

Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Lactobacillus* spp. Isolated from Gajami Sikhae

Eun-Yeong Bae¹, Gi-Un Cho¹, Sung-Keun Jung^{1,2}, Young-Je Cho^{1,2} and Byung-Oh Kim^{1,2*}

¹School of Food Science, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Research Institute of Tailored Food Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Received October 25, 2022 /Revised November 24, 2022 /Accepted November 25, 2022

Helicobacter pylori infects the mucosa, induces chronic inflammation and ulcers, and is known as a biological carcinogen. Antibiotics are used as therapeutic agents for *H. pylori*, but there are problems such as resistance. Thus, research is being conducted on the use of lactic acid bacteria (LAB) as an alternative therapeutic agent. There have been many studies on LAB related to kimchi. However, studies related to Gajami Sikhae, a traditional fermented seafood in Korea, are insufficient. In this study, we investigated the inhibitory effect of LAB isolated from Gajami Sikhae on *H. pylori* and its use as a probiotic. Forty species of LAB isolated from Gajami Sikhae were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Weissella paramesenteroides*, and 10 strains of 40 species were selected through liquid inhibition assay of *H. pylori*. The selected LAB supernatant at 1%, 5%, and 10% had a growth inhibitory effect on *H. pylori* 52, 51, e-53, and 309. The adjusted pH of 7.0 was used for the LAB culture supernatant, in reference to a study that the growth of *H. pylori* is affected by acid. All 10 strains of LAB at 5% and 10% concentration suppressed the growth of *H. pylori* 52, and 7 strains of LAB at 10% concentration suppressed the growth of *H. pylori* e-53. LAB also had the effect of suppressing the activity of urease. Finally, LAB isolated from Gajami Sikhae is expected to be useful for eradicating and preventing *H. pylori*.

Key words : Gajami Sikhae, *Helicobacter pylori*, lactic acid bacteria, probiotics

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 편모가 있는 그람 음성 (-) 균이며 나선형으로 위벽 상피 세포에 군락을 형성하고 요소분해효소(urease)를 생성한다[9, 12]. 위벽의 점막에 *H. pylori*가 감염되면 위 점막의 점액 생산이 감소 되고 외부 자극에 쉽게 손상을 받게되어 만성 염증과 궤양이 유발된다[11]. 세계보건기구(World Health Organization)에서는 *H. pylori*를 위암 발병 인자인 제1종 발암요인으로, 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer)는 생물학적 발암물질로 규정하고 있다[11, 12].

전 세계적으로 인구의 절반 가까이 *H. pylori*에 감염되어 있는 것으로 알려져 있으며, 2016-2017년 한국에서 23,770명을 대상으로 시행되는 2개의 면역 측정 키트를 사용하여 혈청 HP 면역글로블린 G 항체(anti-HP IgG)를

검출한 것을 기반으로 검사한 결과 43.9%가 *H. pylori*에 감염된 것으로 나타났다[13]. Roh와 Shim의 연구[16]에서 *H. pylori*에 감염되어 있는 경우 위암 발생률이 3.8배 높은 것으로 보고되고 있다. 1983년 이후부터 암은 한국인의 사망원인 중 1위이며, 그 중 위암은 국내의 암 발병 1위로 젊은 층 환자에게도 많이 발생해 문제가 되고 있다. 따라서 위암과 위 질환, 그 외의 다양한 질환의 발생률을 높이는 *H. pylori*를 제거하는 연구에 관심이 증가되고 있다.

일반적으로 *H. pylori*의 제균 치료에는 bismuth, proton pump inhibitor, ranitidine bismuth citrate를 근간으로 하는 3중 혹은 4중의 항생제 요법이 사용되고 있다[12]. 이러한 항생제를 투여한 제균은 어느 정도 효과가 있으나, 장기간 투여로 인한 내성을 가진 균주의 등장과 부작용 등의 문제가 보고되고 있다[5]. 또한 국내의 경우 항생제 내성률이 세계 최고 수준에 이르고 있어 항생제 부작용을 최소화 시키며 *H. pylori*에 치료적인 역할과 도움을 줄 수 있는 프로바이오틱스(probiotics)와 같은 기능성 물질에 대한 관심이 증가하고 있다[5, 12, 17]. 프로바이오틱스는 장 질환 치료와 다양한 식중독 균에 대한 항균효과 외에도 *H. pylori*에 대한 항균력을 가지는 것으로 밝혀져, 프로바이오틱스의 항 *H. pylori*에 대한 연구가 진행되고 있으며 [10], 한국인에게 더욱 적합한 젖산균을 찾기 위해 전통발

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-7756, Fax : +82-53-950-6772

E-mail : kimb@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Primers used in this study

Species		Sequence	Target size (bp)
L. brevis sp.	F	GGA AGA TCA AGA ATA TCG GTG	1361
	R	GCG TCT CTA ATT CAC TGA GC	
L. plantarum sp.	F	GAA GAT TTG CCC ATC GGT G	1113
	R	CGT TTG ATG GTA GCG TTG C	
Lc. mesenteroides sp.	F	GTG GTC ATG GGT CTT AGC	886
	R	GGA TCA AGA CTA GCC AAT GG	
W. paramesenteroides sp.	F	GCT GAT GAA CCC ATA CCT C	641
	R	GAC CTG ATT CGC TCG TTG	
H. pylori 16S rDNA	F	CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC	110
	R	ATT ACT GAC GCT GAT TG T GC	

효식품에서 분리한 젖산균의 프로바이오틱스 효과와 항균 작용에 대한 연구가 이뤄지고 있다[12, 18]. 하지만 한국인에게 적합한 젖산균의 분리는 전통발효식품 중 김치류에 집중되어 연구되고 있고, 한국 전통 수산발효식품인 가자미식해(食醃)와 관련된 연구는 미비한 실정이다. 유산균을 분리하여 하는 실험은 RISS 검색 결과 총 1198건이다. 이 중 식해에 관한 연구는 113건이었으며, 가자미식해에 관한 연구는 3건으로 나타났다.

이에 본 연구에서는 *H. pylori*를 억제하는 새로운 생균제를 개발하기 위해 전통발효식품인 가자미식해로부터 분리된 젖산균의 *H. pylori*에 대한 항균 효과를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 *H. pylori*는 표준균주 *H. pylori* 52, *H. pylori* 51와 임상 분리균주인 *H. pylori* e-53, *H. pylori* 309, *H. pylori* 26695, *H. pylori* G88026, *H. pylori* PEDF376-3-1로 경상대학교 헬리코박터 파일로리 분리균주 은행으로부터 제공받아, 10% horse serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 agar 1.2%가 함유된 brucella broth (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용해 37°C, 10% CO₂ incubator (Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan)에서 72시간 동안 미호기적으로 배양하였다. 모든 균주는 실험 전 Polymerase Chain Reaction (PCR) (PCR Max, Stone, Staffordshire, UK)을 이용해 확인한 후 실험에 사용하였다. 사용된 primer는 KIBIR [6]의 연구를 참고하여 사용하였고, Table 1과 같다.

젖산균 배양 상등액의 제조

젖산균주 배양에 사용하는 MRS 배지 성분 중 tween 80, sodium acetate와 같은 성분이 *H. pylori* 생육을 억제할 수 있다는 Lee와 Chang의 연구[12]를 참고하여 위 두 가지 성분을 제외한 변형 MRS broth를 제작하여 실험에 사용

하였다(Table 2). 가자미식해에서 분리한 젖산균주를 변형 MRS 배지에 1% 비율로 접종한 후 37°C, 24시간 조건에서 2회 계대배양하였다. 그 후 4,000× g, 15분의 조건으로 원심분리(Gyrozen, Gimpo, Gyeonggi-do, Korea)하여 배양 상등액을 분리하였으며, 분리된 배양 상등액은 Autoclave로 멸균한 후 0.45 µm syringe filter (Hyundai Mic., Jung-gu, Seoul, Korea)로 여과하여 제조하였다. 상등액의 pH는 3.38~4.36으로 나타났으며, *H. pylori*의 생육이 산에 영향을 받는다는 연구[15, 16]를 참고하여 pH를 조절하지 않은 상등액과 0.1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조절한 상등액을 실험에 각각 사용하여 비교하였다.

젖산균 배양 상등액의 *H. pylori* 증식 억제 효과

Solid inhibition assay로 젖산균 배양 상등액의 항균력을 측정하기 위해 7종의 *H. pylori*에 대해 paper disk법을 이용하여 실험을 실시하였다. Brucella agar에 *H. pylori*를 72시간 배양한 뒤, pellet만 모아 pH 7.0인 Phosphate buffered saline (PBS)에 2번 세척하였다. PBS에 재현탁한 *H. pylori* 균수를 1×10⁹ CFU/ml로 조절하여 200 µl 도말한 후, 멸균한 8 mm paper disk (Advantec, Taipei, Taiwan)에 젖산균주 배양 상등액을 100 µl를 주입하여 Brucella agar에 적용시키고 72시간 배양한 뒤 생성된 생육억제환(clear zone)의 크기를 mm 단위로 측정하였다. Liquid inhibition assay는 *H. pylori* 균수를 1×10⁵ CFU/ml로 조절하여 각각의 *H. py-*

Table 2. MRS used in this study

Ingredient	Amount (g/l)
Proteose Peptone	10
Meat Extract	10
Yeast Extract	5
Glucose	20
Triammonium Citrate	2
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2

lori 균액에 10종의 젖산균 배양 상등액을 각각 1%, 5%, 10% (v/v)를 첨가하여 3일 동안 24시간 간격으로 spectrophotometer (Biochrome, Cambourne, Cambridge, UK)를 이용해 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시간마다 배양 상등액을 첨가하지 않은 균액(A0)과 배양 상등액을 %별로 첨가한 균액(A1)을 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 억제율은 다음 계산식[Inhibition rate (%) = (1 - A1 / A0) × 100]에 따라 계산하였다.

젖산균 배양 상등액의 *H. pylori* urease 활성 억제 효과

H. pylori urease 활성에 대한 젖산균 상등액의 저해 효과를 알아보기 위해 phenol red method [14]에 따라 urease의 활성을 측정하였다. Liquid inhibition assay와 동일하게 *H. pylori* 균수를 1×10^5 CFU/ml로 조절하여 각각의 *H. pylori* 균액에 10종의 젖산균 배양 상등액을 각각 1%, 5%, 10% (v/v)를 첨가하여 배양하였다. Urease reaction buffer는 인산완충용액에 20% (w/v) 요소(Duksan Chem., Ansan, Gyeonggi-do, Korea)와 0.012% (w/v) phenol red (Samchun Chem., Pyeongtaek, Gyeonggi-do, Korea)를 용해시킨 후 pH를 6.5로 조정하여 제조하였다. 배양한 실험용액을 24시간 간격으로 10 µl 취하여 urease reaction buffer를 혼합한 후 *H. pylori*가 암모니아를 생성하도록 37°C에서 1시간 배양한 후 배양 상등액을 첨가하지 않은 균액(A0)과 배양 상등액을 %별로 첨가한 균액(A1)을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 억제율은 다음 계산식[Inhibition rate (%) = (1 - A1 / A0) × 100]에 따라 계산하였다.

항생제 감수성 조사

항생제 감수성 및 내성 시험은 2019년 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guide line M100-S29와 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)를 참고하였다[3, 4]. 계대배양한 젖산균주 배양액을 1×10^8 CFU/mL로 맞추고 MRS agar에 도말하여 24시간 배양 후 10종의 항생제에 대한 억제환의 크기를 측정하여 감수성과 내성을 판정하였다[1]. 사용한 항생제는 ampicillin (AM, 10 µg), cephalothin (CF, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), rifampin (RA, 5 µg), streptomycin (S, 10 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg)은 Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), nalidixic acid (NA, 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg)은 MBcell (Kisan bio., Seocho-gu, Seoul, Korea), chloramphenicol (C, 30 µg)은 Duchefa (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, the Netherlands), kanamycin (K, 30 µg)은 USB (USB corporation, Cleveland, OH, USA)이다.

통계처리

각 항목에 따른 평균값과 표준오차는 3회 이상 반복

실험을 수행하여 얻어진 결과로, 통계분석은 SPSS (Statistical package for Social Science, version 25, SPSS INC., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. 전체 시료에 대한 차이의 통계적 유의성은 분산분석으로 분석하였고, 각 시료 간의 차이는 Tukey의 정직유의차 검정(Tukey HSD tests)으로 5% 범위($p < 0.05$) 내에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

H. pylori 억제 활성을 가진 가자미식해 분리 젖산균

가자미식해로부터 분리한 젖산균 40종의 그람염색 결과 40종 모두 그람 양성(+)의 간균으로 나타났고, 50CHL API kit (date not shown)와 16s rDNA sequencing 결과 균주는 *Lactobacillus plantarum* spp., *Lactobacillus brevis* spp., *Leuconostoc mesenteroides* spp., *Weissella paramesenteroides* spp.로 밝혀졌다. 분리된 40종의 젖산균 중 liquid inhibition assay를 통한 *H. pylori* 생육 억제 활성 실험에서 *H. pylori* 52에 대하여 생육 억제를 보이는 10종의 젖산균을 선별하였고, 각각을 *L. plantarum* GS11, *L. plantarum* GS12, *L. plantarum* GS13, *L. plantarum* GS14, *L. brevis* GS21, *L. brevis* GS22, *Lc. mesenteroides* GS31, *Lc. mesenteroides* GS32과 *W. paramesenteroides* GS41, *W. paramesenteroides* GS42로 최종 명명하여 실험에 사용하였다.

젖산균 배양 상등액의 *H. pylori* 증식 억제 효과

Solid inhibition 결과는 Fig. 1과 같다. 표준균주 *H. pylori* 51, *H. pylori* 52와 임상분리균주 *H. pylori* e-53, *H. pylori* 309를 제외한 3종의 임상분리균주 *H. pylori* 26695, *H. pylori* G88026, *H. pylori* PEDF376-3-1에서 젖산균 배양 상등액의 생육억제환을 관찰할 수 없었는데, 이는 *H. pylori*가 가지는 독성인자 등의 특성 차이 때문인 것으로 생각된다. 4종의 *H. pylori*에서 대조균인 MRS 변형배지에서 생육억제환이 나타나지 않은 것에 비해 대부분의 젖산균 배양 상등액에서 모든 *H. pylori*에 11 mm 이상의 생육억제환이 관찰되었고, *H. pylori* 51에서 *L. brevis* GS22, *Lc. mesenteroides* GS31과 *H. pylori* e-53에서 *L. plantarum* GS11, *Lc. mesenteroides* GS32에서 14 mm 정도의 생육억제환이 관찰되었다. 하지만 모든 *H. pylori*에서 *L. plantarum* GS12, *L. plantarum* GS13은 생육억제환이 관찰되지 않았는데, 이는 *H. pylori*의 성장 최적 pH가 6~8인 것으로 보아, *L. plantarum* GS12, *L. plantarum* GS13의 상등액 pH가 각각 4.36, 4.28인 것에 영향을 받은 것으로 추정된다. Liquid inhibition 결과 모든 *H. pylori*는 배양 시간에 의존적으로 성장하였고, *H. pylori*의 종류와 젖산균 상등액 농도와 종류에 따라 저해율이 다르게 나타났다(data not shown.). 대조균인 MRS 변형배지는 생육억제가 나타나지 않았으며,

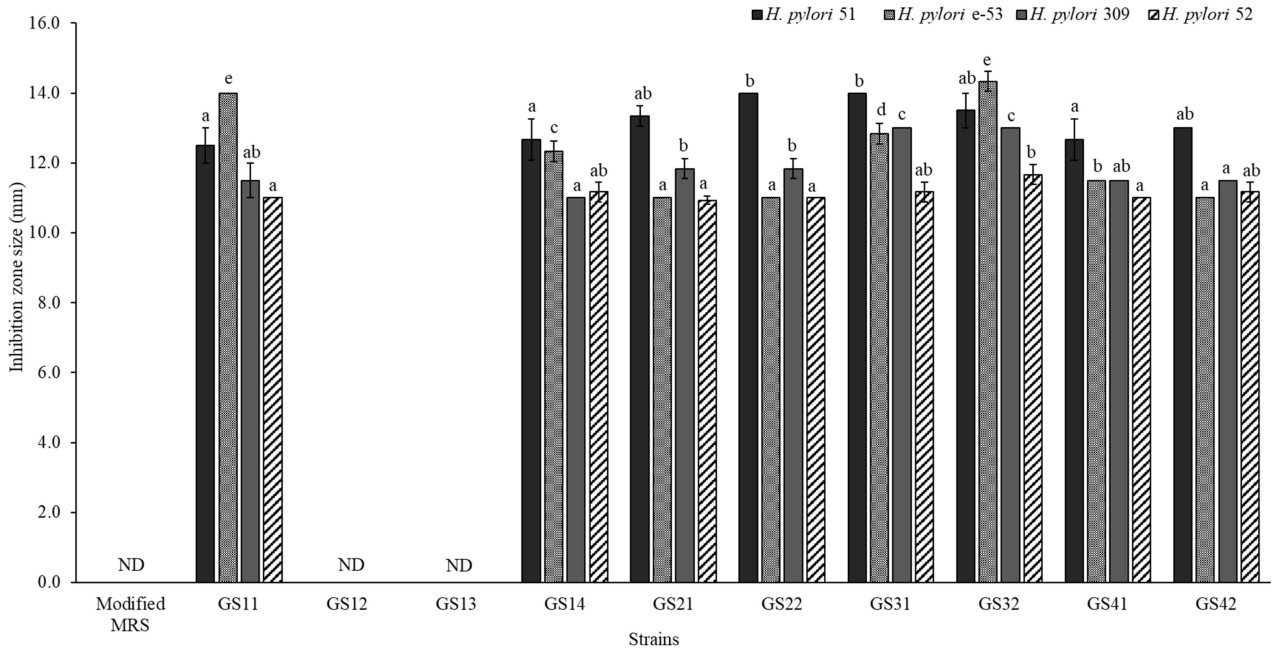


Fig. 1. The anti-*H. pylori* activity of cell-free supernatant of the isolated strains by solid inhibition assay. The data were expressed as the mean \pm SD (n=3). Means with differed letters (a-c) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

72시간 후 *H. pylori* 51, *H. pylori* e-53, *H. pylori* 309, *H. pylori* 52에서 모든 젖산균의 접종 농도가 높아질수록 저해율이 증가하였고, 10%를 접종한 배양액의 저해율이 *H. pylori* 종류에 따라 최대 67.3~90.3%로 나타났다(Fig. 2). *H. pylori* 51에서 *L. plantarum* GS14, *L. brevis* GS22, *Lc. mesenteroides* GS32는 젖산균 상등액 10%에서 82% 이상,

Lc. mesenteroides GS31은 77.2%의 저해율을 보였으며(Fig. 2A), *H. pylori* e-53에서 *Lc. mesenteroides* GS32, *Lc. mesenteroides* GS31과 *W. paramesenteroides* GS41이 각각 90.3, 86.1, 83.0%의 저해율을 나타냈다(Fig. 2B). *H. pylori* 309의 경우 3개의 균주를 제외한 모든 균주가 62% 이상의 저해율을 보였으며, *L. brevis* GS22와 *Lc. mesenteroides* GS31은

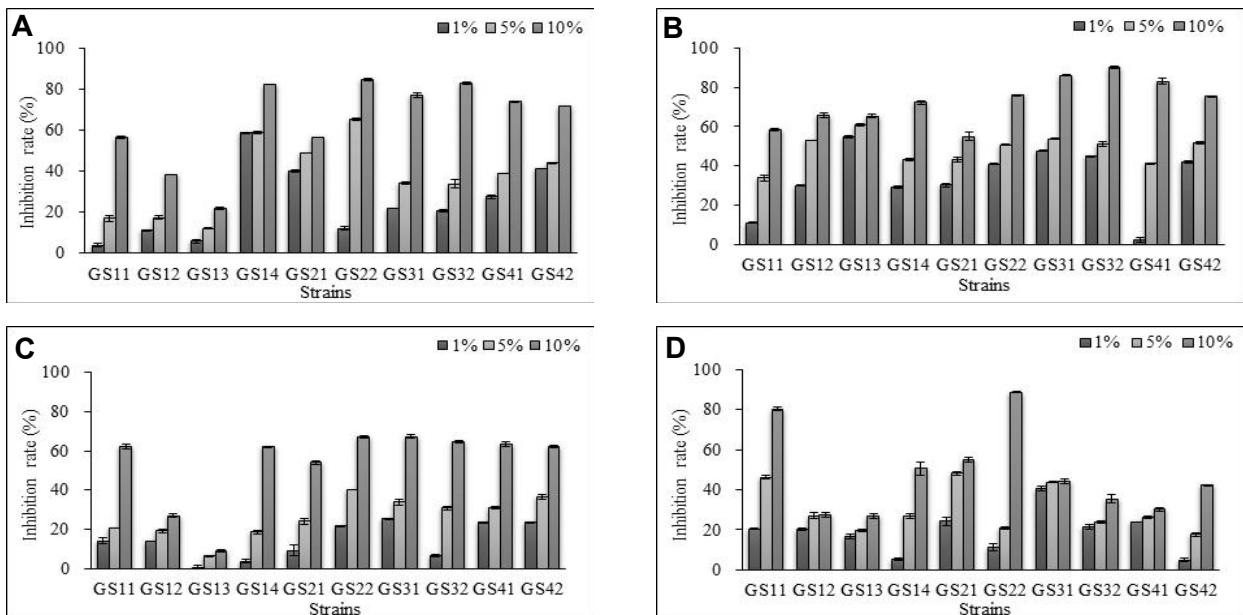


Fig. 2 The anti-*H. pylori* 51 (A), *H. pylori* e-53 (B), *H. pylori* 309 (C), *H. pylori* 52 (D) activity of cell-free supernatant of the isolated strains by liquid inhibition assay. The data were expressed as the mean \pm SD (n=3).

67% 이상의 저해율을 나타냈다(Fig. 2C). *H. pylori* 52는 *L. plantarum* GS11과 *L. brevis* GS22에서 각각 80.2, 88.5%의 저해율을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). Solid inhibition과 같이 liquid inhibition에서도 *H. pylori*와 젖산균 종류에 따라 저해 효과가 다르다는 것을 확인할 수 있었다. Solid inhibition에서 생육억제환이 관찰되지 않았던 *L. plantarum* GS12와 *L. plantarum* GS13이 liquid inhibition에서는 저해 효과를 가진 것으로 봤을 때 젖산균 상등액에 있는 항균 물질의 확산이 Solid inhibition 결과에 영향을 준 것으로 보인다. 결과적으로 젖산균을 배양할 때 생산되는 산과 항균물질 등이 *H. pylori*에 대한 항균 효과를 가지고 각 젖산균마다 다른 산성 항균 물질의 생산 정도에 따라 *H. pylori*의 생장에 영향을 주며, *H. pylori*의 종류마다 저해되는 정도가 다른 것으로 생각된다.

pH를 보정한 젖산균 배양 상등액의 *H. pylori* 증식 억제 효과

Midolo 등[15]이 pH와 유기산이 *H. pylori*의 생육에 미치는 영향을 실험한 결과에서 젖산이 가장 높은 억제 활성을 나타냈고, 초산, 염산 또한 농도 의존적으로 *H. pylori*의 생육을 억제하는 것으로 보고하였다. 따라서 *H. pylori*의 생육에 젖산균이 생성하는 젖산과 초산 등의 유기산에 의한 영향을 배제하고자 pH를 7.0으로 보정한 젖산균 상등액의 *H. pylori* 항균력을 확인하기 위해 실시한 solid inhibition 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군인 아무것도 첨가하지 않은 MRS 변형 배지에서 생육억제환이 나타나지 않았다. pH를 보정한 젖산균 상등액은 *H. pylori* 51과 *H. pylori* 309에 대해 pH를 제외하고는 효과가 미비해 저해 효과가 나타나지 않았으나, *H. pylori* e-53과 *H. pylori* 52에 대해서는 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. *H. pylori* e-53은

모든 젖산균 상등액에서 11.0 mm 이상의 생육억제환이 관찰되었고, *Lc. mesenteroides* GS32와 *W. paramesenteroides* GS41의 경우에는 11.9 mm의 생육억제환이 측정되었다. *H. pylori* 52의 경우에는 *L. brevis* GS21과 *W. paramesenteroides* GS41을 사용한 젖산균 상등액에서는 생육억제환이 관찰되지 않았고, 나머지 젖산균주의 상등액에서 9.0~12.0 mm의 다양한 크기의 생육억제환을 관찰할 수 있었다. Solid inhibition에서 저해를 보이지 않았던 *H. pylori* 51과 *H. pylori* 309 둘 다 liquid inhibition에서도 저해 효과를 확인할 수 없었으며, 대조군인 MRS 변형배지에서도 생육억제환이 나타나지 않았다. Solid inhibition 결과 저해를 보인 *H. pylori* e-53과 *H. pylori* 52 배양액에 pH를 보정한 젖산균 상등액을 각각 1, 5, 10% (v/v) 접종한 결과 모든 *H. pylori*는 배양 시간에 의존적으로 성장하였으며, *H. pylori* 52에 pH 7.0인 젖산균 상등액 5% 접종한 것을 제외한 나머지 젖산균 상등액 1%, 5% 모두 *H. pylori*를 저해시키지 못했다(Fig. 4). *H. pylori* e-53에 상등액 10%를 접종하였을 때, 젖산균 중 *L. plantarum* GS11, *L. brevis* GS22, *W. paramesenteroides* GS41를 제외한 7종의 젖산균이 6.6~29.0%의 저해율을 보였다. *H. pylori* 52는 모든 젖산균 상등액 5%와 10%에서 저해 효과가 보였다. 특히 10%에서 *L. plantarum* GS11 50.3%, *W. paramesenteroides* GS42 54.2%, 나머지 8종의 젖산균에서 42.5~48.5%의 저해율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Solid inhibition 결과에서 생육억제환이 관찰되었으나 liquid inhibition에서 생육억제가 관찰되지 않은 것은 접종 농도에 따른 것으로 추측되며, 접종량이 10%인 젖산균이 두 종의 *H. pylori*에 다른 저해율을 보였는데, 이는 젖산균 상등액에 포함된 산을 제외한 다양한 항균 물질이 포함된 것으로 생각되며, 그 물질에 의한 저해 효과가 *H. pylori* 종류에 따라

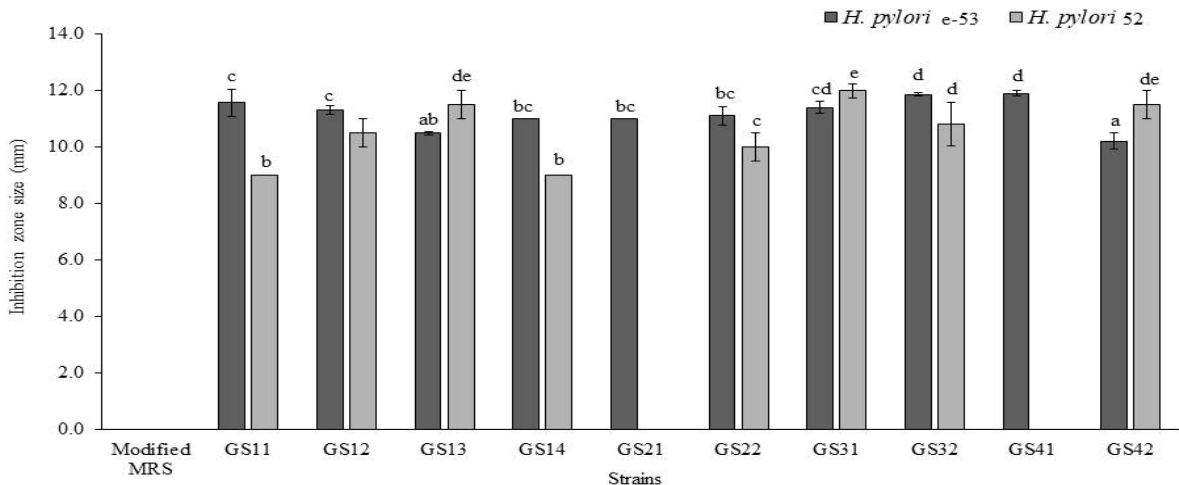


Fig. 3. Anti-*H. pylori* activity of cell-free supernatant adjusted pH 7.0 of the isolated strains by solid inhibition assay. The data were expressed as the mean ± SD (n=3). Means with differed letters (a-e) above the bars in the same material are significantly different at p<0.05 by Tukey HSD tests.

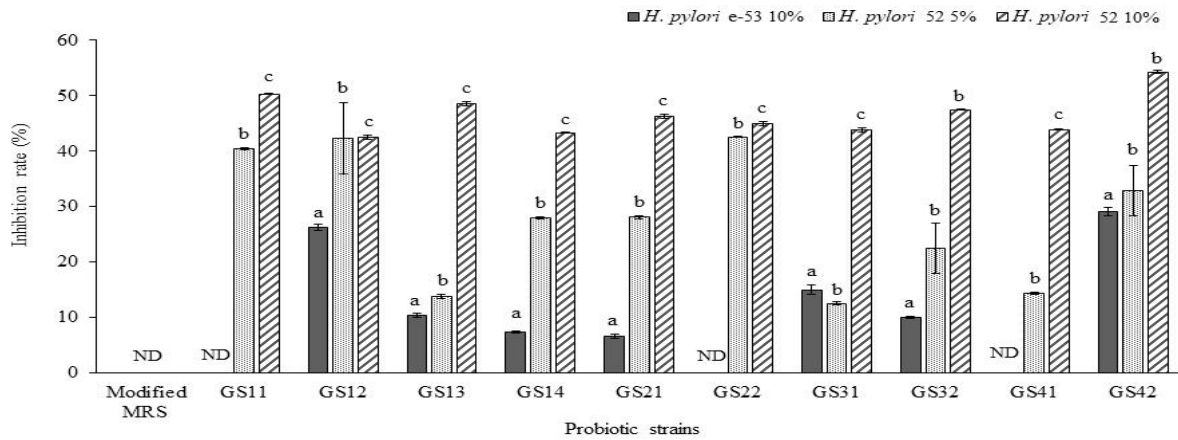


Fig. 4. The anti-*H. pylori* activity of cell-free supernatant adjusted pH 7.0 of the isolated strains by liquid inhibition assay. The data were expressed as the mean \pm SD (n=3). Means with differed letters (a-e) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

Table 3. Inhibitory effect of isolated strains on urease activity of *H. pylori*

Sample tested		H. pylori 51	H. pylori e-53	H. pylori 309	H. pylori 52
Control (0%)		0.873 \pm 0.01 ^d	0.884 \pm 0.01 ^c	1.144 \pm 0.01 ^a	0.976 \pm 0.01 ^b
Modified MRS	1%	0.874 \pm 0.01 ^c	0.883 \pm 0.01 ^c	1.286 \pm 0.00 ^d	0.977 \pm 0.00 ^b
	5% 1	1 0.865 \pm 0.01 ^b	0.853 \pm 0.01 ^b	1.267 \pm 0.00 ^c	0.977 \pm 0.00 ^b
	10% 1	1 0.874 \pm 0.01 ^a	0.821 \pm 0.01 ^a	1.197 \pm 0.00 ^b	0.914 \pm 0.01 ^a
GS11	1%	0.681 \pm 0.01 ^c	0.831 \pm 0.01 ^c	1.147 \pm 0.01 ^c	0.900 \pm 0.00 ^b
	5%	0.516 \pm 0.00 ^b	0.682 \pm 0.01 ^b	0.962 \pm 0.01 ^b	0.857 \pm 0.00 ^a
	10%	0.483 \pm 0.01 ^a	0.522 \pm 0.01 ^a	0.571 \pm 0.01 ^a	0.857 \pm 0.00 ^a
GS12	1%	0.856 \pm 0.00 ^c	0.857 \pm 0.01 ^c	1.133 \pm 0.01 ^c	0.942 \pm 0.01 ^b
	5%	0.839 \pm 0.01 ^b	0.827 \pm 0.02 ^b	1.024 \pm 0.00 ^b	0.937 \pm 0.01 ^b
	10%	0.815 \pm 0.00 ^a	0.783 \pm 0.01 ^a	0.963 \pm 0.01 ^a	0.875 \pm 0.01 ^a
GS13	1%	0.854 \pm 0.01 ^c	0.834 \pm 0.01 ^b	1.093 \pm 0.01 ^c	0.953 \pm 0.01 ^{b,c}
	5%	0.833 \pm 0.01 ^b	0.828 \pm 0.00 ^b	1.052 \pm 0.01 ^b	0.933 \pm 0.01 ^b
	10%	0.763 \pm 0.01 ^a	0.815 \pm 0.00 ^{a,b}	0.993 \pm 0.00 ^a	0.854 \pm 0.00 ^a
GS14	1%	0.731 \pm 0.00 ^c	0.730 \pm 0.01 ^c	1.137 \pm 0.01 ^c	0.947 \pm 0.01 ^c
	5%	0.673 \pm 0.00 ^b	0.654 \pm 0.01 ^b	1.032 \pm 0.01 ^b	0.885 \pm 0.00 ^b
	10%	0.542 \pm 0.01 ^a	0.500 \pm 0.01 ^a	0.848 \pm 0.00 ^a	0.830 \pm 0.00 ^a
GS21	1%	0.817 \pm 0.00 ^c	0.843 \pm 0.01 ^c	1.058 \pm 0.01 ^c	0.958 \pm 0.01 ^c
	5%	0.724 \pm 0.00 ^b	0.738 \pm 0.00 ^b	0.919 \pm 0.01 ^b	0.914 \pm 0.01 ^b
	10%	0.530 \pm 0.01 ^a	0.655 \pm 0.00 ^a	0.864 \pm 0.00 ^a	0.853 \pm 0.01 ^a
GS22	1%	0.807 \pm 0.01 ^c	0.884 \pm 0.00 ^c	1.103 \pm 0.01 ^b	0.941 \pm 0.00 ^c
	5%	0.695 \pm 0.00 ^b	0.632 \pm 0.01 ^b	1.065 \pm 0.01 ^b	0.883 \pm 0.01 ^b
	10%	0.485 \pm 0.00 ^a	0.500 \pm 0.01 ^a	0.547 \pm 0.00 ^a	0.546 \pm 0.01 ^a
GS31	1%	0.765 \pm 0.00 ^c	0.882 \pm 0.01 ^c	1.073 \pm 0.01 ^c	0.944 \pm 0.01 ^c
	5%	0.669 \pm 0.00 ^b	0.809 \pm 0.01 ^b	1.065 \pm 0.01 ^b	0.888 \pm 0.01 ^b
	10%	0.475 \pm 0.00 ^a	0.511 \pm 0.01 ^a	0.918 \pm 0.01 ^a	0.574 \pm 0.01 ^a
GS32	1%	0.824 \pm 0.00 ^c	0.813 \pm 0.01 ^c	1.136 \pm 0.00 ^c	0.968 \pm 0.01 ^c
	5%	0.604 \pm 0.00 ^b	0.700 \pm 0.01 ^b	0.723 \pm 0.01 ^b	0.746 \pm 0.01 ^b
	10%	0.484 \pm 0.00 ^a	0.502 \pm 0.00 ^a	0.576 \pm 0.00 ^a	0.553 \pm 0.01 ^a
GS41	1%	0.844 \pm 0.00 ^c	0.809 \pm 0.00 ^c	1.087 \pm 0.01 ^c	0.971 \pm 0.01 ^c
	5%	0.797 \pm 0.01 ^b	0.715 \pm 0.01 ^b	1.061 \pm 0.01 ^b	0.925 \pm 0.01 ^b
	10%	0.471 \pm 0.01 ^a	0.533 \pm 0.01 ^a	0.836 \pm 0.01 ^a	0.831 \pm 0.01 ^a
GS42	1%	0.764 \pm 0.00 ^c	0.773 \pm 0.01 ^c	1.083 \pm 0.01 ^c	0.927 \pm 0.01 ^c
	5%	0.661 \pm 0.01 ^b	0.660 \pm 0.01 ^b	1.000 \pm 0.01 ^b	0.816 \pm 0.00 ^b
	10%	0.484 \pm 0.00 ^a	0.510 \pm 0.01 ^a	0.669 \pm 0.00 ^a	0.681 \pm 0.01 ^a

The data were expressed as the mean \pm SD (n=3). Means with differed letters (a-d) above the bars in the same material are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey HSD tests.

Table 4 Antimicrobial susceptibility test of probiotic strains from Gajami Sikhae

Antimicrobials	Code/Disk potency (µg)	Antimicrobial susceptibility ^a									
		GS11	GS12	GS13	GS14	GS21	GS22	GS31	GS32	GS41	GS42
Kanamycin	K/30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomycin	S/10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicillin	AM/10	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S
Cephalothin	CF/30	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycin	E/15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloramphenicol	C/30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nalidixic acid	NA/30	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Tetracycline	TE/30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampin	RA/5	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	SXT/25	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S

^aSusceptibility expressed as S (Susceptible), MS (Moderately Susceptible) or R (Resistant) [1].

다른 것으로 추정된다.

젖산균 배양 상등액의 *H. pylori* urease 활성 억제 효과

요소분해효소(urease)는 요소(urea)를 암모니아로 분해하여 위산과 중화반응을 일으켜 강한 산성 환경인 위에서 *H. pylori*가 자신만의 군락을 형성해 위 점막 세포로 파고 들어가면서 염증과 세포독성 등을 일으킨다. 따라서 urease 활성을 저해하는 것이 *H. pylori* 제균을 위한 확실한 방법 중 하나로 알려져 있다[8]. *H. pylori* 배양액에 젖산균 상등액을 각각 1, 5, 10% (v/v) 접종하여 총 72시간 동안 24시간 간격으로 *H. pylori*의 urease 활성 억제 효과를 측정 한 결과는 Table 3와 같다. 모든 젖산균 상등액은 저해율에 차이가 있지만 접종량에 비례해 *H. pylori*의 urease 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 특히 10%와 5%의 배양 상등액을 3일간 처리한 *H. pylori*의 urease 활성은 샘플을 처리하지 않은 것에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 또한 대조군으로 변형된 MRS를 첨가하여 *H. pylori*의 urease 활성에 MRS 성분이 영향을 줄 수 있는지에 대해 확인한 결과 변형된 MRS 성분이 *H. pylori*의 urease 활성 억제에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

항생제 감수성 조사

*H. pylori*의 치료에는 다양한 항생제들이 복합되어 사용되기에 젖산균이 항생물질 내성을 유발할 수 있는 plasmid와 transposon과 같은 항생물질 내성 유전 요소를 가지고 있어 기회감염성균으로 작용할 가능성에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다[2, 7]. 따라서 항생제 내성 양상을 명확하게 밝히기 위해 분리한 젖산균주에 대한 항생제 감수성 및 내성 시험을 진행한 결과는 Table 4와 같다. 대부분의 젖산균주는 aminoglycoside계 항생제인 K, S와 quinolone계 NA에 내성을 나타내었으며, β-lactam계 AM, cephalosporin계 CF, macrolide계 E, penicil계 C, tetracycline계 TE, 기타 계열인 RA, STX에는 감수성을 가지는 것으

로 관찰되었다.

따라서 가자미식해에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* spp., *Lactobacillus brevis* spp., *Leuconostoc mesenteroides* spp., *Weisella paramesenteroides* spp. 등의 LAB는 항생제 내성이 우수한 *H. pylori*에 대해 항균 효과를 활용한 천연 기능성 소재로서 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **61**, 1636-1643.
- Chon, J. W., Seo, K. H., Bae, D. R., Jeong, D. K. and Song, K. Y. 2020. Status and prospect of lactic acid bacteria with antibiotic resistance. *J. Dairy Sci. Biotechnol.* **38**, 70-88.
- CLSI. 2019. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute: Pennsylvania, US.
- EUCAST. 2020. *EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 10.0*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Växjö, Sweden.
- Jeon, I. J. 2006. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Bacillus polyfermenticus* n.sp. Master's thesis. *Inje University, Gimhae, Korea*.
- Kabir, S. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J. Med. Microbiol.* **50**, 1021-1029.
- Kang, C. H., Kim, Y. Y., Han, S. H., Jeong, Y. A. and Paek, N. S. 2017. Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria from Korean Intestine Origin. *KSBB J.* **32**, 153-159.

8. Kang, J. H. and Lee, M. S. 2014. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Pediococcus acidilactici* GMB7330 Isolated from infant feces. *Kor. J. Microbiol.* **41**, 152-156.
9. Kim, B. J. and Kim, J. G. 2015. *Epidemiology and pathophysiology* of helicobacter pylori infections in Korea. *Kor. J. Med.* **89**, 133-141.
10. Kim, J. W. 2016. The effects of probiotics on the treatment of *Helicobacter pylori* eradication. *Kor. J. Helicobacter Up. Gastrointest. Res.* **16**, 129.
11. Lee, K., Kim, B., Cho, Y., Song, Y., Song, J., Lee, K., Kang, H., Baik, S., Cho, M., Rhee, K., Seo, J., Youn, H. and Lee, W. 2011. Comparison of proteome components of *Helicobacter pylori* before and after mouse passage. *J. Bacteriol. Virol.* **41**, 267-278.
12. Lee, Y. and Chang, H. C. 2008. Isolation and characterization of Kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 106-114.
13. Lim, S. H., Kim, N., Kwon, J. W., Kim, S. E., Baik, G. H., Lee, J. Y., Park, K. S., Shin, J. E., Song, H. J., Myung, D. S., Choi, S. C., Kim, H. J., Yim, J. Y. and Kim, J. S. 2018. Trends in the seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and its putative eradication rate over 18 years in Korea: A cross-sectional nationwide multicenter study. *PLoS One* **13**, e0204762.
14. Lim, S. M., Kim, D. S. and Ahn, D. H. 2014. Anti-*Helicobacter pylori* activity of yogurt fermented with lactic acid bacteria from baikkimchi. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 334-344.
15. Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F. and Grayson, M. L. 1995. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 475-479.
16. Roh, S. and Shim, K. N. 2011. The effect of probiotics for *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Helicobacter Up. Gastrointest. Res.* **11**, 26.
17. Song, J. H. 2009. Current status and future strategies of antimicrobial resistance in Korea. *Kor. J. Med.* **77**, 143-151.
18. Yoo, H. L., Lee, Y. D., Han, B. K., Choi, H. J. and Park, J. H. 2013. Synergistic Inhibition of IgY, *Auricularia auricula*, and Lactic Acid Bacteria from Kimchi and Tarak on *Helicobacter pylori*. *Kor. J. Food Nutr.* **26**, 35-43.

초록 : 가자미식해에서 분리한 *Lactobacillus* spp.의 항헬리코박터 활성 평가

배은영¹ · 조기운¹ · 정성근^{1,2} · 조영제^{1,2} · 김병오^{1,2}

(¹경북대학교 식품공학부, ²경북대학교 특수식품연구소)

본 연구에서는 전통 가자미식해에서 분리한 LAB에 의한 *H. pylori* 억제효과를 살펴보았다. 가자미식해에서 분리한 40종의 LAB는 *L. plantarum*, *L. brevis*, *Lc. mesenteroides*, and *W. paramesenteroides* 등으로 확인되었다. 40종의 LAB중 liquid inhibition assay에 의해 *H. pylori* 억제효과가 있는 것으로 판단되는 10 종류의 젖산균을 선별하였다. 선별된 젖산균 배양액을 1%, 5%, and 10% 농도로 적용하였을 때 *H. pylori* 52, 51, e-53와 309에 대해서 생육 억제효과가 나타났다. LAB 배양 상등액의 pH를 7.0으로 조절하여 적용시켰을 LAB 10 종류 모두 5%와 10%의 농도에서 *H. pylori* 52와 LAB 7 종류의 10% 농도에서 *H. pylori* e-53에 대해 억제효과를 나타내었다. 그것은 또한 urease 활성을 억제시키는 영향도 나타내었다. 결과적으로 가자미식해에서 분리한 *L. plantarum* spp., *L. brevis* spp., *Lc. mesenteroides* spp., *W. paramesenteroides* spp. 등에 의해 *H. pylori*가 제균되거나 억제되는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.