

## *Helicobacter pylori*의 생육을 특이적으로 억제하는 유산균 선발

정후길\* · 김응률 · 전석락

매일유업(주) 중앙연구소

위염 및 위궤양, 십이지장궤양, 위암의 주요한 발병 원인균으로 알려져 있는 *Helicobacter pylori*의 생육을 특이적으로 억제하는 유산균을 선발하기 위해서, 45종의 유산균에 대하여 paper disk법을 이용한 항균 효과, Caco-2 세포에 대한 정착능, urease activity법을 이용한 *H. pylori* 억제능 등을 파악하고, 유산균 배양액과 *H. pylori*의 동시배양에 따른 요소 분해효소의 활성 변화와 우유 발효능 등을 실험하였다. *H. pylori*의 생육을 억제하는 물질의 생성 유무를 확인하기 위하여 paper disk법으로 유산균 배양액에 의한 *H. pylori*의 생육 억제력을 측정하고, 28종의 유산균에서 생육 억제력이 형성되었다. 대부분이 유산 생성에 의한 낮은 pH 때문인 것으로 판단되지만, 일부 균종에서는 항균성 물질에 의한 억제력이 형성되었다. 다른 유산균에 비해서 생육 억제력이 가장 큰 *Lactobacillus gasseri* MK-03 균주가 *H. pylori*에 대한 항균 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 항균 활성을 나타낸 28종의 유산균을 대상으로 Caco-2 세포에 대한 정착능을 실험한 결과, 18종의 유산균에서 정착능이 확인되었으며, *Bifidobacterium longum* MK-26 균주가 가장 우수한 것으로 나타났다. 특히 반응 2시간 전에 미리 Caco-2 세포에 정착시켰을 때, *H. pylori*의 정착율은 0.105%에서 0.004%로 감소되었다. 한편 요소 분해효소 활성을 저해하여 *H. pylori*를 억제하는 유산균을 선발하기 위해서 항균 활성이 인정되는 28종의 유산균을 대상으로 실험한 결과, 21종의 유산균에서 요소 분해효소 활성의 저해 효과가 나타났으며, 이 중에서 *Lb. acidophilus* MK-07 균주가 가장 우수한 것으로 판명되었다. 따라서 *Lb. gasseri* MK-03 균주는 항균 활성에서, *Lb. acidophilus* MK-07 균주는 요소 분해효소의 활성 억제에 의해서, *Bif. longum* MK-26 균주는 정착능 저해에 있어서 각각 우수한 *H. pylori* 생육 억제능을 나타냈다. 한편 최종적으로 선발된 3종의 유산균과 대조균주로서 13종의 유산균에 대해서 우유 배양실험을 실시한 결과, 3종의 선발균주 모두가 발효 유 제품에의 응용 적합성을 나타냈다.

**Key words** □ antibacterial activity, Caco-2 cell adherence, *H. pylori* inhibition, milk fermentation feasibility, probiotics, urease activity

19세기부터 사람의 위에는 구부러진 나선형의 세균이 존재하는 것으로 알려져 왔지만 배양이 불가능하여 오랫동안 무시되어 왔는데, 1983년에 처음으로 순수배양에 성공하여 *Campylobacter*로 명명되었다(27). 그후 *Campylobacter*와의 차이점이 발견되면서 *H. pylori*로 분류되었으며, 현재까지 사람과 동물에서 분리되는 *H. pylori*와 유사한 14종류가 보고되어 있다. 한편 만성위염, 위궤양, 소화성궤양, 위암 등의 발생과 밀접하게 관련되는 것으로 알려지면서 *H. pylori*에 대한 연구가 크게 주목을 받고 있다(2,12,17,19,28). 즉, 미국이나 호주의 *H. pylori* 감염 상황은 20세에 약 20%, 50대 및 그 이상에서도 50% 이하인데 반하여, 우리나라 정상인의 *H. pylori* 감염율은 44.8%로서 만19세 이상의 성인에서는 57.8%, 19세 미만의 소아에서는 15.3%를 나타냈다. 한편 연령별 *H. pylori*의 혈청학적 양성율은 연령이 증가함에 따라서 유의한 차이를 보이는데, 20대에서 급격히 증가하는 양상을 나타내며 이후의 연령층에서는 별다른 차이를 나타내지 않는다(1). *H. pylori* 자체는 산에 민감하지만, 요소 분해효소를 분비해서 요소를 분해하여 암모니아와 이산화탄소를 생성하기 때문에

위 내의 강한 산성 조건에서도 살아남을 수 있게 된다(23). 이러한 암모니아 생성과 더불어 여러가지 인자가 *H. pylori*의 위내 서식을 가능하게 한다(26). 즉, 단극성 편모는 *H. pylori*를 신속하게 점질층으로 이동할 수 있게 하기 때문에 산성 위 내에서 오랫동안의 노출을 피할 수 있게 한다. 이러한 운동성이 없다면 *H. pylori*는 위에서 서식할 수 없게 된다. 한편 *H. pylori*가 숙주 선호성을 나타내는 이유로서는 상피세포에의 정착성을 들 수 있는데, 이러한 정착성은 *H. pylori*가 위 내에서 병원성을 일으키는 최초의 단계라고 할 수 있다(5,13,22,25).

최근에 각종 호흡기 및 위장과 관련된 질병을 일으키는 병독원에 대응하기 위한 수동면역이 임상적으로 널리 사용되고 있으며, 사람이나 동물 유래의 항체를 경구투여하여 감염을 예방 및 치료하는 방법이 점진적으로 시도되고 있다(10). 이러한 IgY (immunoglobulin-yolk) 계란 항체는 위궤양의 원인균으로 알려져 있는 *H. pylori* 등의 여러가지 전염성 세균에 대한 면역 기능, 유아의 rotavirus 설사 예방, 충치 예방, 어류의 질병 치료 등에 유용하게 사용되고 있다(14). 한편 田中 등(3)은 위궤양의 원인균으로 알려져 있는 *H. pylori*에 대한 특이적 IgY 항체가 *H. pylori*의 위 점막 mucin에의 정착을 저해한다고 밝혀냈다.

국내에서의 *H. pylori* 감염 치료에 대한 표준 처방은 위산 억제제인 omeprazole, penicillin 계열의 항생제인 amoxicillin, 그리

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 031-660-9144, Fax: 031-668-0247  
E-mail: hkjung@maeil.com

고 erythromycin과 유사한 항생제인 clarithromycin을 하루 2회 1주일동안 복용하는 것이지만, 그 치료율은 80%에 불과하다. 따라서 *H. pylori* 치료를 위해서 항생제를 장기간 투여하는 것 외에 다른 부작용은 물론, 항생제 내성 균주를 증가시킨다는 심각한 문제가 발생하게 된다. 그러나 프로바이오틱 유산균은 *H. pylori*에 직접적으로 작용하거나, 항생제와 수반된 임상적 부작용을 저하시키면서 *H. pylori*에 대한 치료 역할을 하게 된다(6,7).

실제로 Kabir 등(15)은 이미 유산균이 정착하고 있는 무균쥐의 위에서 *H. pylori*는 서식할 수 없지만, 군수가 많으면 서식이 가능하고 그에 따라서 무균쥐의 활동성 위염을 야기시킨다고 보고하였다. 그러나 이미 정착하고 있는 유산균에 의해서 *H. pylori*의 감염을 예방할 수 있다는 사실은 *H. pylori*를 억제하는데 있어서 유산균을 사용할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 한편 Aiba 등(4)은 무균쥐 모델을 이용하여 *H. pylori*의 감염 후에 투여된 유산균이 *H. pylori*의 정착을 억제하거나 제거할 수 있는지의 여부를 규명하였다. 그 결과 경구투여된 *Lb. salivarius*가 유산을 생성하여 *H. pylori*를 효율적으로 억제할 수 있다는 것을 밝혀냈다.

결국 프로바이오틱 유산균이 *H. pylori*의 생육을 억제하기 위해서는 기본적으로 항균 활성, 정착성, 내산성, 유산 생성능, 요소 분해효소의 활성 저하능 등이 우수하여야 한다. 따라서 본 연구에서는 유산균의 항균 효과, 정착능, 요소 분해효소의 활성 저하능 등을 파악하여 *H. pylori*에 대한 생육 억제능 효과가 우수한 프로바이오틱 유산균주를 선발하고, 우유 발효성과 안정성을 확인하여 발효유 제품에 이용하는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

본 실험에는 현재 산업적으로 널리 사용되고 있는 유산균주, 표준균주 및 매일유업(주) 중앙연구소에 보존 중인 *Lactobacilli* 22종, *Streptococci* 7종, *Bifidobacteria* 16종을 사용하였다. 실험에 사용된 *Streptococci*는 M-17 broth (Difco, USA)에서 37°C, 24시간동안 호기적으로 배양하였으며, *Lactobacilli*와 *Bifidobacteria*는 modified MRS broth (0.05% L-cysteine-HCl, 0.01% calcium chloride, 0.02% sodium carbonate 함유; Difco, USA)에서 37°C, 24시간동안 혐기배양하였다. 한편 대조균주로 사용한 *H. pylori*는 BHI agar (0.25% yeast extract, 10% horse serum, 0.4% *Campylobacter* selective complement 함유; Difco, USA)에서 37°C, 24시간동안 10% CO<sub>2</sub> incubator (Forma Scientific, USA)에서 배양하였다.

### 유산균 배양액의 처리

Paper disk법과 urease activity 저하능 실험을 위해서 각각의 유산균 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 취한 후, 성장 정도를 간접적으로 알아보기 위하여 pH를 측정하였다. pH에 의한 실험오차를 줄이기 위하여 2N NaOH 또는 lactic acid를 사용하여 pH를 4.4로 보정하였으며, 0.45 µm syringe filter (Millex-HV, Millipore, France)로 여과하여 실험에 사용하였다.

### 항균 활성

Paper disk법을 사용하여 *H. pylori*에 대한 유산균의 항균 활성을 측정하기 위한 실험 조건은 다음과 같다. 미리 준비된 유산균 배양액 60 µl를 *H. pylori* 균주가 표면도말된 modified Colombia agar (7% horse serum, 0.4% *Campylobacter* selective complement 함유; Oxoid, England) 위의 paper disk (10mm diameter; Toyo Roshi Kaisha, Japan)에 주입한 후, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C로 배양했을 때 형성된 생육 억제환의 크기를 측정하여 *H. pylori*에 대한 항균 활성을 확인하였다.

### 정착성 실험

Caco-2 세포에 대한 정착능 비교를 위해서 Konishi 등(16)의 방법을 응용하여 실험하였다. 24-well plate에 monolayer가 형성된 Caco-2 세포를 PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.0)로 2회 세척한 후, 유산균 현탁액 100 µl (OD 1.0)에 FBS (fetal bovine serum; JRH Biosciences, USA)와 streptomycin/penicillin이 함유되지 않은 incomplete DMEM 0.4 ml를 혼합 첨가하였다. 접종된 well plate는 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 2시간동안 배양하였다. 배양 종료후 PBS로 4회 세척하고, 1% Triton X-100 (Sigma, USA) 용액을 200 µl 첨가하여 10분동안 교반한 후 다시 800 µl의 PBS를 첨가하였다. 전체 1 ml의 용액을 사용하여 0.85% saline 용액으로 십진희석한 후 유산균수를 측정하였다. Caco-2 세포에 대한 유산균의 정착율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{유산균 정착율(\%)} = (\text{정착된 유산균수} / \text{초기 유산균수}) \times 100.$$

### Urease activity 실험

요소 분해효소의 활성 측정에 의한 유산균의 *H. pylori* 억제능을 실험하기 위해서 *H. pylori* 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 PBS로 2회 세척한 후, 배양하지 않은 신선한 BHI medium으로 동량 mass up하였다. 한편 배양하지 않은 신선한 BHI medium이 함유된 24-well plate에 유산균 배양상등액을 각각 0%, 10%, 20%씩 첨가하고, 준비된 *H. pylori* 배양액을 2% 접종하여 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 15시간동안 배양하였다. 요소 분해효소의 활성을 측정하기 위해서 반응용액 200 µl와 상기의 시료 10 µl를 혼합하여 23°C에서 30분동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 우유 발효능 실험

11% 탈지유에 배양상등액이 제거된 유산균 현탁액을 1-5 × 10<sup>6</sup> cfu/ml로 접종하여 37°C에서 호기적으로 배양하였으며, 평균 수는 modified MRS agar에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Paper disk법에 의한 유산균의 *H. pylori* 항균 활성

*H. pylori*의 생육을 특이적으로 억제하는 유산균을 선발하기 위해서 paper disk법을 사용하여 유산균의 항균 활성을 측정한다. 결과는 Table 1과 같다. pH와 유산에 의한 실험오차를 줄이기

**Table 1.** Antibacterial effect of lactic acid bacteria tested on *H. pylori* growth

Strains tested	pH	Clear zone (mm <sup>a</sup> )		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs
<i>Lb. gasseri</i> MK-01				
<i>Lb. gasseri</i> MK-02	3.85	17	13	13
<i>Lb. gasseri</i> MK-03	3.89	22	20	18
<i>Lb. acidophilus</i> MK-04	3.95	16	13	14
<i>Lb. acidophilus</i> MK-05	4.48	18	13	11
<i>Lb. acidophilus</i> MK-06	3.98	14	13	12
<i>Lb. acidophilus</i> MK-07	4.00	17	13	14
<i>Lb. acidophilus</i> MK-08	3.83	16	16	14
<i>Lb. casei</i> MK-09	3.69	13	11	10
<i>Lb. casei</i> MK-10	3.66	16	18	14
<i>Lb. paracasei</i> MK-11	3.67	17	14	13
<i>Lb. bulgaricus</i> MK-12	5.62	11	16	11
<i>Lb. helveticus</i> MK-13	3.70	16	15	15
<i>Lb. casei</i> MK-14	3.63	14	15	13
<i>Lb. casei</i> MK-15	3.68	16	14	14
<i>Lb. casei</i> MK-16	3.68	14	14	13
<i>Lb. plantarum</i> MK-17	3.71	18	16	16
<i>Lb. rhamnosus</i> MK-18	3.70	16	17	14
<i>Str. thermophilus</i> MK-19	5.52	16	11	11
<i>Str. thermophilus</i> MK-20	5.53	15	15	11
<i>Str. thermophilus</i> MK-21	5.52	11	11	11
<i>Str. thermophilus</i> MK-22	—	—	—	—
<i>Str. thermophilus</i> MK-23	5.72	11	11	11
<i>Str. thermophilus</i> MK-24	5.44	11	11	11
<i>Str. thermophilus</i> MK-25	5.76	11	11	11
<i>Bif. longum</i> MK-26	4.38	18	16	14
<i>Bif. longum</i> MK-27	4.53	17	17	13
<i>Bif. longum</i> MK-28	4.15	17	17	14
<i>Bif. longum</i> MK-29	4.55	18	17	15
<i>Bif. longum</i> MK-30	4.30	17	16	13
<i>Bif. adolescentis</i> MK-31	4.27	14	15	14
<i>Bif. infantis</i> MK-32	4.34	14	16	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-33	4.01	16	16	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-34	4.26	18	18	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-35	4.18	16	17	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-36	4.55	14	15	12
<i>Bifidobacterium</i> MK-37	4.45	16	18	15
<i>Bifidobacterium</i> MK-38	4.59	16	16	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-39	4.63	18	16	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-40	4.25	14	15	14
<i>Bifidobacterium</i> MK-41	4.78	12	16	11
<i>Lb. casei</i> MK-42	3.71	18	16	14
<i>Lb. acidophilus</i> MK-43	4.33	18	16	14
<i>Lb. salivarius</i> MK-44	4.19	18	17	16
<i>Lb. casei</i> MK-45	3.69	16	15	14

<sup>a</sup>Paper disk, 10 mm diameter

위해서 유산과 2N NaOH를 사용하여 유산균 배양상등액의 pH를 4.4로 보정하여 실험한 결과, 유산균 균종별로 보면 streptococci가 lactobacilli와 bifidobacteria에 비해서 생육 억제환의 크기가 작게 나타났다. MK-03, MK-05, MK-07, MK-11, MK-17, MK-26, MK-27, MK-28, MK-29, MK-30, MK-34, MK-39, MK-42, MK-43, MK-44 균주가 *H. pylori* 억제 효과가 우수한 것으로 밝혀졌는데, 이 중에서 *Lb. gasseri* MK-03 균주가 가장 커다란 생육 억제환을 나타냈다. 이러한 결과는 유산균 배양상등액의 낮은 pH에 의한 영향이라기보다는 생성된 산의 종류와 항균성 물질에 의한 것으로 판단된다.

실제로 *H. pylori* 균주에 대한 생육 억제능이 가장 강한 균주는 다량의 유산을 생성하지 않았다. 이러한 사실로부터 이 균주에 의해서 생성되는 다른 세포의 성분이 *H. pylori*에 대한 생육 억제 활성에 있어서 매우 중요하다고 생각되는데, 이들 물질은 아마도 이미 기술된 바와 같이 항균성 물질과 유사한 물질로 추정된다(24). 한편 Kabir 등(15)은 *Lb. salivarius* 균주가 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 *H. pylori*에 길항 작용을 나타내는 물질을 생성한다고 보고하였다. 최근의 임상연구 결과에 의하면, 항미생물제를 생성하는 *Lb. acidophilus* La1 균주의 배양상등액 성분은 *H. pylori* 감염의 재발을 억제하는 항생제-제산제 치료의 증강보조제로 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다.

유산균이 *H. pylori*의 생육을 억제하는 기작으로서 pH와 유기산이 미치는 영향은 다음과 같다. 유산균이 생성하는 유산은 pH와 상관없이 *H. pylori*의 생육을 억제하는데 관여하는 것으로 추정되고 있다. Midolo 등(21)은 pH와 유기산이 *H. pylori*의 생육에 미치는 영향을 실험한 결과에서 유산, 초산, 염산 등이 농도 의존형 방식으로 *H. pylori*의 생육을 억제하는 것으로 보고하였는데, 유산이 가장 높은 억제 활성을 나타냈다. 한편 Bhatia 등(9)은 3% 농도의 유산이 *H. pylori*의 생육을 억제하지만 이는 pH와 연관되어 있지 않은 것으로 밝혀냈으며, Coconnier 등(11)은 *Lb. acidophilus* LB 균주의 배양상등액 성분이 *in vitro*에서 pH와 유산 농도에 관계없이 *H. pylori*의 생존성을 극적으로 감소시켰다고 보고하였다. 따라서 *Lb. gasseri* MK-03 균주의 *H. pylori*에 대한 항균 효과는 단순히 pH와 유기산에 의한 것 뿐만 아니라 항균성 물질의 생성에 의한 것으로 판단된다.

#### 유산균의 Caco-2 세포 정착능

정착능이 우수한 유산균은 *H. pylori*의 정착을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있기 때문에 유산균의 Caco-2 세포 정착능을 확인한 결과는 Table 2와 같다. 28종의 유산균을 실험한 결과 18종의 유산균에서 정착능이 확인되었으며, MK-02, MK-03, MK-07, MK-14, MK-16, MK-17, MK-18, MK-26, MK-27, MK-31, MK-32, MK-34, MK-43, MK-45 등이 1% 이상의 정착율을 나타냈다. 이 중에서도 *Bif. longum* MK-26 균주의 정착율은 10% 이상으로서 매우 월등한 것으로 나타났다.

Lee 등(18)은 *Lb. acidophilus*가 *H. pylori*의 정착능을 저해하는 활성에 대해서 실험하였는데, *H. pylori*의 정착성은 당지질 함량이 증가할수록 직선적으로 증가한다고 보고하였다. 또한 Coconnier 등(11)은 HT29-MTX 세포를 감염시키는 *H.*

*pylori*에 대한 유산균의 활성을 조사한 결과, 1시간동안의 접촉 후 *H. pylori*의 생균수와 결합력이 1 log cycle만큼 감소하였

다고 보고하였다. 따라서 *Bif. longum* MK-26 균주의 월등히 높은 정착능은 *H. pylori*의 위 점막 정착을 억제하는 것으로 사료된다.

**Table 2.** Adherence ability of lactic acid bacteria tested to Caco-2 cell

Strains tested	Adherent bacterial cell (cfu/well)
<i>Lb. gasseri</i> MK-02	$2.3 \times 10^5$
<i>Lb. gasseri</i> MK-03	$7.8 \times 10^5$
<i>Lb. acidophilus</i> MK-05	$3.5 \times 10^3$
<i>Lb. acidophilus</i> MK-06	$<10^3$
<i>Lb. acidophilus</i> MK-07	$2.4 \times 10^5$
<i>Lb. acidophilus</i> MK-08	$4.5 \times 10^3$
<i>Lb. Casei</i> MK-10	$2.5 \times 10^3$
<i>Lb. paracasei</i> MK-11	$<10^3$
<i>Lb. helveticus</i> MK-13	$3.1 \times 10^4$
<i>Lb. casei</i> MK-14	$1.6 \times 10^5$
<i>Lb. casei</i> MK-15	$4.6 \times 10^4$
<i>Lb. casei</i> MK-16	$2.1 \times 10^5$
<i>Lb. plantarum</i> MK-17	$3.0 \times 10^5$
<i>Lb. rhamnosus</i> MK-18	$2.9 \times 10^5$
<i>Bif. longum</i> MK-26	$3.5 \times 10^6$
<i>Bif. longum</i> MK-27	$3.2 \times 10^5$
<i>Bif. longum</i> MK-28	$4.5 \times 10^3$
<i>Bif. longum</i> MK-29	$1.9 \times 10^5$
<i>Bif. longum</i> MK-30	$<10^3$
<i>Bif. adolescentis</i> MK-31	$4.7 \times 10^5$
<i>Bif. infantis</i> MK-32	$1.1 \times 10^5$
<i>Bifidobacterium</i> MK-33	$<10^3$
<i>Bifidobacterium</i> MK-34	$1.2 \times 10^5$
<i>Bifidobacterium</i> MK-39	$5.5 \times 10^3$
<i>Lb. casei</i> MK-42	$1.0 \times 10^3$
<i>Lb. acidophilus</i> MK-43	$6.2 \times 10^5$
<i>Lb. salivarius</i> MK-44	$5.5 \times 10^4$
<i>Lb. casei</i> MK-45	$3.3 \times 10^3$

### 유산균의 *H. pylori* 정착 억제능

정착능이 우수한 것으로 선발된 유산균 중에서 *Lb. gasseri* MK-03, *Lb. acidophilus* MK-07, *Bif. longum* MK-26 균주가 *H. pylori*와 Caco-2 세포에 동시 반응되었을 때의 실질적인 정착 억제능을 확인하기 위하여 동시반응법을 사용하였으며, 그 결과는 Table 3과 같다. 단독 정착반응시 3종의 유산균 모두가 정착능이 우수하였으며 특히 *Lb. gasseri* MK-03 균주가 가장 우수한 정착능을 나타냈다. 그러나 혼합 정착반응시의 정착능은 *Lb. gasseri* MK-03 균주가 우수하였지만, *H. pylori*에 대한 정착 억제능은 *Bif. longum* MK-26 균주가 가장 우수한 것으로 나타났다.

### Urease 활성 억제 유산균의 선발과 *H. pylori* 생육 억제능

McGowan 등(20)은 *H. pylori*의 생존성이 *in vitro*의 pH 2에서 극적으로 감소하지만, 이 pH 조건에서 *H. pylori*의 생존율은 요소 분해효소에 의해서 생성되는 암모니아의 존재 하에서 현저하게 증가한다고 보고하였다. 이러한 점을 고려할 때, 요소 분해효소의 활성 저하능을 측정하므로써 *in vivo*에서 *H. pylori*의 억제 효과를 간접적으로 측정할 수 있는 것으로 판단된다. 따라서 유산균에 의한 *H. pylori* 요소 분해효소의 활성 억제능 실험 결과는 Table 4와 5에 나타났다. 28종 유산균의 배양상등액에 의한 *H. pylori* 요소 분해효소의 활성 억제 효과는 배양상등액 10% 함유 시료에서는 7종의 유산균을 제외한 나머지 유산균에서 억제능이 나타났지만, 배양상등액을 20% 함유하는 시료에서는 모든 유산균이 *H. pylori*를 완전하게 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 유산균이 *H. pylori*의 생육을 억제하는 기작이 요소 분해효소의 활성을 억제하기 때문이라고 주장한 Bae 등(8)의 결과와 일치하였다. 또한 선발된 *Lb. gasseri* MK-03, *Lb. acidophilus* MK-07, *Bif. longum* MK-26 균주의 배양상등액 농도와 *H. pylori*의 배양시간에 따른 요소 분해효소 활성의 저하 효과를 실험한 결과, 배양상등액 5%에

**Table 3.** Changes of adherence by reaction time during co-cultivation with selected lactic acid bacteria and *H. pylori*

Strains tested	Viable cell count(cfu/well)				Percentage of adherence (%)		
	Inoculum size (cfu/well)	Single	Mixed inoculation		Single	Mixed inoculation	
			LAB <sup>b</sup>	<i>H. pylori</i>		LAB <sup>b</sup>	<i>H. pylori</i>
<i>Lb. gasseri</i> MK-03	$1.1 \times 10^7$	$1.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$	$1.4 \times 10^3$	16.36	22.73	0.064
<i>Lb. acidophilus</i> MK-07	$1.1 \times 10^7$	$3.4 \times 10^5$	$6.5 \times 10^5$	$2.1 \times 10^3$	3.09	5.91	0.095
<i>Bif. longum</i> MK-26	$2.6 \times 10^6$	$6.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$1.0 \times 10^2$	2.58	6.15	0.004
<i>Bif. longum</i> MK-29	$2.3 \times 10^6$	$4.7 \times 10^4$	$8.4 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$	2.04	3.65	0.055
<i>H. pylori</i>	$2.2 \times 10^6$	$1.6 \times 10^3$	—	$2.3 \times 10^3$	0.073	—	0.105
		(2 hrs) <sup>a</sup>		(4 hrs) <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>Reaction time.

<sup>b</sup>Lactic acid bacteria.



**Table 4.** Inhibitory effect of lactic acid bacteria on urease activity of *H. pylori* depending upon concentrations of spent culture supernatant (SCS)

Strains tested	SCS <sup>a</sup>	
	10%	20%
<i>Lb. gasseri</i> MK-02	0.081	0
<i>Lb. gasseri</i> MK-03	0.074	0
<i>Lb. acidophilus</i> MK-05	0.113	0
<i>Lb. acidophilus</i> MK-06	0.088	0
<i>Lb. acidophilus</i> MK-07	0.045	0
<i>Lb. acidophilus</i> MK-08	0.186	0
<i>Lb. casei</i> MK-10	0.113	0
<i>Lb. paracasei</i> MK-11	0.092	0
<i>Lb. helveticus</i> MK-13	0.080	0
<i>Lb. casei</i> MK-14	0.101	0
<i>Lb. casei</i> MK-15	0.075	0
<i>Lb. casei</i> MK-16	0.098	0
<i>Lb. plantarum</i> MK-17	0.087	0
<i>Lb. rhamnosus</i> MK-18	0.104	0
<i>Bif. longum</i> MK-26	0.051	0
<i>Bif. longum</i> MK-27	0.052	0
<i>Bif. longum</i> MK-28	0.073	0
<i>Bif. longum</i> MK-29	0.146	0
<i>Bif. longum</i> MK-30	0.375	0
<i>Bif. adolescentis</i> MK-31	0.114	0
<i>Bif. infantis</i> MK-32	0.362	0
<i>Bifidobacterium</i> MK-33	0.272	0
<i>Bifidobacterium</i> MK-34	0.399	0
<i>Bifidobacterium</i> MK-39	0.601	0
<i>Lb. paracasei</i> MK-42	0.099	0
<i>Lb. acidophilus</i> MK-43	0.097	0
<i>Lb. salivarius</i> MK-44	0.089	0
<i>Lb. casei</i> MK-45	0.098	0

Control : *H. pylori*; SCS 0%, 0.426.

Fresh MRS broth (pH 6.8): SCS 10%, 0.378 ; SCS 20%, 0.257

Fresh MRS broth (pH 4.4 by HCl) : SCS 10%, 0.258 ; SCS 20%, 0.261.

<sup>a</sup>SCS, Spent culture supernatant.**Table 5.** Inhibitory effect of lactic acid bacteria tested on urease activity of *H. pylori* depending upon incubation time and concentration of spent culture supernatant (SCS)

Samples tested		Incubation time		
		4 hrs	6 hrs	48 hrs
Control (SCS <sup>a</sup> 0%)		0.351	0.452	0.676
		0.378	0.458	0.635
SCS 5%	Fresh MRS	0.349	0.385	0.675
	MRS <sup>b</sup> (pH 4.4)	0.294	0.333	0.673
	MK-03	0.215	0.322	0.657
	MK-07	0.201	0.306	0.648
	MK-02	0.258	0.412	0.621
	MK-26	0.348	0.485	0.616
	MK-29	0.404	0.535	0.621
	SCS 10%	Fresh MRS	0.258	0.500
MRS(pH 4.4)		0.416	0.438	0.661
MK-03		0.304	0.391	0.384
MK-07		0.392	0.478	0.423
MK-02		0.485	0.545	0.655
MK-26		0.343	0.501	0.482
MK-29		0.513	0.474	0.658

<sup>a</sup>Spent culture supernatant.<sup>b</sup>pH-adjusted fresh MRS medium.

서는 별다른 효과를 보이지 못하였지만, 배양상등액 10% 첨가 시에는 배양시간이 증가할수록 요소 분해효소에 대한 활성 저하능이 나타났다.

#### 선발균주의 우유 발효능 및 제품 적용성

11% 탈지유에 선발균주를 접종하여 37°C에서 호기적으로 배양하였을 때의 pH와 적정산도, 생균수에 대한 결과는 Table 6 와 같다. 모든 선발균주에서 생균수 및 유산 생성능이 양호하였으며 관능검사 결과도 양호한 풍미를 제공하는 것으로 나타났다. 따라서 이들 선발균주를 이용한 발효유 제품은 *H. pylori*의 예방 및 치료식으로 응용이 가능하다는 것을 알 수 있다.

**Table 6.** Milk fermentation ability of selected lactic acid bacteria

Strains tested	pH				Titratable acidity (%)				Viable cell count (cfu/ml)			
	0 hrs	8 hrs	16 hrs	24 hrs	0 hrs	8 hrs	16 hrs	24 hrs	0 hrs	8 hrs	16 hrs	24 hrs
<i>Lb. gasseri</i> MK-03	6.35	6.15	5.93	4.88	0.16	0.19	0.24	0.52	9.8×10 <sup>5</sup>	3.4×10 <sup>6</sup>	2.7×10 <sup>7</sup>	1.6×10 <sup>7</sup>
<i>Lb. acidophilus</i> MK-07	6.35	6.25	6.15	5.02	0.16	0.16	0.20	0.52	9.5×10 <sup>4</sup>	2.5×10 <sup>5</sup>	2.0×10 <sup>6</sup>	5.7×10 <sup>7</sup>
<i>Bif. longum</i> MK-26	6.35	6.17	6.07	5.00	0.16	0.21	0.41	0.51	2.4×10 <sup>6</sup>	5.8×10 <sup>6</sup>	4.0×10 <sup>6</sup>	3.1×10 <sup>7</sup>

## 참고문헌

1. 김현수, 이용찬, 이홍우, 유효민, 이천균, 김준명, 이광재, 김범수, 문병수, 박효진, 김도영, 이관식, 김원호, 한광협, 정재복, 전재윤, 이상인, 문영명, 강진경, 박인서. 1999. 한국인에게서 *Helicobacter pylori* 감염의 혈청학적 역학 연구. 대한소화기학회지. 33, 170-182.
2. 조명제, 이광호. 1996. *Helicobacter pylori* 감염에 의한 위암의 원인론. *Medical Postgraduates*. 3(24), 157-16
3. 田中 直子, 桑山 肇, 砂人 道夫, 中嶋 睦安, 清水 誠, 八田 一, 金武祚, 山本 武彦. 1990. *Helicobacter pylori* の胃粘膜への接着と特異抗體によるの沮害. *Bacterial Adherence 研究會講演錄*. Vol. 4, 15-20.
4. Aiba, Y., N. Suzuki, A.M.A. Kabir, A. Takagi, and Y. Koga. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 2097-2101.
5. Andersen, L.P. and S. Holck. 1990. Possible evidence of invasiveness of *Helicobacter*(*Campylobacter*) *pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 135-138.
6. Armuzzi, A., F. Cremonini, V. Ojetti, F. Bartolozzi, F. Canducci, M. Candelli, L. Santarelli, G. Cammarota, A. De Lorenzo, P. Pola, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. 2001. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy : A pilot study. *Digestion* 63, 1-7.
7. 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. Effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 163-169.
8. Bae, E.A., D.H. Kim, and M.J. Han. 2000. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Bifidobacterium* spp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 532-534.
9. Bhatia, S.J., N. Kochar, P. Abraham, P.G. Nair, and A.P. Mehta. 1989. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2328-2330.
10. Bogstedt, A.K., K. Johansen, H. Hatt, M. Kim, T. Casswall, L. Svensson, and L. Hammarstrom. 1996. Passive immunity against diarrhoea. *Acta Paediatr.* 85, 125-128.
11. 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.
12. Cover, T.L. and M.J. Blaser. 1995. *Helicobacter pylori*: A bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. *ASM News* 61, 21-26.
13. El-Shoura, S.M. 1995. *Helicobacter pylori*. I. Ultrastructural sequence of adherence, attachment, and penetration into the gastric mucosa. *Ultrastructural Pathol.* 19, 323-333.
14. Juneja, L.R. and M. Kim. 1995. Designing foods with novel proteins from egg yolk. *FI Europe '95 Conference Proceedings*.
15. Kabir, A.M., Y. Aiba, A. Takagi, S. Kamiya, T. Miwa, and Y. Koga. 1997. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in gnotobiotic murine model. *Gut*. 41, 49-55.
16. Konishi, Y.S., K. Shibata, S.S. Yun, Y.H. Kudo, K. Yamaguchi, and S. Kumagai. 1996. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(5), 886-888.
17. Lee, A., J. Fox, and S. Hazell. 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: A perspective. *Infect. Immun.* 61, 1601-1610.
18. Lee, Y.H., E.J. Shin, J.H. Lee, and J.H. Park. 1999. *Lactobacillus acidophilus* inhibits the *Helicobacter pylori* adherence. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 794-797.
19. Marshall, B.J. 1994. *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 89, S116-S128.
20. McGowan, C.C., T. L. Cover, and M.J. Blaser. 1996. *Helicobacter pylori* and gastric acid : Biological and therapeutic implications. *Gastroenterology* 110, 926-938.
21. Midolo, P.D., J.R. Lambert, R. Hull, F. Luo, and M.L. Grayson. 1995. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 475-479.
22. Noach, L.A., T.M. Rolf, and G.N.J. Tytgat. 1994. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.* 47, 699-704.
23. Smoot, D.T., H.L.T. Mobley, G.R. Chippendale, J.F. Lewison, and J.H. Resau. 1990. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 58, 1992-1994.
24. Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
25. Tanida, N., T. Sakagami, Y. Fukuda, and T. Shimoyama. 1998. Modulation of pathogenesis by intestinal microflora. The role of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Biosci. Microflora* 17, 89-95.
26. Taylor, N.S., J.G. Fox, N.S. Akopyants, D.E. Berg, N. Thompson, B. Shames, L. Yan, E. Fontham, F. Janney, F.M. Hunter, and P. Correa. 1995. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 33, 918-923.
27. Warren, J.R. and B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-1275
28. World Health Organization. 1994. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 61, 177-240.

(Received March 26, 2001/Accepted May 28, 2001)

---

**ABSTRACT : Selection of Lactic Acid Bacteria Specifically Inhibiting the Growth of *Helicobacter pylori***

**Hoo-Kil Jung, Eung-Ryool Kim, and Suk-Lak Juhn** (R&D Center, Maeil Dairy Industry Co., Ltd., 480, Gagok-ri, Jinwi-myun, Pyungtaek-si, Kyunggi-do, 451-861, Korea)

This study was conducted to select lactic acid bacteria which possess potential inhibitory effect on *Helicobacter pylori*, and to make feasibility test of fermented milk products using them. In order to select lactic acid bacteria specifically inhibiting the growth of *H. pylori*, antibacterial activity using paper disk method, adherence ability to Caco-2 cell, inhibitory effect on urease activity of *H. pylori*, and milk fermentation feasibility were measured. Among 45 strains of lactic acid bacteria tested, 28 strains showed clear zone and *Lactobacillus gasseri* MK-03 showed the largest clear zone. Caco-2 cell adherence by lactic acid bacteria and inhibitory effect of them on *H. pylori* adherence were also evaluated. Of 28 strains tested, 18 strains appeared to be effective on adherence to Caco-2 cell, and especially *Bifidobacterium longum* MK-26 was found to be superior to others. When *Bif. longum* MK-26 and *H. pylori* were reacted with Caco-2 cell 2hrs before, adherence percentage of *H. pylori* decreased from 0.105% to 0.004%. To investigate inhibitory effect of lactic acid bacteria-derived supernatant on urease activity of *H. pylori*, pH-adjusted fermented supernatant (pH 4.4) was assessed by co-cultivation method. Thereof *Lb. acidophilus* MK-07-derived supernatant showed the most inhibitory effect on urease activity of *H. pylori*. Considering milk fermentation ability of selected 3 strains, they were comparably feasible to fermented milk products. Consequently, *Lb. gasseri* MK-03, *Lb. acidophilus* MK-07, and *Bif. longum* MK-26 were selected to specifically inhibit the growth of *H. pylori*, by antibacterial activity, inhibition of urease activity, and inhibition of Caco-2 cell adherence, respectively.