

Fomitopsis pinicola 균사체배양액의 *Helicobacter pylori*에 대한 저해물질의 분리 및 특성

이재경 · 최성우 · 황유현 · 박희국 · †운정원
수원대학교 자연과학대학 생명공학과
(접수 : 2006. 6. 1., 게재승인 : 2006. 10. 23.)

Isolation and Characterization of Inhibition *Helicobacter pylori* from Culture Media of *Fomitopsis pinicola*

Jae Kyoung Lee, Seong Woo Choi, Yu Hyun Hwang, Hee Kuk Park, and Jeong Weon Yoon†
Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science,
The Suwon University, Hwaseong 445-743, Korea
(Received : 2006. 6. 1., Accepted : 2006. 10. 23.)

The culture media from *Fomitopsis pinicola* were extracted by methanol and examined growth inhibition against *Helicobacter pylori*. The culture media from 8 days fermentation of *F. pinicola* showed maximum inhibition activity on *H. pylori* in 0.25 mg as MIC value. The highest activity against *H. pylori* by MHCS agar diffusion medium by Fp-P1 in 22.7 mm ID among 3 peaks from methanol fraction of 8 days culture media of *Fomitopsis pinicola* which purified by ion-exchange chromatography. The Fp-P1 from DEAE-Sephadex A-25 have been analysed by TLC as Fp-T1, Fp-T2 and Fp-T3 by ninhydrin staining. Fp-T3 (Rf value = 0.67) was higher activity against *H. pylori* in 14.4 mm ID. Fp-T3 was identified as single band by HPLC and TLC. It was assumed to aminosugar by BioLC analysis and TLC staining.

Key Words : *Helicobacter pylori*, *Fomitopsis pinicola*, antibiotics

서 론

Strickland와 Mackay는 만성 위염을 해부학적 부위와 원인에 따라 A형과 B형으로 분류한 바 있다. B형 위염은 전 정부에 흔히 발생하며 위궤양환자의 70%, 십이지장 궤양환자의 90%에서 동반되는데, B형 위염은 *Helicobacter pylori* 감염과 관련이 깊다고 알려져 있다. Warren과 Marshall은 대개 만성 위염환자의 70%, 활동성 위염환자의 90% 이상에서 *H. pylori*가 발견되었다고 보고한 바 있다. 또한 최근까지 *H. pylori* 감염과 위암 발생과 관련이 있음을 주장하는 여러 보고들이 이어졌고(1-5), 빈혈의 원인이 라고도 알려졌다. International Agency for Cancer Research에서는 *H. pylori*를 발암원으로 분류하기에 이르렀다. *H.*

*pylori*의 감염에 의해 초래되는 만성 위축성 위염과 장상피화생은 위암의 전구성 병변으로 알려져 있으며, 반드시 그렇지는 않지만, 높은 위암 발병율을 보이는 나라에서의 *H. pylori* 감염 빈도가 대체적으로 높게 보고된다.

소나무 잔나비버섯 (*Fomitopsis pinicola*)은 민주름목(Aphyllophorales) 구멍장이 버섯과 (Polyporaceae) 잔나비버섯속 (Fomitopsis)에 속하며 자실체는 다년생, 백색 반구형이 되고 둥근 산모양의 균모가 생겨 지름 10~50 cm, 두께 20~30 cm으로 큰 버섯이다. 주로 침엽수의 생 또는 고목이나 넘어진 나무에 나며 갈색부후를 일으킨다. 해발 300 m 이상 고산지대로 죽은 소나무조직에 많이 자라며 우리나라에서는 다도해상국립공원, 오대산, 지리산, 백두산 등에서 자생하고 있으며, 일본, 북반구 온대 이북지역에 분포한다. *F. pinicola*추출물(6)은 *Bacillus subtilis*에 대하여 항균활성을 갖는 것으로 보고되었다.

*H. pylori*는 세계적으로 감염이 심각하며 한국에서도 전 국민의 90% 이상이 감염(7)되어 있으므로 *F. pinicola* 균사체 배양액에서부터 항균효과가 있는 물질을 분리하고 이를 *H. pylori*의 예방이나 치료의 가능성을 연구하였다.

† Corresponding Author : Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science, The Suwon University, Wau-ri, Bongdam-eup, Hwaseong-si, Kyunggi-do 445-743, Korea

Tel & Fax : +82-31-220-2327

E-mail : jwyoona@suwon.ac.kr

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용한 *Helicobacter pylori* 균주로서는 *H. pylori* ATCC 43504를 분양받아 사용하였으며, 비섯 균주로는 *Fomitopsis pinicola* (소나무 잔나비버섯)의 자실체를 경기도 화성시에 위치한 경기중균연구소가 네팔에서 채취하였고, 자실체에서 조직분리하여 얻은 균사체를 한국미생물 보존센터 (KCCM)에 의뢰하여 ITS-5.8S rDNA sequencing을 하였으며 형태적 특징은 자실체를 통해 확인받았다.

사용배지

H. pylori 성장배지인 Muller-Hinton calf serum (MHCS)의 agar 배지는 Muller-Hinton (Difco Co.)에 1.5% (w/v) agar를 넣고 멸균 후 10% (v/v) calf serum (BRL)을 첨가하여 제조하였으며 배양은 MHCS agar 배지에 *H. pylori* 균체를 접종하여 다습한 37°C, 10% CO₂ incubator에서 3일간 배양하였다.

항균력 측정

F. pinicola 균사체의 성장 배지로는 Potato Dextrose agar (PDA) 배지에서 조직 분리 및 계대배양을 하고, Potato Dextrose broth (PDB)에 접종하여 8~17일간 25°C/150 rpm에서 shaking incubation하였다. MHCS agar 배지에 *H. pylori*를 섞어 pour plating하고 균힌 뒤 agar diffusion 방법을 사용하여 균사체 배양액을 microfiltration (pore size 0.45 µm)하여 농도별 (30 µl~200 µl)로 넣고 37°C, 10% CO₂ incubator에서 3일간 배양하고 생육저해환의 유무와 크기를 측정하였다. *F. pinicola* 균사체를 동량으로 Potato Dextrose broth (Difco Co.) 250 ml씩 8개의 flask에 접종하여 3일 간격으로 17일간 25°C / 150 rpm에서 진탕배양하면서 배양액을 취하여 pH, DNS법에 의한 당량, agar diffusion에 의한 *H. pylori*에 대한 항균력의 변화를 측정하였다. 3일간 배양한 *H. pylori*를 1 × 10⁸ CFU/ml 되게 생리멸균수에 현탁하고 균체현탁액 30 µl를 eppendorf tube에 넣고 각 *F. pinicola* 균사체 배양액 (완전건조하여 배양액의 건조 중량을 측정하고 이를 농도별 (mg/ml)로 멸균된 D.W에 녹임)과 섞은 후, MHCS agar 배지에 각 균체현탁액과 *F. pinicola* 균사체 배양액의 혼합액을 도말하고 (대조구로서는 *F. pinicola* 배양액 대신 PDB 배지) 37°C, 10% CO₂ incubator에서 3일간 배양한 후 colony 계수에 의한 relative activity를 측정하였다.

H. pylori 확인

Oxidase test

*H. pylori*를 배양하고 *F. pinicola*의 항균력을 실험하고 나머지 균체에 0.1% N,N,N',N'-phenylene diamine (Sigma Co.)을 섞어 반응시키고 푸른색을 나타내면 양성으로 판독하였다. 0.1% N,N,N',N'-phenylenediamine는 시간이 지나면 스스로 푸른색으로 변하기 때문에 확인 전에 만들어 사용하였으며, 항균력 실험이 끝나고 0.1% N,N,N',N'-phenylenediamine 2 ml을 실험한 urease 생성 확인하였다.

Christensen's urea calf serum agar 배지 (pepton 0.1%, NaCl

0.5%, KH₂PO₄ 0.2%, Glucose 0.1%, Phenol red 0.0012%, Urea 2%, calf serum 10%, agar 1.5%, pH 6.8)를 제조하여 *H. pylori* 균체를 접종하였을 때 pH 6.8에서 yellow였던 배지색이 pink 또는 red로 색이 변하고 NH₃ 가스가 발생하면 urease 양성으로 판별하였다(5). plate에 부어 생육저해환의 유무와 크기 측정을 정확히 하고 *H. pylori*를 확인하였다.

Catalase test

H. pylori 균체를 slide glass에 점적하고 3% (v/v) 과산화수소 (H₂O₂)를 떨어뜨려 가스생성이 있으면 catalase 양성으로 판독하였다 (3).

*H. pylori*의 항생제 내성과 감수성

BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs의 10가지 항생제 (Erythromycin, Ampicillin, Ciprofloxacin, Streptomycin, Oxytetracycline, Colistin, Cephalothin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, Neomycin)를 사용하여 agar diffusion method로 저해환의 크기를 측정하여 *H. pylori*의 항생제 내성과 감수성을 알아보았다(8).

항균물질 분리 및 정제

TLC

TLC plate (Sigma co.)에 development solvent는 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 30 : 64 : 10 으로 사용하였으며 발색시약으로는 Ninhydrin, Silver nitrate, H₂SO₄를 사용하여 아미노 그룹, 당, 유기물을 확인하고 각각의 R_f값을 구하였다. 활성부위를 확인하기 위하여 5배 volume의 acetone으로 용출시키고, 용매를 vacuum dryer로 제거한 후 3차 증류수로 용해하여 *H. pylori*에 대한 항균력 실험과 분석용 시료로 사용하였다.

LC

DEAE-Sephadex A-25 (Sigma Co.)를 사용하여 *F. pinicola* 배양액을 10 mM phosphate buffer (pH 7.8)로 washing하였다. *Fomitopsis pinicola* 배양액을 10 mM phosphate buffer와 후반부에서는 0.1 mM PBS에 NaCl로 0~1 M의 농도 구배로 fraction을 용출하였다. 280 nm에서 나타나는 피크들의 DNS 당정량을 통해 당의 농도를 구하고, vacuum dryer로 용매를 제거하고 1/10 (v/v)의 3차 증류수로 용해시켜 agar diffusion 방법으로 *Helicobacter pylori*에 대한 항균력을 알아보았다.

HPLC와 BioLC

Waters symmetry 300 C₁₈ 5 µm column (3.9 × 150 mm)을 사용하고 flow rate가 0.9 ml/min로 3차 증류수를 용매로 사용하였고, 25 µl의 시료를 injection하고 waters 486 detector를 사용하여 280 nm에서 흡광도로 정량분석하였다. Dionex사의 LC20 chromatography system을 사용하여 PDB, *F. pinicola* 배양액, Fp-T3의 당을 분석하였다.

결과 및 고찰

F. pinicola의 조직 분리와 균사체 배양 및 균주 동정

한국 재래종 *F. pinicola* AF533966.1과는 다른 종으로 경기 종균연구소가 네팔에서 채취한 *F. pinicola* 자실체를 조직분리하여 균사체를 얻어서 실험에 사용하였다. 한국미생물보존센터 (KCCM)에 의뢰하여 ITS-5.8S rDNA sequencing한 결과 Fig. 1과 같이 *F. pinicola* AY854083으로 나타났다. 균사체를 배양하고 톱밥배지 등에 접종하여 자실체 생산에 필요한 노력과 경비 등을 고려해 볼 때 대량생산이 가능하며 산업화가 용이한 균사체를 사용할 수 있는 방법을 검토하였다. 균사체를 PDA 평판배지를 통해 계대배양하면서 액상배지인 PDB에 접종하여 대량 배양하였다. 배양된 균사체와 균사체 배양액을 나누어 균사체는 열수, methanol로 추출하고 배양액은 microfiltration을 하여 균체를 제거한 후 *H. pylori*에 대한 항균력을 실험한 결과 *F. pinicola* 균사체 추출물에서는 생육저해환이 보이지 않은 반면 *F. pinicola* 균사체 배양액에서 *H. pylori*에 대한 항균력이 나타났다. 이는 균사체가 액상배지에서 성장하면서 exopolymer 형태로 2차대사산물을 생산하는 것으로 사료되었다. 따라서 *F. pinicola* 균사체를 액상 배양하여 배양액을 사용하였다.

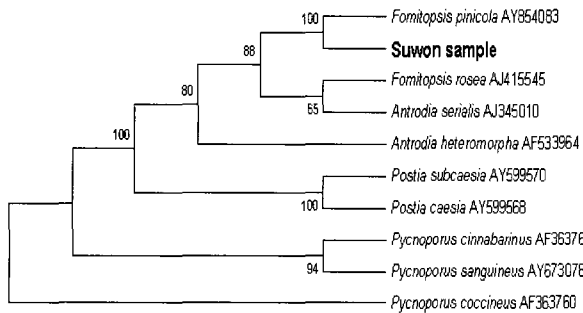


Figure 1. Position of the *F. pinicola* in the dendrogram of its relation 9 strains, derived from base sequence of ITS-5.8s rDNA.

H. pylori 확인 및 특성

*H. pylori*의 항생제에 대한 감수성 및 내성 실험결과 *H. pylori* ATCC 43504 균주는 Colistin, Cephalothin 두 가지 항생제에만 내성을 보여 선택배지에 사용하였다. urease는 Christensen's urea calf serum agar 배지를 통해 붉은색을 나타내면서 NH₃ 가스를 발생하는 것을 확인함으로써 urease 양성으로 판정하였다. catalase test에서도 가스를 발생함으로써 양성으로 판독하였고, oxidase test는 실험 전후에 실시하여 균체가 푸른색으로 변색됨을 확인하고 실험후에도 *H. pylori*가 성장한 배지의 색깔이 푸른색으로 변하는 것으로 나타나 oxidase 양성으로 판독하였다.

F. pinicola 균사체 배양액의 H. pylori에 대한 항균력 검증

F. pinicola 균사체 배양액의 배양시간에 따른 변화와 *H. pylori*에 대한 항균력 비교 실험에서는 Fig. 2, 3과 같이 나타났다. 배양시간이 지남에 따라 pH가 감소하여 산성을 띄며 항균력은 증가하는 것으로 나타났다. 5일이 지나면서

pH가 급격히 감소하면서 8일 이후 11일부터 pH가 2에 가깝게 나타났다. 항균력 또한 8일이 지나면서 명확히 나타나고 있다.

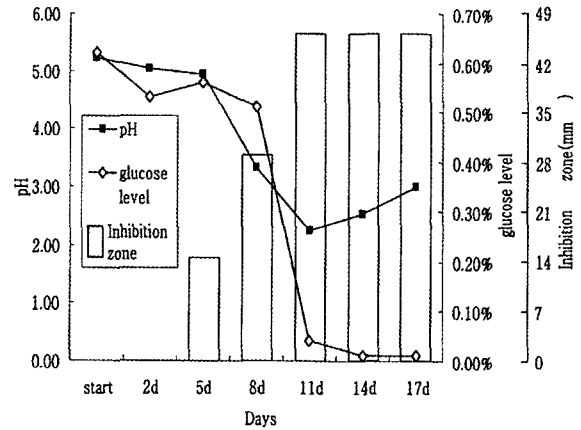


Figure 2. Changing of glucose level, pH and inhibition zone of *F. pinicola* culture medium by culture time.

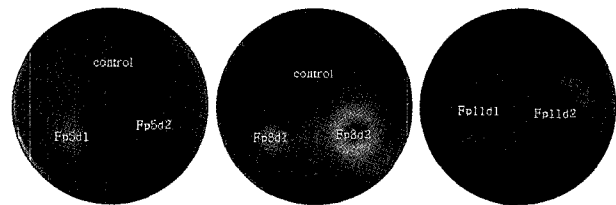


Figure 3. Inhibition zone of extracts from *Fomitopsis pinicola* culture medium against *Helicobacter pylori* on MHCS agar plates by culture time.

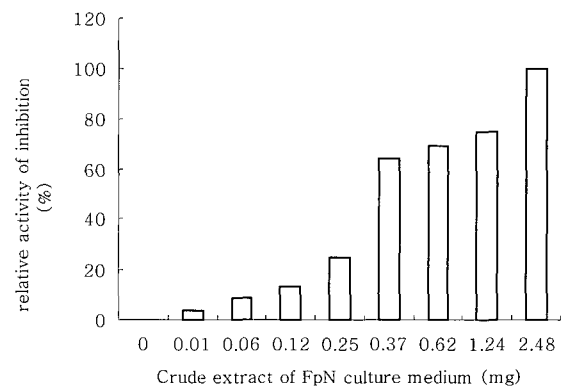


Figure 4. The inhibition of *Helicobacter pylori* growth by culture medium of *F. pinicola* (FpN).

*H. pylori*에 대한 최소 억제 농도는 *F. pinicola* 균사체 8일 배양액에서 Fig. 4와 같이 배양액의 건조 중량이 0.0124 mg에서 생육억제가 일어나며 0.248 mg에서는 30% 이상, 0.372 mg에서 60% 이상의 생육억제를 나타내며 1.24 mg 이후에는 90% 이상의 생육억제를 보였다. *F. pinicola* 균사체 배양액의 glucose level 또한 8일 이후에 급격히 감소하여 14일 이후에는 0%에 가깝게 낮아지는 것을 볼 수 있다. glucose의 감소는 1

차대사과정에 의한 것으로 보이며 2차 대사산물을 생산하는 중에 산을 포함하는 것으로 나타났다. *F. pinicola* 균사체 8일 배양 이후에는 agar diffusion에 있어서 산도에 의한 agar 배지의 손상과 산에 의한 생육저해가 심하게 나타나므로 2차대사산물 중에 산을 제거한 나머지 물질을 검색하는데 어려움이 있었다. 따라서 배양 일수는 8일간 배양하며 11일이 넘지 않는 범위를 선택하게 되었다.

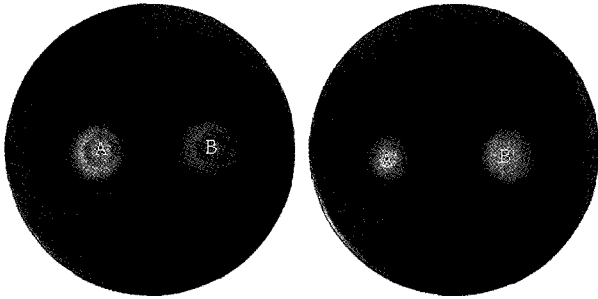


Figure 5. Inhibition zone of *H. pylori* from *F. pinicola* culture media and neutralized cultured media.

- A, : *F. pinicola* culture media 100 μ l, pH 3.4
- B, : *F. pinicola* culture media 200 μ l, pH 3.4
- A' : neutralization cultured media 100 μ l, pH 6.8
- B' : neutralization cultured media 200 μ l, pH 6.8

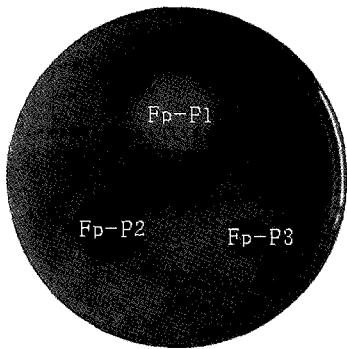


Figure 6. The agar plates showed inhibitory zone of fraction by DEAE-sephadex A-25 from culture media with mycelium of *Fomitopsis pinicola*.

2차대사산물중 산에 의한 항균효과가 나타나는 것으로 볼 수 있다. 따라서 *F. pinicola* 균사체 배양액을 중화하여도 항균력이 지속된다면 *H. pylori*에 대한 항균력이 산에 의한 것 이외에도 다른 물질에 의한 것으로 사료되었다. *F. pinicola* 균사체 8일 이후의 배양액(pH 3.4)을 pH 6~7로 중화하여 같은 방법으로 *H. pylori*에 대한 항균력을 검증한 결과 Fig. 5와 같이 *F. pinicola* 균사체 배양액은 100 μ l(A)에서 15 mm, 200 μ l(B)에서 18 mm로 생육저해환이 측정되었고, 중화시킨 *F. pinicola* 균사체 배양액은 100 μ l(A')에서 14 mm, 200 μ l(B')에서 16 mm로 생육저해환이 나타났다. 이는 *H. pylori*에 대한 항균력이 *F. pinicola* 균사체 배양액과 중화액의 생육저해환의 차이가 크게 나지 않았으므로 산 이외에도 다른 물질에 의해 나타나는 것을 보여주었다.

***F. pinicola* 균사체 배양액의 항균물질 분리 및 정제**
F. pinicola 균사체 배양액의 중화액에서도 항균력을 확

인하였으므로 수소이온 농도에 따른 항균력 이외의 물질을 탐색한 결과 DEAE-Sephadex A-25를 충전한 LC 분석에서 Fp-P1, Fp-P2, Fp-P3이라 하고 각 fraction들을 DNS법에 의해 glucose 정량분석을 하였다. 당정량에 의한 결과 Fp-P1에서 당량이 약 0.35%로 나타났다. 배양시간이 8일이 지나면 glucose level이 현저히 감소함에도 불구하고 당량이 나타나는 것은 배양액 내의 glucose를 1차대사에 사용하고 다른 종류의 환원당을 생성하여 DNS에 의해 검출된 것으로 추정되며 BioLC에 의한 분석을 통해 확인하였다. 각 peak fraction을 *H. pylori*에 대한 항균력 실험에서 Fp-P1의 pH는 6.36이었고 inhibition zone은 22.7 mm로 항균력이 확인되었다. 나머지 Fp-P2, Fp-P3의 pH는 각각 5.81, 7.21이었으며 항균력은 나타나지 않았다(Fig. 6).

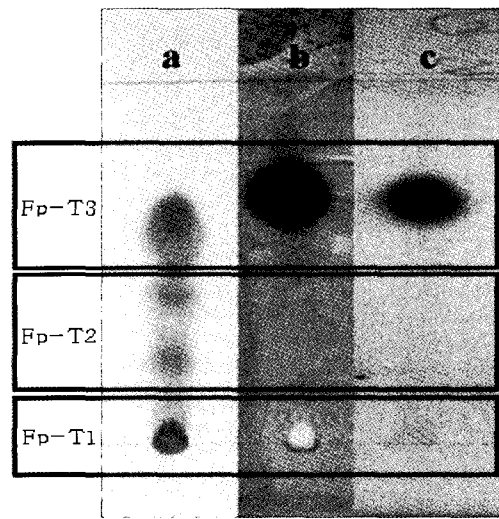


Figure 7. TLC separation of Fp-P1 after DEAE-ionexchange chromatography from *Fomitopsis pinicola* culture media on silicagel G.

- a : detected with ninhydrin detection
- b : detected with silver-nitrate detection
- c : detected with 40% H₂SO₄ detection

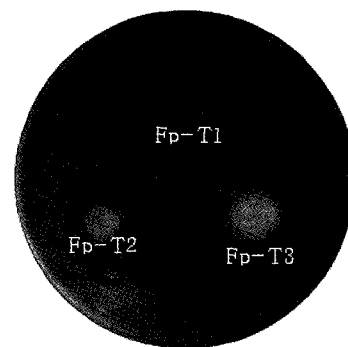


Figure 8. The agar plates showed inhibitory zone of Fp-T3 by TLC separation from culture media with mycelium of *Fomitopsis pinicola*.

Fp-P1을 TLC로 분리한 결과 Fig. 8과 같이 나타났다. CHCl₃ : MeOH : H₂O = 30 : 64 : 10 전개용매에서 ninhydrin으로 발색한 결과(a) 4개의 band로 분리 되었으며, 각각의 R_f값은 전개되지 않은 부분부터 0.23, 0.4, 0.67이었다. silver-nitrate로 발

색한 결과(b)에서는 R_f값이 0.67인 1개의 band가 나타났으며, H₂SO₄ 로 발색한 결과(c)에서도 (b)와 같은 결과를 보였다. (a)를 기준으로 band를 3부분으로 나누어 면도칼로 TLC판을 끊어내어 용출하고 Fp-T1, Fp-T2, Fp-T3의 시료를 얻었으며, *H. pylori*에 대한 항균력 실험을 한 결과 Fp-T3에서 *H. pylori*에 대한 항균력이 14.4 mm로 나타났다(Fig. 7).

F. pinicola 균사체 8일 배양액, Fp-f1, Fp-T3를 UV spectrum scanning 하였을 때 280 nm에서 최대 흡광도를 나타내었으므로 HPLC를 이용하여 280 nm에서 Fp-T3를 *F. pinicola* 균사체 8일 배양액의 성분과 Fp-f1과 비교 분석하였다(Fig. 9). *F. pinicola* 균사체 8일 배양액의 결과(A) 7개의 peak를 볼 수 있었으며 항균력을 나타내는 부분을 알아보기 위해 HPLC에 의해 분리된 Fp-f1(B)과 비교한 결과 1, 3, 6의 peak이 제거되어도 Fp-f1은 항균력이 나타는 것으로 미루어 볼 때, 2, 4, 5, 7의 peak이 항균력을 갖는 것을 알 수 있었다. Fp-f1을 TLC로 분리한 시료 중 항균력을 보인 Fp-T3의 HPLC의 결과(C) 7번의 peak 만이 남아 있는 것으로 나타났다. 따라서 *F. pinicola* 균사체 8일 배양액 성분 중 마지막에 나타난 7번 물질이 항균력을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

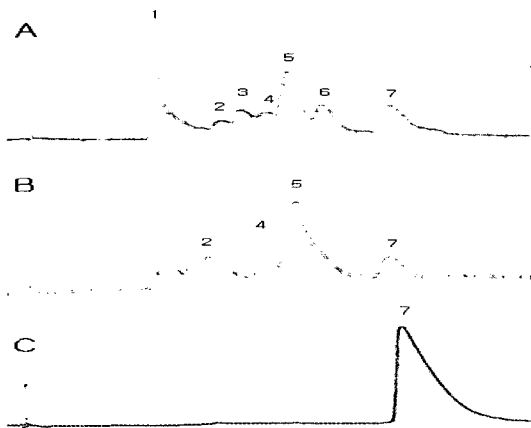


Figure 9. HPLC of culture media from *F. pinicola* by Waters symmetry 300 C₁₈ 5 μm column (3.9 × 150 mm).
 A : culture media from *Fomitopsis pinicola*
 B : early fractions after DEAE-ionexchange chromatography (Fp-P1)
 C : Fp-T3(R_f 0.67) after TLC

Fp-T3를 BioLC를 통해 PDB 배양액, *F. pinicola* 균사체 8일 배양액, standard (fucose, glucose, mannose, fructose)와 당을 비교분석한 결과 Standard와 PDB 배양액에서 glucose가 일치 하였으나 *F. pinicola* 균사체 8일 배양액에서는 glucose가 아닌 retention time값이 7.40분인 당이 나타났다(Fig. 10). 이는 *F. pinicola*가 생장에 glucose를 사용하고 2차 대사산물인 다른 당으로 변화한 것으로 생각되며 *F. pinicola* 균사체 8일 배양액에서는 amino기에 의한 간섭에서 나타난 부분이 TLC 분리 후 제거되어 Fp-T3에서는 retention time이 6분인 다른 정제된 환원당이 검출된 것으로 사료되었다.

Fp-T3는 TLC상에서 ninhydrin에 발색하고 silver-nitrate에도 발색되었으며 HPLC 분석에서 단일 peak가 나타났고

BioLC를 이용한 당의 검출에서도 단일한 당으로 나타났다. 따라서 Fp-T3는 아미노기를 가지는 당으로 사료되며 *H. pylori*에 대한 항균력을 가지는 것으로 나타났다.

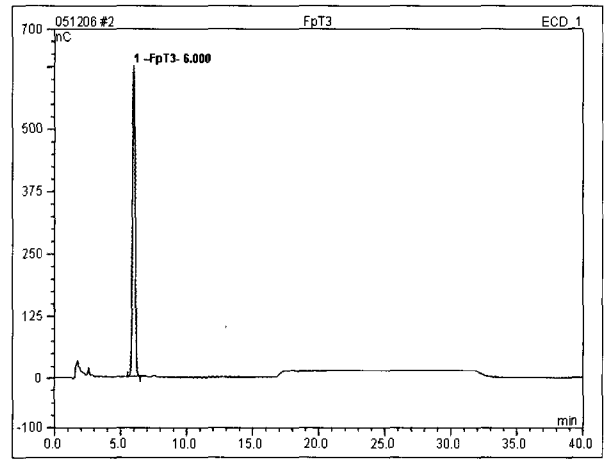
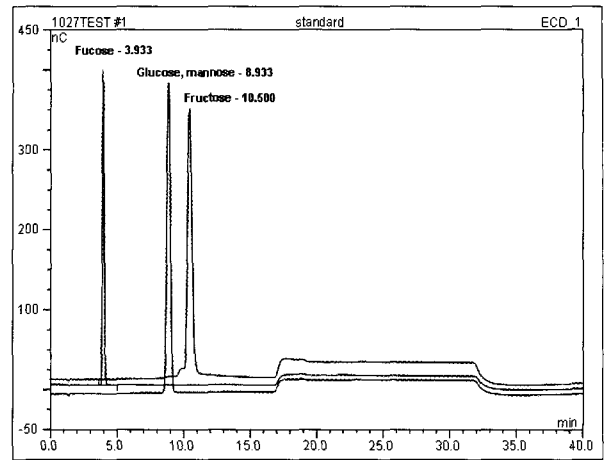


Figure 10. Bio-LC peaks of standard sugars by CarboPac PA1 column (DIONEX) and Bio-LC peak of Fp-T3 (R_f 0.67) after TLC by CarboPac PA1 column.

요 약

*Helicobacter pylori*에 대하여 항균효과가 가장 높은 *Fomitopsis pinicola*를 동정하고 저해물질의 성질에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론이 얻어졌다.

*H. pylori*에 대한 항균력이 가장 크게 나타난 내팔에서 채취한 *F. pinicola*의 동정결과는 *F. pinicola* AY854083로 밝혀졌다. *F. pinicola*의 균사체는 액상배양을 시작한 후 5일이 경과하면서 *H. pylori*에 대한 항균력이 나타났으며 8일 이후부터 가장 높았다. 그러나 균사체 추출물에서는 항균력이 나타나지 않았다. *F. pinicola* 균사체 8일 배양액의 *H. pylori*에 대한 최소억제 농도는 0.25 mg/ml이었고, 배양액의 낮은 pH (pH 2.0)가 *H. pylori*의 생육억제에 영향을 주지만 중화를 하여도 *H. pylori*에 대한 항균력은 유지되었다.

F. pinicola 균사체 8일 배양액을 DEAE-sephadex A-25 LC로 분리하여 Fp-P1, Fp-P2 및 Fp-P3를 얻었으며 *H. pylori*에 대한 항균력은 Fp-P1에서만 나타났다. Fp-P1을 thin layer chromatography로 분리하였으며 *H. pylori*에 대한 항균력은 R_f 값이 0.67인 Fp-T3에서만 나타났다. *F. pinicola* 균사체 8일 배양액, Fp-P1, Fp-T3를 HPLC의 Waters symmetry 300 C₁₈ 5 μm column (3.9 × 150 mm)으로 분리한 결과 Fp-T3에서 단일 peak만 남았으며 이것이 *H. pylori*에 대한 항균력을 확인하였다.

*H. pylori*에 대한 항균력을 나타내는 *F. pinicola* 균사체 배양액에서 분리 정제한 물질은 BioLC 분석과 TLC 발색결과로써 아미노기를 포함한 당으로 사료된다.

감 사

본 연구는 경기도 산학연 공동기술개발사업의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser (1997), *Helicobacter pylori*, *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Malekzadeh, F., H. Ehsanifar, M. Shahamat, M. Levin, and R. R. Colwell (2001), Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula Retz*) against *Helicobacter pylori*. *Internation, J. of Antimicrob. Agents* **18**, 85-88.
- Phadnis, S. H., Parlow, M. H. Levy, M., Ilver, D., Caulkins, C. M. Connors, J. B. and Dunn, B. E. (1996), Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacteria autolysis, *Infec. immun.* **64**, 905-912.
- Myung-Je Cho, Woo-Kon Lee, Young-Seok Jeon, Kyung-Hee Kim, Seung-Hee Kim, Seung-Chul Baik, Kwang-Ho Rhee, Yoon-Ok Kim, Hee-Shang Yoon, and Nam-Soo Kim (1995), Intrafamilial Transmission of *Helicobacter pylori*. Detected by Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting, *Mol. Cells* **5**(5), 508-513.
- Goodwin, C. S. and J. A. Armstrong (1990), Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*), *Eur. J. Clin. Microbiol. & Infect. Disea.* (Historical Archive), **9**(1), 1-13.
- Keller, A. C., Maillard, M. P. and K. Hostettmann (1996), Antimicrobial Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*, *Phytochem.* **41**, 1041-1046.
- Kim S. W., Cha C. K., Han S. U., Kim Y. B., Lee W. H., Joo H. J., Cho Y. K., Cho S. W., Kim M. W. and K. B. Hahm (2002), Alimentary Tract : Long - term Evaluation of Mouse Model Infected with *Helicobacter pylori* and Influence of *Helicobacter pylori* Infection on Gastric Carcinogenesis, *Kor. J. Gastroenterol.* **39**: 22-32.
- Rhee K. H., Youn H. S., Baik S. C., Lee W. K., Cho M. J., Choi H. J., Maeng K. Y., and K. W. Ko (1990), Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Korea, *The Kor. J. Bacteriology and Virology* **25**, 475-490.
- Lee J. K. and J. W. Yoon (2004), Determination and Characterization of Inhibitory Activity of Mycelial Extracts from Several Korean Mushrooms against *Helicobacter pylori*, *Kor. J. Micol.* **32**, 142-144.