: 151-157.
2. Armuzzi, A., F. Cremonini, F. Bartolozzi, F. Canducci, M. Candelli, V. Ojetti, G. cammarota, M. Anti, A. De Lorenzo, P. Pola, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. 2001. The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* **15**: 163-169.
3. Bae, E. A., D. H. Kim, and M. J. Han. 2000. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Bifidobacterium* spp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 532-534.
4. Baek, Y. J. 1993. Lactic acid bacteria and human health. *Kor. J. Food Nutr.* **6**: 53-65.
5. Chou, L. S. and B. Weimer. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **82**: 23-31.
6. Chung, W. B., W. S. Soe, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2003. Isolation and characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for probiotics production from korean dongchimi. *Kor. J. Food Preserv.* **10**: 406-410.
7. Coconnier, M. H., V. Lievin, E. Hemery, and A. L. Servin. 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4573-4580.
8. Drahoslava, L., C. Irene, and L. Andre. 2007. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J. Nutr.* **137**: 812-818.
9. Kang, J. H. and M. S. Lee. 2005. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Enterococcus faecium* GM-1. *Can. J. Microbiol.* **51**: 629-636.
10. Kil, J. H., K. O. Jung, H. S. Lee, I. K. Hwang, Y. J. Kim, and K. Y. Park. 2004. Effects of kimchi on stomach and colon health of *Helicobacter pylori*-infected volunteers. *J. Food Sci. Nutr.* **9**: 161-166.
11. Kim, E. A., S. C. Baick, and W. H. Chung. 2002. A study on growth inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by lactic acid bacteria. *J. Anim. Sci. Technol.* **44**: 491-498.
12. Kim, H. J. and H. C. Chang. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 196-203.
13. Kim, N. Y. 2006. The effect of antibiotic resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Gastroenterol.* **47**: 82-86.
14. Kim, T. S., J. W. Hur, M. A. Yu, C. I. Cheigh, K. N. Kim, J. K. Hwang, and Y. R. Pyun. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food Protection.* **66**: 3-12.
15. Kim, Y. M., U. K. Park, J. S. Mok, and D. S. Chang. 1995. Physiological characteristics of *Listeria monocytogenes* YM-7. *J. Kor. Fish Soc.* **28**: 443-450.
16. Kobayashi, Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 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.
17. Koo, J. K. and T. B. Choe. 2001. Studies on adherance inhibition and detachment of *Helicobacter pylori* using egg yolk Igy and additives. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 41-47.
18. Lee, H. M. and Y. H. Lee. 2006. Isolation of *Lactobacillus plantarum* from *kimchi* and its inhibitory activity on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1513-1517.
19. Lee, H. S. and M. J. No. 1997. Viablility in artificial gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 617-622.
20. Lee, H. S., S. H. Park, H. K. Chung, and T. B. Choe. 1993. Antitumor effect of cell wall component purified from *Lactobacillus plantarum* KK. *J. Gen. Eng.* **5**: 22-28.
21. Lee, S. Y. 2006. Usefulness of probiotics against *Helicobacter pylori*. *Safe. Food.* **1**: 44-52.
22. Lee, Y. 2007. Isolation and characterization of lactic acid bacteria showing anti-cancer activity and anti-*Helicobacter pylori*. M. S. Thesis, Chosun University.
23. Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo, and M. L. Grayson. 1995. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 475-479.
24. Moon, K. H., P. B. Park, and J. W. Yoon. 2005. Inhibiton activity and charaterization of lactic acid bacteria from pig feces. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **20**: 76-83.
25. Paik, H. D., M. Y. Jung, H. Y. Jung, W. S. Kim, and K. T. Kim. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 73-78.
26. Park, J. G., S. Y. Yun, S. Oh, J. G. Shin, and Y. J. Baek. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from korean breast-fed infant. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**: 1244-1247.
27. Park, M. J., J. S. Kim, J. Y. Yim, H. C. Jung, I. S. Song, E. S. Yu, J. J. Lee, C. S. Huh, and Y. J. Baek. 2001. The suppressive effect of a fermented milk containing *Lactobacilli* on *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Kor. J. Gastroenterol.* **38**: 233-240.
28. Rokka, S., A. Pihlanto, H. Korhonen, and V. Joutsjoki. 2006. *In vitro* growth inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacilli* belonging to the *Lactobacillus plantarum* group. *Appl. Microbiol. Lett.* **43**: 508-513.
29. Servin, A. L. 2001. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection by the lactic acid bacteria. *J. Kor. Public Health. Assoc.* **27**: 5-12.
30. Shin, M. S., J. J. Lee, S. H. Na, H. S. Bae, C. S. Huh, and Y.

J. Baek. 1998. Characteristics of *Bifidobacterium* spp. isolated from korean feces for probiotics. *Kor. J. Dairy Sci.* **20**: 273-282.

31. Sim, J. H., S. J. Oh, S. K. Kim, and Y. J. Baek. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 101-104.
32. Won, B. R., E. H. Song, G. H. Kang, M. W. Chang, and Y. H. Yoon. 2001. Inhibitory effect of *Lactobacillus heiviticus* CU631 on urease and vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori*. *J. Anim. Sci. Technol.* **43**: 931-940.

**(Received Mar. 29, 2008/Accepted May 21, 2008)**