pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 4, pp. 372~375 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.4.372

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Lactobacillus plantarum LP2 균주의 *Helicobacter pylori* 억제효과

김태중 · 문기성*
한국교통대학교 생명공학과

Antimicrobial Activity of *Lactobacillus plantarum* LP2 against *Helicobacter pylori*

Tae-Jung Kim and Gi-Seong Moon*
Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Chungbuk 27909, Korea
(Received November 9, 2015/Revised November 19, 2015/Accepted November 25, 2015)

ABSTRACT - A lactic acid bacterium LP2 strain, which was previously isolated from a natural cheese, was confirmed to produce 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA), a bifidogenic growth factor. The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* (99% identity) by a homology search of the 16S rRNA gene sequence and named *Lactobacillus plantarum* LP2. The culture supernatant of the strain presented an antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* KCTC 12083, where the DHNA might have influenced on the activity.

Key words : *Helicobacter pylori*, 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, *Lactobacillus plantarum*

최근 들어 유산균을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics) 균주에 대한 관심이 증대되면서 새로운 유산균을 분리하고 그 기능성을 검증하기 위한 많은 노력들을 하고 있다. 유산균은 장도달성 및 정착성이 우수하여 인체 장내에서 다양한 기능들을 발휘하는데 대표적으로 1) 장내 병원성 미생물 억제[1], 2) 설사 및 변비 예방[2-3], 3) 면역 증강[4], 4) 항암 활성[5], 5) 혈중 콜레스테롤 저하[6], 6) 비타민 합성[7] 등이 있다. 특히 장내미생물과 인체 생리와의 상관관계가 과학적으로 규명되면서 비만을 비롯하여 다양한 대사질환의 원인을 장내미생물 균총과 연계하려는 경향이 커지고 있다. 따라서 예방적 혹은 치료적 접근방법으로 장내 환경을 개선할 수 있는 프로바이오틱스 균주 적용에 대한 실험적 연구들이 활발하다[8]. 장내 환경 개선을 위한 방법은 여러 가지 있을 수 있는데 그 중에서 가장 효과적인 방법은 장내 유익균을 증식시키는 방법일 것이다. 이를 위해서 유산균과 같은 유익균을 꾸준히 섭취하거나 장내에 이미 정착되어 있는 유익균을 선택적으로 증식시켜주는 방법들이 활용될 수 있다. 후자의 목적을 달성하기 위하여 프리바이오틱스(prebiotics) 제품들이 상업화 되어 있는데 주로 올리고당(oligosaccharide)이나 식이섬유(fiber)와 같이 인체 소화효소에 의해 분해되지 않는 불용성의 탄수화물이 주를 이루고 있다[9]. 그러나 프리바이오틱스는 아니지만 장내 유익균의 증식에 도움을 주는 미생물 대사산물들도 있다. 그 중에서 대표적인 것이 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA)인데 일본 유(乳)업체 연구그룹에 의해 DHNA가 비피도박테리아에 대한 증식효과가 있음이 밝혀졌다[10]. 또한 DHNA에 대한 추가적인 연구들이 진행되면서 위염 및 위암의 원인균으로 잘 알려져 있는 *Helicobacter pylori*에 대한 억제효과도 우수한 것으로 확인되었다[11]. *H. pylori*는 한국인을 포함하여 전세계적으로 성인들에서 많이 감염되어 있는 것으로 나타나 이를 제어하기 위한 의약품 개발이 활발하다[12]. 따라서 DHNA 생산 유산균을 분리하여 프로바이오틱스 균주로 개발한다면 장내 유익작용뿐만 아니라 *H. pylori*에 대한 억제능도 부가할 수 있어 상업적인 가치가 향상될 수 있다. 본 연구에서는 DHNA 생산 유산균인 *Lactobacillus plantarum* 균주 분리와 이의 항 *H. pylori* 효과에 대해 보고하고자 한다.

*Correspondence to: Gi-Seong Moon, Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Chungbuk 27909, Korea
Tel: 82-43-820-5251, Fax: 82-43-820-5272
E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

Materials and Methods

사용균주 및 배양조건

본 연구에서 사용한 유산균은 MRS 배지를 이용하여 37°C, 정치배양 하였으며 *H. pylori* KCTC 12083 균주는

10% Horse blood가 첨가된 Brucella 고체 배지(Difco, Sparks, MD, USA)에서 37ºC, 미호기성(microaerophilic) 조건(O_2 6-12%, CO_2 5-8%; AnaeroPack system, Mitsubishi Gas Chem Co., Tokyo, Japan)으로 배양하였다.

LP2 균주의 DHNA 생산 확인

멸균한 유청배지(10%, w/v) 50 mL에 LP2 균주 하룻밤 배양액을 1% 접종한 후 37ºC에서 혐기적인 조건으로 48 h 배양하였다. 배양액 4 mL에 두 배의 메탄올을 혼합한 후 sodium-ascorbate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 최종농도 0.2%가 되게 첨가하였다. 10 min 정도 추출한 후 원심분리하여(3,600 rpm, 10 min, 4ºC) 그 상등액을 회수한 후 40ºC에서 진공회전증발농축기(Eyela, Tokyo, Japan)로 농축(200 μL) 하였다. 농축액에 두 배(400 μL)의 메탄올을 혼합한 후 주사필터(0.45 μm; Sartorius, Göttingen, Germany)로 여과하여 그 여액을 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석용 시료로 사용하였다. 표준 DHNA 시료는 시약급(Sigma-Aldrich)으로 조제하였는데 적정량을 메탄올에 녹인 후 주사필터(0.45 μm; Sartorius)로 여과하여 그 여액을 표준시료로 사용하였다. HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고 이동상으로 혼합용액(acetonitrile: methanol: water: acetic acid = 15: 25: 225: 0.1)을 사용하였으며 암모니아수(ammonium hydroxide; Sigma-Aldrich)를 이용하여 pH 5.5로 조정하였다. 컬럼의 온도는 45ºC로 유지시켰으며 유속은 1 mL/min으로 하였고 시료 주입량과 검출파장은 각각 20 μL와 254 nm로 하였다.

LP2 균주의 동정

LP2 균주는 선행연구에서 자연치즈(3년 숙성 체다 치즈)로부터 분리되었으며 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열 분석법을 사용하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열의 분석은 국내 생명공학회사(Macrogen, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 또한 미국립보건원(NIH) 산하 생명공학정보센터(NCBI; The National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Align Search Tool) 프로그램(blastn)을 이용하여 분석된 서열 정보의 상동성(homology)을 조사하였다.

L. plantarum LP2 균주의 *H. pylori*에 대한 항균활성

L. plantarum LP2 균주를 MRS 액체 배지(Difco)에 배양하여 원심분리(6,000 rpm, 10 min, 4ºC)후 상등액(10 mL)을 여과(0.22 μm 주사필터, Sartorius)하였고 그 여액은 3 M NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 보정하였다. 이를 동결건조하여 DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Sigma-Aldrich) 1 mL에 현탁하였으며 여과(0.22 μm 주사필터, Sartorius) 후 시료로 사용하였다. –76ºC 초저온냉동고(Ilshin, Dongducheon, Gyeonggi, Korea)에 글리세롤 스톡으로 보관된 *H. pylori* KCTC 12083을 10% Horse blood가 첨가된 Brucella 고체 배지(Difco)에 도말 후 그 위에 직경 8 mm의 paper disc를 올린 다음 시료 200 μL를 점적하였다. 양성 대조군으로 DHNA (5 ppm) 용액을 동시에 점적하였다. 처리된 고체 배지들은 미호기성 조건(O_2 6-12%, CO_2 5-8%; AnaeroPack system, Mitsubishi Gas Chem Co.)으로 72 h 배양하였으며 이후 육안으로 paper disc 주변에 형성된 생육저해환(inhibition zone)을 관찰하였다.

Results and Discussion

LP2 균주의 DHNA 생산

LP2 균주로 부터의 DHNA 생산 확인은 HPLC 분석으로 수행되었다. 표준물질 DHNA (Sigma-Aldrich)의 머무름 시간(retention time)이 27.1 min으로 나타났고(Fig. 1A), LP2 균주의 배양 상등액에서도 동일한 시간대의 피크가 확인되었다(Fig. 1B). 표준물질을 이용한 정량곡선(standard curve; Fig. 1C)에 기초하였을 때 배양 상등액 내에 0.55 ppm의 DHNA가 함유된 것으로 확인되었다. 앞서 설명한 바와 같이 현재까지 DHNA 생산은 주로 일본의 연구그룹에 의해 주도되었으며 생산 균주로 프로피온산균(*Propionibacterium freudenreichii*)을 사용해왔다[10]. 유산균에서의 DHNA 생산은 본 연구그룹에서 주도하고 있으며 *Lactobacillus casei*로 부터의 DHNA 생산에 관한 연구논문을 발표한 바 있다[13].

LP2 균주의 동정

LP2 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 미국생명공학정보센터(NCBI) GenBank 데이터베이스에 등록하였으며(Accession no. KT852804), BLAST 프로그램(blastn)에 의한 상동성 분석 결과 *L. plantarum* (GenBank accession no. KC422389.1, AB598974.1, JF417991.1 등)과 가장 높은 상동성(일치율 99%)을 보여 LP2 균주를 *L. plantarum* LP2로 명명하였다.

L. plantarum LP2 균주의 *H. pylori*에 대한 항균활성

앞서 설명한 방법으로 시료를 조제하여 *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정한 결과 대조군으로 사용한 DHNA 용액(5 ppm) 보다 더 큰 항균활성을 나타내었다. *L. plantarum*이 *H. pylori*에 대한 항균활성이 있음은 이미 보고된 바 있다. Rokka 등(2006)은 그 항균활성이 세포벽 성분에 기인하는 것으로 추론하였고 다른 논문에서는 배양 상등액에서 항균활성이 확인되었다[14-15]. 그러나 이들 논문에서 어떤 성분이 항 *H. pylori* 활성을 가지는지 명확히 규명되지 않았다. 본 연구에서는 시료의 pH를 중성으로 보정하

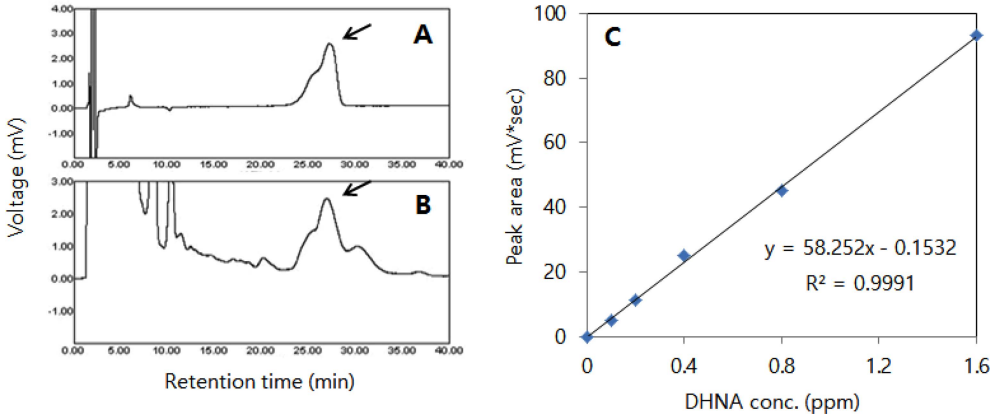

Fig. 1. HPLC of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid from fermented whey with *Lactobacillus plantarum* LP2. A: chromatogram for standard DHNA (5.0 ppm); B: chromatogram for sample; C: standard curve (0.0-1.6 ppm of DHNA). The arrows indicate DHNA peak. HPLC condition: column, Agilent HC-C18 (4.6 × 150 mm; 5 μm); column temperature, 45°C; flow rate, 1 mL/min; injection volume, 20 μL; detection wavelength, 254 nm; mobile phase, acetonitrile: methanol: water: acetic acid = 15: 25: 225: 0.1 (pH 5.5 with ammonium hydroxide).

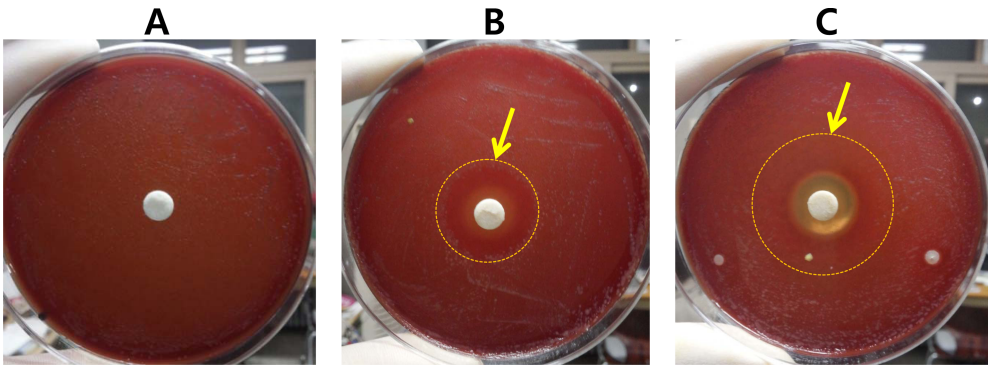

Fig. 2. Antimicrobial activity of culture supernatant of *Lactobacillus plantarum* LP2 against *Helicobacter pylori* KCTC 12083. A: MRS broth; B: 5.0 ppm of DHNA; C: Culture supernatant of *Lactobacillus plantarum* LP2. The arrows indicate the boundaries of inhibition zones.

였고 또한 박테리오신 생산에 대한 증거가 없어 *H. pylori*에 대한 항균활성이 시료 속에 포함된 DHNA에 기인하는 것으로 추정되었다. 앞서 설명한 바와 같이 타 선행연구를 통해 DHNA가 *H. pylori*에 대한 항균활성을 가지는 것으로 확인되었는데 DHNA가 *H. pylori*의 호흡을 억제하여 궁극적으로 ATP 생성을 저해하는 것으로 추론되었다[11]. 그러나 상관관계를 명확히 규명하기 위해서는 보다 정밀한 분석이 요구된다. 그럼에도 불구하고 위염 및 위암 원인균인 *H. pylori*에 대한 항균성 유산균주를 확보했다는 것은 상업적인 측면에서 가치가 있다고 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 농림수산식품부 고부가 식품기술개발사업(과제번호: 111014-01-1-HD110)에 의해 이루어진 것이며 이에 감사 드립니다.

국문요약

비피도박테리아 증식인자인 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid 생산 유산균주 LP2가 선행연구에서 자연치즈로부터 분리되었다. LP2 균주는16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 균주동정에서 *Lactobacillus plantarum*(99% 일치율)과 가장 높은 상동성을 나타내어 *Lactobacillus plantarum* LP2 균주로 명명하였다. LP2 균주의 배양 상등액은 *Helicobacter pylori* KCTC 12083 균주에 대하여 항균활성을 나타내었으며 이는 생산된 DHNA에 기인하는 것으로 추측되었다.

References

1. Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V. and Arul, V.: Probiotics and its functionally valuable products-a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 641-

658 (2013).
2. An, H.M., Baek, E.H., Jang, S., Lee, D.K., Kim, M.J., Kim, J.R., Lee, K.O., Park, J.G. and Ha, N.J.: Efficacy of lactic acid bacteria (LAB) supplement in management of constipation among nursing home residents. *Nutr. J.* **9**, 5 (2010).
3. Pattani, R., Palda, V.A., Hwang, S.W. and Shah, P.S.: Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients: systematic review and meta-analysis. *Open Med.* **7**, e56-67 (2013).
4. Tsai, Y.T., Cheng, P.C. and Pan, T.M.: The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 853-862 (2012).
5. Zhong, L., Zhang, X. and Covasa, M.: Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 7878-7886 (2014).
6. Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S. and Yadav, H.: Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp. Diabetes Res*. **2012**, 902917 (2012).
7. Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P. and Spano, G.: Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1383-1394 (2012).
8. Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J. and Gil, A.: The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 505878 (2015).
9. Rastall, R.A.: Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **1**, 305-339 (2010).
10. Isawa, K., Hojo, K., Yoda, N., Kamiyama, T., Makino, S., Saito, M., Sugano, H., Mizoguchi, C., Kurama, S., Shibasaki, M., Endo, N. and Sato, Y.: Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 679-681 (2002).
11. Nagata, K., Inatsu, S., Tanaka, M., Sato, H., Kouya, T., Taniguchi, M. and Fukuda, Y.: The bifidogenic growth stimulator inhibits the growth and respiration of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **15**, 422-429 (2010).
12. Song, Y.G.: Overview of *Helicobacter pylori* and treatment options. *Econ. Environ. Geol.* **48**, 241-246 (2015).
13. Kang, J.E., Kim, T.J. and Moon, G.S.: A novel *Lactobacillus casei* LP1 producing 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, a bifidogenic growth stimulator. *Prev. Nutr. Food Sci.* **20**, 78-81 (2015).
14. Rokka, S., Pihlanto, A., Korhonen, H. and Joutsjoki, V.: In vitro growth inhibition of *Helicobacter pylori* by lactobacilli belonging to the *Lactobacillus plantarum* group. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 508-513 (2006).
15. Sunanliganon, C., Thong-Ngam, D., Tumwasorn, S. and Klaikeaw, N.: *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World J. Gastroenterol.* **18**, 2472-2480 (2012).