

*Helicobacter pylori*의 생육억제에 대한 유산균, 난황항체 및 목이버섯의 상승효과

유혜림 · 이영덕 · 한복경* · 최혁준* · †박종현
가천대학교 식품생물공학과, *(주)비케이바이오

Synergistic Inhibition of IgY, *Auricularia auricula*, and Lactic Acid Bacteria from *Kimchi* and *Tarak* on *Helicobacter pylori*

Hye-Lim Yoo, Young-Duck Lee, Bok-Kyung Han*, Hyuk-Joon Choi* and †Jong-Hyun Park

Dept. of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

*Research and Development Department, BKbio Co. Ltd., Seongnam 462-819, Korea

Abstract

The substances of lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Kimchi* and *Tarak*, *L. mesenteroides* LAB kw5, and *S. thermophilus* LAB KW15 were investigated for growth effect of *Helicobacter pylori* with IgY and *Auricularia auricula*. Inhibition of *H. pylori* was confirmed at LAB KW5 and KW15 supernatants. Interestingly, anti-*H. pylori* substance in LAB KW5 and KW15 supernatants were sensitive to lipase, but insensitive to protein hydrolase and carbohydrate hydrolase. The inhibition zone toward *H. pylori* was not shown with the lipase-treated supernatants. Therefore, there seemed to be lipid-like substances in the cultures. By the analyses with gas chromatography, undecanoic acid (C_{11:0}), palmitic acid (C_{16:0}), stearic acid (C_{18:0}), and oleic acid (C_{18:1}) were detected at the culture substances from *L. mesenteroides* LAB KW5 and *S. thermophilus* LAB KW15, and more eicosadienoic acid (C_{20:2}) from *L. mesenteroides* LAB KW5. Anti-*H. pylori* substances of LAB with IgY and *A. auricula* extract were analyzed for inhibition effect of *H. pylori*. The inhibition increased more by the range from 57% to 86% by the mixture. The substances with IgY and *A. auricula* extract showed more effective inhibition of *H. pylori* than single or double trials.

Key words: *Helicobacter pylori*, lactic acid bacteria, IgY, *Auricularia auricula*

서 론

*Helicobacter pylori*는 위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위암 및 위림프종과 같은 소화성 질환의 중요 인자로 인식되고 있으며(Marshall 등 1984, 1988), 세계보건기구(WHO) 산하 국제 종양연구국(IARC)의 실행위원회에서 *H. pylori*는 발암 유발 원 제1군이라고 정의하였다(WHO 1994). *H. pylori*은 urease에 의해 요소를 분해하여 많은 양의 암모늄과 이산화탄소를 생

산하며, 위 내에 강한 산성에서 살아갈 수 있고, 세균표면의 lectin은 위점액층의 당지질과 선택적으로 결합함으로써 위점막 감염을 일으키게 한다(Jeong 등 2006). 이러한 *H. pylori* 감염 치료를 위한 제균 방법으로 항생제를 투여하지만, 최근에 항생제로 인한 부작용, 내성 균주의 출현, 위액 내의 항생제가 세균이 있는 점액층 및 점막에까지 도달하지 못하는 문제 등으로 인하여 치료에 어려움이 있다. 특히, 3제 요법 중에서 주로 사용되는 항생제 metronidazole과 clarithromycin의 내성

† Corresponding author: Jong-Hyun Park, Dept. of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea. Tel: +82-31-750-5500, Fax: +82-31-750-5501, E-mail: p5062@gachon.ac.kr

이 높아지고 있으며(Debets-Ossenknopp 등 1999; Vasquez 등 1996), 우리나라에서도 점차 *H. pylori*의 항생제 내성이 강해지는 추세이다.

최근 항생제 대신 *H. pylori*를 치료 및 예방하기 위해 박테리오파지, 자연추출물, 유산균, 면역시스템 등을 연구한 보고가 있다(Roe 등 2002; Kim 등 2007; Cha 등 2006; Schmid 등 1990; Brown 등 2009). 그 중에서 유산균을 이용하는 방법이 매우 활발하게 연구되고 있다. 인체 내에서 유산균이 *H. pylori*의 생육을 억제하는 방법은 *H. pylori*를 저해하는 특정한 유산균이 위점막 조직을 선점하여 *H. pylori*의 부착을 억제하거나, 유산균이 생산하는 항균 물질에 의한 항균 작용 등이 동시에 가능하기 때문인 것으로 사료된다(Servin 등 2001; Lee 등 1999). 유산균이 생산하는 대표적인 항균 물질인 박테리오파지는 항미생물 활성을 나타내는 저분자, 내열성을 가지는 펩타이드계 물질이며, *H. pylori*에 저해효과를 나타내는 잠재적 원인 물질로 보고되고 있다(Klaenhammer 1988). 한 연구에 따르면 젓산균이 생산하는 7가지의 박테리오파지 *H. pylori*에 대하여 항균성을 지니는 것을 확인하였으며, Hong 등에서도 *P. pentosaceus* CBT SLA균에서 분리한 박테리오파지 투여 6주 후 *H. pylori*에 대해 저해효과를 관찰하였다(Kim 등 2003; Hong 등 2004). 유산균 이외에 *H. pylori*의 생육을 억제하는 방법으로는 면역단백질을 이용하거나 다양한 식물 유래 천연물의 사용이 연구되고 있다(Koo & Choe 2001; Bae 등 2003; Cha 등 2006; Cho 등 2006). *H. pylori*의 숙주세포 부착에 관여하는 adhesion에 대한 항체를 이용한 난황 항체(IgY)는 계란의 항체인 IgY는 닭의 모자 면역 체계로 닭의 항체를 계란으로 이동시켜 병아리의 초기방어에 중요한 역할을 하게 된다(Lee 등 1991). 이 항체를 계란의 난황에서 유래되었다고 하여 IgY(Immunoglobulin Yolk)라고 한다. 이러한 IgY가 *H. pylori*의 위벽세포 탈부착에 대해 관여되는 기전이나 물질은 아직 확실하게 보고된 바가 없지만, *H. pylori*의 위점막 부착을 억제하는 3-sialyl lactose와 당지질에 sulfated oligosaccharide이 결합되는 sulfatide의 부착저해물질 등이 연구되고 있다(Opekun 등 1999; Mysore 등 1999). *In vitro*에서 *S. enteritidis* 또는 *S. typhimurium*이 IgY의 결합 활동(binding activity)에 의해 생육 저해가 된다고 하였다(Lee 등 2002). 또한, Zhen 등(2009)은 혈액 또는 우유에서 IgY가 식세포에 의해 *S. aureus*에 식균작용을 하며, IgY의 유방염의 치유율 50~83.3%은 penicillin의 치유율 33.3~66.7% 보다 더 높다고 보고하였다.

목이버섯(학명: *Auricularia auricula-judae*)은 다당체 중에 β -D-glucan은 동물실험을 통해 잠재적인 항종양, 항혈소판 응집, 새로운 면역 강화제의 효과가 증명되었다(Ma 등 2010; Jiangwei 등 2011; Desbois 2010). 목이버섯에서도 *H. pylori*의 억제하는 원리는 명확하게 규명되지는 않았지만, 다당류에

있는 화합물이 *H. pylori*의 부착 억제를 하는 성분이 있는 것으로 추측되고 있다. 또한, 목이버섯 추출물은 유해세균과 효모의 항균작용이 있다고 하였다(Fagade & Oyelade 2009).

따라서 여태까지 유산균, IgY, 목이버섯과의 혼합을 통해 생육 억제 상승효과에 대해 보고된 바 없지만, 이번 실험을 통해 연구하고자 한다. 또한 분리한 유산균, IgY와 목이버섯에 존재하는 *H. pylori* 성장 억제 물질을 확인하여 *H. pylori*와 관련된 위장질환 예방 및 치료에 이용될 수 있는 기능성 식품 소재로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 *Helicobacter pylori* KCTC 12083을 생명자원센터에서 분양 받았으며, 야생형의 *H. pylori* 52, 26695, 1061는 경상대학교 의과대학에서 분양받아 수행하였다. 김치와 타락으로부터 분리한 유산균의 배양은 0.05% L-cysteine을 첨가하여 만든 Lactobacilli MRS broth 또는 agar(Difco Laboratory, MI, USA)에서 37°C, 24시간 동안 배양하였으며, *H. pylori*는 10% fetal bovine serum(FBS)(Invitrogen, CA, USA)이 첨가된 Brucella broth 또는 agar(Difco Laboratory, Detroit, MI, US)에 접종 후 37°C에서 microaerobic chamber(Ruskin Technologies, Jouan, France)나 10% CO₂ 항온배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 48시간 동안 배양하였다.

2. 유산균의 항균물질 농축

김치와 타락으로부터 분리된 유산균 *Streptococcus thermophilus* LAB KW 15, *Leuconostoc mesenteroides* LAB KW5(Lee 등 2010)을 사용하였다. 24시간 동안 Lactobacilli MRS broth에서 배양된 배양액을 원심 분리(10,000×g, 5 min)한 후 상정액을 취해 pH 7.0으로 보정하였다. 0.2 μ m syringe filter(Sartorius Stedim biotech, Goettingen, Germany)를 이용하여 제균한 후, 동결건조기기(Ilsin Lab Co. Ltd., Dongducheon, Korea)에서 vacuum gauge 5 mTorr, -70°C에서 72시간 동안 동결 건조하였다. 그리고 생육실험을 위해 동결 건조 분말을 멸균 증류수에 녹여 100 mg/ml 농도로 재수화하여 사용하였다.

3. 항균물질의 효소 처리

α -Amylase, β -glucanase, protease, trypsin, chymotrypsin(Sigma-aldrich, USA), lipase, pectin hydrolase(Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)의 효소 처리를 통한 항균 물질의 특성을 확인하고자 하였다. 각각의 효소 용액(α -amylase: 150~250 units/mg, protease: >30 units/mg, trypsin: 1,000~2,000 units/mg, chymotrypsin: \geq 40 units/mg, β -glucanase: ~1 units/mg, lipase: ~50 units/mg,

pectin hydrolase: ≥ 5 units/mg)을 넣고, 37°C에서 3시간 동안 반응시켰으며, 48시간 배양된 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 Brucella agar에 도말한 후 효소 처리된 유산균 배양 상징액을 spot assay를 통해 활성을 확인하였다.

4. 항균물질의 지방산 분석

분리된 항균 물질에 대해 포화 지방산과 불포화 지방산의 조성을 확인하기 위해 gas chromatography(GC) 분석을 통해 수행하였으며, GC 분석기기는 Agilent 7890 GC system을 사용하였다. 분석조건 중 유속은 분당 0.75 ml, 시료 주입량은 1.0 μ l, 칼럼은 SPTM-2560(100 m \times 0.25 mm \times 0.20 μ m)으로 분석하였다. 오븐의 온도 조건은 100°C에서 4분간 유지하고, 240°C까지 3°C/min으로 승온한 후, 15분간 유지하여 분석하였다. 시료 주입은 주입구 온도를 225°C로 유지한 상태에서 split ratio를 200:1로 하였으며, He 운반 기체 하에서 질량분석 검출기를 이용하여 스펙트럼을 얻었다. 검출기는 Flame ionization detector(FID)을 이용하고, 검출 온도는 285°C로 유지하였다.

5. 항균물질에 의한 항미생물 활성

유산균 배양 상징액의 *H. pylori*에 대한 항균 활성 여부를 확인하였다. 10% FBS가 첨가된 Brucella broth에서 48시간 배양된 100 μ l의 *H. pylori*를 10% FBS가 첨가된 Brucella agar에 도말한 후 10 μ l의 *L. mesenteroides* LAB KW5와 *S. thermophilus* LAB KW15의 동결 건조된 배양 상징액을 각각 분주하였다. 그리고 37°C에서 미호기성 상태에서 48시간 배양한 후 생육 상태를 확인하였다. 아울러 *Escherichia coli* 27, 28, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12079, *Cronobacter sakazakii* KCTC 2949, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* KCCM 12103, *Enterococcus faecalis* KCTC 2011, *Enterococcus faecium* KCCM 12118, *Bacillus cereus* KCTC 1094의 식중독 세균에 대한 항균 활성을 측정하였다.

6. 목이버섯 추출물 정제

목이버섯을 blender를 이용하여 마쇄한 후 마쇄된 목이버섯 100 g에 증류수 2,000 ml를 넣어 교반, 침지하고, 95°C 이상에서 3시간 가열하여 열수 추출을 하였다. 열수 추출하고 원심 분리(8,000 \times g, 20 min)한 후 상징액을 회수하여 상징액에 4배의 ethanol을 가하여 다당을 침전시키고, 동일한 조건으로 원심 분리하여 침전된 다당을 회수한 후 투석을 통해 저분자 불순물을 제거(MW cut off 2,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)하였다. 투석한 다당은 동결건조기(Ilsin Lab Co. Ltd., Dongducheon, Korea)에서 vacuum gauge 5 mTorr, -70°C에서 72시간 동안 동결 건조를 하였다.

7. 목이버섯 추출물의 다당체 분석

목이버섯 추출 다당의 분자량 측정을 위하여 시료를 1 mg/ml의 농도로 증류수에 녹여 high performance liquid chromatography(HPLC)를 행하였다. HPLC는 YL9110(YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)을 사용하였으며, 분석조건 중 유속은 분당 0.5 ml, 컬럼의 온도는 50°C, 시료 주입량을 20 μ l로 제한하여 사용하였다. 칼럼은 SUGAR KS-803 column(8 \times 300 mm)(Shodex Co. Ltd., Japan)을 사용하였고, eluent(이동상)은 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)으로 분석하였다. 분자량 측정은 표준 물질 pullulan series(P-50, 20, 10 및 5)를 이용하여 retention time을 측정한 후 각 분자량에 대해 표준곡선으로부터 환산하였다.

8. IgY 분리정제 및 역가 측정

면역란은 1차 접종 후 11일째부터 주마다 2회씩 회수하여 13주까지 수거하였다. 면역란으로부터 IgY의 분리는 난황을 난백과 분리한 후 난황의 질량을 측정하고, 증류수를 7배 혼합하였다. 실온에서 30분간 교반한 후 원심분리(10,000 \times g, 10 min)하고 상징액을 회수하여 -20°C에서 냉동 보관하였다. IgY의 정제는 IgY purification kit(Thermo, Illinois, USA)를 이용하여 수행하였다. 면역란으로부터 IgY 역가를 측정하기 위하여 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 수행하였다(Roe 등 2002). 즉, 항원을 tissue culture test plate(SPL Life Sciences, Namyangju, Korea)에 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. PBS-T(phosphate buffer saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4) buffer로 3회 세척한 후 1% bovine serum albumin(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 250 μ l씩 넣고, 23°C에서 1시간 동안 blocking하였다. 다시 PBS-T buffer로 3회 세척한 후 10배씩 희석된 시료 및 표준시료를 200 μ l씩 넣고, 23°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T buffer로 3회 세척한 후 2nd ab-conjugate로 anti-chicken IgG Ab-HRP conjugate를 희석한 용액을 200 μ l씩 넣고 23°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T buffer로 3회 세척한 후 TMB chromogen 용액 50 μ l를 넣고 바로 기질 용액 100 μ l를 넣은 후 23°C에서 10분 동안 반응시켰다. Stop 용액(2 M H₂SO₄)을 50 μ l씩 넣어 반응을 정지시킨 후, 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 표준시료와 비교하여 항체 역가를 unit로 산출하였다.

9. 유산균, 목이버섯, IgY의 *H. pylori*에 대한 생육 억제 효과

목이버섯 추출액과 IgY, 동결 건조된 유산균 배양 상징액들을 혼합하여 *H. pylori*에 대한 혼합에 따른 저해 상승 효과를 확인하고자 하였다. *H. pylori*에 대한 생육 억제 상승 효과 실험을 위해, 확인된 각각의 최소 저해 농도를 기준으로 하여

목이버섯은 0.10 mg/ml, IgY는 1.00 mg/ml, 동결 건조된 유산균 배양 상징액은 0.78 mg/ml로 설정하여 각각에 대해 혼합한 후 tissue culture test plate에 200 μ l씩 분주하였다. 그리고 CO₂ incubator에 배양하면서 시간에 따라 *H. pylori*의 생육 억제 정도를 흡광도(620 nm)와 생균수를 측정하여 생육 억제 상승 효과를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 유산균 배양 상징액의 효소처리에 의한 *H. pylori*의 생육 저해 효과

다양한 proteolytic enzyme, lipase, carbohydrate hydrolase를 처리하여 *H. pylori* 생육을 저해하는 항균 물질에 대한 특성을 확인하였다(Fig. 1). 지질 분해 효소인 lipase 이외에 단백질 분해 효소인 protease, trypsin, chymotrysin, 탄수화물 분해 효소인 amylase, β -glucanase, pectin hydrolase을 처리한 동결 건조된 유산균 배양 상징액은 *H. pylori*의 생육 억제능이 확인되어 당이나 단백질 등의 물질은 아니라는 것을 알 수 있었다. 반면, lipase에 처리된 유산균 배양 상징액에서는 *H. pylori*의 생육 억제능이 보이지 않았다. Park 등(2003)의 연구에 따르면 김치 유래의 박테리옌은 proteinase K, trypsin, α -chymotrypsin, papain에 의해 항균활성이 보이지 않았지만, lysozyme, lipase, catalase 또는 β -glucosidase에서 활성이 확인되었다. 일반적으로 박테리옌의 특성에 따라 효소활성에 의한 약간 차이가 있었지만, 공통적으로 proteolytic enzyme에 의해 항균활성이 나타나지 않았다고 하였다. 그러므로 *H. pylori*의 생육을 저해하는 유산균 배양 상징액 중의 항균 활

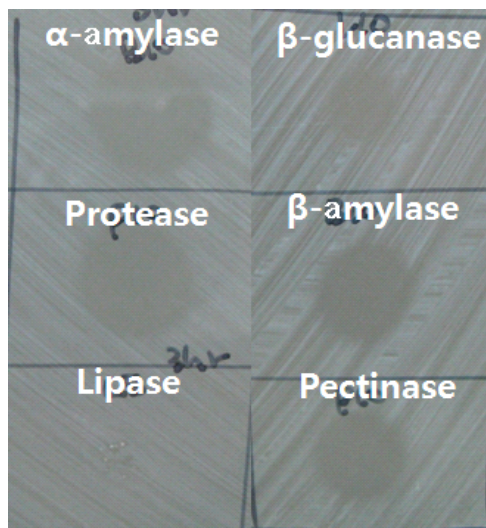


Fig. 1. Anti-*H. pylori* activity of supernatants from lactic acid bacteria against various enzyme treatment.

성 물질이 지질을 함유할 것으로 추측되었다.

2. 유산균 배양액의 지방산 분석

동결 건조된 유산균 배양 상징액에 대해 지방산의 조성을 확인하기 위해 Gas chromatography(GC) 분석을 통해 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. 동결 건조된 유산균 배양 상징액의 지방산 조성은 undecanoic acid(C_{11:0}), palmitic acid(C_{16:0}), stearic acid(C_{18:0}), oleic acid(C_{18:1})가 *L. mesenteroides* LAB KW5와 *S. thermophilus* LAB KW15에서 모두 확인되었으며, eicosadienoic acid(C_{20:2})는 LAB KW5에서만 나타났다. 최근 다양한 유리지방산에 그람 음성, 그람 양성 세균에 대한 생육 억제, 항곰팡이, 항바이러스 등 다양한 미생물에 대하여 생육 억제의 효과가 보고되고 있으며, 지방산의 소수성 부분 길이가 늘어남에 따라 그 효과가 높아지는 것으로 알려져 있다(Desbois 2010). 현재 유리지방산의 항미생물 효과에 대한 명확한 기작이 알려져 있지 않지만, 지금까지 보고에서는 미생물의 electron transport chain의 파괴, 영양분 흡수 저해, 효소 활성 억제, 세포내 지방산 합성 저해, autolysis 유발, 대사산물의 유출, 산화적 인산화의 간섭 등에 의한 것으로 알려져 있다(Andrew 등 2010). 따라서 *H. pylori*에 대해 본 연구진이 분리한 *S. thermophilus* LAB KW 15와 *L. mesenteroides* LAB KW5가 생산하는 배양 상징액 중의 지방산 성분에 의해 생육 억제 효과가 나타난 것으로 사료되며, 이러한 결과를 바탕으로 유산균

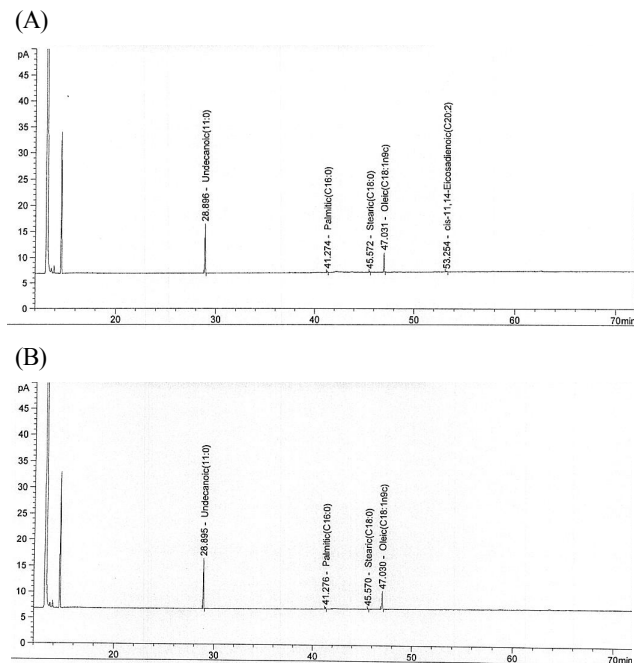


Fig. 2. The analyses with gas chromatography of fatty acids from (A) *L. mesenteroides* LAB KW 5 and (B) *S. thermophilus* LAB KW 15.

들이 생산하는 다양한 지방산들의 분리, 농축, 정제 등을 통해 *H. pylori*에 생육 억제제를 위한 상업적 응용이 용이할 것으로 판단된다.

3. 유산균 상정액에 의한 항미생물 활성

동결 건조된 유산균 배양 상정액을 *H. pylori*에 생육 억제제를 확인하기 위해 spot assay를 수행하였으며, 그 결과 *H. pylori*에 대한 생육 저해능이 확인되었다(Table 1). 다른 식중독균에서도 spot assay를 수행한 결과, 그람 음성 세균 중에서 특히 *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *C. sakazakii* 등에서 생육 저해능이 확인되었고, *E. coli* O157:H7, *E. coli*는 *H. pylori*와 저해 양상이 흡사하게 나타났다. 또한 이와 비슷한 연구에 의하면 *H. pylori*에 저해하는 김치 유산균 상정액이 *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhi*, *E. coli* O157:H7의 그람 음성 식중독균도 제어한다고 보고하였다(Yang 2008). 이러한 그람 음성 세균의 주요한 항균 활성은 앞서 분석한 유산균 상정액 성분 중 지방산에 의한 것으로 사료된다. 그리고 보고된 그람 음성 세균에 항균 활성을 나타내는 유리 지방산들은 capric acid(C_{10:0}), lauric acid(C_{12:0}),

myristic acid(C_{14:0}), palmitoleic acid(C_{16:1}), pentadecanoic acid(C_{15:0}), palmitic acid(C_{16:0}), heptadecanoic acid(C_{17:0}), straric acid(C_{18:0}), oleic acid(C_{18:1}), octadecatetraenoic acid(C_{18:4}), arachidonic acid(C_{20:4}), eicosapentaenoic acis(C_{20:5}), behenic acid(C_{22:0}), docosatetraenoic acid(C_{22:4}), docosapentaenoic acid(C_{22:5})들이 알려져 있으며(Bergsson 등 1999; Benkendorff 등 2005), 다른 그람 양성 세균에도 효과적인 것으로 보고되었다(Kabara 등 1972; Feldlaufer 등 1993). 이는 *H. pylori*의 저해능 뿐만 아니라 다른 유해 세균에 대해서 강한 항균 활성을 보여 식품안전을 위해 사용될 수 있는 특성으로 기대된다.

4. 목이버섯 추출물 다당체 분석

목이버섯으로부터 획득한 활성 다당체의 구성당 분석을 HPLC를 통해 수행한 결과, glucose(38.9%)와 mannose(26.2%)의 함량이 높았으며, 그 외에도 galactose(14.26%), xylose(11.06%) 및 fucose(7.31%) 등의 usual sugar가 다양하게 존재하고 있음이 확인되었다 (Fig. 3). 일반적으로 *Auricularia* 속 버섯류의 다당체는 β -glucan, glucurono-xylomannan 및 glucomannan이 알려져 있다(Peng 등 2010). 구성당 분석결과에서 glucose, mannose 및 xylose의 함량이 비교적 높다는 점과 앞선 HPLC 분석결과에서 분자량이 상이한 다당체가 혼재하는 사실로부터 목이버섯 유래 *H. pylori* 억제 활성 다당은 glucurono-xylomannan 혹은 glucomannan이 β -glucan과 함께 존재하는 혼합물이 관여할 수 있으리라 사료된다(Song & Du 2012; Jiangwei & Zengyong 2011).

Table 1. Anti-bacterial activity of supernatants from *L. mensenteroides* LAB KW5 and *S. thermophilus* LAB KW15 against various bacteria

Group	Indicator	Activity	
		<i>L. mensenteroides</i> LAB KW 5	<i>S. thermophilus</i> LAB KW 15
	<i>H. pylori</i> KCTC12083	+++ ¹⁾	+++
	<i>H. pylori</i> 52	+++	+++
	<i>H. pylori</i> 26695	+++	+++
	<i>H. pylori</i> 1061	+++	+++
Gram	<i>E. coli</i> 27	+++	+++
(-)	<i>E. coli</i> 28	+++	+++
	<i>E. coli</i> O157:H7 NCTC12079	+++	+++
	<i>E. coli</i> O157:H7 505B	+++	+++
	<i>C. sakazakii</i> KCTC2949	+ ³⁾	+
	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC23715	- ⁴⁾	-
	<i>S. aureus</i> KCCM12103	-	-
Gram	<i>E. faecalis</i> KCTC2011	-	-
(+)	<i>E. faecium</i> KCCM12118	-	-
	<i>B. cereus</i> KCTC1094	+	+

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: +++¹⁾; 14~22 mm, ++²⁾; 10~13 mm, +³⁾; 7~9 mm, -⁴⁾; no inhibition zone.

5. IgY 역가 측정

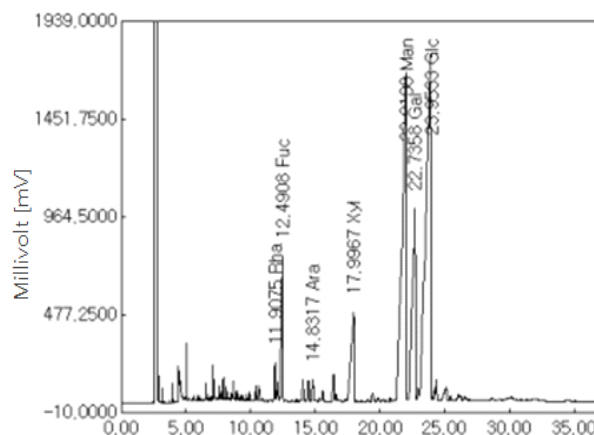


Fig. 3. Chromatography of acetylated alditols derived from polysaccharide extracted from *A. auricularia-judae*. Mol %: Rhamnose(Rha)-1.24, Fucose(Fuc)-7.3, Arabinose(Ara)-1.02, Xylose(Xyl)-11.06, Mannose(Man)-26.23, Galactose(Gal)-14.26, Glucose(Gly)-38.89.

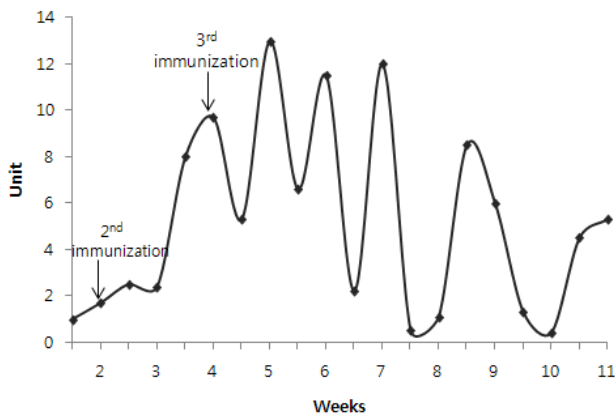


Fig. 4. Changes of IgY activity in egg yolk during the immunization period.

면역 기간 동안의 항체 역가 측정 결과는 Fig. 4와 같다. 1차 접종 후 7주째까지는 항체 역가가 상승곡선을 나타내다가 그 이후로 감소하는 추세를 보였고, 10주째 booster 면역을 한 결과 10주 이후부터는 다시 상승하는 모습을 보였다. 5~7주째에 항체 역가가 가장 높게 나타나는 반면, 10주째에는 가장 낮은 역가를 보였다. 따라서 처음 접종 후 5~7주차 계란을 수거하는 것이 효율적이라고 사료되었다.

6. 혼합액에 의한 *H. pylori* 생육 억제 상승 효과

동결 건조된 유산균 배양 상징액, IgY, 목이버섯 추출액을 혼합 배양하여 배양시간에 따른 생육 저해력의 변화를 흡광도와 생균수를 측정하여 확인하였다(Fig. 5, 6). IgY, 목이버섯을 단독으로 첨가한 경우 낮은 생육 저해력을 보였지만, 동결 건조된 유산균 배양 상징액의 단독 처리, IgY 또는 목이버섯을 혼합하여 처리한 경우 비교적 높은 생육 저해력을 나타냈다. 흡광도 측정 결과에서 동결 건조된 유산균 배양 상징액을 제외한 IgY와 목이버섯을 단독으로 첨가한 경우 저해율이 각각 23.6%, 9.0%인 반면, LAB KW5과 LAB KW15 동결건조액의 단독 처리는 각각 57.4%, 55.6%의 생육 저해율을 나타내었다. IgY와 동결 건조된 유산균 배양 상징액을 첨가한 경우의 저해율은 $70.1 \pm 3.3\%$, 목이버섯과 동결 건조된 유산균 배양 상징액을 첨가한 경우는 $62.8 \pm 5.4\%$ 로 확인되었다. 또한, IgY, 목이버섯, 동결 건조된 유산균 배양 상징액 혼합액의 경우의 생육 저해율($85.2 \pm 1.1\%$)이 가장 효과가 우수하였다. 또한, 혼합액을 첨가한 배지에서는 *L. mesenteroides* LAB KW5와 *S. thermophilus* LAB KW15의 동결건조액을 단독으로 첨가한 결과, 각각 96.9%, 96.0%로 높은 *H. pylori*의 저해율을 나타냈지만, IgY와 목이버섯을 단독으로 첨가한 경우 각각 62.6%, 34.2%의 생육 저해율을 보였다. IgY와 동결 건조된 유산균 배양 상징액 혼합액, 목이버섯과 동결 건조된 유산균 배양 상

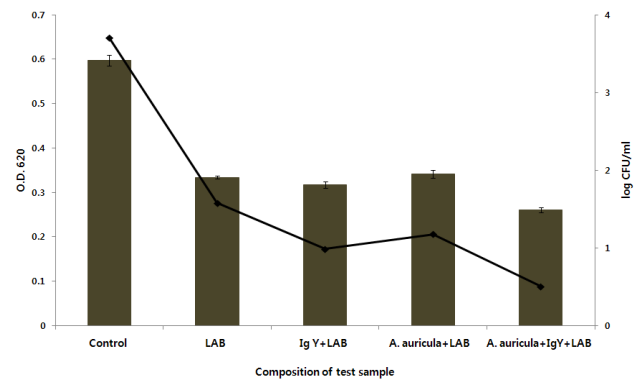


Fig. 5. Synergistic effect of the *H. pylori* KCTC12083 using the mixture of *L. mesenteroides* LAB KW5 with IgY and *A. auricula-judae*. ■: Viability of *H. pylori* KCTC12083, ◆: Absorbance 620 nm.

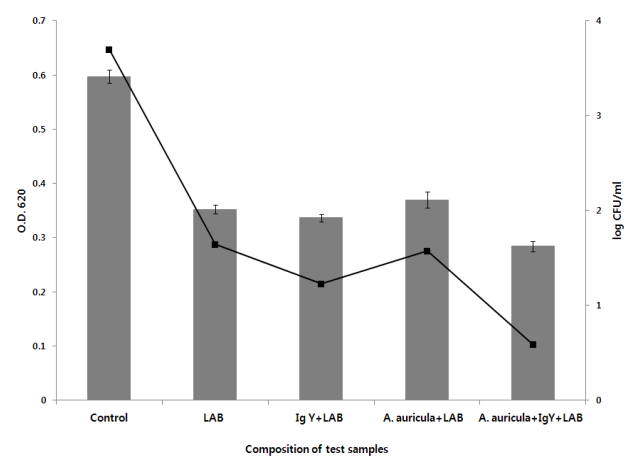


Fig. 6. Synergistic effect of the *H. pylori* KCTC12083 using the mixture of *S. thermophilus* LAB KW15 with IgY and *A. auricula-judae*. ■: Viability of *H. pylori* KCTC12083, ■: Absorbance 620 nm.

징액 혼합액을 첨가한 경우에는 $96.3 \pm 1.3\%$, 3 가지를 모두 혼합한 경우는 $98.2 \pm 0.6\%$ 의 *H. pylori* 생육 감소율을 보여 3가지 혼합액을 첨가하였을 때 가장 효과가 있는 것으로 나타났다. 전반적으로 IgY, 목이버섯을 단독으로 첨가한 경우 낮은 생육 저해력을 보였지만 동결 건조된 유산균 배양 상징액의 단독 처리, IgY 또는 목이버섯을 혼합하여 처리한 경우 비교적 높은 생육 저해력을 나타냈다. Bergsson 등(2002)의 연구에 따르면 지방산 monocaprin($C_{10:0}$), monolaurin($C_{12:0}$), palmitoleic acid($C_{16:1}$) 등의 지질이 세포막을 파괴하여 *H. pylori* 제어에 효과가 있다고 하였다. 결과적으로 유산균에 의해 *H. pylori*의 저해 효과가 제일 크고, IgY와 목이버섯의 혼합 시 상승효과가 있는 것으로 나타났다. Bae 등(2003)의 연구에 따르면 IgY

의 위염(또는 위궤양) 치료 효과에 대한 임상실험을 통해 *H. pylori* 박멸률이 항생제와 IgY를 병용하였을 때 항생제 단독투여 했을 때보다 높게 나타났지만, IgY 단독투여로 *H. pylori* 가 박멸되지 않아 단일치료법으로 사용하기는 어려울 것으로 보고하였다. 또한, Lee 등(2006)은 *H. pylori* 감염생쥐에서 IgY 처리한 그룹이 처리하지 않은 그룹보다 제균효과가 있다고 보고하였다. *H. pylori*와 결합하는 위벽세포에 당을 변이시키는 sodium periodate 등으로 처리할 경우, 결합력이 감소하게 되는데, 세포 표면에 존재하는 carbohydrates가 *H. pylori*와 위벽 세포의 결합에 관여하는 기전(Slomiany 1992)이 목이버섯의 다당체와 유사할 것으로 예측되었다. 또한, 목이버섯 추출물이 최소농도점 750 mg/ml에서 *S. aureus*, *C. albicans*, *S. pyogenes*, *Flavobacterium* sp.에 대한 항균활성이 있다고 하였다. 그러므로 복합 처리는 동결 건조된 유산균 배양 상징액이 *H. pylori*를 제균하는 동시에 IgY와 목이버섯이 추가 억제함으로써 *H. pylori*의 저해효과를 상승하는 것으로 보인다.

요 약

소화성 질환의 중요 인자인 *Helicobacter pylori*를 저해하는 IgY, 목이버섯, 김치와 타락 유산균을 이용하여 생육 저해 상승 효과를 분석하고자 하였다. 동결 건조된 유산균 배양 상징액을 다양한 효소 처리 결과, 지질 분해 효소를 제외하고는 활성을 나타냈다. GC 분석을 통해 유산균 동결건조액의 지방산 조성은 undecanoic acid(C_{11:0}), palmitic acid(C_{16:0}), stearic acid(C_{18:0}), oleic acid(C_{18:1})가 *L. mesenteroides* LAB KW5와 *S. thermophilus* LAB KW15에서 모두 확인되었으며, eicosadienoic acid(C_{20:2})는 LAB KW5에서만 나타났다. 또한 유산균 동결건조액은 다른 식중독균에서도 spot assay의 결과, 그람 음성균 중에서 특히 *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *C. sakazakii* 등에서 생육 저해능이 확인되었다. 목이버섯 추출물은 열수 추출과 ethanol을 이용해 분리하였으며, HPLC를 이용하여 목이버섯 추출 다당체를 분석한 결과, glucuronoxylomannan 혹은 glucomannan이 β -glucan과 함께 존재하는 혼합물일 것으로 되었다. 또한, 면역란은 1차 접종 후 11일째부터 주마다 2회씩 회수하여 IgY를 분리, 정제하였다. 실험을 통해 동결 건조된 유산균 배양 상징액, IgY, 목이버섯 추출액을 혼합 배양하여 배양시간에 따른 생육 저해력의 변화를 확인한 결과, 유산균에 의해 *H. pylori*의 저해 효과가 있었으며, IgY와 목이버섯의 혼합 시 추가 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러므로 동결 건조된 유산균 배양 상징액, IgY, 목이버섯 추출액의 복합처리는 *H. pylori*를 제어하는데 효과적인 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부(식품) 기술 개발 사업 2009년도 연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사합니다.

참고문헌

- Bae MJ, Kim SJ, Kim BK, Park CH, Suh JI, Kim WN, Jang TJ, Kweon SH. 2003. Study on the effect of chicken egg containg Ig Y against *Helicobacter pylori*. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 32:1357-1363
- Bergsson G, Steingrímsson Ó, Thormar H. 1999. *In vitro* susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Ch* 43:2790-2792
- Benkendorff K, Davis AR, Rogers CN, Bremner JB. 2005. Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *J EXP Mar Biol Ecol* 316:29-44
- Bergsson G, Steingrímsson Ó, Thormar H. 2002. Bactericidal effect of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Ag* 20:258-262
- Brown JC, Huang G, Haley-Zitlin V, Jiang X. 2009. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 75:848-852
- Cha WS, Kim JH, Lee KH, Kwon HJ, Yoon SJ, Choi UK, Cho YJ. 2006. Antioxidative and inhibition activities on *Helicobacter pylori* of spice extracts. *J Kor Soc Food Nutr* 23:867-878
- Chung YS, Kang KH, Chang MW. 2001. Effects of green and taste teas on the growth and vacuolating toxin titer of *Helicobacter pylori*. *J Kor Biotechnol Bioeng* 16:163-169
- Cho YJ, Chun SS, Lee KH, Kim JH, Kwon HJ, Kim JH, Kwon HJ, An BJ, Kim MU. 2006. Screening of the antimicrobial activity against *Helicobacter* and antioxidant by extracts from mulberry fruit (*Morus alba* L.). *J Kor Soc Food Sci Nutr* 35:15-29
- Debets-Ossenknopp YJ, Herscheid AJ, Pot PG, Kuipers EJ, Kusters JG, Vandenbroucke-Grauls CM. 1999. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and trovafloxacin in the Netherlands. *J Antimicrob Chemoth* 43:511-515
- Desbois AP, Valeria JS. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biot* 85:1629-1642
- Feldlaufer MF, Knox DA, Lusby WR, Shimanuki H. 1993.

- Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Apidologie* 24:95-99
- Hong UP, Chung MJ, Kim SD, Oh ET, So JS, Chung CI. 2004. Protein of infection and eradication activity of culture product by *Pediococcus pentosaceus* CBT SL4 showing antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Kor J Food Sci Technol* 36:779-783
- Jeong EJ, Park LP, Lee SH. 2006. Changes of immuno-activity in yogurt prepared with immunized milk containing anti-*Helicobacter pylori* antibody. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 35:985-989
- Jung SH, Kim HJ, Lee SW, Lyoo YS, Park HS, Lee NH. 2005. The safety and clinical test of anti-*Helicobacter pylori* IgY. *Kor J Food Sci Ani Resour* 25:465-471
- Jiangwei M, Zengyong Q, Xia X. 2011. Optimisation of extraction procedure for black fungus polysacchrides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities. *Carbohydr Polym* 84: 1061-1068
- Jung SH, Kim HJ, Lyoo YS, Rho JH, Lee NH. 2006. Effects of anti-*Helicobacter pylori* IgY powder to protect mice from *Helicobacter pylori*. *Kor J Food Sci Technol* 38:93-98
- Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Ch* 2:23-28
- Koo JK, Cheo TB. 2001. Studies on adherence inhibition and detachment of *Helicobacter pylori* using egg yolk IgY and additives. *Kor J Biotechnol Bioeng* 16:41-47
- Kim HR, Kim YH, Park SC, Kim MS, Baik KS, Cho HW and Seong CN 2007 Growth inhibition of *Helicobacter pylori* by ingestion of fermented soybean paste. *J Life Sci* 12:1695-1700
- Kim NY, Lim SH, Lee KH, Koo MS, Kim JM, Hwang JH, Kim JW, Lee DH, Jung HC, Song IS. 2003. Retreatment of *Helicobacter pylori* infection with triple therapy after initial treatment failure. *Kor J Gastroenterol* 42:195-203
- Kim TS, Hur JW, Yu MA, Cheiqh CI, Kim KN, Hwang JK, Pyun YR. 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 66:3-12
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349
- Lee YD, Yoo HL, Hwang JY, Han BK, Choi HJ, Park JH. 2010. Antimicrobial effect of lactic acid bacteria isolated from Kimchi and Tarak on *Helicobacter pylori*. *Korean J Food Nutr* 23:664-669
- Lee YH, Shin EJ, Lee JH, Park JH. 1999. *Lactobacillus acidophilus* inhibits the *Helicobacter pylori* adherence. *J Microbiol Biotech* 9:794-797
- Lee K, Ametani A, Shimizu M, Hatta H, Yamamoto T, Kimnogawa S. 1991. Production and characterization of anti-human insulin antibodies in the hen's egg. *Agric Biol Chem* 55:2141-2143
- Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS. 2002. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 81:632-641
- Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1314
- Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, Murray R, Blincow ED, Blackbourn SJ, Phillips M, Waters TE, Sanderson CR. 1988. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 2:1437-1442
- Ma Z, Wang J, Zhang L, Zhang Y, Ding K. 2010. Evaluation of water soluble β -D -glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydr Polym* 80: 977-983
- Mobely HL, Island MD, Hansinger RP. 1995. Molecular biology of microbial. *J Microbiol Rev* 59:169-182
- Mysore JV, Wigginton T. 1999. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel anti-adhesion compound. *Gastroenterology* 117:1316-1325
- Nguyen TL, Wang D, Hu Y, Fan Y, Wang J, Abula S, Guo L, Zhang J, Khakame SK, Dang BK. 2012. Immuno-enhancing activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydr Polym* 89:1117-1122
- Opekun AR, El-zaimaity HM. 1999. Novel therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharm Ther* 13:35-42
- Park MJ, Choi IJ, Kim JS, Lee DH, Jung HC, Song IS, Kim CY. 2000. Efficacy of quadruple therapy as retreatment regimen in *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer disease. *Kor J Gastroenterol* 36:457-464
- Park SH, Itoh K, Kikuchi E, Niwa H, Fujisawa T, 2003. Identification and characteristics of nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. *Curr Microbiol* 46: 385-388
- Peng XB, Li Q, Ou LN, Jiang LF, Zeng K. 2010. GC-MS, FT-IR analysis of black fungus polysaccharides and its

- inhibition against skin aging in mice. *Int J Biol Macromol* 47:304-307
- Raymond J, Kalach N, Bergeret M, Benhamou PH, Barbet JP, Gendrel, Dupont C. 1998. Effect of metronidazole resistance on bacterial eradication of *Helicobacter pylori* in infected children. *Antimicrob Agents Ch* 42:1334-1335
- Roe IH, Nam SW, Yang MR, Myung NH, Kim JT, Shin JH. 2002. The promising effect of egg yolk antibody (Immunoglobulin yolk) on the treatment of *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *Kor J Gastroenterol* 39:260-268
- Roe IH, Nam SW, Myung NH, Kim JT, Shin JH. 2002. *In vitro* and *in vivo* activities of garlic against *Helicobacter pylori*. *Kor J Gastroenterol* 40:159-165
- Schmid EN, Von Recklinghausen G, Ansorg R. 1990. Bacteriophages in *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *J Med Microbiol* 32:101-104
- Servin AL. 2001. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection by the lactic acid bacteria. *Kor J Pubic Health Assoc* 27:5-12
- Slomiany BL, Stomiany A. 1992. Mechanism of *Helicobacter pylori* pathogenesis focus on mucus. *J Clin Gastreterol* 14:114-121
- Song G, Du Q. 2012. Structure characterization and antitumor activity of an α β -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Food Rese Int* 45:381-387
- Vasquez A, Valdez Y, Gilman RH, McDonald JJ, Westblom TU, Berg D, Mayta H, Gutierrez V. 1996. Metronidazol and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. *J Clin Microbiol* 34: 1232-1234
- W.H.O. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistomes, liver flakes and *Helicobacter pylori*. *W.H.O.* 61:177-240
- Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from *Kimchi*. *Kor J Micribiol Biotech* 36:276-284
- Zhen YH, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP, 2009. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 133:317-322

접 수 : 2012년 10월 11일
 최종수정 : 2013년 2월 13일
 채 택 : 2013년 2월 15일