

2007年 2月

碩士學位 論文

김치로부터 *Helicobacter pylori* 억제  
유산균의 분리와 특성 규명

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

孫智龍

김치로부터 *Helicobacter pylori* 억제  
유산균의 분리와 특성 규명

*Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria  
harboring anti-Helicobacter pylori activity*

2007年 2月

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

孫智龍

김치로부터 *Helicobacter pylori* 억제  
유산균의 분리와 특성 규명

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2007年 2月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

孫 智 龍

# 孫智龍의 碩士學位論文을 認准함

委員長     조선대학교 교수                                    \_\_\_\_\_ 印

委 員     조선대학교 교수                                    \_\_\_\_\_ 印

委 員     조선대학교 교수                                    \_\_\_\_\_ 印

2006 年 11 月

朝鮮大學校 大學院

# 목 차

ABSTRACT .....	vi
LIST OF TABLE .....	iii
LIST OF FIGURE .....	iv
제 1 장 서        론.....	1
제 2 장 실험재료 및 방법.....	5
제 1 절. <i>H. pylori</i> 억제 유산균주의 분리 .....	5
제 2 절. <i>H. pylori</i> 억제 유산균주의 동정 .....	5
제 3 절. <i>H. pylori</i> 억제 유산균주의 특성 .....	9
1. 배양시간에 따른 생육도.....	9
2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도 .....	9
3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도 .....	9
4. 분리균주의 <i>H. pylori</i> 억제 활성 .....	10
5. Urease 활성 억제 효과.....	10
제 4 절. 분리균주의 장내 생존성 및 안전성 확인.....	12
1. 내산성 및 인공위액 저항성.....	12
2. 인공담즙 저항성.....	13
3. 용혈성 검사.....	13

제 3 장 결과 및 고찰	14
제 1 절 <i>H. pylori</i> 억제 유산균주의 분리	14
제 2 절 <i>H. pylori</i> 억제 유산균주의 동정	14
제 3 절 <i>H. pylori</i> 억제 유산균의 특성	24
1. 배양시간에 따른 생육도	24
2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도	24
3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도	25
4. 분리균주의 <i>H. pylori</i> 억제 활성	25
5. Urease 활성 억제 효과	26
제 4 절 분리균주의 생존성 및 안전성 확인	33
1. 내산성 및 인공위액 저항성	33
2. 인공담즙 저항성	35
3. 용혈성 검사	41
제 4 장 결론	43
제 5 장 참고문헌	45

## *LIST OF TABLE*

Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used in this experiment.....7

Table 2. Morphological and metabolic characteristics of isolated strains ML5, CL1,  
MD1 and CH2.....16

Table 3. Sugar utilization of the isolated strains ML5, CL1, MD1 and CH2.....18

## LIST OF FIGURE

Figure 1. 16S rRNA gene sequencing procedure for microorganism from kimchi .....	8
Figure 2. Gram staining of the isolated strain.....	17
Figure 3. 16S rRNA gene sequence of the isolate ML5.....	19
Figure 4. 16S rRNA gene sequence of the isolate CL1.....	20
Figure 5. 16S rRNA gene sequence of the isolate MD1.....	21
Figure 6. 16S rRNA gene sequence of the isolate CH2 .....	22
Figure 7. Phylogenetic relationship between <i>Lb. sakei</i> ML5, <i>Lb. sakei</i> CL1, <i>Ped. pentosaceus</i> MD1, <i>Lb. sakei</i> CH2 and other related bacteria based on 16S rRNA gene sequence.....	23
Figure 8. Growth curves of <i>Lb. sakei</i> ML5, <i>Lb. sakei</i> CL1, <i>Ped. pentosaceus</i> MD1, and <i>Lb. sakei</i> CH2 in MRS broth at 30°C .....	27
Figure 9. Effects of the NaCl concentration on growths of <i>Lb. sakei</i> ML5, <i>Lb. sakei</i> CL1, <i>Ped. pentosaceus</i> MD1, and <i>Lb. sakei</i> CH2.....	28



Figure 10. Effects of the initial pH media on growths of <i>Lb. sakei</i> ML5, <i>Lb. sakei</i> CL1, <i>Ped. pentosaceus</i> MD1, and <i>Lb. sakei</i> CH2.....	29
Figure 11. Inhibition activity of the LAB against <i>H. pylori</i> KCCM41756.....	30
Figure 12. Urease activity of <i>H. pylori</i> by LAB culture supernatant 10% (V/V) addition.....	31
Figure 13. Urease activity of <i>H. pylori</i> by LAB culture supernatant 20% (V/V) addition.....	31
Figure 14. Acid tolerance of the LAB in 0.05M sodium phosphate pH 3.0.....	34
Figure 15. Acid tolerance of the LAB in the artificial gastric juice at pH 3.0.....	35
Figure 16. Bile resistance of the LAB against 0.3% oxgall media.....	38
Figure 17. Bile resistance of the LAB against 0.5% oxgall media.....	39
Figure 18. Bile resistance of the LAB against 0.3% oxgall after treatment for 2h in artificial gastric juice of pH 3.0.....	40
Figure 19. Hemolysis test for the LAB .....	42

## ABSTRACT

### *Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria harboring anti-*Helicobacter pylori* activity*

Son, Ji-Young

Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

LAB isolated from Kimchi were screened for inhibition activity against *H. pylori*. Among 55 isolates, three rod-shaped and one coccus-shaped LAB showed strong inhibition activity against *H. pylori*. Inhibition activity were examined by using a paper disk diffusion method. Culture supernatants of 4 strains of *Lactobacilli* showed a strong inhibitory activity on the urease activity of *H. pylori* KCCM 41756. The four selected strains were identified and designated as *Lactobacillus sakei* ML5, *Lactobacillus sakei* CL1, *Pediococcus pentosaceus* MD1, *Lactobacillus sakei* CH2 based on the biolog test and 16S rRNA gene sequencing. Acid and bile tolerance of these LAB strains were evaluated. Resistance of the four LAB under artificial gastric juice and bile acid showed high viability( $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml) in 0.05M sodium phosphate buffer(pH 3.0), artificial gastric juice and 0.3% oxgall and 0.5% oxgall solution. Hemolysis test did not show clear zones on the blood agar plate surrounding test LAB colonies.

# 제 1 장 서 론

김치는 새콤한 산미, 감미, 향미가 조화되어 독특한 맛을 내는 채소류 발효식품으로써 주원료로 배추나 무, 부원료로 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가 한 것으로 외국에서는 그 유례를 찾아 볼 수 없는 한국 고유의 전통 식품이다. 채소류의 젓산균 발효식품으로 대표되는 김치류는 지방 및 계절에 따라서 원료가 다르고 각 가정마다 담그는 방법이 달라서 결코 같은 맛을 낼 수 없는 독특성을 지닌다(8, 48). 최근에 김치는 카로틴, 식이섬유, 페놀성 화합물과 같은 생리활성 물질들로 인하여 항암, 고혈압 예방, 항산화 효과 등 여러 기능성이 보고되고 있다(13, 42). 이와 같은 김치의 독특성과 효능 때문에 그 인기는 점차 높아가고 있다.

김치 발효에 관여하는 미생물로 이상젓산 발효를 하는 *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, 정상젓산 발효를 하는 *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Streptococcus faecalis* 등이 보고 되고있다(1, 3, 4, 28). 김치의 발효과정에 관여하는 유산균들의 경시적 변화에 의해 발효초기에는 *Leuconostoc*속 등과 같은 이상젓산균(heterofermentative lactic acid bacteria)의 번식에 의하여 발효가 시작되며 발효 중기 이후 pH가 4.0 이하로 낮아지면 내산성이 강한 정상젓산균(homofermentative lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus* 속 등이 빨리 증식하면서 많은 유기산을 생성하여 김치의 산패를 일으킨다(32, 35).

유산균(lactic acid bacteria: LAB)은 자연계에 널리 존재하며 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젓산을 생성하는 미생물로 유제품, 육류, 야채 등의 starter로 널리 사용되고 있으며 또한 사람이나 동물의 장에 서식하고 있다(5, 36, 44, 49). 당류를 발효해서 50%이상 젓산을 생성하는 유산균은 상큼한 향과 맛을 내게 하고 나아가 당, 유기산, 단백질 및 지방성분을 이용하여 독특한 향과 풍미성분으로 전환시키어 제품의 품질 향상에 바람직한 역할을 한다(43). 19세기 중반 파스퇴르에 의해 그 존재가 밝혀지고 1908년 불가리아의 생화학 학자인 메치니코프가 유산균 발효유의 불노장수설을 주장한

이후(40), 유산균 발효유의 효능이 과학적으로 입증되면서 건강에 좋다는 인식 때문에 유산균 함유 식품을 통하여 건강을 유지하고 질병을 예방하려는 노력을 하고 있다. 더불어 유산균 관련 제품에 대하여 전 세계적으로 관심이 집중되고 소비가 증가하는 인기상품이 되었다(23). 유산균의 생리활성 기능은 여러 가지로 알려져 있다. 그 중 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*가 병원성 세균인 *E. coli*나 *Salmonella* 등을 억제한다고 보고되었으며(43), 사람의 장에서 찾은 내산성이 우수한 유산균 *Lactobacillus*, *Streptococcus*를 *in vitro*와 *in vivo*에서 실험한 결과 cholesterol 저하능이 있음이 보고되었다(6, 40). Ahotupa 등은 *Lactobacillus rhamnosus* GG가 *in vitro*에서 지질산화를 억제한다고 보고하였고(13), Kaezen 등은 *Lactobacillus* sp. SBT 2028은 *in vivo*에서 항산화 효과를 가지며 인체 내 활성산소축적을 감소시켜 준다고 보고하였다(37). 또한 이 등은 유산균의 증균속도에 대한 흡착효과를 보고하였으며 이러한 효과는 배양조건 뿐 아니라 pH, 금속염 등의 반응조건에 따라 달라질 수 있다고 하였다(25). 정 과 오 등이 보고한 논문에 의하면 어린이의 타액에서 추출한 *Lactobacillus acidophilus* V-20이 치주병원균인 *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*를 성장, 억제하여 치주질환을 예방한다고 보고되었다(8). 김치로부터 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*의 항돌연변이 효과도 보고 된바있다. 항돌연변이는 김치유산균의 농도에 의존적이었고 항돌연변이 활성은 세포벽물질에 의한 것으로 보고되고 있다(1, 52, 59). 김치 유산균은 *Leu. mesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*은 종양생성을 각각 39%, 57%, 88% 저해함으로써 항종양 효과를 나타내었다(39). 유산균의 식품보존효과는 유산균 발효로 pH저하가 제1요인이지만, 그 외에 유산이 생산하는 다양한 물질이 식품 오염균, 병원성균, 부패균의 생육을 억제 또는 저해함으로써 식품보존효과를 나타내고있다. 유산균이 생산하는 항균성 대사산물로는 organic acid, hydrogen peroxide, diacetyl 및 저분자의 단백질성 물질인 박테리오신 등이 있다(9, 10, 15, 17, 51).

*Helicobacter pylori*는 1983년 Warren과 Marshall에 의해 위장에서 *Campylobacter*와 유사한 세균이 발견된 이후 이 균주에 대한 생화학적 연구가 진행되었으며

Goodwin 등에 의해 *Helicobacter pylori*로 명명되었다(7). *H. pylori*는 갈매기 모양의 만곡형 그람음성 세균으로 크기는  $2 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$  정도이고 미호기성으로 (microaerophilic) 최적 산소 분압은 2~8%이며, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양할 수 있다. 최적 생장온도는 30~37°C 이고 최적 pH는 7.0~7.4이다(18, 53). *H. pylori*의 특징적 성상은 강력한 운동성과 urease, catalase, phospholipase A<sub>2</sub>,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase 등의 효소 생산능이다(2). *H. pylori* 자체는 산에 민감하지만 다른 세균들과 달리 강산의 위내에서도 살 수 있는 이유는 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫째는 편모(flagella)이다. *H. pylori*는 pH 4 정도의 산성 용액에 노출되면 쉽게 파괴되지만(29), 위내부의 점액으로 덮여진 pH가 7 정도인 상피세포 표면으로 이동하여 살수있다. 이동을 가능하게 해주는 것이 균에 존재하는 편모이다. 둘째는 요소분해효소 (urease)이다. *H. pylori*는 세포질내에서 urease를 합성해 낸다. *H. pylori*의 urease생성능력은 protease보다 100배 이상 높다고 보고되었다(29). 또한 *H. pylori*의 urease는 위 점막에 극소량으로 존재하는 요소를 암모니아와 CO<sub>2</sub>로 효과적으로 분해할 수 있다(41). 이 암모니아가 세균의 세포질 및 주위를 중성화시켜 위내의 강한 산성으로부터 균을 보호한다. Urease를 만들어 낼 수 없는 변이균주의 경우 위에 정착하지 못한다는 실험결과가 보고되고 있다(52). 셋째는 부착인자이다. *H. pylori*가 위에 정착하여 질병을 일으키기 위해서는 일차적으로 균이 위 상피세포에 부착되어야만 한다. *H. pylori*는 위 상피세포에 매우 강하게 부착 된다. 이와 같은 단백질성분의 여러 세균의 부착인자와 당지질로 구성된 숙주 수용체 사이의 결합에 의해 일어나는 것으로 추정하고 있다. 이 균은 위점막 보호작용을 하는 sulfhydryl을 감소시키고, 활성라디칼에 의한 출혈이나 허혈 등의 혈관 손상을 발생시켜 위염 및 위암 등의 원인이 되며, 간경변 환자에서는 고암모니아혈증과도 관련이 있는 것으로 알려지고 있다(22, 41). *H. pylori*의 감염률은 전 세계 인구의 50% 이상이고 우리나라의 성인의 약 80% 정도로, 감염빈도는 선진국일수록 낮고 개발도상국에서 높은 것으로 알려져 있으며 또한 연령, 지역분포, 종족 간에 차이가 있다(37). *H. pylori*에 의한 감염을 치료하는 방법으로는 bismuth제제, metronidazole, amoxicillin, tetracycline 등을 포함하는 3가지 항균제를 동시에 투여하는 방법이 유효한 것으로 보고되고 있다(19, 53). 그러나 이러한 치료법은 환자의 순응도를 필요로 하

고, 항생제에 대한 내성, 재발 가능성의 내재, 고비용 등의 문제가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에 백리향(50), 중국차(55), cashew apple(33), 소목과 황련(34), 한약재 추출물(53), 애엽추출물(12), 유산균(48) 등의 여러 천연물의 *H. pylori*에 대한 억제 활성이 연구 보고 되었다.

최근 채소와 관련된 유산균의 영양학적 및 약리학적 장점들이 전통발효식품의 산업화와 더불어 관심이 커지고 있으며 이에따라 보다 과학적이고 체계적인 이분야의 연구가 요구되어진다. 이에 발효식품 중 가장 널리 이용되고 있는 김치에서 유산균을 분리하였고, 또한 위에 서식하면서 위염, 위궤양 및 위암의 원인균으로 알려진 *H. pylori*의 생육을 억제하고 감염방어, 제균작용을 가지며 위장에서의 부착을 저해하는 유산균을 선별하였다. Probiotics의 선발조건 중 장내 생존가능성을 확인하기 위하여 *in vitro*에서 내산성, 인공위액 및 담즙산 처리에 따른 유산균의 생존력(viability)를 확인하였다. 또한 이들 유산균의 인체에 대한 안전성을 알아보기 위하여 적혈구가 파괴, 분해되는 현상인 hemolysis test 를 통해 인체에 투여시 안전하게 사용가능한지를 확인하였다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 제 1 절 *Helicobacter pylori* 억제 유산균의 분리

유산균을 분리하기 위해서 가정집, 유명 사찰, 명가 식당 등에서 수집하였다. 마쇄한 김치를 멸균, 여과하여 멸균수로 적정 배율로 희석 후 *Lactobacilli* MRS (Difco Co., France) 배지에 30°C에서 48시간 배양하였다. 2% CaCO<sub>3</sub> (Amresco Ind., USA)가 첨가된 배지에 tooth picking 하여 투명환을 형성하고 gram (Gram stain kit BD Co., USA) 양성, catalase (Biomerieux., France) 음성인 집락을 유산균으로 잠정 분리하였다.

시험 유산균주로서는 전남지역의 김치에서 분리한 40종의 유산균주로부터 *H. pylori* 억제 작용이 우수한 4종의 유산균주를 선별하여 실험에 사용하였다. *H. pylori*의 억제여부는 paper disk법(34)을 이용하였다. 분리균주는 MRS 액체배지에 배양 후 대수기에 있는 배양액에 glycerol 25% (v/v)가 되게 첨가하여 -70°C에서 보관 하면서, 5 mL MRS 액체배지에 접종한후 30°C에서 24시간 배양 다음 계대하여 사용하였다.

### 제 2 절 *Helicobacter pylori* 억제 균주의 동정

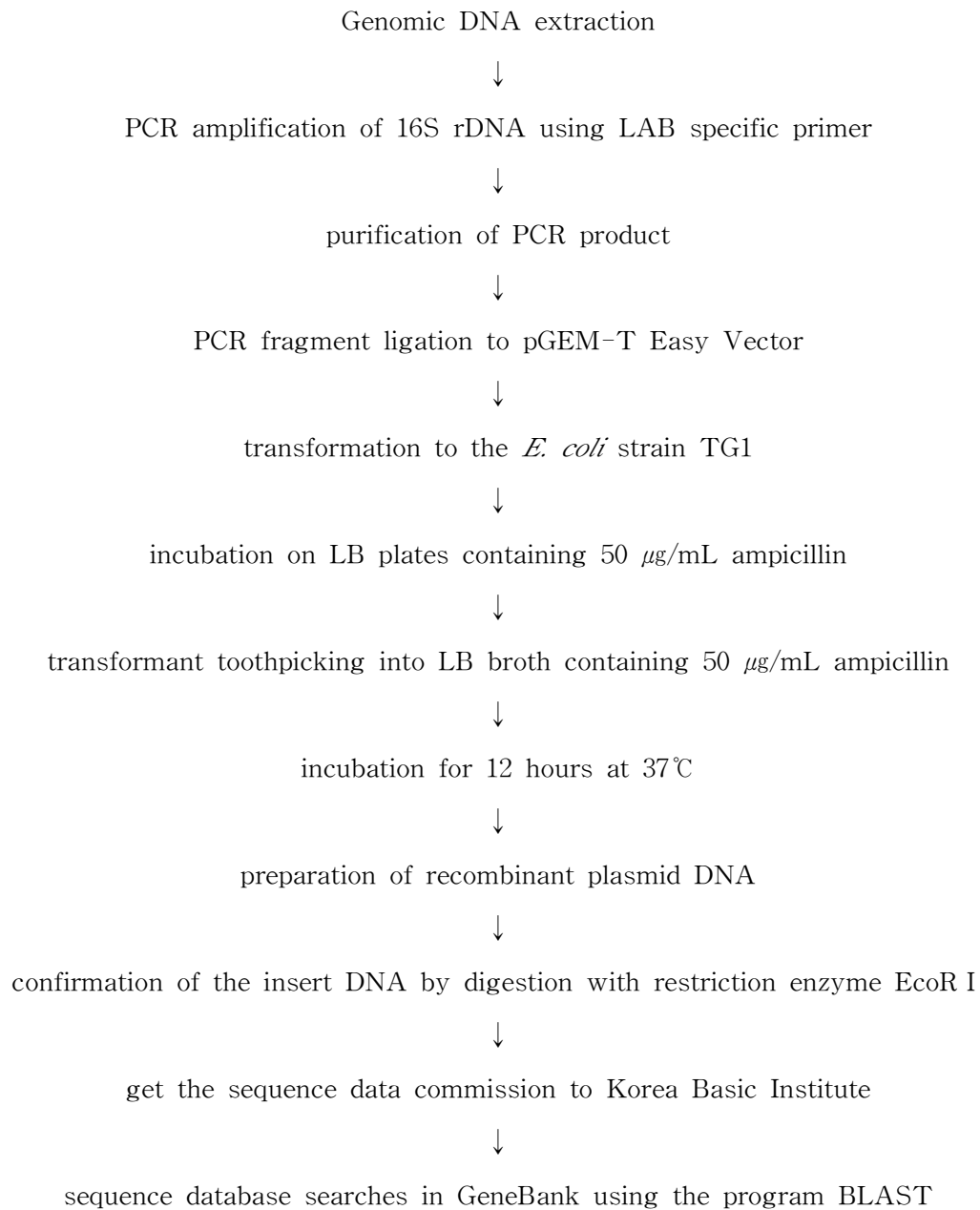
분리된 *H. pylori* 억제 유산균주는 그람염색 (Gram stain kit. BD Co., France)을 비롯한 형태학적특성, API kit (50CHL, Biomerieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열을 통하여 동정하였다. 16S rRNA 염기서열을 분석하기 위하여, 분리균주로부터의 genomic DNA 추출은 Genome DNA kit (Q-Biogene, USA)를 사용하였다. 분리균의 동정을 위한 16S rRNA 증폭용 primer는 유산균속 특이적

primer 를 사용하였다(Table 1). PCR은 genomic DNA 2.57 g을 template로 하고, *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Co., Japan) 2.5 unit을 첨가하여 Palmcycler (Corbett Research., Australia)을 사용하여 수행하였다. PCR 온도조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation을 수행하고, 72°C에서 10분간 post-elongation을 실행하였다. PCR에 의하여 증폭된 단편은 Qiaquick gel extration kit (Qiagen Co., Germany)를 사용하여 회수한 후 pGEM-Teasy vector (Promega Co., USA)에 ligation하였다. Ligation DNA 혼합물의 형질전환 시 *E. coli* TG1을 숙주세포로 사용하였으며, 항생제 (ampicillin, 50  $\mu$ l/mL)가 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 12시간 진탕 배양하여 Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen Co., Germany)으로 plasmid DNA를 추출하였다. 재조합 plasmid는 제한효소 *EcoR* I (TaKaRa Co., Japan)으로 digestion하여 삽입된 단편의 크기를 확인한 후 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 상동성 검사는 Gene Bank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program에 의하여 실행하였다(20).



*Table 1. Sequences of the oligonucleotide primers used in this experiment*

<i>Primers</i>	<i>Oligonucleotide sequences(5' → 3')</i>
<i>LeuP</i>	Forward : GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG
	Reverse : GACCCGGGAACGTATTCACCGCGGC



***Figure 1. 16S rRNA gene sequencing procedure for the microorganism from kimchi***

### 제 3 절 *Helicobacter pylori* 유산균주의 특성

#### 1. 배양시간에 따른 생육도

분리균주의 배양시간에 따른 생육도를 조사하기 위하여 30℃에서 24시간 전배양한 분리균주를 1% (v/v) 접종하여 48시간 정치 배양하면서 매 4시간마다 A<sub>600</sub> (Ultro spec 2100pro, Amersham Bioscience Co., England)에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2. 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도

배지의 초기 NaCl 농도가 분리균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NaCl을 0, 1, 3, 5, 7% (v/v)접종하여 30℃에서 24시간 정치배양한 후 A<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 실험은 3회 반복하여 평균치를 구하였다.

#### 3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

배지의 초기 pH가 분리균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 1N NaOH 또는 1N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 9.0, 10.0, 12.0으로 보정한 MRS액체 배지에 분리균주를 1% (v/v) 접종한 다음 30℃에서 24시간 정치배양한 후 A<sub>600</sub>에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 실험은 3회 반복하여 평균치를 구하였다.

#### 4. *Helicobacter pylori* 억제 활성

김치에서 분리된 유산균으로부터 *H. pylori* 억제를 조사하기 위하여, 10% horse serum (GIBCO., USA)이 첨가된 brucella (Difco., France) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 37°C, CO<sub>2</sub> 10% incubator(ASTEC., Japan)를 사용하였고 회전속도를 조절하기 위해서 Lacker(Vision., Korea)를 사용하였다. Brucella 평판배지에 *H. pylori* 400 µL를 분주하고 도말한 다음 멸균된 paper disk를 올리고 유산균 배양농축액을 100 µL씩 분주한후 37°C, 10% incubator에서 24시간 배양하여 disk 주위의 저해환의 생성유무를 확인한 후 억제환을 측정하였다. 이때 유산균배양액은 변형된 MRS를 사용하였다. MRS배지 성분 중 sodium acetate, tween 80과 같은 성분이 *H. pylori*의 생육을 억제할 수 있다는 보고에 따라(11), 본 실험에서는 위의 두 가지 성분을 제외한 1 L당 proteose peptone NO.3 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 10 g, dextrose 20 g, ammonium citrate 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, manganese sulfate 0.05 g, dipotassium phosphate 2 g의 변형 MRS를 조제하여 사용하였다. 대조구는 변형 MRS를 사용하였다.

#### 5. Urease 활성 억제 효과

김치로부터 분리된 유산균의 *H. pylori*의 억제능을 조사하기 위하여 urease 활성을 측정하였다. *H. pylori*를 BHI (Difco., France) 액체배지에 계대배양 후 5 mL *H. pylori*배양액을 원심분리 (9,950×g, 10 min, 4°C)한 다음 PBS (phosphate buffer saline)로 2회 세척 후 PBS를 가하여 동량 5 mL로 맞추었다. BHI액체 배지에 PBS로 세척 후 현탁하여 준비된 *H. pylori* 배양액을 2% (v/v) 접종하였다. MRS 액체배지에서 30°C로 24시간 배양한 각각의 유산균을 원심분리 (9,950×g, 5 min, 4°C)한후 0.45 µm filter (Milipore Co., USA)로 여과한 배양액을 각각 10% (v/v), 20% (v/v)를 접종하여

37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에 24시간 배양하였다(5). Urea 액체배지에 *H. pylori*와 유산균이 혼합된 배양액 5% (v/v)를 접종 후 3시간 동안 30분 간격으로 A<sub>560</sub>에서 흡광도 변화를 측정하였다. 대조군으로는 urea 액체배지에 유산균 배양상징액이 첨가되지 않고 *H. pylori*만 접종하여 배양한 것으로 하였다(11, 12, 24, 38, 53).

## 제 4 절 분리균주의 장내생존성 및 안전성

### 1. 내산성 및 인공위액 저항성

분리균주의 산 저항성 시험으로 우선 단순 산성 pH에 대한 내성의 측정은 1.0 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정된 0.05 M sodium phosphate 용액하에서 시행하였다 (25). 인공위액하에서의 저항성은 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위하여 인공위액을 조제하여 실시하였다. 인공위액의 조제는 Kobayashi 등의(30) 방법을 변형하여 1 N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정된 MRS 액체배지에 pepsin (Sigma Co., USA)을 1,000 unit/mL가 되도록 첨가하였다. 분리균주를 MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리 (9,950×g, 5 min, 4°C)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수하였다. pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액을 각각 상정액과 동량으로 첨가하여 30°C에서 2시간 후 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액으로 처리된 유산균을 멸균수로 10배씩  $10^1 \sim 10^7$ 배 까지 희석한 후 잘 혼합하여 고체배지에 100 μL를 도말하여 배양하였다. 30°C에서 48시간 배양 후 형성된 colony의 수를 측정하여 내산성과 인공위액에 대한 저항성을 비교하였다. 생균수는 3배씩 측정하였고 대조군으로는 분리균주를 MRS에 배양한 후 (30°C, 24시간) 측정된 생균수로 하였다.

### 2. 인공담즙 저항성

인공담즙의 조제는 MRS 액체배지에 0.45 μm filter (Milipore Co., USA)로 여과 제균된 oxgall (Sigma chemical Co., USA) 용액을 0.3% 및 0.5%가 되도록 첨가하였다. 분리균주의 인공담즙에 대한 내성은 인공위액에서 2시간 동안 배양한 배양액을 각각 원심분리(9,950×g, 5 min, 4°C)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 후 인공담즙액을

상징액과 동량으로 첨가한 다음 30℃에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 생균수를 측정하여 인공담즙에 대한 저항성을 비교하였다. 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정하였으며 대조군으로는 분리균주를 동일 조건하에서 MRS 배양한 후 측정된 생균수로 하였다.

### 3. 용혈성 검사

김치로부터 분리된 유산균주 4종이 *H. pylori*에는 억제활성이 있으나 독성이 없음을 증명하기 위하여 용혈성검사를 시행하였다. Blood agar base (OXOID., England)를 멸균 후 7% horse blood (OXOID, England)를 첨가 하여 평판배지를 만들어서 분리균주 4종을 streaking 한 후 30℃에서 48시간 배양한 다음 균체 주위에 투명환의 생성여부로 용혈성을 판단하였다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 제 1 절 김치에서 *Helicobacter pylori* 억제 유산균 분리

가정집, 사찰 및 명가에서 식용되는 김치 중 맛이 가장 좋은 최적 성수기의 김치를 수집하여 마쇄하였다. 마쇄한 김치를 멸균수로 적정 배율 희석하여 MRS 평판배지에서 48시간 배양하였다. 2% CaCO<sub>3</sub>가 함유된 MRS 고체배지에 tooth pick하여 투명환을 형성하는 colony를 유산균으로 잠정적으로 분리하였다. *Helicobacter pylori* KCCM 41756에 대하여 생육을 억제시키는 유산균주를 분리하였으며, 이들 중 *H. pylori*억제능이 우수한 4종을 선발하였다. 이 분리균주를 동정하기 전까지 편의상 ML5, CL1, MD1 및 CH2로 명칭하였다.

### 제 2 절 분리 균주의 분류 및 동정

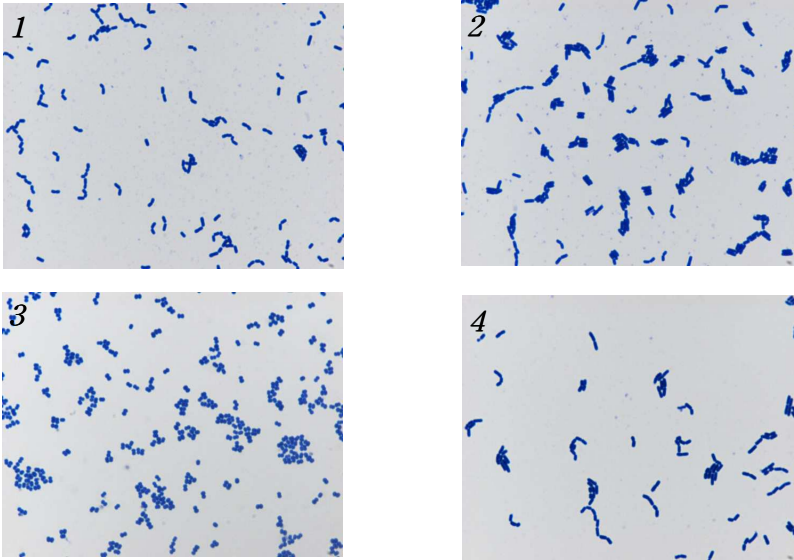
*H. pylori*를 억제하는 분리 유산균주 ML5, CL1, MD1 및 CH2의 생태학적, 배양학적 및 당대사능을 통한 생화학적 특성, 16s rRNA 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 특성을 살펴보았다. 분리균주 4종을 MRS배지에 접종하여 24시간 혐기배양하고 gram 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰한 결과 (Table 2, Fig. 2), 분리균주 ML5, CL1, CH2은 그람양성의 간균이었고 MD1은 그람양성의 구균이었으며 colony는 4종 모두 등근형 이었다. 표면은 MD1이 거칠하였고 ML5, CL1, CH2는 부드러웠으며 ML5, CL1, MD1은 크림색을 CH2는 우유빛을 나타내었다. 생화학적 특성으로 API 50 CHL kit을 통한 분리균주의 당대사능을 검토한 결과는 Table 3에 나타내었다. 분리균주의 16s rRNA 염기서열 분석을 통한 균주동정을 위하여 분리균주 4종으로부터 chromosomal DNA를 추출하고 primer Leup를 통해 특정부위의 DNA를 PCR에 의해 증폭하였다. 그



결과 ML5은 1,470 bp를, CL1은 1,381 bp를, MD1은 1,504 bp를, CH2은 1,381 bp를 결정한 후 읽어진 16S rRNA 염기서열을 분석하고 (Fig. 4, 5, 6, 7) Blast program을 사용하여 상동성을 검색하였다. 분리균주 ML5, CL1, MD1, CH2은 각각 *Lactobacillus sakei* 99%, *Lactobacillus sakei* 99%, *Pediococcus pentosaceus* 99%, *Lactobacillus sakei* 98%의 상동성을 나타내었다. 분리균주 ML5은 *Lactobacillus sakei* ML5, CL1은 *Lactobacillus sakei* CL1, MD1은 *Pediococcus pentosaceus* MD1, CH2은 *Lactobacillus sakei* CH2로 각각 명명하였으며 Fig. 7에서 16S rRNA 염기서열을 기초로 하여 분리균주들의 다른 bacteria와의 계통 발생론적 관계를 나타내었다.

*Table 2. Morphological and metabolic characteristics of the isolated strains ML5, CL1, MD1 and CH2*

<i>characteristics</i>	<i>ML5</i>	<i>CL1</i>	<i>MD1</i>	<i>CH2</i>
Gram-stain	+	+	+	+
Morphology	rod	rod	coccus	rod
Colony	circular	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	rough	smooth
Colony color	cream color	cream color	cream color	milk color
colony opacity	opaque	opaque	opaque	opaque



*Figure 2. Gram staining of the isolated strain*

1. Isolate ML5, 2. Isolate CL1, 3. Isolate MD1, 4. Isolate CH2

Gram stain kit, BD Co., USA

magnification

**Table 3. Sugar utilization of the isolated strains ML5, CL1, MD1 and CH2.**

<i>Reaction</i>	<i>ML5</i>	<i>CL1</i>	<i>MD1</i>	<i>CH2</i>	<i>Reaction</i>	<i>ML5</i>	<i>CL1</i>	<i>MD1</i>	<i>CH2</i>
control	-	-	-	-	Esculine	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	Salicine	-	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	Cellobiose	+	+	+	-
D-Arabinose	-	-	-	-	Maltose	-	-	+	-
L-Arabinose	+	+	+	+	Lactose	-	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	Melibiose	+	-	+	+
D-Xylose	-	-	+	-	Saccharose	+	-	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	Trehalose	-	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	Inuline	-	-	+	-
$\beta$ -Methyl-xyloside	-	-	-	-	Melezitose	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	D-Raffinose	-	-	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	Amidon	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	Glycogene	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	$\beta$ -Gentiobiose	-	+	+	+
Rhamnose	-	+	-	-	D-Turanose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	D-Tagatose	-	-	+	-
Mannitol	-	-	-	-	D-Fucose	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	L-Fucose	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	+	L-Arabitol	-	-	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	Gluconate	+	+	-	+
Amygdaline	-	+	+	+	2 keto-gluconate	-	-	-	-
Arbutine	-	+	+	+	5 keto-gluconate	-	-	-	-

Incubation at 30°C for 48 hours

+ : positive reaction, - : negative reaction

1 CCGCCAGCGC GTCTAATCAT GCAAGTCGAA CGCACTCTCG TTTAGATTGA AGGAGCTTGC 60  
61 TCCTGATTGA TAAACATTTG AGTGAGTGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG GGTAACCTGC 120  
121 CCTAAAGTGG GGGATAACAT TTGGAAACAG ATGCTAATAC CGCATAAAAC CTAACACCGC 180  
181 ATGGTGTAGG GTTGAAAGAT GGTTCGGCT ATCACTTTAG GATGGACCCG CGGTGCATTA 240  
241 GTTAGTTGGT GAGGTAAAGG CTCACCAAGA CCGTGATGCA TAGCCGACCT GAGAGGGTAA 300  
301 TCCGCCACAC TGGGACTGAA ACACGGCCCC AACTCCTACG GGAGGCGCCC ACAAGGAATC 360  
361 TTCCACAATG GACGAAAGTC TGATGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGAAGAAG GTTTTCGGAT 420  
421 CGTAAACTC TGTGTTGGA GAAGAATGTA TCTGATAGTA ACTGATCAGG TAGTGACGGT 480  
481 ATCCAACCAG AAAGCCACGG CTAACCTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGTGGCA 540  
541 AGCGTTGICC GGATTTATTG GGCGTAAAGC GAGCGCAGGG CGGTTTCTTA GTCTGATGTG 600  
601 AAAGCCTTCG GCTCAACCGA AGAAGTGCAT CGGAAACTGG GAAACTTGAG TGCAGAAGAG 660  
661 GACAGTGGAA CTCCATGTGT AGCGGTGAAA TCGTAGATA TATGGAAGAA CACCAGTGGC 720  
721 GAAGGCGGCT GTCTGGTCTG TAACTGACGC TGAGGCTCGA AAGCATGGGT AGCAAACAGG 780  
781 ATTAGATACC CTGGTAGTCC ATGCCGTAAG CGATGAGTGC TAGGTGTTGG AGGGTTTCCG 840  
841 CCCTTCAGTG CCGCAGCTAA CGCATTAAAG ACTCCGCTG GGGAGTACGA CCGCAAGGTT 900  
901 GAAACTCAAA GGAATTGGCG GGGGTCCACA CAAGCGGGG AACAGGTGGT ATAATTTGAA 960  
961 GCAACGCGAA GAACCTTCCC AGGTCTTGAC ATCCTTTGAC CACTCTAGAG ATAGAGCTTT 1020  
1021 CCCTTCGGGG ACAAAGTGAC AGGTGGTGCA TGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT 1080  
1081 TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TATTACTAGT TGCCAGCATT TAGTTGGGCA 1140  
1141 CTCTAGTGAG ACTGCCGGCG ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GACGACGTCA AATCATCATG 1200  
1201 CCCCTTATGA CCTGGGCTAC ACACGTGCTC CAATGGATGG TACAACGAGT TGCAGACCG 1260  
1261 CGAGGTTTAG CTAATCTCTT AAAACCATTC TCAGTTCGGA TTGTAGGCTG CAACTCGCCT 1320  
1321 ACATGAAGCC GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCAG 1380  
1381 GCCTTGATACA CACCGCCCGT CACACCATGA GAGTTTGTAA CACCCAAAGC CGGTGAGGTA 1440  
1441 ACCCTCGGAG CCGCCTCTAG GTGACAATGG 1470

*Figure 3. 16S rRNA gene sequence of the isolate ML5*

1 GGGCCCGACG TCGCATGCTC CCGGCCGCCA TGGCGGCCGC GGAATTCGA TTGCGGCGTG 60  
61 CCTAATACAT GCAAGTCGAA CGCACTCTCG TTTAGATTGA AGGAGCTTGC TCCTGATTGA 120  
121 TAAACATTTG AGTGAGTGGC GGACGGGTGA GTAACACGTG GGTAACTGC CCTAAAGTGG 180  
181 GGGATAACAT TTGGAAACAG ATGCTAATAC CCCATAAAAC CTAACACCGC ATGGTGTAGG 240  
241 GTTGAAAGAT GGTTCGGCT ATCACTTTAG GATGGACCCG CGGTGCATTA GTTAGTTGGT 300  
301 GAGGTAAAGG CTCACCAAGA CCGTGATGCA TAGCCGACCT GAGAGGGTAA TCGGCCACAC 360  
361 TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGAATC TTCCACAATG 420  
421 GACGAAAGTC TGATGGAGCA ACGCCGCGTG AGTGAAGAAG GTTTTCGGAT CGTAAAACTC 480  
481 TGTTGTTGGA GAAGAATGTA TCTGATAGTA ACTGATCAGG TAGTGACGGT ATCCAACCAG 540  
541 AAAGCCACGG CTAACACGT GCCAGCAGCC GCGTAATAC GTAGGTGGCA AGCGTTGTCC 600  
601 GGATTTATTG AGCGTAAAGC GAGCGCAGGC GGTTCCTTAA GTCTGATGTG AAAGCCTTCG 660  
661 GCTCAACCGA AGAAGTGCAT CGGAAACTGG GAAACTTGAG TGCAGAAGAG GACAGTGGAA 720  
721 CTCCATGTGT AGCGGTGAAA TCGTAGATA TATGGAAGAA CACCAGTGGC GAAGGCGGCT 780  
781 GTCTGGTCTG TAACTGACGC TGAGGCTCGA AAGCATGGGT AGCAAACAGG ATTAGATACC 840  
841 CTGGTAGTCC ATGCCGTAAA CGATGAGTGC TAGGTGTTGG AGGGTTTCCG CCCTTCAGTG 900  
901 CCGCAGCTAA CGCATTAAGC ACTCCGCCTG GGGAGTACGA CCGCAAGGT GAAACTCAA 960  
961 GGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCAACGCGAA 1020  
1021 GAACCTTACC AGGTCTTGAC ATCCTTTGAC CACTCTAGAG ATAGAGCTTT CCCTTCNNG 1080  
1081 ACAAAGTGAC AGGTGGTGCA TGTTGTTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT 1140  
1141 CCCGCAACGA GCGCAACCT TATTACTAGT TGCCAGCATT TAGTTGGCA CTCTAGTGAG 1200  
1201 ACTGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GACGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA 1260  
1261 CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGATGG TACAACGAGT TGCGAGACCG CGAGGTTTAG 1320  
1321 CTAATCTCTT AAAACCATT TCAGTTCGGA TTGTAGGCTG CAACTCGCCT ACATGAAGCC 1380  
1381 G 1381

*Figure 4. 16S rRNA gene sequence of the isolate CL1*

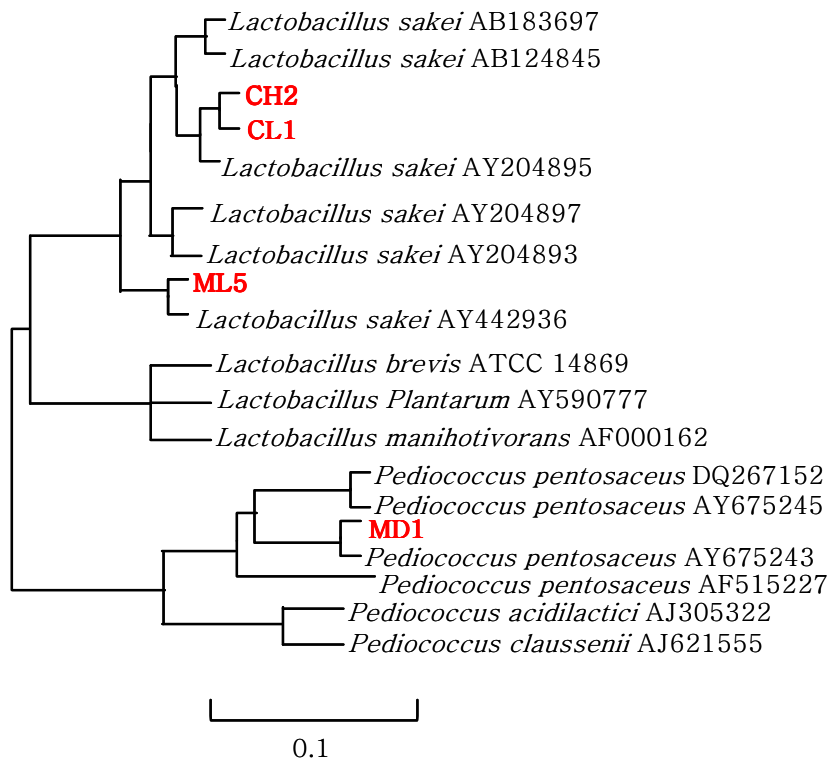
1	GCGGCGTGCC	TAATACATGC	AAGTCGAACG	AACTTCCGTT	AATTGATTAT	GACGTA	CTTGG	60
61	TACAGATTGA	GATTTTAAACA	CGAAGTGAGT	GGCGAACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTA	AACC	120
121	TGCCCAGAAG	TAGGGGATAA	CACCTGGAAA	CAGATGCTAA	TACCGTATAA	CAGAGAAAAC		180
181	CGCATGGTTT	TCTTTTAAAA	GATGGCTCTG	CTATCACTTC	TGGATGGACC	CGCGGCGTAT		240
241	TAGCTAGTTG	GTGAGGTAAA	GGCTCACCAA	GGCAGTGATA	CGTAGCCGAC	CTGAGAGGGT		300
301	AATCGGCCAC	ATTGGGACTG	AGACACGGCC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG	CAGTAGGGAA		360
361	TCTTCCACAA	TGGACGCAAG	TCTGATGGAG	CAACGCCGCG	TGAGTGAAGA	AGGGTTTCGG		420
421	CTCGTAAAGC	TCTGTTGTTA	AAGAAGAACG	TGGGTAANAG	TAAGTGTTTA	CCCAGTGACG		480
481	GTATTTAACC	AGAAAGCCAC	GGCTAACTAC	GTGCCAGCAG	CCGCGTAAT	ACGTAGGTGG		540
541	CAAGCGTTAT	CCGATTTAT	TGGGCGTAAA	GCGAGCGCAG	GCGGTCTTTT	AAGTCTAATG		600
601	TGAAAGCCTT	CGGCTCAACC	GAAGAAGTGC	ATTGGAAACT	GGGAGACTTG	AGTGCAGAAG		660
661	AGGACAGTGG	AACTCCATGT	GTAGCGGTGA	AATGCGTAGA	TATATGGAAG	AACACCAGTG		720
721	GCGAAGGCGG	CTGTCTGGTC	TGTAAGTAC	GCTGAGGCTC	GAAAGCATGG	GTAGCGAACA		780
781	GGATTAGATA	CCCTGGTAGT	CCATGCCGTA	AACGATGATT	ACTAAGTGTT	GGAGGGTTTC		840
841	CGCCCTTCAG	TGCTGCAGCT	AACGCATTAA	GTAATCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAGG		900
901	TTGAAACTCA	AAAGAATTGA	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTTCG		960
961	AAGCTACGCG	AAGAACCCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCTTCTG	ACAGTCTAAG	AGATTAGAGG		1020
1021	TTCCTTCG	GGACAGAATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT		1080
1081	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CTTATTACTA	GTTGCCAGCA	TTAAGTTGGG		1140
1141	CACTCTAGTG	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGACGACGT	CAAATCATCA		1200
1201	TGCCCTTAT	GACCTGGGCT	ACACACGTGC	TACAATGGAT	GGTACAACGA	GTCGCGAGAC		1260
1261	CGCGAGGTTA	AGCTAATCTC	TTAAAACCAT	TCTCAGTTCG	GACTGTAGGC	TGCAACTCGC		1320
1321	CTACACGAAG	TCGGAATCGC	TAGTAATCGC	GGATCAGCAT	GCCGCGGTGA	ATACGTTCCC		1380
1381	GGGTCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAT	GAGAGTTTGT	AACACCCAAA	GCCGGTGGGG		1440
1441	TAACCTTTTA	GGAGCTAGCC	GTCTAAGGTG	GGACAGATGA	TTAGGGTGAA	GTCGTAACAA		1500
1501	GGTA	1504						

*Figure 5. 16S rRNA gene sequence of the isolate MD1*

1 GCGGCGTGCC TAATACATGC AAGTCGAACG CACTCTCGTT TAGATTGAAG GAGCTNGCTC 60  
61 CTGATTGATA AACATTTGAG TGAGTGGCGG ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAACCTGCCC 120  
121 TAAAGTGGGG GATAACATTT GGAAACAGAT GCTAATACCG CATAAAACCT AGCACCGCAT 180  
181 GGTGCAGGGT TGAAAGATGG TTTCCGGCTAT CACTTTAGGA TGGACCCGCG GTGCATTAGT 240  
241 TAGTTGGTGA GGTAAAGGCT CACCAAGACC GTGATGCATA GCCGACCTGA GAGGGTAATC 300  
301 GGCCACACTG GGA CTGAGAC ACGGCCAG A CTCCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT 360  
361 CCACAATGGA CGAAAGTCTG ATGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGAAGAAGGT TTTCCGGATCG 420  
421 TAAACTCTG TTGTTGGAGA AGAATGTATC TGATAGTAAC TGATCAGGTA GTGACGGTAT 480  
481 CCAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAAATACGT AGGTGGCAAG 540  
541 CGTTGTCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGCGA GCGCAGGCCG TTTCTTAAGT CTGATGTGAA 600  
601 AGCCTTCGGC TCAACCGAAG AAGTGCATCG GAAACTGGGA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA 660  
661 CAGTGGAACT CCATGTGTAG CCGTGAATG CGTAGATATA TGAAGAACA CCAGTGGCGA 720  
721 AGGCGGCTGT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG AGGCTCGAAA GCATGGGTAG CAAACAGGAT 780  
781 TAGATACCCT GGTGGTCCAT GCCGTAAACG ATGAGTGCTA GGTGTTGGAG GGTTCGGCC 840  
841 CTTCAGTGCC GCAGCTAACG CATTAAAGCAC TCCGCCTGGG GAGTACGACC GCAAGGTTGA 900  
901 AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC 960  
961 AACCGGAAGA ACCTTACCAG GTCTTGACAT CCTTTGACCA CTCTAGAGAT AGAGCTTTCC 1020  
1021 CTTCGGGGAC AAAGTGACAG GTGGTGCATG GTTGTCTGCA GCTCGTGTCTG TGAGATGTTG 1080  
1081 GGTAAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCTTA TTAGTAGTTG CCAGCATTAA GTTGGGCACT 1140  
1141 CTAGTGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA CGACGTCAA TCATCATGCC 1200  
1201 CCTTATGACC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGATGGTA CAACGAGTTG CGAGACCGCG 1260  
1261 AGGTTTAGCT AATCTCTTAA AACCATTCTC AGTTCGGATT GTAGGCTGCA ACTCGCCTAC 1320  
1321 ATGAAGCCGG AATCGCTAGT AATCGCGGAT CAGCATGCCG CGGTGAATAC GTTCCCGGGT 1380  
1381 C 1381

*Figure 6. 16S rRNA gene sequence of the isolate CH2*





*Figure 7. Phylogenetic relationship between Lb. sakei ML5, Lb. sakei CL1, Ped. pentosaceus MD1, Lb. sakei CH2 and other related bacteria based on 16S rRNA gene sequence*

### 제 3 절 *Helicobacter pylori* 억제 유산균의 특성

#### 1. 배양시간에 따른 생육도

분리균주 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2를 30℃에서 48시간 정치배양하면서 매 4시간마다 흡광도를 측정하여 배양시간에 따른 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. Fig. 8과 같이 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2은 4시간부터 12시간까지 대수적으로 증가 하였고 12~16시간에서 생육도가 최대가 되었으며, 그 이후에는 정지기로 들어가는 것을 관찰할 수 있었다.

#### 2. NaCl 농도에 따른 배지의 생육도

NaCl이 균주 성장에 미치는 영향을 검토하기 위해 MRS 액체배지에 NaCl을 0, 1, 3, 5 및 7%가 되게 첨가하여 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. Fig. 9와 같이 4균주 모두 NaCl 농도 0%~3%범위에서  $A_{600}$ : 5.0 이상을 나타내어 생육도가 왕성하였다. 분리균주 중 *Lb. sakei* ML5, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2는 0~5% NaCl에서 0% NaCl에 비하여 60%의 생육도를 나타내었으나, 배지 내 7% NaCl 농도에서는 급격히 생육도가 감소하여 배지 내 0% NaCl에 비하여 25%의 생육도를 나타내었다. *Lb. sakei* ML5, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2는 이로부터 0~5% NaCl 범위에서 내염성을 나타내었다. *Lb. sakei* CL1은 배지 내 NaCl 1%이상 농도부터 급격히 생육도가 떨어지는 양상을 보여 다른 3종의 균주보다 내염성이 낮음을 알 수 있었다.

### 3. 초기 pH에 따른 배지의 생육도

1.0 N NaOH 또는 1 N HCl로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 9.0, 10.0, 12.0으로 보정한 MRS 액체배지에 30°C에서 24시간 정치배양하여 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. Fig. 10과 같이 분리균주 4종 모두 pH 5.0에서 부터 pH 10.0까지의 범위에서 잘 생육하였으나 pH 5.0 이하 pH 10.0 이상에서는 급격히 감소하는 생육도를 나타내었다. 분리균주 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2의 최적 pH는 7.0으로 나타났다.

### 4. *Helicobacter pylori* 저해활성

분리균주 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1 및 *Lb. sakei* CH2의 *H. pylori*에 대한 저해력을 확인하기 위하여 *H. pylori*를 10% horse serum이 함유된 brucella 액체배지에 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 교반배양 후 고체배지에 도달한 다음 제공된 농축배양액을 paper disk에 가하여 실험한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 각 disk의 저해환을 측정하여 분리유산균의 *H. pylori* 저해력을 판단할 수 있었다. 분리유산균 4종 중 *H. pylori* KCCM 41756에 대한 가장 큰 저해환을 나타낸 것은 *Ped. pentosaceus* MD1으로 저해환 18.83 mm이였고 다음이 *Lb. sakei* CH2 17.5 mm, *Lb. sakei* CL1 15.50 mm, *Lb. sakei* ML5 14.60 mm의 순서로 저해환이 나타났다. 억제활성은 동일 균종에서도 균주에 의한 차이가 있었으며 균에 의하여 생성되는 항균물질의 생성능력 차이에 기인될 것으로 판단된다.

## 5. Urease 활성 억제효과

*H. pylori*의 생리학적 특성 중 가장 주목할 만한 것으로서 다량의 urease (urea aminohydrolase) 생성능력이 보고되었다. Urease는 1분자의 urea에서 2분자의 암모니아와 하나의 수소이온을 생성함으로써 pH를 상승시켜 위액의 강한 산성 조건에서도 *H. pylori*가 살 수 있도록 도와주는 것으로 알려져 있다(12, 26). 이와 같이 *H. pylori* 생존율은 요소분해 효소에 의해서 생성되는 암모니아 존재 시 증가한다고 판단하고 요소분해 효소의 활성 저해능을 실험해서 *H. pylori*의 억제효과를 간접적으로 측정하였다(5). *H. pylori*를 BHI (Difco., France) 액체배지에 계대배양 후 5 mL배양액을 원심분리 (9,950×g, 10 min, 4°C)하여 PBS (phosphate buffer saline)로 2회 세척 후 PBS를 가한 다음 동량 5 mL로 맞추었다. BHI 액체배지에 PBS로 세척 후 현탁하여 준비된 *H. pylori* 배양액을 2% (v/v) 접종하고 제균 된 유산균 배양상징액 각각 BHI 액체배지에 10%, 20%를 접종한 다음 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 것을 urea 액체배지 2 mL에 위의 배양액 100 µL씩 넣어 30분 간격으로 3시간 동안 A<sub>560</sub>에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 12, 13에 나타내었다. 10% 유산균 배양상징액에서는 *Ped. pentosaceus* MD1 저해력이 가장 컸고 다음이 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Lb. sakei* CH2 순서였다. Urease 활성 저해력이 가장 큰 *Ped. pentosaceus* MD1과 가장 작은 *Lb. sakei* CH2의 urease 활성 저해력 차이는 11% 이상으로 나타났다. 20% 유산균 배양상징액에서는 *Lb. sakei* ML5가 저해력이 가장 크게 나타났고 *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2, *Lb. sakei* CL1 순서였다. Urease 활성 저해력이 가장 큰 *Lb. sakei* ML5와 가장 작은 *Lb. sakei* CL1의 저해력 차이는 15% 이상임을 확인할 수 있었다. *H. pylori*에 대한 저해력은 10% 유산균 배양상징액일 때 보다 20% 유산균 배양상징액일 때가 3배 이상 향상되는 것을 확인하였다. 유산균 배양액 첨가량이 많을수록 *H. pylori*의 urease 활성 억제효과가 큰 것을 알수 있었고 이러한 결과는 *H. pylori*의 생육을 억제하는 기작이 요소분해 효소의 활성 억제 때문이라고 주장한 것과 일치하였다(14).

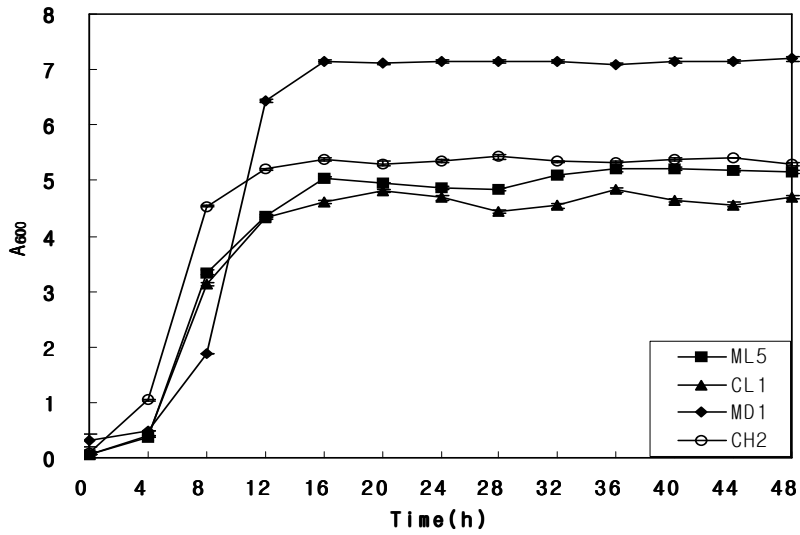
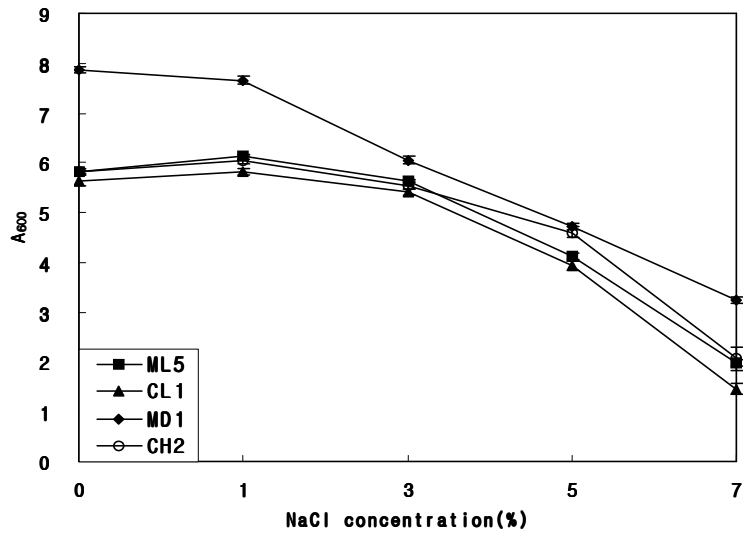


Figure 8. Growth curves of *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1 and *Lb. sakei* CH2 in MRS broth at 30°C

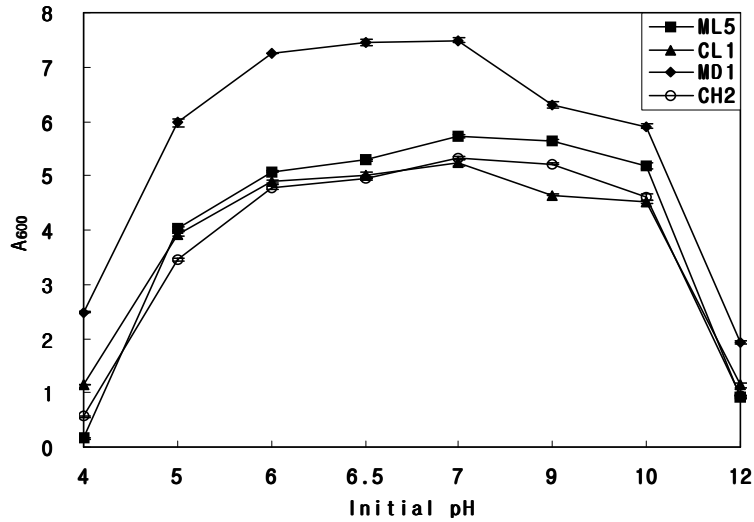
All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)



*Figure 9. Effects of the NaCl concentration on growths of Lb. sakei ML5, Lb. sakei CL1, Ped. pentosaceus MD1 and Lb. sakei CH2*

Incubation in MRS broth containing 0~7% NaCl at 30°C for 24 hours

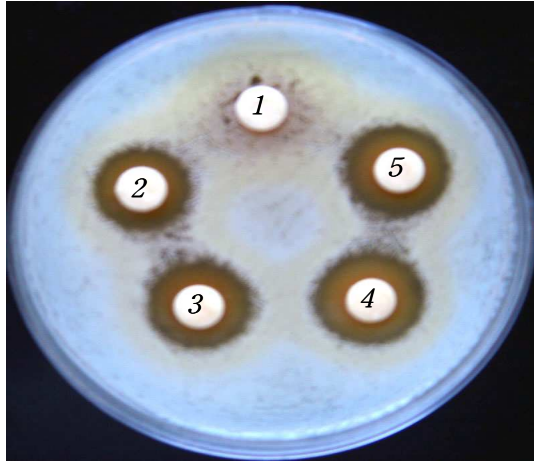
All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)



*Figure 10. Effects of the initial media pH on growths of Lb. sakei ML5, Lb. sakei CL1 and Ped. pentosaceus MD1 and Lb. sakei CH2*

Incubation in MRS broth to adjust the pH 4~12 at 30°C for 24 hours

All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)



*Figure 11. Inhibition activity of the LAB against H. pylori KCCM41756*

Incubation in brucella 10% horse serum plate at 37°C and 10% CO<sub>2</sub> for 24 hours

1. control: MRS broth (×25, 100μl)
2. *Lb. sakei* ML5
3. *Lb. sakei* CL1
4. *Ped. pentosaceus* MD1
5. *Lb. sakei* CH2



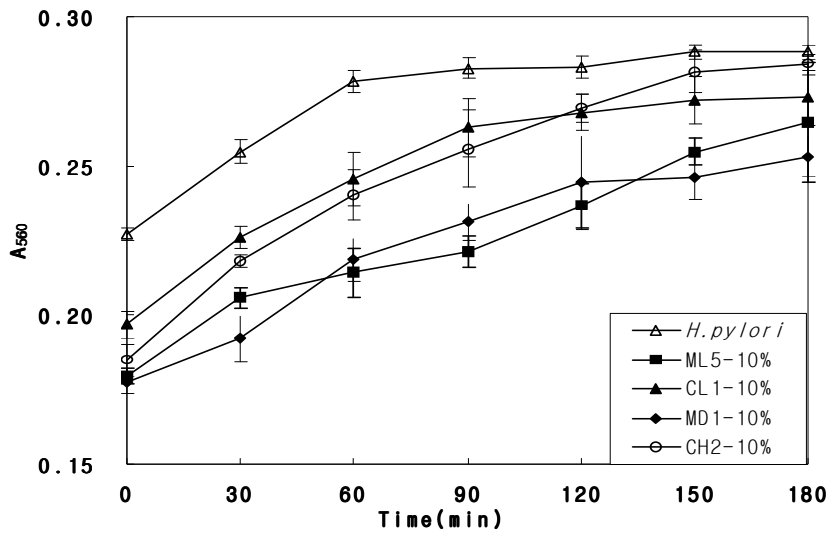


Figure 12. Urease activity of *H. pylori* by the LAB culture supernatant 10%(V/V) addition

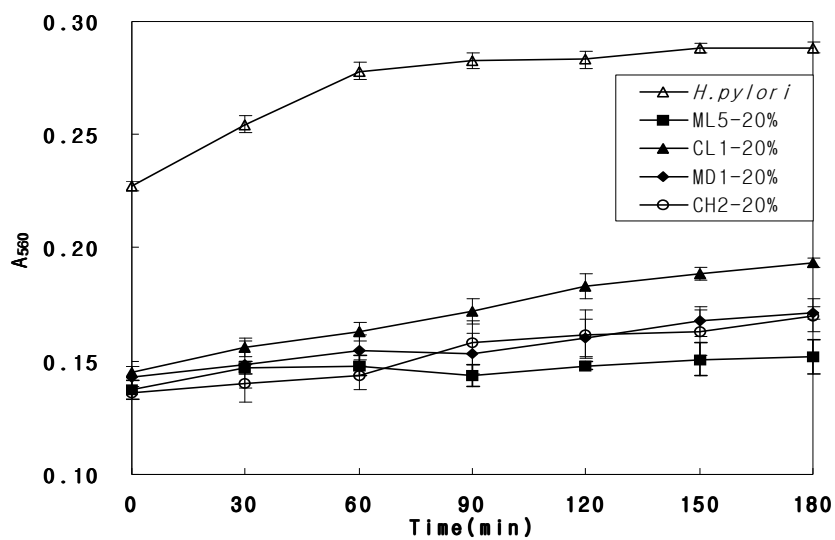


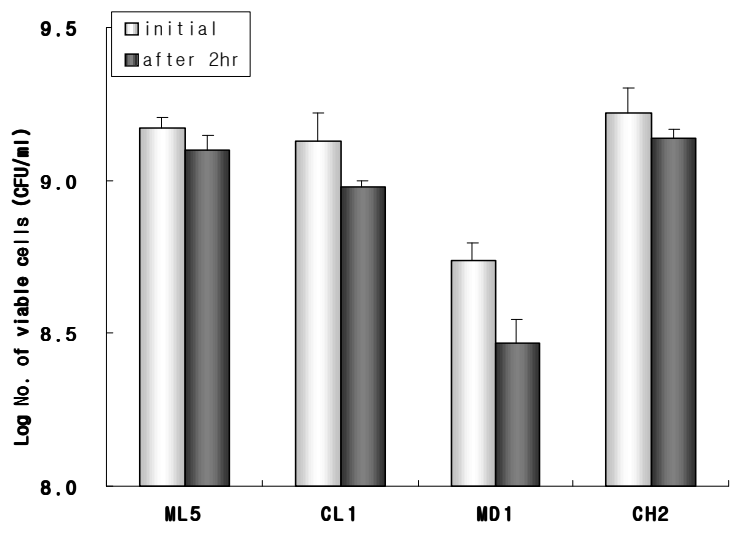
Figure 13. Urease activity of *H. pylori* by the LAB culture supernatant 20%(V/V) addition

## 제 4 절 분리균주의 장내 생존성 및 안전성

### 1. 내산성 및 인공위액 저항성

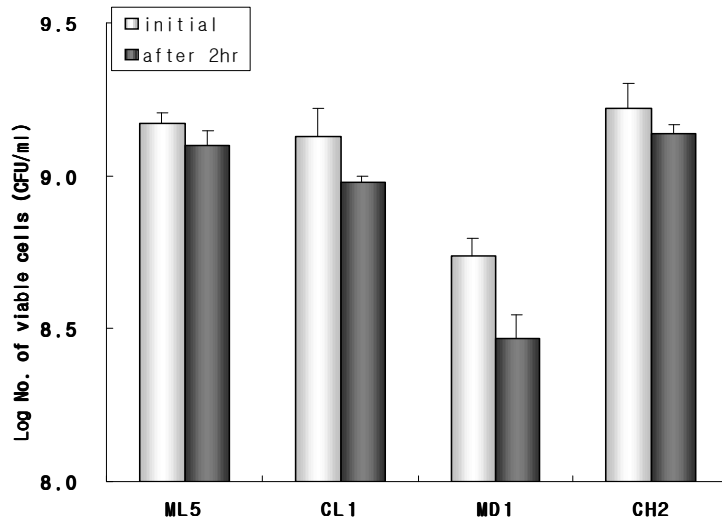
구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여 생존해야 한다. 따라서 4종의 분리 균주 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1 및 *Lb. sakei* CH2에 대하여 단순 산성 pH에 대한 내성을 측정하기 위하여 pH 3.0으로 조정된 0.05 M sodium phosphate 용액과 위액에 대한 내성을 알아보기 위하여 pepsin (1,000 unit/mL)이 함유된 인공위액을 제조하여 저항성 시험을 실시하였다. 산 저항성 여부는 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정한 것을 평균치로 나타내었다. 그 결과 Fig. 14, Fig.15에 나타난 바와 같이 4종의 분리균주는 0.05 M sodium phosphate 용액과 인공위액에서 2시간이 지난 후에도 사멸하지 않고 초기균수 ( $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL)를 유지하며 99% 이상의 높은 저항성을 나타내었다. 이는 위에서 생존하여 장으로 이동할 수 있다는 가능성을 제시한 결과라 할 수 있겠다. 순수한 위액의 pH는 pH 1.4~2.0 정도로 거의 대부분 미생물은 여기에서 사멸하게 되지만 섭취한 음식물의 완충작용으로 인해 위의 pH가 높아진다는 것을 고려한다면 생존율은 더욱 높아질 것으로 사려 된다(27).

지금까지 산에 대한 강한 내성을 지님으로써 probiotics로 기능할 수 있는 유산균들이 많이 연구되어졌다. 그러나 이들 균들의 분리원이 동물의 장이나 분변에서 분리한 것이거나 식품에서 분리한 경우도 대부분 발효유제품에서 분리한 것이고, 김치에서 분리한 유산균의 경우는 이 등의 보고가 있지만(44) 인공위액 처리 시 초기 균수  $10^9$  CFU/mL에서  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL을 나타내며 대체로 생균수는 1~2 log cycle 감소하여 비교적 낮은 생존율을 보였다.



*Figure 14. Acid tolerance of the LAB in 0.05M sodium phosphate at pH3.0*

All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)



*Figure 15. Acid tolerance of the LAB in the artificial gastric juice at pH 3.0*

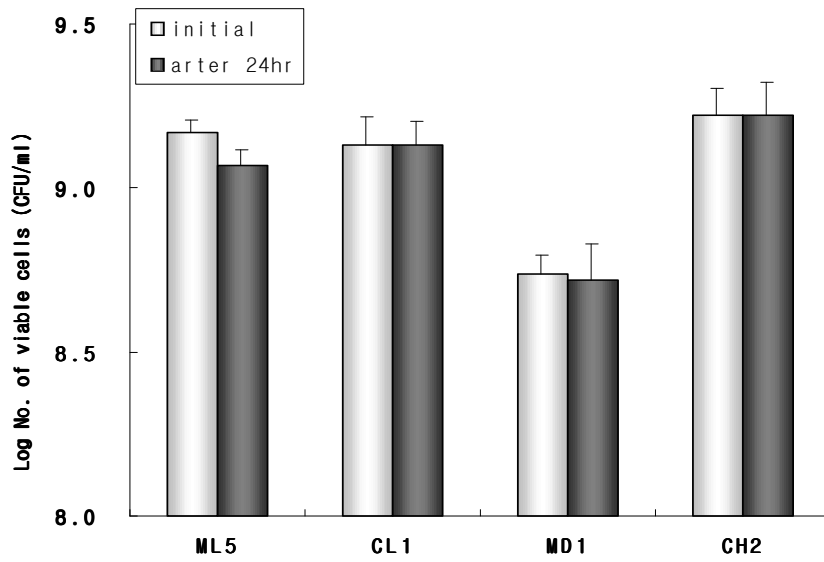
All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)

## 2. 인공담즙 저항성

본 연구에서 4종의 분리균주는 모두 인공위액에서의 높은 생존율로 인해 위를 통과하여 장으로 이동할 수 있을 것으로 예측하였다. 위를 거쳐 장에 도달하기 위해서는 그 전에 체장과 십이지장을 통과하게 되는데, 이 부위에서는 담즙액이 분비된다. 따라서 최종적으로 살아있는 유산균이 장내로 들어오기 위해서는 담즙액에 대한 내성 또한 갖추어야 할 중요한 특성이다. Gilliland 등은 probiotics생균이 가져야할 담즙액에 대한 내성은 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다고 보고한 바 있다(16). 실제로 probiotics 생균으로서의 기능을 정상적으로 수행하려면 장내 담즙의 농도 (0.6 g/L)보다 훨씬 많은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있는 내성을 가져야 한다 (21).

인공담즙에 대한 저항성을 측정하기 위하여 분리균주 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2의 인공위액 처리전 배양액과 인공위액 저항성 시험을 거친 배양액을 각각 0.3% (v/v)와 0.5% (v/v) oxgall이 함유된 MRS에 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 저항성 여부는 생균수를 측정하여 비교한 것으로, 생균수는 적정비율로 희석하여 3번씩 측정한 것을 평균치로 나타내었다. 그 결과 0.3%의 oxgall 함유 인공담즙에서 분리균주 4종 모두 초기균수 ( $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL)를 유지하며 초기균수의 98~100%의 높은 생존을 나타내었고(Fig. 16), 0.5% oxgall에서도 분리균주 4종 모두 초기균수 ( $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL)를 유지하면서 99% 이상의 높은 생존율을 보였다(Fig. 17). 우리의 소화기는 위를 통과하여 장으로 도달하기 때문에 이와 동일한 조건에서 실험하기 위하여 pepsin (1,000 unit/mL)에서 2시간 처리 후 0.3% oxgall에서 24시간 처리하여 생존율을 확인하였다. Fig. 18과 같이 분리균주 4종은 oxgall 처리전의 초기균수의 96~98%로 높은 생존율을 보였다. 정 등 (56)이 보고한 동치미에서 분리한 *Lactobacillus* sp. FF-3이 인공위액에서의 저항성이 높은 반면 인공담즙에서의 생존율이 6%로 나타난 점에 비하면 본 연구에서의 분리균주 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2는 99%의 높은 내산성의 기능

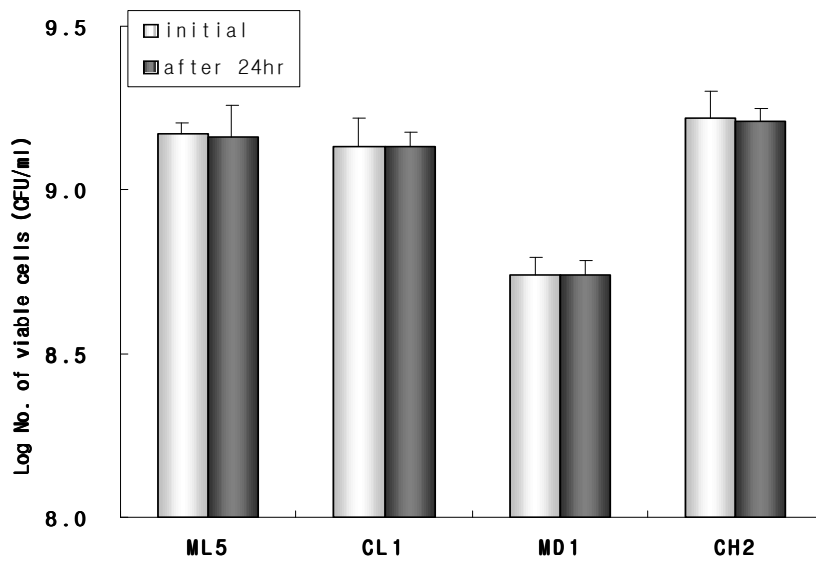
을 가졌다고 볼 수 있다. 동시에 담즙에 대한 높은 저항성을 나타내어 기존의 연구에서는 내산성, 인공위액처리 및 담즙산 처리 후 ( $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL) 정도의 생균수만을 나타낸 것과 비교하면 4종의 분리균주 모두 10배 이상 더 높은 장내 정착성을 나타내었다. 위암이나 만성위염의 원인 균인 *H. pylori*를 저해하기 위해서는 위속의 강한 산성 환경에서도 생존해야하므로 이를 저해하기 위해서는 유산균 역시 산에 대한 높은 생존율을 가져야 한다. 본 연구에서 분리된 균주 4종은 이러한 요건을 만족시키고 동시에 장내로 이동한 후에도 장내에서 정상작용의 기능을 수행할 수 있다는 점에서 타 연구와 차별화 할 수 있다.



*Figure 16. Bile resistance of the LAB against 0.3% oxgall media*

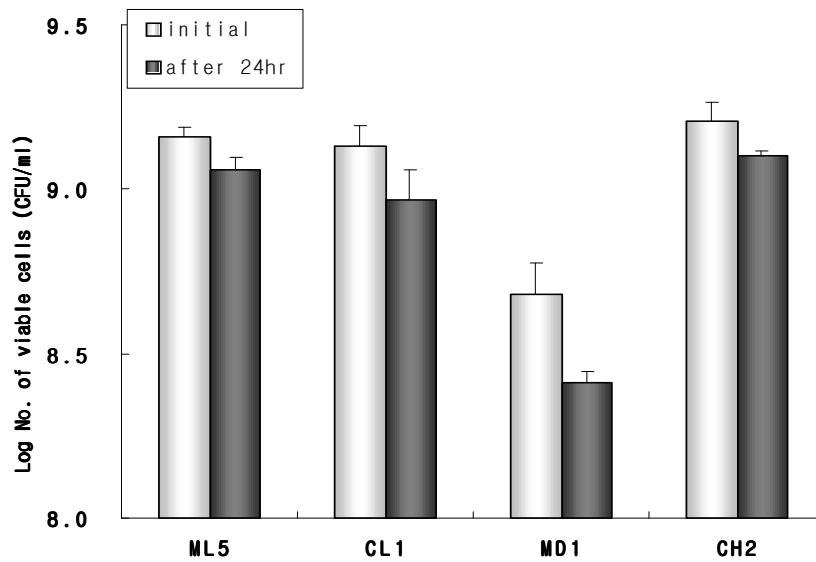
All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)





*Figure 17. Bile resistance of the LAB against 0.5% oxgall media*

All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)

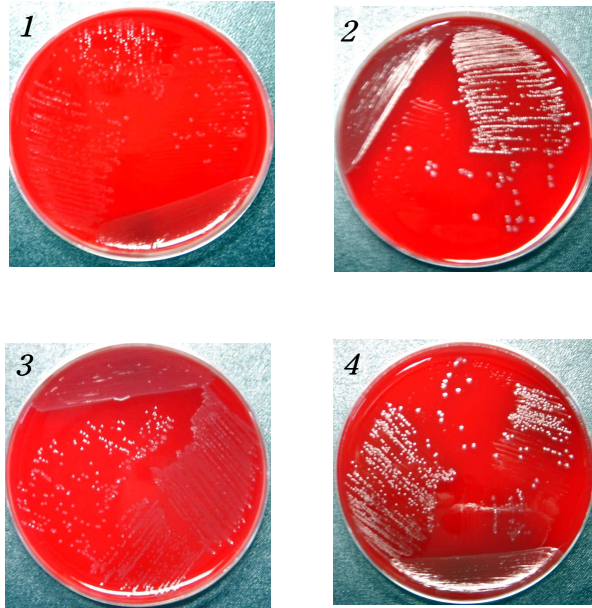


*Figure 18. Bile resistance of the LAB against 0.3% oxgall after treatment for 2h in artificial gastric juice of pH 3.0*

All values were mean  $\pm$  S.E.(n=3)

### 3. 용혈성 검사

용혈은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는 비정상적인 작용이다. 본 연구에서는 김치로부터 분리된 *H. pylori* 억제 유산균이 유해균에는 활성이 있으나 인체에는 독성이 없음을 증명하기 위하여 용혈성 검사를 시행한 결과를 Fig. 19로 나타내었다. 분리균주 4종 모두 용혈성 검사에서 균체주위에 투명환을 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않았으므로 분리균주를 적용한 probiotics로의 안전성을 입증하였다.



**Figure 19. Hemolysis test for the LAB**

7% horse blood contain blood agar base plate at 37°C 5% CO<sub>2</sub> for 48 hr

1. *Lb. sakei* ML5, 2. *Lb. sakei* CL1, 3. *Ped. pentosaceus* MD1, 4. *Lb. sakei* CH2

## 제 4 장 결 론

*Helocobacter pylori*는 1983년 Warren과 Mashall에 의해 발견되었다. 음식물과 함께 위 내강에 들어온 세균이 강한 운동성을 가진 편모를 이용하여 위 점액층을 뚫고 들어간다. 위 점액층 내에 위 상피세포층 상부와 세포 간 접합부에 서식하면서 다량의 urease를 분비하여 점액층을 알칼리성으로 변화시킴으로서 gastrin에 의한 위산분비 촉진을 비정상적으로 과다하게 유도한다. 이로 인해 염증, 궤양 및 암 등 질병의 원인이 된다. 치료법으로 bismuth제제, netronidazole, amoxicillin, tetracycline을 포함하는 3가지 항균제를 동시에 투여하고 있지만 환자의 순응도, 항생제의 내성, 재발가능성 내제 및 고비용 등의 문제가있다.

최근에 *H. pylori*에 재감염, 치료중의 여러 문제점 등의 이유로 천연물질에서의 연구가 활발해지고 있다. 본 연구는 여러 천연물질 중 우리나라 고유의 채소 발효식품인 김치로부터 *H. pylori*억제 활성이 높은 유산균을 선별하여 urease 활성 억제, 장내 정착성 여부, 안전성을 확인하였다. 분리유산균의 *H. pylori* 억제능을 규명하기 위하여 paper disk assay로 억제환을 측정된 결과 분리균주 4종 모두 *H. pylori*를 억제하는 것으로 나타났고 그 중 억제환이 가장 큰 것은 *Ped. pentosaceus* MD1이었다. *H. pylori*의 생리학적 특성 중 주목할 만한 것은 다량의 urease 생성인데, 이 urease는 pH를 상승시켜 위액의 강한 산성 조건에서도 *H. pylori*가 살아갈 수 있도록 도와주는 것으로 알려져있다. Urease활성을 억제하는 것이 *H. pylori*의 감염예방을 위한 하나의 방법이 될 수 있기 때문에 분리균주의 urease 활성 억제를 측정하였다. 분리균주 4종의 배양상징액의 첨가량을 BHI 액체배지에 10% 및 20%로 조정하여 urease 활성 억제 효과를 측정된 결과 10% 유산균배양상징액 첨가구에서 보다 20% 유산균 배양상징액 첨가구에서 urease 활성 억제 효과가 3배 이상 크게 나타났다. 10% 유산균배양상징액에서는 *Ped. pentosaceus* MD1이, 20% 배양상징액 에서는 *Lb. sakei* ML5가 강한

urease 억제활성이 나타났으나, 두 균의 활성억제크기는 오차범위안에 있으므로 유의성이 없다. *H. pylori*를 억제하는 김치유산균의 장내 정착성 여부 확인을 위하여 내산성, 인공위액 및 인공 담즙액에서 처리한 결과 pH 3.0의 0.05 M sodium phosphate buffer와 인공위액에서 2시간 처리한 후에도 분리유산균 4종 모두 초기균수( $10^8 \sim 10^9$  CFU/unit)를 유지하였으며, 인공담즙 저항성 실험의 경우 위액에서 생존 시 위에서 장으로 이동할 것임을 고려하여 인공위액에서 생존한 균주를 동일조건의 인공담즙에 대해서도 초기균수 ( $10^8 \sim 10^9$  CFU/unit)를 유지하며 높은 저항성을 나타내었다. 이 결과로 인해 본 연구에서 분리한 4종의 *H. pylori* 억제 김치유산균 *Lb. sakei* ML5, *Lb. sakei* CL1, *Ped. pentosaceus* MD1, *Lb. sakei* CH2은 위에서 *H. pylori* 정착 및 생성을 억제하고 장내 정착하면서 정상 작용을 할 수 있을 것을 확인하였다. 김치로부터 분리된 4종의 유산균이 *H. pylori*의 억제는 활성이 있으나 인체에는 무독함을 증명하기 위하여 용혈검사를 시행한 결과 분리 유산균 4종 모두 균체주위에 투명환을 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않았으므로 분리 균주를 probiotics로 활용하여도 인체에 안전하다는 것을 확인하였다. 분리균주 4종 중 *Ped. pentosaceus* MD1은 *H. pylori* 억제환이나 urease 생성억제를 가장 크게 하면서 장내정착성 또한 우수하며 인체에도 무독함을 확인하였다. 지금까지 김치로부터 분리된 유산균이 *H. pylori*를 억제하면서 다른 기능을 할 수 있는 probiotics의 가능성을 보았다. Probiotics 유산균은 장내까지 생존하여 정상작용, 생존성과 정착성, 안전성도 중요하지만 다른 유해세균과의 영양성분에 의한 경쟁적 이용, 실제 장세포에서 생존 가능성 또한 중요하다. 앞으로의 연구는 다른 병원균과의 항균활성이나, 장세포에서의 정착성 등에 대한 추가적인 연구수행이 요구된다. 또한 앞으로의 연구를 통하여 분리 유산균이 어떤 작용에 의해서 *H. pylori*를 억제하는지 밝혀내고 그 물질을 규명해야 할 것이다.

## 제 5 장 참 고 문 헌

1. 심선택, 경규항, 유양자. 김치에 젖산균의 분리 및 이 세균들의 배추즙액 발효. 한국 식품과학회지. 22:373-379(1990)
2. 이광호 *Helicobacter pylori* 감염의 세균학적 특성. 대한의사협회지 40:1154(1997)
3. 이철우, 고창영, 하덕모. 김치발효중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지. 20:102-109(1992)
4. 임종락, 박현근, 한홍의. 김치에 서식하는 Gram 양성세균의 분리 및 동정의 재평가. 한국산업미생물학회지. 27:404-414(1989)
5. 정후길, 김응률, 전선락. *Helicobacter pylori*생육을 특이적으로 억제하는 유산균 선발. J. Micro 37(2):151-157(2001)
6. 정후길. Selection criteria for probiotics and their Industrial application. 유산균의 산업적 이용(IV)
7. 중앙대학교 의과대학 내과 김재규. *Helicobacter pylori*감염
8. 한국과학기술원 유전공학센터 미생물공학 연구실. 김치 발효와 미생물. 한국조리과학회지. 4(1):97-105(1988)

9. Adams. M. R. and Hall C. J. Growth inhibition of food-born pathogens by lactic acid and their mixtures. International. J. Food Sci. Technol. 23:287-292(1997)
10. Adbel-Bar, Harris, N. D. and Rill, R. L. Purification and properties of an anti-microbial substance produced by *Lactobacillus bulgolicus*. J. Food. Sci. 52(2):411-415(1987)
11. B. R. Won, E. H. Song, G. H. Kang, M. W. Chang and Y. H. Yoon. Inhibitory effect of *Lactobacillus heiviticus* CU631 on urease and vacuolating toxin activity of *Helicobacter pylori* J. Anim. Sci & Technol(kor) 43(6):931-940(2001)
12. C. E. Park, C. H. Park. Inhibition of urease activity of *Helicobacter pylori* by *Artemisia asiatica Nakai* korean J. Biotechnol Bioeng. 19(5):348-351(2004)
13. Cheigh. H. S. and Park. K. Y. Biochemical, microbiological and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). Criv. Rev. Food sci nutr. 34:175-203(1994)
14. E. A Bae, D. H. Kim, and M. J. Han. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Bifidobacterium spp* J. Microbiol. Biotechnol. 10:532-234(1998)
15. E. A. Kim, S. C . Baick and W. H. Chung. A study on growth inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by lactic acid bacteria. Korean. J. Anim, Sci & Technol. 44(4):491-498(2002)
16. Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci.



67:3045-3051(1984)

17. Gonzalez, S. N. Apella. M. C. Romero, N. C and Oliver. inhibition of enteropathogens by *Lactobacillus* strains used in fermented milk. J. Food protect 56(9)773-776(1993)
18. Goodwin CS, Amstrong JA, Chilvers T. *Campylobacter pyloris* and *Campylobacter mustele* to *Helicobacter gen.nor* as *Helicobacter pylori Comb. nov* and *Helicobacter mustele Comb. nov* respectively. Int. Systbacteriol 39:397(1989)
19. Hentschel E., G. Brandstatter, B. Dragosics, A. M. Hirschl, H. Nemeč, K. Schutze, M. Taufer, and H. Wuzer. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. N. Engl. J. Med. 328:308-312(1993)
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
21. Hyun-Dong Paik, Min-Yong Jung, Hwang-Young Jung, Won-Seok Kim and Kee-Tae Kim. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. Korean J. Food Sci. Technol. 34(1):73-78(2002)
22. Jang BK, Ahn SH, Hu JW, Hwang JS, Kang YW, Park SK. The effect of *Helicobacter pylori* infection on peptic ulcer bleeding. J. Korean Gastroterol 34:295-300(1999)

23. Jae-Ho Hyun, Hyun-Dae Kim, Hong-Su Lee and Beung-Ho Ryn. Isolation of *Lactobacillus sp.* produced  $\gamma$ -Aminobutyric acid from traditional salt fermented anchovy. Korean J. Food & Nutr. 17:72-79.(2004)
24. J. H. Kang and M. S. Lee. In Vitro Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Enterococcus faecium* GM-1 J. Microbiol. 51:629-636(2005)
25. Jong-Gil Park, Suk-Young Yun, SeJong Oh, Jung-Gul Shin and Young-Jin Bark. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from korean Breast-Fed Fufant Korean. J. Food Sci Technol. 35(6):1244-1247(2003)
26. J. S. Kim, M. J. Bail and K. H. Rhee. Purification of the urease of *Helicobacter pylori* and production of monoclonal antibody to the urease of *Helicobacter pylori*. Korean J. Soc. Microbiol. 23:17-26(1988)
27. Jae-Hun Sim, Se-Jong Oh, Sang-Kyo Kim and Young-Jin Baek. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. Korean J. Food Sci. Technol. 27(1):101-104(1995)
28. Jung-Sook Lee, Min-Chul Jung, Woo-Sik Kim, Keun-Chul Lee, Hong-Joong Kim, Chan-Sun Park, Hun-Joo Lee, Yun-Jung Joo, Kun-Jong Lee. Identification lactic acid bacteria from kimchi by cellular FAME<sub>s</sub> analysis. korean. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24(2):234-241(1996)
29. Jung Mogg. Kim. M. D. Current Research on the virnlence factors of *Helicobacter pylori*. 대한 소화기 학회지41:77-86(2003)

30. Kobayashi, Y., Tohyama, K. and Terashima, T. 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(1974)
  
31. K. H. Rhee, J. M. Cho, J. B Cho and Y. C. Kim. Bacteriological characteristics of *Campylobacter pylori*. Korean. J. Microbiol. 23:17-26(1988)
  
32. Kang. S. M, Yung W. S. Kim, Y. C. , y\Joung. E. Y. and Han. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of stater. Kor. J. Alii. Microbiol. 23:461-471(1995)
  
33. Kubo. J., J. R. Lee, and Kubo Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple . Agric Food chem. 47:533-537(1999)
  
34. Lee. J. J., S. H. Kim B. S. Chang, J. B. Lee, C. S. Huh, T. J. Kim and Y. J. Beak. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. kor. J. Food Sci. Technol:31:764-770(1999)
  
35. Lew. C. W. Chang. Y. K. and Ha. D. W. Changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.20:102-109(1992)
  
36. Lingeren. S. E. and Dobrogosz. W. J. Antagonistic activites of lactic acid bacteria in food and feed fermentation FEMS Microbiol Rew. 87:149(1990)

37. Nayoung Kim. Epidemiology and transmission route of *Helicobacter pylori* infection. 대한소화기학회지. 46:153-158(2005)
38. Marie-helene coconner, Vanessa lievin, Elisabeth hemeryandalain, Sernin. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain Lb. APPLIED AND ENVIRONMENT. MICROBIOLOGY. 4573-4580(1998)
39. M. S. Shin, J. J. Lee, S. H. Na, H. S. Bae, C. S. Huh and Y. J. Baek. Characteristics of *Bifidobacterium spp.* isolated from Korean feces for probiotics. Korean. J. Sci. 20:(4)273-282(1998)
40. Metchnikoff. E. The prolongation of life. Amopress, Newyork (1906)
41. Mobely HL, Island MD, Hansinger RP, Molecular biology of microbial. J. Microbiol Rev59:451-480(1995)
42. Park. K. Y. The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer. J. Korean. Soc. Food Nutr. 24:169-182(1995)
43. Patricia Ruas-Madiedo, Jeroen Hugenholtz, Pieternela Zoon. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 12:163-171(2002)
44. Piard J. C. and Desmazeud , M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. bacteriocins and other antibacterial substances. Le lait. 72:113(1992)

45. Roe IH, Yang MR, Kim JT, Joe JH, Lee JH, Ammonia induced gastric mucosal injury. J. Korean Gastroenterol. 29:442-448(1997)
46. Rauws, E.A, W, Langenberg, H. J. Houthoff, H. C. Znen, and G. N Tytgat. *Campylobacter pylori* dis-associated chronic active antral gastritis: a prospective study of its prevalence and the effect of antibacterial and antiulcer treatment. Gastroenterol. 94:33-40(1998)
47. Shin-Ho Lee, Myung-Ja No. Viability in Artificial Gastric and bile juice and antimicrobial activity of some lactic acid bacteria isolated from kimchi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25(6):617-622(1997)
48. Seon-Jae Kim. Physicochemical Characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from kimchi. Korean. J. Food culture.20(3)337-340(2005)
49. Stiles. M. E. and Hastings, J. W. Bacteriocin producing by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. trends Food Sci. Technol., 2:24(1991)
50. Tabak, M. R. Artmom, I. Potasman, and I. Neeman. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts infection. J. Appl. Bacteriol 80:667-672(1996)
51. Ten Brink, B. Minekus, M. Van der Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J. and Huis Int Veld J. H. J. Antimicrobial activity of lactobacilli preliminary characterization and optimization of production of acidocin B a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. J. Appl. Bacteriol. 77:140-148(1994)
52. Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa Urease-negative mutant

of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize. J. Infect Immun.62:3586-3589(1994)

53. Y. S. Yoon, S. H. Lee, N. I. Beak, H. Y. Kim and C. H. Park. Inhibition of cell growth and urease activity of *Helicobacter pylori* by medicinal plant extracts. Korean. J. Biotechnol Bioeng. 19(3):187-191(2004)
54. Young-Je Cho, Sung-Sook Chu, Jeung-Hoan Kim and So-Jung Yoon. Inhibition against *Helicobacter pylori* and biological activity by Rue Extracts. J. Korean Soc Food sci Nutr34(4):460-465(2005)
55. Yee. Y. K, M. W. Koo and M. L. Szeto. Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter pylori* infection. J. gastroenterol. Hepatol. 17:552-555(2002)
56. Won-Bok Chung, Won-Seok Soe, Jae-Young Cha and Young-Su Cho. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* sp. FF-3 for Probiotics Production from Korean Dongchimi. Korean Journal of Food Preservation. 10(3):406-410(2003)

## 감사의 글

2년 반이라는 시간이 너무나도 빠르게 지나간 것 같습니다. 뒤돌아보면 즐겁기도 하고 힘겹기도 했던 시간들이 지금은 아쉽게만 느껴집니다. 많은 것을 배울 수 있었고 느낄 수 있었으며 부족하기만 한 저에게 더욱 성숙할 수 있게 해준 소중한 시간 이었습니다. 저를 사랑의 눈빛으로 봐주신 모든 분들께 진심으로 고마움과 감사의 말씀 전합니다.

미숙한 저에게 논문을 마칠 수 있도록 물신양면 도와주신 장해춘 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 논문을 심사하여 좋은 논문이 나올 수 있도록 학문적 충고와 세심한 배려를 해주신 이명렬 교수님, 김복희 교수님께도 감사드립니다. 학문적 성취를 위해서 많은 가르침을 주신 서화중 교수님, 노희경 교수님, 김경수 교수님께도 감사드립니다.

언제나 저에게 관심 갖고 힘들때 위로해주신 은주언니, 따뜻한 말과 웃음으로 챙겨주신 지윤언니, 항상 석사들을 친동생처럼 챙겨주신 장미언니, 언제나 저의 마음을 잘 알아주시던 효주언니, 투정 부릴때 마다 받아주시던 유란언니, 실험실에서 가장 큰 힘이 되 준 율이, 착하고 귀여운 지혜와 현경이, 막내 은실에게도 진심으로 감사의 마음 전합니다.

그리고 6년이라는 시간동안 힘들때 항상 응원해주던 친구 은정, 민정, 소현, 정희, 길진이, 미숙에게 고마움전하며, 논문 쓰는 동안 힘내게 도와준 지용이 에게도 고마움 전합니다.

그 어떤 말과 글로도 고마움 전할 수가 없는 저의 가족들.....  
항상 셋째딸 말이면 다 믿어주시고 들어주시던 아빠, 속없다며 걱정해주시던 엄마 부모님께 너무나도 큰 은혜에 감사, 사랑의 말 전하고 싶습니다. 언제나 제 편이 되어준 큰언니, 둘째언니, 동생이지만 언니 같은 세상에 하나뿐인 맘 착한 동생지화, 첫째형부, 둘째형부, 이모 말 잘 듣는 광현, 아름, 지민이에게도 고마움마음 전합니다.

항상 저를 지켜봐주시고 응원 해주신 모든 분들께 다시 한번 감사드리며 이 논문을 마칩니다.

## 저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20057054	과 정	석사
성 명	한글: 손 지 용      한문 : 孫智龍      영문 : Son, Ji Young				
주 소	광주 광역시 광산구 소촌동 스위트벨리 303동 601호				
연락처	E-MAIL : 0176155665@hanmail.net				
논문제목	한글 : 김치로부터 <i>Helicobacter pylori</i> 억제 유산균의 분리 및 특성 규명 영문 : Isolation and characterization of Kimchi lactic acid bacteria harboring anti- <i>Helicobacter pylori</i>				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(    ) 조건부 동의(    ) 반대( ○ )

2006년 12월

저작자: 손 지 용 (서명 또는 인)

**조선대학교 총장 귀하**