

초산에 의한 마우스 위의 *Helicobacter pylori* 살균효과

김선영 · 권우제 · 강상모*

건국대학교 미생물공학과

The Antibiotic Effect of Acetic acid on *Helicobacter pylori*

Kim Sun-Young, Woo-Je Kwon, and Sang-Mo Kang*

Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Received August 16, 2010; Accepted October 28, 2010

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is the main causal bacteria occurring stomach diseases such as gastritis and gastric ulcer. These bacteria are found in most adults' stomach. Especially, 60~90% of *H. pylori* is found in Korean stomach. As a lot of curing methods have been applied to remove *H. pylori* and certain effects have been done but it's impossible to remove it perfectly with the existing medicines for curing. Therefore, it's very urgent to develop a certain substance showing more excellent effect than the existing medicines. In this study, it was found that organic acids can be accessed easily, inserted into mouth for curing and has excellent sterilizing effect among the substances showing excellent antibiotic power. Among them, acetic acid showed the most excellent effect. To confirm the refraining power against *H. pylori*, we performed tests through *in vitro* contact testing methods by concentration and tsta. In the result, *H. pylori* were terminated perfectly in the solution of acetic acid more than 0.3% within 1 minute. With a base of the result of *In vitro* test, It was performed *in vivo* test. As the results, *H. pylori*were terminated perfectly on 0.2% solution of acetic acid from the result of confirming through urease test, ELISA method and RT-PCR. Therefore, the result of this research will be very useful information in developing the functional foodstuffs using acetic acid in order to terminate *H. pylori* on the people's stomach, who suffers from *H. pylori*.

Key words: *H. pylori*, antibiotics, acetic acid

*Helicobacter pylori*는 그람음성 나선형(curved or spiral)의 세균으로, 1983년 위장 질환 환자의 위 점막을 덮고 있는 점액층에서 최초로 발견되었다[Warren과 Marshall, 1983].

*H. pylori*의 최적생장온도와 pH는 각각 30~37°C와 7.0~7.4이다[Goodwin과 Armstron, 1990], 산소 분압에 민감하여 미호기적 조건(최적 조건은 5% O₂ with 5~10% CO₂)에서는 3~5일 정도 배양하여야 작은 집락을 관찰할 수 있다. 대기 중에서는 6시간 이내에 모두 사멸하기 때문에 배양하기가 까다로울 뿐 아니라, 전통적인 세균학적 방법으로 연구가 어려운 세균이다[Robert, 1995]. *H. pylori*의 특징적 성상은 강력한 운동성과 urease생산능이다[Robert, 1995]. *H. pylori*는 3~7개의 편모를 가지고 있어 위점막의 점액층을 뚫고 들어갈 수도 있고 점액층 내에서도 자유롭게 다니면서 위점막 상피세포의 접합부에 부착하여 살아갈 수 있는 것으로 알려져 있다[Lee와 Hazell, 1993].

또한 urease는 위점막의 혈장 삼출액이나 조직액 내에 있는 요소를 분해하여 암모니아와 CO₂를 발생시켜 균체 주위를 알칼리성으로 만들어 위 내부의 강산을 중화하는 능력이 있다[Eaton 등, 1991; Ferrero 등, 1992].

이러한 기작으로 *H. pylori*는 만성위염, 위궤양, 십이지장궤양 및 위 MALT 림프종의 중요한 원인이며 위선암의 발생에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[Graham 등, 1992]. *H. pylori*는 위 점막 상피세포에 손상을 입히고 기본적인 대사산물의 공급을 위해 다양한 효소를 분비하는데 이는 균이 상피 조직에 colony를 형성하기 위해서이다. 효소 분비는 점막 장벽을 약하게 하고 알칼리화 환경을 만들어 정상적인 위에서 위염 및 위궤양으로 발전하게끔 유도한다. 효소와 편모 외에 균 자체의 특수 구조와 생성물, 자가면역 반응의 세포생성물 또한 상피세포 표면에 손상을 준다[Song 등, 2002].

이러한 각종 질병의 원인이 되는 *H. pylori*의 감염율은 지역에 따라 두 가지 양상을 보이는데 선진국에서는 어린 시기의 감염률은 낮으며 연령이 증가할수록 증가하여 60세가 되면 전체 인구의 50~60%에서 감염된 것으로 보고되고 있으며, 개발도상국에서는 출생 후 어린 시기부터 감염률이 급격히 증가하

*Corresponding author
Phone: +82-2-450-3524; Fax: +82-2-3437-8360
E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

여 20세가 되면 70~80%에 도달하여 이후 같은 수준을 유지하는 것으로 알려져 있다. 국내에서의 감염율의 보고를 보면 성인의 60~90%에서 감염을 보인다고 알려져 있다[Cho 등, 1998].

H. pylori 감염 후 인체에서는 선천(innate) 및 적응(adaptive) 면역반응이 격렬하게 진행되지만 인위적으로 제균을 시도하지 않는 한 대부분 평생 감염이 지속된다[Kim, 2005]. *H. pylori*의 제균을 위해 최근 국내에서 널리 사용되고 있는 요법은 clarithromycin, metronidazole, amoxicillin 혹은 tetracycline 중 2가지 항생제와 proton pump inhibitor, ranitidine bismuth citrate 혹은 bismuth salt 중 1가지를 병합하는 3제 요법이다[Kim, 2005]. 그러나 환자의 10~20%는 제균에 실패하는데, *H. pylori*의 항생제 내성은 제균 실패의 주요 원인이 되며 최근 국내에서는 clarithromycin과 amoxicillin에 대한 내성이 급격하게 증가하고 있다[Kim, 2005]. 현재 국내에서 사용되는 치료법은 1~2주 혹은 그 이상의 치료 기간이 필요하여 환자의 순응도가 저하되거나, 1차 제균의 실패에 따른 항생제 내성 균주의 등장, 재발 가능성의 내재 그리고 약 값이 증가하는 고비용 등의 문제가 있다.

이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근 백리향, 중국차 등의 다양한 한약재[Alain, 2001; Jung, 2001], 유산균이나 그 발효 추출물[Jin 등, 2002], 난황항체[Ho 등, 1991] 등의 천연물을 이용하여 *H. pylori*를 억제하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 이런 천연물들은 널리 알려지지 못하고, 구하여 섭취하기가 쉽지 않으며, 일부는 제품으로 판매되고 있으나 기대 이상의 효과가 나타나지 않고 있다. 이러한 이유로 가급적 섭취가 용이하고 안전하며 쉽게 구할 수 있는 식품 및 첨가물 중에서 항균효과가 있는 식품의 탐색이 필요하다.

본 연구에서는 이러한 보고와 현상을 기초로 하여 한국인이 주변에서 쉽게 접하고 식이할 수 있는 물질 100종류 중 *H. pylori*를 억제할 수 있는 것을 screening 하였는데 그 중 유기산들이 효과가 뛰어난 것을 알았다. 따라서 가장 살균력이 뛰어난 초산을 screening하고 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 살균효과를 확인하고, 결과를 토대로 초산을 이용한 기능성 식품 개발의 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 사용 배지. *H. pylori* 균주는 사용한 mouse에 따라 위 점막에 대한 적응 정도가 상당히 불규칙적이고, colonization 정도가 다양하여 mouse에 감염이 잘 되도록 적응시킨 표준균주를 사용하여야 한다. 따라서 이 실험에 사용한 균주는 위, 십이지장궤양 원인균인 *H. pylori*로서 감염이 용이한 표준균주인 ATCC 43504를 KCTC에서 구입하여 사용하였다[Sawai 등, 1999].

균주의 단기보존 및 CFU(colony forming unit) 측정, disc method를 위한 고체배지는 Columbia agar base(Oxoid, CM0331)와 tryptic soy agar(Difco, 236950)를 50:50으로 혼합, 살균한 후 45~50°C로 식힌 다음 fetal bovine serum(Gibco, 10091-148)을 5%(v/v) 첨가하여 사용하였다. 계대 배양 및 시료에 접종을 위한 액체 배지로는 Columbia agar base와 tryptic soy

agar를 50:50으로 혼합한 용액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 agar를 제거 한 후 살균하여 4°C에서 보관하면서 필요량에 따라 fetal bovine serum을 10%(v/v) 첨가하여 사용하였다. 동물 실험 후 *H. pylori*의 재 배양 및, 시료의 항균효과 확인을 위한 배지는 상기 배지에 vancomycin(10.0 mg/L), trimethoprim(5.0 mg/L), cefsulodin(5.0 mg/L), amphotericin B(5.0 mg/L)로 구성된 *Helicobacter pylori* selective supplement(Oxoid, SR0147)를 첨가하여 사용하였다.

***In vitro* 초산의 항균활성.** 유기산들의 항균활성 실험은 각 유기산들을 3%(W/V)의 농도로 준비하고 염산은 위액의 염산 농도와 동일한 0.5%(0.1 M)로 준비하였다. *In vitro*에서 초산 농도에 따른 항균 활성을 알아보기 위해, 초산 시료를 멸균수에 희석하여 농도가 다른 샘플을 조제하고 항균력의 차이를 시료 접촉법을 사용하여 확인하였다.

시료접촉법을 통한 항균활성은 준비된 각각 농도의 시료 900 μ L를 Eppendorf tube에 분주하고, 액체 배양한 *H. pylori*를 mL당 2.3×10^8 CFU 정도로 희석 한 후, 시료가 들어있는 Eppendorf tube에 100 μ L씩 접종하고, vortex mixer로 섞어준 후 일정 시간 동안 시료와 접촉하게 하였다. 일정 시간 후 시험 균액 100 μ L를 test tube에 미리 준비한 상기 고체배지 조성 과 동일하나 water bath에서 45°C로 식힌 종충배지 2 mL에 혼합하고 기층배지에 분주하여 고르게 편 후 37°C의 미호기성 조건에서 96시간 동안 배양하였다. 배양 후 plate에 발생된 투명하고 작은 전형적 형태의 *H. pylori* 집락의 수를 계측하였으며, 본 실험은 3회 반복 실험하였다.



***In vivo* 초산의 항균활성.** *In vivo* 초산의 항균활성 실험은 3회 반복 실험하였다.

실험동물. 실험동물은 Male BALB/c mice(5주령)를 (주)중앙 실험 동물에서 구입하여 균을 control은 12마리, 그 외는 15마리씩 6군으로 나누어 동물 실험에 이용하였으며 각 군에 대한 자세한 정보는 Table 1과 같다. 실험동물은 입식 후 1주간 안정성을 유지시켰으며, 각각의 무게를 측정해 평균 중량이 22 g이 되도록 하여 실험 처리군 별로 독립된 cage에서 사육하였으며, 음수와 사료는 자유식이하였다. 사육조건은 온도 25±2°C, 습도는 50±10%의 상태를 유지시켜 주었다. 그 중에 대조군을 제외한 나머지 군에 *H. pylori*를 경구투여하고 접종하고, 1주 후 무작위로 각 군마다 3마리씩 희생시켜 위 절편의 감염여부를 urease test를 통해 확인하였다[Urrestarazu 등, 1989].

***H. pylori*의 감염 및 확인.** *H. pylori* 감염은 접종 전 9시간 동안 절식시킨 후 48시간 액체 배양한 *H. pylori*를 개체 당 10^9 CFU의 균체를 경구투여하였고, 감염 1주 후 위를 채취하여 감염확인을 하였다. 감염이 확인된 군은 준비된 시료를 1일 0.1 mL씩 각 군에 해당하는 처리 농도에 준하여 음식물이 위에 머물러있게끔 사료 급식 후 3시간 이내인 오전 9시에 정해진 횟수만큼 경구투여하였다. 1일 3회 투여하는 군은 오전 9시부터 6시간 간격으로 3회 초산 시료를 투여하였다.

H. pylori 감염 확인은 감염시키고 1주 후 mouse를 24시간 동안 절식시킨 후, 각 군당 3마리씩 경추 탈골하여 희생시켰다. 위의 유문부 상단과 분문부 하단을 잘라서 PBS(phosphate buffered saline; pH 7.4)로 1회 세척 후 유문부를 세척하여

Table 1. The results of urease kit test and information of groups of the animal test

	Control	Non-acetic acid	Acetic acid group			
			0.1%	0.2%	0.3%	0.3%*
Number of mice	12	15	15	15	15	15
<i>H. pylori</i> infection	-	+	+	+	+	+
Feeding times/a day	-	-	1	1	1	3
Urease kit test color						
 - Before feeding	-	+	+	+	+	+
 + After feeding (3week)	-	+	+	-	-	-

0.3%*, the group was fed 0.3% acetic acid by 3 times every 6 hours per a day.

urease test kit(아산제약주식회사)를 이용하여 반응을 확인하였다. 2~24시간 후 육안적으로 색의 변화를 관찰하였고, kit의 조직 접합 부위의 색깔이 노란색에서 보라색으로 변화된 것을 양성으로 판정하였다. 3마리 중 1마리 이상이 음성으로 판정되었을 경우 해당 군에 대해 위와 같은 방법으로 한 번 더 *H. pylori*를 감염시키고, 동일 방법으로 감염여부를 확인한 후 초산 시료를 급여하였다.

H. pylori 살균 효과 확인. *H. pylori* 재 배양 및 균체 수 계측을 위해 초산 시료 급여 후 3주, 6주 후에 상기와 같은 방법으로 각 군당 3수씩 위 조직을 채취, 세척한 후 각각의 위를 polypropylene test tube에 넣고 무게를 측정하고, *H. pylori* 배양 및 균주 보관 시 사용한 배지와 동일성분의 액체배지를 동량 넣은 후, homogenizer를 이용하여 현탁액을 만들었다. 조제된 현탁액을 다단계로 희석하고, 잡균의 오염을 막기 위해 항생물질 함유 *Helicobacter pylori* selective supplement(Oxoid, SR0147)를 첨가한 agar 배지에 접종, 배양하여 *H. pylori*의 집락수를 계측하여 초산 시료의 항균 효과를 비교하였다. 또한 배양된 *H. pylori*는 상기와 같은 방법으로 Gram staining, urease test, catalase test, oxidase test를 통한 확인과정을 거쳐 경구투여를 위해 배양한 본래의 *H. pylori*와 동일 균임을 확인하였다 [Harper 등, 2003]. 상기의 urease test kit로 발색 반응을 확인하고, 추가적으로 urease 반응을 흡광도의 변화로 알아보기 위해 urease test broth(20 g urea, 9.5 g potassium phosphate dibasic, 9.1 g potassium phosphate monobasic, 1 g Bactoagar, 0.1 g Bacto yeast extract, 0.01 g Bactophenol red, pH 6.8, total volume 1 L)를 조성, 충분히 반응이 일어나도록 10~30분 정도 반응시킨 뒤 효소면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)으로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다 [Stefano 등, 1996].

RT-PCR은 위 내에 *H. pylori*가 존재하는지 알아보기 위해 실시하였다. 이 과정은 *H. pylori* 특이적 유전자인 *cag C* gene을 PCR로 확인하였고, genomic DNA 추출에는 상용화되어 있는 i-genomic CTB DNA extraction mini kit(iNtRON Co., Korea)를, polymerase는 i-Starnax II DNA polymerase (iNtRON Co., Korea)를 사용하였으며, primer는 *cag3c-R*, *cag5c-F*(Bionics, Korea)를 사용하였다. 분리균으로부터 DNA 추출 시, 액체 질소에 냉동 보관되어 있던 *H. pylori* 균주를 녹여 배지에 접종하여 배양하고, 6,000xg에서 10분간 원심분리하여

침전시키고 PBS로 세척한 뒤, 세척한 균액을 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 i-genomic CTB DNA extraction mini kit(intron Co., Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Mouse의 조직으로부터 DNA를 추출 시, 균별로 위를 취하여 PBS에 세척한 뒤, 추출이 용이하도록 조직을 얇게 자르고 homogenizer로 갈아 주었다. 갈아진 샘플을 1.5 mL Eppendorf-tube에 옮겨 담고 분리균과 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA를 *cag C* primer인 *cag3c-R*와 *cag5c-F*를 사용하여, DNA를 증폭시켜 real time PCR을 시행하였다. 사용한 primer의 염기 서열은 *cag3c-R*, GGG TTG TAT GAT ATT TTC CAT AA; *cag5c-F*, GTT GAT AAC GCT GTC GCT TC이다(30). PCR 후, 전기 영동하여 *cag C* 유전자의 존재여부를 확인할 수 있고 이를 통해 위 조직의 *H. pylori* 여부를 알 수 있었다.

결과 및 고찰

유기산의 항균 활성. 유기산은 식품의 원료에 천연적으로 혹은 발효 산물로 존재하거나 인공적으로 첨가하는 경우가 있는데 항진균성과 항균성을 갖고 있다고 알려져 있으며 [Beuchat와 Golden, 1989], 항균 기작은 비해리된 분자가 이온화되면서 세포 내 pH를 변화시키거나 세포막의 투과성을 변화시켜 기질의 이동을 방해하고 NADH 산화를 막아 전자전달체계에 이상을 준다고 알려져 있다 [Freese와 Gallier, 1973].

H. pylori 억제능을 나타내는 물질로써, 계란황체, 생마늘, 한약재, 녹차 등이 다양한 연구를 통하여 많이 알려졌다 [Roe 등, 2002; Park 등, 2006]. 하지만 이전의 연구에서 녹차 [Matsubara 등, 2003] 외에는 주변에서 쉽게 응용할 수 있는 것이 많지 않고, 녹차는 음용이 쉽고 효과도 뛰어나 다량의 카페인에 의해 카페인 중독, 심박수 상승, 부정맥 등의 부작용이 있다. 또한 녹차 내의 폴리페놀에 의해 단백질의 침전이 일어나 단백질 소화의 어려움이 생길 수 있으며, 위장 질환을 가진 사람이 공복에 마시는 것은 적합하지 않다. 그래서 우리가 매일 먹고 마시는 식품이나 음료수의 원료나 첨가물 중 *H. pylori* 억제능을 갖는 물질이 있는지 탐색해 본 결과는 약 100종류의 물질 중 유기산들이 효과가 좋은 것으로 나타났으며 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1은 식품공전에 기재되어있는 물질 중 일부 산들과 위액의 주성분인 염산을 이용하여 *H. pylori*에 대한 항균 효과를

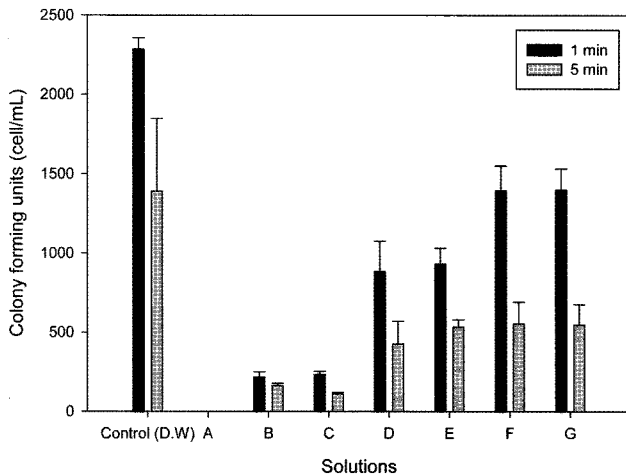


Fig. 1. Inhibition of *H. pylori* by various solution. Alphabets: A, acetic acids; B, hydrochloric acid(HCl); C, lactic acid; D, tartaric acid; E, malic acid; F, citric acid; G, succinic acid.

접촉시험법으로 알아본 것이다. 대조군으로 멸균수를 사용하고, 각 시료는 함량이 동일하게 3%(w/v)(염산의 경우 0.5%)로 만들었으며, 각각의 시료에 2.3×10^3 CFU의 *H. pylori*를 접종하고 1분과 5분 처리 후 agar plate에 접종하여 배양한 후 CFU를 확인하였다. 실험 결과 초산용액을 처리한 균액에서 *H. pylori*가 전혀 나타나지 않아서, 항균활성이 가장 높은 것을 알 수 있었다. 다음으로 염산과 젓산이 유사하게 1분 처리 시 200 CFU 정도이며, 5분 처리 시 150 CFU, 100 CFU 정도였다. 그 외 주석산, 사과산, 구연산은 1000 CFU 정도 이상이고 5분 처리 시 500 CFU 정도 이상이었다.

그리고 시료 접촉법으로 *H. pylori* 살균에 초산의 적합한 농도와 시간을 알아보았다. *H. pylori*를 2.3×10^3 CFU로 희석하여 각 농도의 초산용액에 접종하였다. 초산과 접촉시간을 1분에서 30분까지로 하여 *H. pylori*에 대한 초산의 항균활성을 보아 Fig. 2에 나타내었다. 실험 결과 초산용액은 고농도일수록 *H. pylori*에 대한 항균 활성이 높았는데, 0.3%(w/v)에서는 1분 만에 100% 항균력을 나타내었고 0.2%(w/v)에서는 5분 만에 모두 살균되었다. 그리고 초산을 첨가하지 않은 상태에서도 10분 만에 10% 정도만 생존하여 90%가 산소 등 맞지 않은 환경 때문에 사멸되며 10%는 실험한 30분까지 그 농도로 유지되는 것으로 나타났다. 이 실험을 3회 반복하였으나 Fig. 2와 항상 같은 결과를 보였다.

수소이온 투과도는 세포질막 자체의 물리적 성질, 그와 연관되는 지방산 조성의 변화 및 H^+ -ATPase를 비롯한 세포질막에 발현되는 다양한 효소의 양과 활성 등의 통합적인 것으로[Kim 등, 1998], 세포내부로 유입되는 수소이온이 효과적으로 방출될 때 알짜 수소이온 투과도가 낮아지며, 알짜 수소이온 투과도가 적을수록 내산성이다. 보통 젓산균은 알짜 수소이온 투과도가 낮아 내산성균이다. Fig. 1에서 0.5% 농도의 염산용액에서 *H. pylori*는 1분 처리 시 200 CFU 정도, 5분 처리 시 150 CFU 정도로 나타나 초산 다음으로 염산에 균이 많이 살균되었다. 이것은 염산의 pKa 값이 -0.8이므로 물속에서 대부분 해리되어 H^+ 상태로 존재하므로 *H. pylori* 세포 내에 H^+ 이 들어갈 수 있

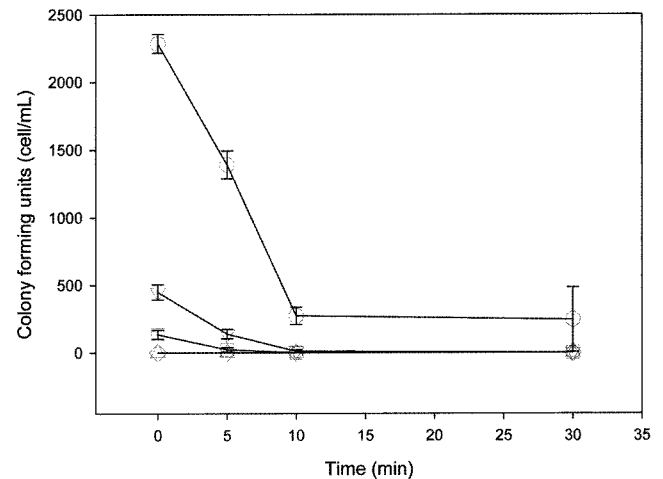


Fig. 2. Inhibition of *H. pylori* by acetic acid solution on various concentration. Symbols: ○, 0% acetic acid; ▽, 0.1% acetic acid; □, 0.2% acetic acid; △, 0.3% acetic acid; ◇, 0.5% acetic acid. *0 min: bacterial suspension was inoculated on media immediately after contact with each concentration of acetic acid sample.

고 내산성균이 아닌 *H. pylori*의 세포질을 중성으로 유지하는 힘이 약하여 쉽게 산성으로 변하고 단백질들이 변성되거나 혹은 세포막의 주변 pH가 낮아져 막의 변성이 일어나 균이 사멸된 것으로 생각되었다.

그리고 유기산들이 높은 항균활성을 나타내는 것은 유기산이 약산이므로 산의 해리도가 염산보다 낮아 미생물 세포질 내로 해리되지 않은 상태로 침투할 수 있고 중성인 세포질 내에서 해리될 수 있기 때문이다. 세포 내부로 수소 이온이 유입이 늘어나게 되면 미생물은 H^+ -ATPase를 이용하여 수소 이온을 세포 밖으로 배출하는데, 균의 내산성이 높다는 것은 H^+ -ATPase 활성이 높아 수소 이온을 효과적으로 방출한다는 것을 뜻한다 [Goo 등, 2008]. *H. pylori*는 내산성균이 아니므로 H^+ -ATPase 활성이 낮고 미해리형 분자 상태의 유기산은 소수성의 세포막과 친화력이 높아 수소이온보다 세포내 유입이 용이하다. 유기산이 일단 세포내로 유입이 되면 해리하여 생성되는 수소 이온을 H^+ -ATPase 활성이 낮은 *H. pylori*가 세포 밖으로 방출하는 데는 역부족이기 때문에 세포질 내 pH가 떨어져 사멸되는 것으로 생각된다. 따라서 동일 농도에서 미해리 상태의 유기산이 세포 내로 많이 들어갈 수 있기 때문에 미생물 사멸에 대한 효과가 높다고 볼 수 있다. Fig. 2에서 초산의 pKa 값이 4.76, 젓산이 3.85, 주석산이 3.2, 염산이 -8.0으로 초산이 가장 pKa 값이 높아 해리도가 가장 낮다고 볼 수 있다. 또한 분자량도 초산이 60.05로 염산 36.46을 제외하고는 가장 작은 분자이다. 따라서 해리도와 분자량을 함께 고려 시 초산이 미생물벽 투과도가 가장 높다고 볼 수 있다. 또한 염산의 H^+ 이온보다 미해리형 초산이 세포벽 투과력이 높은 것이 알려져 있다. 그리고 분자구조에 있어서도 초산은 미생물 세포벽의 비극성 부분과의 친화도가 높은 $-CH_3$ 의 비극성기를 가지고 있어 미생물 세포벽 투과에 있어 유리한 측면이 있다. 이와 같은 이유들로 볼 때 일반적으로 유기산 중 초산이 가장 미생물 내로 투과력이 높아 *H. pylori*에 대해서도 높은 살균력을 나타낸 것으로 생각되었

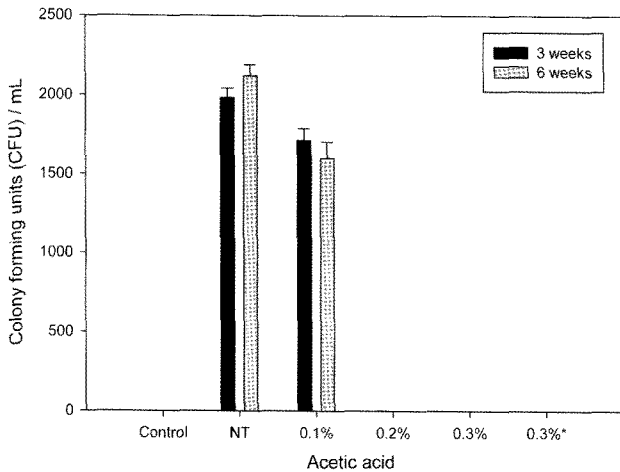


Fig. 3. Colony forming units of *H. pylori* by feeding acetic acid. Horizontal axis: Control, no infection; NT, no treatment; 0.1%, 0.1%(w/v) acetic acid one time/a day; 0.2%, 0.2%(w/v) acetic acid one time/a day; 0.3%, 0.3%(w/v) acetic acid one time/ a day; 0.3%*, 0.3%(w/v) acetic acid tree times/a day.

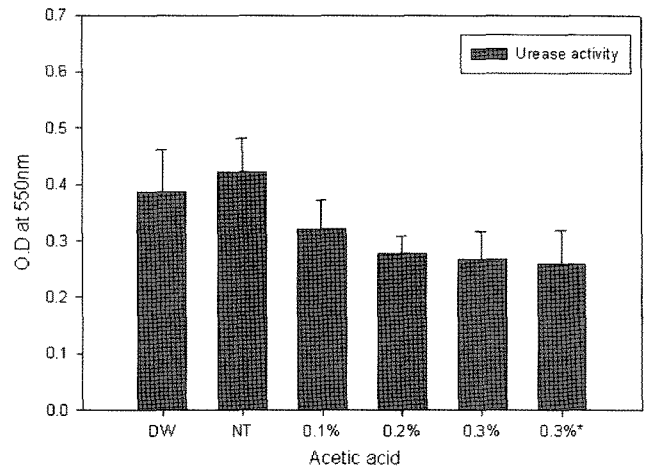


Fig. 4. The results of urease test by ELISA at 550 nm (3 weeks). Horizontal axis: DW, control by no infection of *H. pylori*; NT, no treatment; 0.1%, 0.1%(w/v) acetic acid one time/a day; 0.2%, 0.2%(w/v) acetic acid one time/a day; 0.3%, 0.3%(w/v) acetic acid one time/a day; 0.3%*, 0.3%(w/v) acetic acid tree times/a day.

다. 그리고 Fig. 3와 4에서 초산 농도 0.3%이면 pH가 약 2.6 인데 이 농도에서는 다량의 미해리형 초산 분자가 *H. pylori*에 침투하여 세포질에서 해리형 초산이 많아지므로 세포질의 산성도가 높아져 세포질의 단백질 등이 쉽게 변성되어 균이 사멸된 것으로 생각되었다.

In vivo 초산의 항균활성. *H. pylori*는 동물의 위장에서 생식하며 병원성을 나타내기 때문에 항균 물질 개발에 앞서 동물모델의 확립은 매우 중요한 문제이다. *H. pylori* 감염에 의한 동물 모델의 필요성이 증대되고 있던 차에 1997년에 Lee 등 [1997]은 *H. pylori*를 감염환자로부터 성공적으로 분리배양하였으며, 이 균은 C57BL/6[Goo 등, 2008]나 BALB/c[Yang 등, 2008] 등의 마우스에서 높은 colonization을 보였다고 밝힌 바 있다. *H. pylori* 균주는 사용한 mouse에 따라 위 점막에 대한 적응 정도가 상당히 불규칙적이고, colonization 정도가 다양하여 mouse에 감염이 잘 되도록 적응시킨 표준균주를 사용하여야 하고, mouse 역시 *H. pylori*에 대하여 감수성이 높은 mouse를 사용하여야 한다. 흔히 *H. pylori* 실험에 있어서 균주는 Sydney strain 1(SS1) 균주나 이 실험에서 사용한 ATCC 43504 균주를 많이 사용하며, mouse 역시 C57BL/6를 사용한 예가 많았으며, 이 실험에서도 역시 그 중 하나인 Male BALB/c mouse를 사용하였다.

Table 1과 같이 6 종류의 균으로 마우스를 나누고 대조군을 제외한 나머지 군에 *H. pylori*를 개체 당 10^9 CFU의 균체를 경구투여 하였고, 감염 1주 후 무작위로 각 군마다 3마리씩 희생시켜 위 절편의 감염여부를 확인한 결과 모두 urease test 양성으로 판정되었으며, *H. pylori*를 접종하지 않은 대조군의 3마리는 모두 음성으로 판정되었다.

*H. pylori*를 감염시킨 실험군 5종류와 대조군의 mouse를 식이 3주간과 6주간 사육 시 4군은 Table 1과 같이 0.1%에서 0.3% 초산을 매일 0.1 mL씩 1회에서 3회 투여하였다. 초산 식이 후 *H. pylori*의 사멸 정도를 확인하기 위해 쥐의 위를 적출하였는데, 육안적으로 위 표면에서 염증을 비롯한 외관상의 문

제는 없는 것을 확인하였다. 각 군마다 하나씩 무작위로 위 조직의 일부를 떼어 횡단, 종단으로 얇게 잘라 현미경으로 관찰해 보아도 마찬가지였다. 그 후 각 군당 각각 3마리씩 위를 중측으로 3등분 하여 3조각의 절편으로 나누고 그 중 하나씩의 절편을 homogenize 하여 배양 배지에 직접 배양하는 재배양 실험법으로 확인한 결과, 0.2%(w/v) 이상의 초산농도에서 완전한 *H. pylori* 생육 억제능을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 3).

Fig. 1, 2의 *in vitro* 초산 처리 실험에서는 0.3%(w/v) 이상의 초산농도에서 1분 이내 균이 사멸되었는데, Fig. 3의 *in vivo* 실험의 0.2% 초산 농도에서 항균력을 나타냈다. 이는 *in vitro*와 단정적으로 비교하기는 어려우나 위산과 초산의 상승작용으로 *in vivo*에서도 낮은 초산농도에서 항균력이 나타나는 것으로 보였다. 그리고 이러한 위를 절제하여 *H. pylori* 생균을 확인하기 위한 검사방법으로 재배양하는 실험법은 질병이 있는 사람을 양성으로 검출하는 비율인 민감도(sensitivity)가 77-95%이며, 건강한 사람을 음성으로 검출하는 비율인 특이도(specificity)는 100%로 민감도가 약간 떨어지는 경향이 있다[Peng 등, 2009]. 따라서 *H. pylori* 존재 여부를 좀 더 알아보기 위하여 재배양 확인 실험과 마찬가지로 채취한 위 절편 중 하나씩의 조직을 가지고 urease test kit로 test하였다. Urease test는 배양법에 비해 *H. pylori*의 생존여부를 비교적 간단히 실험할 수 있는 방법이다. 그 결과 감염군 중 초산 비처리군과 0.1%(w/v) 초산 처리군에서만 색의 변화가 Table 1의 positive와 같이 뚜렷한 보라색으로 관찰되었고 0.2%(w/v) 초산농도이상 처리군은 Table 1의 negative와 같이 주황색으로 관찰되어 *H. pylori*가 사멸된 것으로 보였다. 따라서 감염군 중 초산 비처리군과 0.1%(w/v) 초산 처리군은 *H. pylori* 양성으로 판정하였고 0.2% 이상의 초산농도에서는 음성으로 판정하였다.

이어서, 다른 하나씩의 절편을 가지고 urease test broth를 이용하여 ELISA로 흡광도를 측정한 결과, 감염만 된 비처리군에 비해 초산을 처리한 군에서 흡광도가 눈에 띄게 낮았고 0.2%(w/v) 이상의 농도에서는 OD=0.27 정도로 모두 유사한 낮

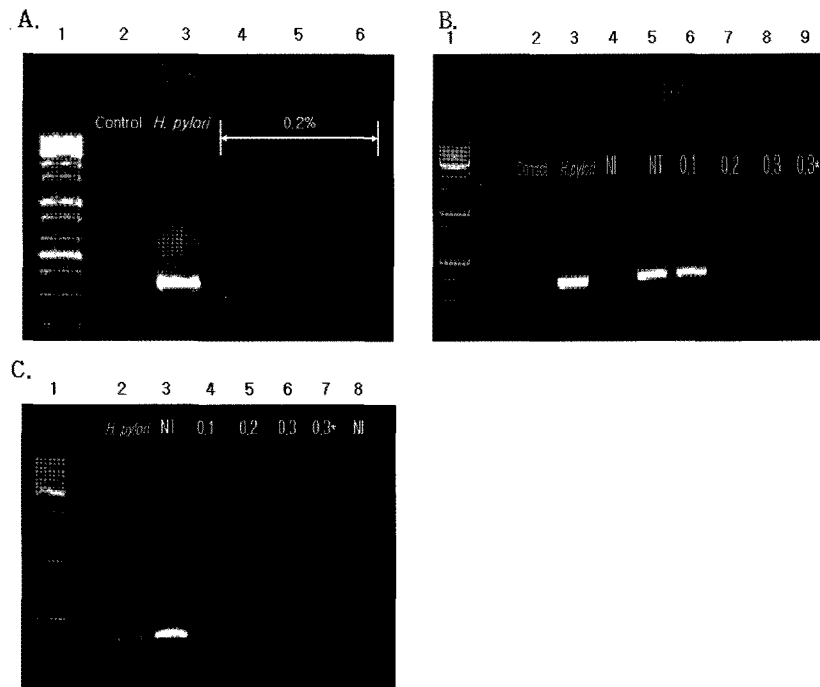


Fig. 5. The results of real time PCR (3 weeks). Standard strain used *H. pylori* ATCC 43504. Lanes of A: 1, standard mark; 2, Control; 3, RT-PCR of *cag C* gene in *H. pylori*; 4-6, 0.2%(w/v) acetic acid one time/a day. Lanes of B: 1, standard mark; 2, Control; 3, RT-PCR of *cag C* gene in *H. pylori*; 4, (NI) no infection of *H. pylori*; 5, (NT) no treatment; 6, (0.1) 0.1%(w/v) acetic acid one time/a day; 7, (0.2) 0.2%(w/v) acetic acid one time/a day; 8, (0.3) 0.3%(w/v) acetic acid one time/a day; 9, (0.3*) 0.3%(w/v) acetic acid three time/a day Lanes of C: 1, standard mark; 2, RT-PCR of *cag C* gene in *H. pylori*; 3, (NT) no treatment; 4, (0.1) 0.1%(w/v) acetic acid one time/a day; 5, (0.2) 0.2%(w/v) acetic acid one time/a day; 6, (0.3) 0.3%(w/v) acetic acid one time/a day; 7, (0.3%*) 0.3%(w/v) acetic acid three times/a day; 8, (NI) no infection of *H. pylori*.

은 수치를 나타내었다(Fig. 4). OD=0.27은 *H. pylori* 음성으로 판정하는 기준이다. 그리고 각 농도의 초산 식이 6주간 후의 *H. pylori*의 항균력 실험은 재배양 실험, urease test, ELISA법에서 모두 3주간과 동일하게 0.2%(w/v) 초산농도부터 *H. pylori* 이 negative로 나타났다.

H. pylori 생균을 확인하기 위한 검사방법으로 urease test 법은 민감도가 89-98%이며 특이도는 90-100%이다. ELISA법도 urease test법과 같은 정도의 민감도와 특이도를 나타낸다[Peng 등, 2009].

이들 *H. pylori* 생균을 확인하기 위한 검사방법으로 재배양 실험법, urease test법, ELISA법의 결과를 종합하면 *H. pylori* 생균의 존재를 거의 판정할 수 있다고 생각된다. 그러나 타 균에 의한 urease test 양성반응 가능성도 있으므로 이들 *H. pylori* 생균의 존재 유무를 좀 더 확실하게 알기 위하여 초산 식이 3주 후, 같은 방법으로 마우스의 위를 취하여 이를 RT-PCR 법으로 검사하였다[Ho 등, 1991; Andery 등, 1995]. 결과는 Fig. 5에 있다. Fig. 5에 의하면 초산용액 0.1-2%(w/v)의 농도까지 식이한 군(Fig. 5 B lane 6 and lane 7, C lane 4 and lane 5)은 초산용액을 식이하지 않은 대조군(Fig. 5 B lane 5, C lane 3)의 위치에 같은 밴드로 *H. pylori*의 유전자가 검출되고 0.3% 초산용액에서는 검출되지 않았다(Fig. 5 B lane 8 and lane 9, C lane 6 and lane 7).

Fig. 5에서 보면 0.2% 초산용액에서 *H. pylori*의 유전자가 검출되었으나(Fig. 5 B lane 7) Fig. 3-4의 재배양 실험법과 urease test는 음성반응을 나타내어 서로 상이한 결과를 보였다.

이러한 결과를 얻어 *in vivo* 실험을 전체적으로 3회 반복 실험하였다. 그 결과 Fig. 5 A의 lane 4-6과 같이 0.2% 초산용액에서는 *H. pylori*의 유전자가 검출 안 되기도 하였으며, Fig. 5 B의 lane 7처럼 유전자가 미약하게 검출되기도 하였다. 이 실험을 총 3회 반복한 결과 검출빈도는 약 30%로 나타났다. Fig. 5 B의 lane 7은 0.2% 초산용액 처리군 중 *H. pylori*의 유전자가 검출된 샘플만 모아 다른 군과 비교한 것으로, 그 농도의 차이가 분명하게 나타났다. 또한 0.2% 초산용액 처리군의 유전자를 3배 농축시킨 경우(Fig. 5 C lane 5), 0.1% 초산용액 처리군(Fig. 5 C lane 4)과 비슷한 농도로 검출되었다.

재배양법과 urease test 결과 0.2(w/v)농도에서 음성반응을 보였으나 RT-PCR에서는 0.2(w/v)농도에서 30%비율로 유전자가 검출되어 서로 상이한 결과를 보였다. 이것은 생균을 측정하는 재배양법과 urease test법에서 음성을 나타냈기 때문에 0.2% 초산용액 식이에서는 *H. pylori*가 사멸되었을 것이라 추측된다. 그리고 위 벽에 *H. pylori*의 잔해가 남아 사균까지도 측정되는 RT-PCR법에서는 사균이 검출이 된 것이라고 생각된다. 즉, RT-PCR에서 *H. pylori*가 30%정도 검출되는 0.2% 초산용액은 *H. pylori*가 초산에 의해 마우스 위속에서 죽을 수도 있고 초산에 견딜 수도 있을 정도의 농도로 생각할 수 있으나 재배양 실험법과 urease test 법에서 활성이 없는 것으로 보아 결국은 0.2% 초산용액에서 사멸되는 것으로 보인다. 따라서 *in vitro*에서는 초산 0.3%(w/v)에서 1분 이내 균이 사멸되는 항균활성을 나타낸다면 *in vivo*에서는 0.2%의 초산용액이 *H. pylori*에 대해 살균효과를 나타내기 시작하는 변곡점으로써 *H. pylori* 사멸에

유효한 농도라고 볼 수 있다. 즉, *H. pylori*를 살균시킬 수 있는 초산의 최저 농도는 0.2%로 생각된다. 그리고 *in vivo*에서 0.2%의 초산용액이 *H. pylori*에 대해 살균효과를 나타내는 것은 마우스 위의 위산과의 상승작용 때문일 가능성도 높다.

BALB/c mouse는 식이량이 1일에 약 10 g이며 사람은 이의 약 350배인 3500 g을 식이한다. 상대적인 식이량의 비율을 위의 크기로 간주하였을 때, 마우스에게 매일 0.2~0.3%의 초산을 사료 식이 후 3시간지나 0.1 mL씩 급이하였고, 이를 2~3% 농도의 시중에 판매되는 식초로 환산했을 때 0.01 mL씩 급이한 꼴이 된다. 그리고 이의 350배인 3.5 mL 초산을 사람에게 투여하면 *H. pylori* 제균이 가능하다는 계산이 된다. 환산하면 사람에게는 2~3%의 식초 1 mL 정도의 양으로도 효과를 나타낼 수 있다고 볼 수 있고 마시기 부담이 된다면 희석하여 마실 수도 있다. 그러면 이론적으로 사람에게 감염된 *H. pylori*를 제거할 수 있다는 셈이다. 그러나 이것을 사람에게 그대로 적용하는 데에는 한계가 있다.

우리는 초산이 *H. pylori*에 대한 살균효과를 나타냄을 *in vitro*, *in vivo* 상에서 확인하였고, 이 결과는 *H. pylori* 감염환자가 초산을 마시게 되면 *H. pylori*가 살균될 가능성이 있다. 그리고 *in vitro*에서는 초산 0.3%(w/v)에서 1분 이내 균이 사멸되는데 *in vivo*에서는 0.2%의 초산용액이 *H. pylori*를 사멸시켰다. 따라서 이 농도에서 균이 죽기 시작하는 것으로 보이며 이러한 비교적 낮은 농도는 위산의 상승작용에 의한 것일 가능성이 있다.

정상적인 사람이 *H. pylori*에 감염되면 상반된 두 가지 발병 양상을 보이는데, *H. pylori*에 의해 가스트린 호르몬이 과다하게 분비되어 위산과다로 소화성 궤양을 일으키는 것이 그 하나이다[Jung 등, 2006]. 이러한 경우, *H. pylori* 감염을 치료하지 않으면 소화성 궤양이 자주 재발하기 때문에 궤양의 치료에 앞서 *H. pylori*의 박멸이 필수적이다. 초산은 *H. pylori* 살균효과가 있으므로 초산의 이용은 소화성 궤양의 치료에 유용할 것이라 생각된다. 또 다른 발병 양상은 *H. pylori*가 만성 염증을 일으켜 위를 위축시킴으로써 산의 생산을 억제하고 위암의 위험성을 증가시키는 위축성 염증을 일으키는 것이다. 위축성 위장 질환을 겪는 환자의 경우 위산이 부족하여 *H. pylori* 및 다른 세균에 감염되기 쉽고 이미 균에 감염된 사람은 *H. pylori*에 의해 그 증상이 악화되어 암으로 발전할 가능성이 높다[Kuipers 등, 1996]. 또한 위산이 부족하기 때문에 위 내에 *H. pylori* 외에도 다른 균이 서식할 수 있게 된다. 현재 저위산증에 의한 위축성 위염의 처방법 및 치료제는 개발되지 않은 상태이나 초산이 *H. pylori* 및 다른 유해균에 대해서도 살균효과를 보이므로 위축성 위염의 치료 및 염증 완화에 유용할 것이라 생각된다. 또한 초산은 위축성 위염에 있어 부족한 위산의 역할을 보충하는 보충제로써의 역할을 할 수 있기 때문에 유용하다. 기존의 항생물질 투여는 균 자체에 영향을 주어 내성 문제와 제균 후 재감염 등의 문제가 있었으나, 적정량의 식초는 독성 문제가 없고 인체에 유익한 측면이 있다. 그리고 식초는 장복하여도 항생물질처럼 산에 대하여 내성을 갖는 변이균이 발생하지는 않으므로 *H. pylori*를 치료하기도 쉬울 것으로 생각된다.

근래에는 식후에 식초를 마시는 사람들이 많으며 이로 인해

H. pylori 감염을 어느 정도 예방할 수는 있다고 본다. 따라서 사람을 대상으로 *H. pylori* 제거를 위한 적정량의 초산량이 구해진다면 그리고 그 양을 일정기간 음용한다면 적어도 이 세상 사람들의 절반이상이 감염[Cho 등, 1998]되어 있는 *H. pylori*를 퇴치하는데 매우 유용할 것이다. 또한 이 연구 결과가 초산을 이용한 기능성 식품 개발에 유용한 자료로써 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

초 록

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 위 감염증의 주된 원인균으로, 위염 및 위궤양을 일으키는 균으로 알려져 있다. 대부분의 성인 남녀의 위에서 발견이 되며, 특히 한국 성인의 위에서 60~90% 정도 발견된다. *H. pylori*를 제균하기 위해 많은 치료 방법들이 시도되었고 어느 정도의 제균 활성은 있었으나, 완벽한 제균은 기존의 치료 약물로는 어렵다. 따라서 기존의 약물보다 더 효과가 좋은 물질의 개발이 시급한 상황이다. 본 연구에서는 항균 능력이 뛰어난 물질 중, 쉽게 접할 수 있고 경구투여로 치료가 용이하여 약제나 식품으로 응용할 수 있는 물질들 중 유기산들이 살균능력이 뛰어난 것을 알았다. 그 중 초산이 가장 뛰어난 살균효과를 보였다. 초산의 *H. pylori*에 대한 억제능력을 확인하기 위해 농도별, 시간별로 *in vitro* 접촉실험으로 실험을 시행하였다. 그 결과 0.3% 이상의 초산 용액에서는 *H. pylori*가 1분 이내에 100% 사멸되었다. *In vitro* 실험 결과를 토대로 BALB/c mouse를 이용한 *in vivo* 실험을 하였다. *H. pylori*를 경구투여로 위에 접종하였다. 다음 감염된 것을 확인하고 초산용액을 각 군에 해당하는 농도에 준하여 0.1 mL를 1일 1회 혹은 3회 경구투여하였다. 초산에 의한 *H. pylori*의 사멸 정도를 재배양 실험법, urease test 및 ELISA법으로 확인한 결과 초산용액 0.2% 식이에서 모두 사멸되었다. RT-PCR법으로 검정한 결과는 초산용액 0.2%에서 밴드가 나타났지만 이는 사멸된 균의 것으로 보이며, 0.3%에서 존재하지 않는 것으로 나타났다. RT-PCR법에서 0.2% 초산용액 식이에서는 *H. pylori*가 확인되는 것은 *H. pylori*의 사균이 위벽에 붙어 있다가 RT-PCR법으로 확인되는 것으로 보였다. 따라서 이 연구 결과가 세상 사람들의 절반이상이 감염되어 있는 *H. pylori*를 퇴치하는데 매우 유용한 자료가 될 것이다. 또한 초산을 이용한 기능성 식품 개발에도 중요한 자료로써 활용될 것으로 생각된다.

Key words: *H. pylori*, 항생물질, 초산

감사의 글

이 논문은 2008학년도 건국대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

This work was supported by the Konkuk University.

참고문헌

Alain LS (2001) Antagonistic activity against *Helicobacter pylori*

- infection by the lactic acid bacteria. *J Korean Public Health Assoc* **27**(1), 5-12.
- Andery PL, Edmond G, Alan F, Alain B, Jean-Paul B, Alex B, and Youri G (1995) Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of *cagA* Gene in Gastric Biopsy Specimens. *J Clin Microbiol* **33**(10), 2752-2756.
- Beuchat LR and Golden DA (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol* **43**: 134-142.
- Cho YI, Park HS, Song KH, In HH, Yoon SW, Kim YRi, Lee JD, Jin CJ and Yoon SA (1998) Histopathological Features of *H. pylori*-induced Gastritis and Improvement of Gastritis after Eradication of *H. pylori*. *Kor J Med* **54**, 158-167.
- Chung SH, Kim HJ, Ryu YS, Noh JH and Lee NH (2006) Effects of Anti-*Helicobacter pylori* IgY Powder to Protect Mice from *Helicobacter pylori*. *Kor J Food Sci Technol* **38**(1), 93-98.
- Ding SZ, Jia BQ and Liu XG (1993) An urease enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, **32**(5), 298-301.
- Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR and Krakowaka S (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **59**, 2470-2475.
- Ferrero RL, Hazell SL and Lee A (1998) The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and a related bacterium. *J Med Microbiol* **27**, 33-40.
- Freese E, Sheu CW and Galliers E (1973), Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives, *Nature* **241**, 321-325
- Goodwin CS and Armstrong JA (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**, 1-13.
- Goo MJ, Ki MR, Lee HR, Hong IH, Park JK, Yang HJ, Yuan DW, Hwang OK, Do SH, Yoo SE and Jeong KS (2008) Primary biliary cirrhosis, similar to that in human beings, in a male C57BL/6 mouse infected with *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20**(10), 1045-1048.
- Graham DY, Lew GM, and Klein PD (1992) Effect of treatment of *H. pylori* infection and the long-term recurrence of gastric and duodenal ulcer. a randomized, controlled study, *Ann Intern Med* **116**, 705-711.
- Harper CG, Xu S, Rogers AB, Feng Y, Shen Z, Taylor NS, Dewhirst FE, Paster BJ, Miller M, Hurley J and Fox JG (2003) Isolation and characterization of novel *Helicobacter* spp. from the gastric mucosa of harp seals *Phoca groenlandica*. *Dis Aquat Organ* **57**(1-2), 1-9.
- Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Mapstone DCNP, Dixon MF, Wyatt JI, Tompkins DS, Taylor GR, and Quirke P (1991) Direct Polymerase Chain Reaction Test for Detection of *Helicobacter pylori* in Humans and Animals. *J Clin Microbiol* **29**(11), 2543-2549.
- Jung HC (2001) Effects of Fermented Milk on the *Helicobacter pylori* Infection in Human stomach mucous, *J Kor Public Health Assoc*. **27**(3), 193-197.
- Jung HK, Na YJ, Moon IH (2006) Changes of *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer disease: based on data from a general hospital. *Kor J Gastroenterol* **32**, 1-8.
- Jin CJ, Park HS, Lee HW, Kim SR, Kang DG, Lee JS, Lee JD, Wang JH (2002) The Suppressive Effect of *L. lactis* CBT-8 on *Helicobacter pylori* Infection. *KonKuk J Medical Sciences* **12**, 75-83.
- Kim JK (2005) Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Kor J Gastroenterol* **46**, 172-180.
- Kim NY (2005), Epidemiology and Transmission Route of *Helicobacter pylori* Infection, *Kor J Gastroenterol* **46**, 153-158.
- Kim YC, Jung EJ, Kim EH, Jung DH, Jung SH, Yi DH, Kwon TJ and Kang SM (1998) Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* which was improved as Kimchi Starter. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **26**(4), 275-282.
- Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, Havu N, Festen HP, Liedman B, Lamers CB, Jansen JB, Dalenback J, Snel P, Nelis GF and Meuwissen SG (1996) Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *N Engl J Med* **334**(16), 1018-1022.
- Lee A, Fox J, and Hazell S (1993) Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun* **61**, 1601-1610.
- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G and Dixon MF (1997) A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterol* **112**(4), 1386-1397.
- Matsubara S, Shibata H, Ishikawa F, Yokokura T, Takahashi M, Sugimura T and Wakabayashi K (2003) Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun* **310**(3), 715-719.
- Park YS, Kim YH (2006) The Effect of Medicinal Herb Extract on Antimicrobial Activity against *Helicobacter pylori* and Antioxidant Activity. *J East Asian Soc Dietary Life* **16**(6), 199-206.
- Peng NJ, Lai KH, Lo GH and Hsu PI (2009) Comparison of noninvasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* Infection. *Med Princ Pract* **18**, 57-61.
- Roe IH, Nam SW, Yang MR, Myung NH, Kim JY and 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**(2), 260-268.
- Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y and Imanishi J (1999) Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun* **67**(1), 279-285.
- Song JC, Cho EK, Park HJ, Shin WC and Choi SY (2002) Antimicrobial growth effect of various organic acids as preservatives on *Helicobacter pylori*. *J Human Ecol* **3**(2), 44-56.
- Stefano Censini, Christina Lange, Zhaoying Xiang, Jean E. Crabtree, Paolo Ghiara, Mark Borodovsky, Rino Rappuoli, and Antonello Covacci (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 14648-14653.
- Tabak M, Artmom R, Potasman I, and Neeman I (1996) *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J Appl*

- Bacteriol* **80**, 667-672.
- Urrestarazu GMI, Serrano CN, Piero R, Aristimuo OL, Lpez BY, Ramn PJ (1989) The urease test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* infection. *G E N.* **43**(3), 169-172.
- Warren JR and Marshall BJ (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**, 1279-1275.
- Yang JC, Shun CT, Chien CT and Wang TH (2008) Effective prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection using a combination of catechins and sialic acid in AGS cells and BALB/c mice. *J Nutr* **138**(11), 2084-2090.
- Yee YK, Koo MW, and Szeto ML (2002) Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter* infection. *J Gastroenterol Hepatol* **17**, 552-555.
- Yoon YS, Lee SH, Baek NI, Kim HY and Park CH (2004) Inhibition of Cell Growth and Urease Activity of *Helicobacter pylori* by Medicinal plant Extracts. *Kor J Biotechnol Bioeng.* **19**(3), 187-191.