

## *Helicobacter pylori*의 생육과 각종 유기산의 식품 보존료로서의 효과

송재철 · 조은경\* · 박현정\* · 신완철 · 최석영  
울산대학교 생활과학부 · \*다손식품연구소

## Antimicrobial growth effect of various organic acids as preservatives on *Helicobacter pylori*

Song, Jae-Chul · Cho, Eun-Kyung\* · Park, Hyun-Jeong\* ·  
Shin, Wan-Chul · Choi, Suck-Young  
Dept. of Food Sci. & Nutri., University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea  
\*Dason Food Research Institute, Seoul 157-014, Korea

### <Abstract>

The purpose of this study was to examine the effect of various organic acids as food preservatives on the growth of *Helicobacter pylori*(*H. pylori*). The antimicrobial effects of sorbic acid, propionic acid and benzoic acid currently used as food preservatives were examined in light of the growth of *Helicobacter pylori*. Each of them was observed to have positive antimicrobial effect on *Helicobacter pylori*. However, benzoic acid wasn't higher than sorbic acid and propionic acid in antimicrobial effect. As for the combination of preservatives, antimicrobial activity of *H. pylori* was shown in the combination of sorbic acid(0.5%) and propionic acid(0.5%). However, its effect was not significantly different in comparison with other combinations. In the relationship of organic acids and *H. pylori*'s growth, organic acid had no effect on antimicrobial activity when it was used alone, whereas antimicrobial effect was shown to be better in case of combination. If intermix of organic acids and preservatives and addition to the medium for suppression of *H. pylori* growth were achieved, organic acid exhibited synergistic effect on suppression of *H. pylori*'s growth, even in combination of any

other preservatives. In particular, in combination of citric acid and sorbic acid, the growth of *H. pylori* was shown to be remarkable suppression. And the effectiveness on suppression of *H. pylori*'s growth was lowered in order of citric acid + benzoic acid and citric acid + propionic acid. It was also found that the antimicrobial effects of malic acid and succinic acid were similar to those of citric acid.

## I. 서론

위암의 발생 요인은 다양하다(1, 2). 그 요인 중 최근에 밝혀진 바에 의하면 *Helicobacter pylori*에 의한 감염이 위암 발생에 간접적인 영향을 미친다는 것이다. 그것은 짜고 매운 자극성 식품의 섭취가 위축성 위염과 만성위염을 발생시키고 이러한 일련의 위해들이 *H. pylori*의 생육을 촉진하고 균이 분비한 분비물 중 성분들이 만성 위염과 위암으로 가속화된다는 것이다(3). 현재 위장관 질환의 요인으로 알려진 *H. pylori*는 위장관 질환을 가진 사람의 대부분이 이 균을 보유하고 있다. 그러나 아직 이 균의 감염과정은 잘 밝혀져 있지 않다(4). 특히 위장관 질환을 가진 사람의 대부분이 이 균에 감염되어 있는 것으로 보아 그 원인이 *H. pylori* 감염과 상관성이 있을 것으로 추정된다(5).

1983년 Warren과 Marshall은 100명의 위점막 생검조직에서 동일한 형태의 만곡형 세균을 관찰, 11명의 위점막 생검조직으로부터 세균을 분리배양, *Gastric Campylobacter Like Organisms*(GLOCs)이라고 규명하였으나 위의 유문부에서 관찰되므로 *Campylobacter pyloridis*라고 명명하였다. 후에 *Campylobacter pylori*로 바뀌었고 *Campylobacter*속의 다른 세균 종과는 세포막 지방산 및 미세구조에 차이가 있고 urease를 다량 생산하는 세균이라는 사실이 밝혀짐에 따라 1989년 Goodwin은 이를 *H. pylori*로 명명하였다. *H. pylori*의 생태학적 서식처는 위점막 상피 세포간 접합부이며 초기 감염 부위는 위의 유문부 점막이다. 미호기성의 간균으로 크기는  $1.8-7.7 \times 0.4-1.25 \mu\text{m}$  정도이고 세균을 배양하려면 미호기 상태 혹은 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 습기가 충분히 유지된 고형배지에 배양하는데 이 세균의 최적성장에 필요한 pH는 7.0-7.4이다.

*H. pylori*는 위점막 상피 세포에 손상을 입히고 기본적인 대사산물의 공급을 위해 다양한 효소를 분비하는데 이는 균이 상피조직에 colony를 형성하기 위해서이다. 효소의 분비는 점막 장벽을 약하게 하고 알칼리화 환경을 만들어 정상적인 위에서 위염 및 위궤양으로 발전하게끔 유도한다. 효소와 편모외에 균 자체의 특수 구조와 생성물, 자가 면역 반응의 세포 생성물 또한 상피세포 표면에 손상을 준다. *H. pylori*가 위, 십이지장 질환에서 상당히 높은 빈도로 관찰되기 때문에 이 세균이 병원성을 가지고 있는지 여부에 대해서 논란이 되고 있다. 1985년 Marshall은 자신이 직접 *H. pylori*를 먹은 위 급성위염이 유발된 사실을 보고하였고 1987년 Morris와 Nicholson은 조직학적으로 정상인 자원자에게 *H. pylori*를 투여한 8일 후에 pH가 상승하고 11일 후에는 위의 전정부와 기저부 생검에서 균이 생육하고 있음을 확인하였다. 계속되는 실험에서 자원자에게 bismuth subsalicylate를 28일간 투여하였더니 균은 전혀 분리되지 않았음도 보고하였다. 위와 같은 실험을 통해 *H. pylori*가 Koch의 가설을 충족시키는 세균으로 판단되었다. 즉 *H. pylori*는 정상세균총이 아닌 위십이지장에 기생하는 병원성 세균으로 추정된다.

본 연구자들은 이미 *H. pylori*의 생육에 영향을 미치는 성분에 관한 1차 조사를 한 바 있다. 연구 결과에 의하면 위암의 유발요인이 salt, nitrate과 ascorbic acid,  $\beta$ -carotene과 같은 항산화성분들이 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이 결과는 salt에 의해 유발된 점막의 손상이 *H. pylori*의 감염으로 위내의 염증을 가속화할 가능성이 있으며 nitrate의 경우에도 비슷한 이론이 성립되었다. 특히 이미 밝혀졌지만 이 균은 *N*-nitrosamine을 형성하는 것으로 carcinogen으로 작용하지만(6) 실제 평상 식사 속 *H. pylori*의 생육에 영향을 미치는 성분이 이미 본 연구자들이 조사한 것의 더 많을 것으로 생각된다. 특히 ascorbic acid의 nitrosamine형성 억제작용은 다른 유기산의 영향을 검토하게 만들었다. 알려진 바에 의하면 일부 유기산은 산소제거의 기능을 가진 것으로 알려져 있는데 이것은 *H. pylori*에 감염된 사람들의 ascorbic acid의 농도가 정상인들보다 훨씬 낮은 농도로 관찰되는 것과 관련이 있다(7).

실제 *Helicobacter pylori*에 관한 연구는 잘 이루어져 있지 않다. 국내 일부 학자들은 환자들의 감염정도만 조사하였을 뿐 생육에 미치는 성분에 관해서는 자료가 부족한 상태였다. 본 연구는 그러한 측면에서 연구 가치가 있으며 이 결과는 차후 *in vivo*상의 연구에 기초자료가 될 수 있다. 본 연구에서는 *H. pylori*를 치료하기 위한 일환으로 평소 식생활에서 쉽게 찾을 수 있는 유기산이 *H. pylori*의 생육에 어떤 영향을 미치는지를 검토하여 식이적 요인을 응용, 궤양의 발생 억제 가능성을 규명하는데 있다. 따라서 각종 임상적 효능을 가진 유기산 중 보존료로 사용되는 소르빈산(sorbic acid), 안식향산(benzoic acid), 프로피온산(propionic acid)를 비롯하여 구연산, 사과산, 젖산, 푸말산, 숙실산, 케토글루타민산 등을 대상으로 *H. pylori*의 생육관계를 검토하여 이를 근거로 위장질환의 발생과 진행 정도를 규명하고 식이치료제의 개발에 관한 정보를 얻고자 한다.

## II. 재료 및 방법

본 실험에 사용한 시험 미생물은 위궤양 유발 *H. pylori*의 ATCC 43126이며 부산대의 대 병리학 교실에서 균주를 분양받아 계대하였다. 계대에 사용한 배지는 초콜릿 배지(Korea media)를 사용하였고 Gas Pack(BBL사의 Campy pouch)에서 배양하였다. 실험시 진탕배양에 사용한 배지는 Brucella broth(Difco)에 7% horse serum(Gibco)을 첨가한 것을 사용하였다. 배양 조건은 시험 미생물이 미호기성균이므로 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 5일간 배양하였고, 진탕배양시에는 튜브를 느슨하게 풀어서 시험관 안의 공기 조성을 조절, 미호기로 한 후 배양하였다. 실험에 사용한 제반 시약은 특급용을 사용하였다.

실험에 사용한 식품보존료는 소르빈산, 안식향산, 프로피온산 등이며 유기산은 구연산, 사과산, 젖산, 푸말산, 숙실산, 케토글루타민산 등은 특급시약을 사용하였다. 멸균한 15ml test tube에 배지 9ml를 넣고 각 샘플을 0.1-1.0%의 농도로 실험에 따라 첨가한 후 세균을 4 logCFU 되게 접종, vortex(Thermolyne, 37600 mixer)로 혼합시켜서 incubator(Jouan, Ig150)에서 CO<sub>2</sub> 5%의 공기조성에서 37°C, 5일간 배양한다. 보존료의 조합병행시험에서는 소르빈산 + 프로피온산, 소르빈산 + 안식향산, 프로피온산 + 안식향산을 각각 0.5% 씩 혼합하여 실시하고 유기산류와 보존료의 조합병행실험에서는 유기산류 + 소르빈산, 유기산류 + 안식향산, 유기산류 + 프로피온산류 등으로 그룹화하여 유기산류와 보존료의 첨가량은 각 0.5%로 하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 보존료와 *H. pylori* 생육과의 관계

*Helicobacter pylori*(*H. pylori*)의 생육에 미치는 제반 성분 및 첨가물 영향을 규명하기 위해 우선 보존료로 현재 식품첨가물로 사용되고 있는 소르빈산(sorbic acid), 프로피온산(propionic acid), 안식향산(benzoic acid) 등의 *H. pylori*에 대한 항균능력을 검토하였다. 일반적으로 보존료들은 세균, 곰팡이, 효모 등의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있으나 항균 메커니즘이 각각 특이하고 그 작용범위(spectrum)가 일정치 못하기 때문에 공통적 항균 패턴을 규명하기는 매우 어려운 실정이다. 본 연구에서는 *H. pylori*의 생육을 저해하는 성분 중 일반적으로 많이 사용되고 있는 보존료의 항균력을 우선 검토하였다. Fig. 1은 소르빈산의 농도를 달리하여 첨가한 결과 0.1% 첨가시 항균효과가 좋게 나타났으며 0.5% 이상 첨가할 경우에는 매우 좋은 항균효과를 나타내었다. 소르빈산의 항균효과는 경시적으로 1일-3일사이에 큰 효과를 나타내었다. 소르빈산을 1.0% 첨가한 경우에는 생육 5일까지 생육은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 소르빈산 비헤리부분이 세포막을 통해서 침투하여 주로 세포내 효소계 기능을 저해하거나 전자전달 인산화과정에서의 기질이동과 산화적 인산화 반응을 저해, 또는 균의 아미노산의 흡수를 방해하기 때문으로 생각된다. 소르빈산의 첨가는 주로 대수기에서 생육 억제효과가 나타나는 것으로 관찰되었다. 소르빈산에 유기산이나 소금, 향산화제, nitrite 등을 병용하면 균의 생육은 더 억제되는 것으로 알려져 있다. Fig. 2는 프로피온산의 *H. pylori*에 대한 생육패턴을 나타낸 것이다. 프로피온산은 미생물의 탈수소계의 기능을 저하하여 미생물의 생육을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 생육억제는 소르빈산과 비슷한 경향을 나타내었는데 0.5%이상에서는 억제효과가 큰 것으로 나타났으며 생육 3일후부터 균의 생육은 다소 억제되는 것으로 관찰되었다. 이것은 프로피온산의 세포내 이행능력(carry through)이 다른 보존료보다 늦게 나타나기 때문으로 생각된다. 안식향산(benzoic acid)의 경우에는 *H. pylori*에 대한 생육정도는 Fig. 3과 같이 경시적으로 억제효과가 있었으나 소르빈산이나 프로피온산과 비교했을 때는 별로 큰 효과를 나타내지 못하였다. 안식향산은 세포내의 기질 이동과 산화적 인산화 기능을 저해하며 미생물 생육에 필요한 필수영양분의 세포막 투과를 저해하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있는데 소르빈산, 탄산가스, 소금, 설탕 등은 상승효과를 보이지만 비이온성 계면활성제는 길항하는 것으로 알려져 있다. Fig. 4는 합성보존료로 사용되고 있는 유기산류 보존료의 조합에 대한 *H. pylori*의 생육효과를 나타낸 것으로 0.5% 소르빈산과 0.5% 프로피온산의 조합의 경우가 *H. pylori*의 생육 억제에 약간 효과가 나타나고 있지만 다른 조합군과 비교할 때 큰 차이를 나타내지 못하였다.

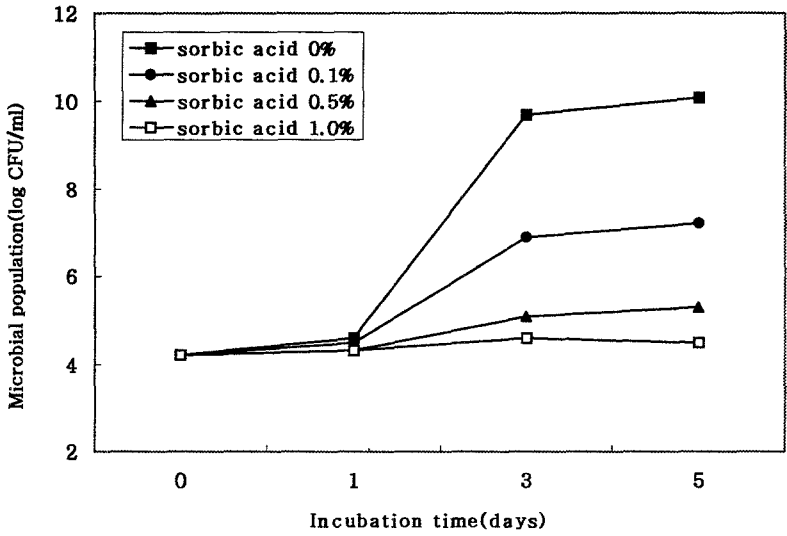


Fig. 1. Growth pattern of *Helicobacter pylori* by addition of various concentrations of sorbic acid on incubation time

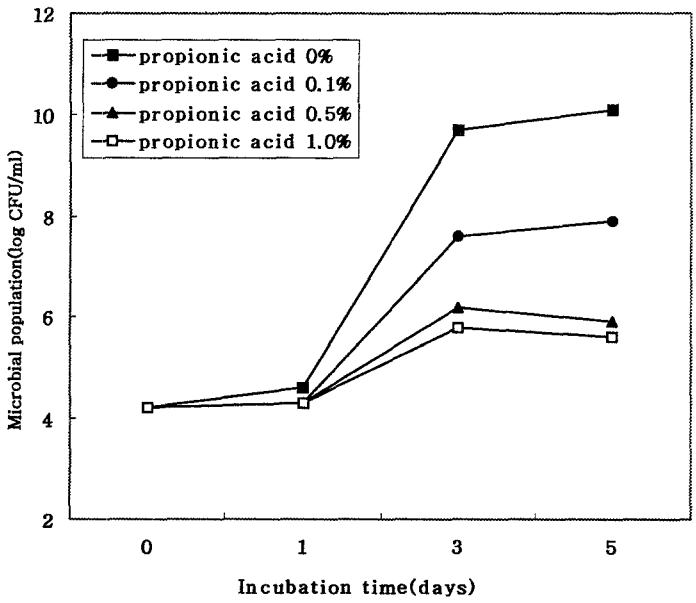


Fig. 2. Growth pattern of *Helicobacter pylori* by addition of various concentrations of propionic acid on incubation time

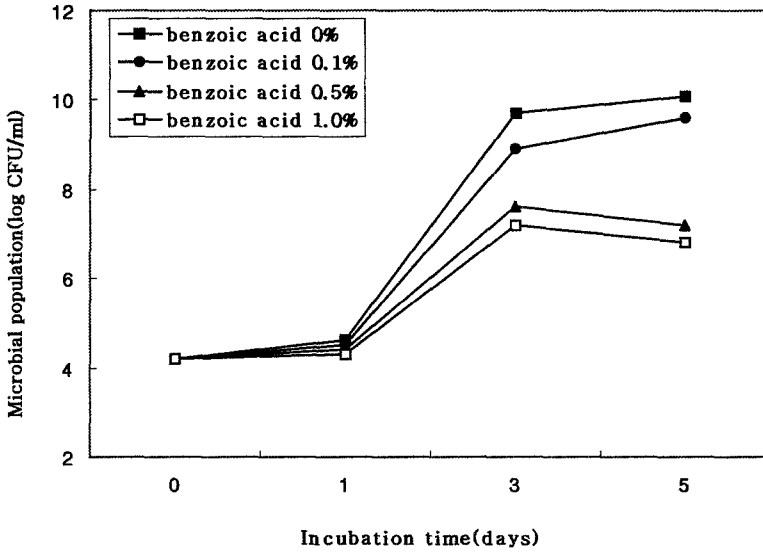


Fig. 3. Growth pattern of *Helicobacter pylori* by addition of various concentrations of benzoic acid on incubation time

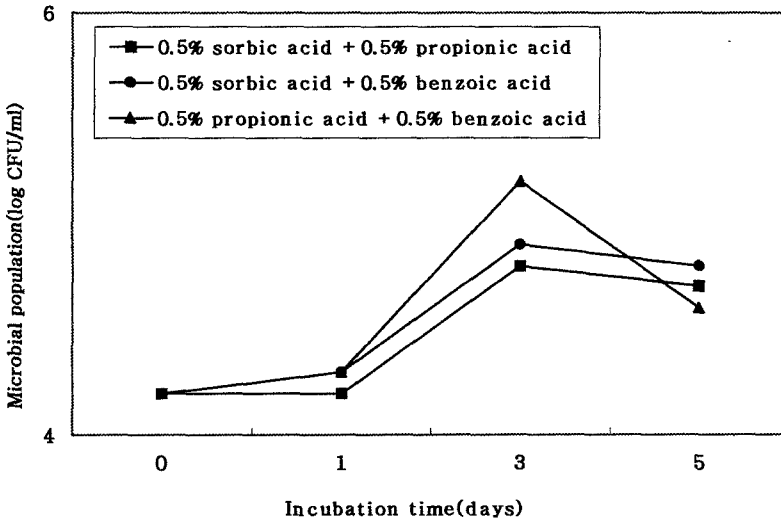


Fig. 4. Growth pattern of *Helicobacter pylori* by addition of combination of various preservatives

## 2. 유기산과 *H. pylori*의 생육관계

유기산은 비해리부분이 많아 보존료로 가끔씩 사용되어 왔다. 그러나 특정한 미생물에 대해서는 생육의 경우 억제 또는 상승작용을 하는 경우를 보게 된다. 특히 보존료와 조합할 경우 비해리부분의 세포내 이행능력(carry through)이 상승하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 우선 유기산의 항균력을 검토하기로 하였다. Fig. 5는 구연산(citric acid)의 항균력을, Fig. 6은 사과산(malic acid)의 항균력을 검토한 것이다. 결과에서 본 바와 같이 구연산과 사과산의 항균력을 비슷한 경향을 나타내었다. 구연산은 1%이상 첨가할 경우 항균력을 나타내었으며 첨가량을 증가해도 항균력에 큰 차이는 나타내지 않았다. 구연산과 사과산이 *H. pylori*의 생육에 큰 영향을 미치지 못하는 것은 직접 항균작용을 하는 것보다 다른 보존료와 혼합할 때 생육억제에 상승효과가 더 있을 것으로 생각된다. 그것은 비해리부분이 많지만 항균력이 적은데 따른 해석이다. 기인한다. 그러나 구연산의 경우 10% 정도의 고농도에서는 *H. pylori*의 생육이 46%정도 억제되는 것으로 알려져 있다(4). 또 각각 0.5% 첨가하여 조합하는 경우에도 생육억제효과는 그렇게 크게 나타나지 않았다(Fig. 7). 또 젖산(lactic acid), 푸말산(fumalic acid)의 항균력을 검토한 결과(Fig. 8, Fig. 9) 젖산은 첨가량에 관계없이 별다른 항균력에 차이를 나타내지 못했으며 경시적으로도 항균력에는 차이를 나타내지 못하였다. 이러한 경향은 푸말산의 경우에도 비슷하게 나타났다. 그러나 젖산과 푸말산을 조합한 경우에는 첨가량을 증가할수록 항균력에 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 10). 이 결과는 젖산과 푸말산을 단독으로 사용할 경우보다 항균력이 우수한 것이다. 특히 3일 후의 항균력은 좋은 것으로 생각되었다. 숙신산(succinic acid)과 케토글루타린산(ketoglutaric acid)의 경우에는(Fig. 11, Fig. 12) 3일 후의 항균패턴을 제외하고는 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 조합한 경우에는 매우 좋은 항균효과가 관찰되었다(Fig. 13). 숙신산과 케토글루타린산 등은 균의 생육과 관련되어 영양원 또는 비해리도 변화, 효소계의 작용, 용해도 영향 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서는 단독 첨가 시에는 항균력이 크게 나타나지 않고 조합하는 경우에만 좋은 항균력을 나타내었다. 특히 케토글루타린산은 균이 자화할 수 없는 유기산이며 이행능력도 약한 것으로 사료된다.

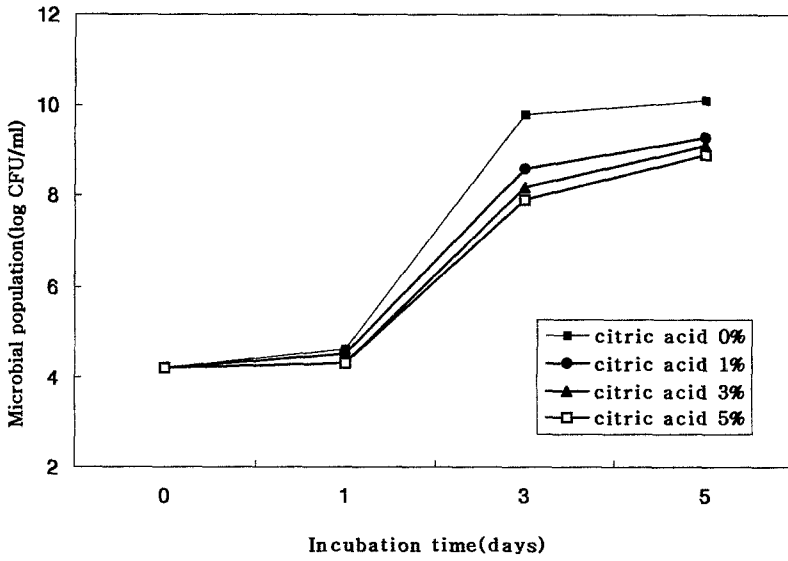


Fig. 5. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by various concentrations of citric acid

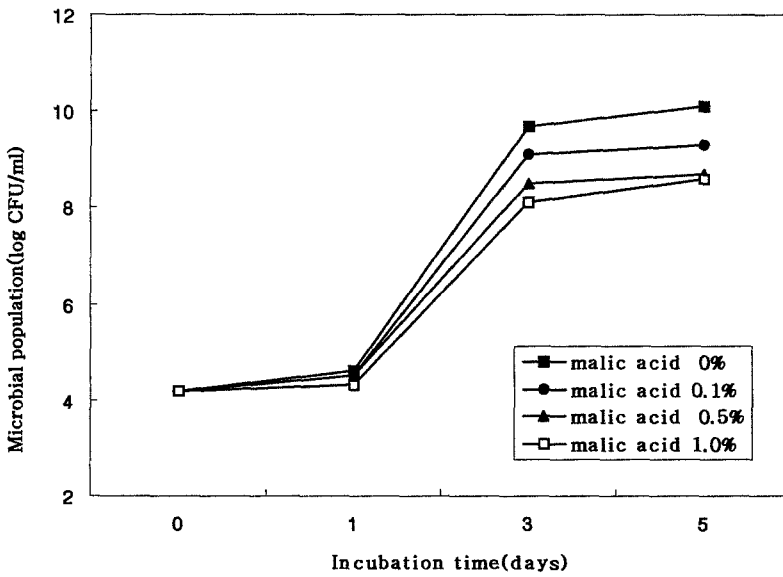


Fig. 6. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by various concentrations of malic acid



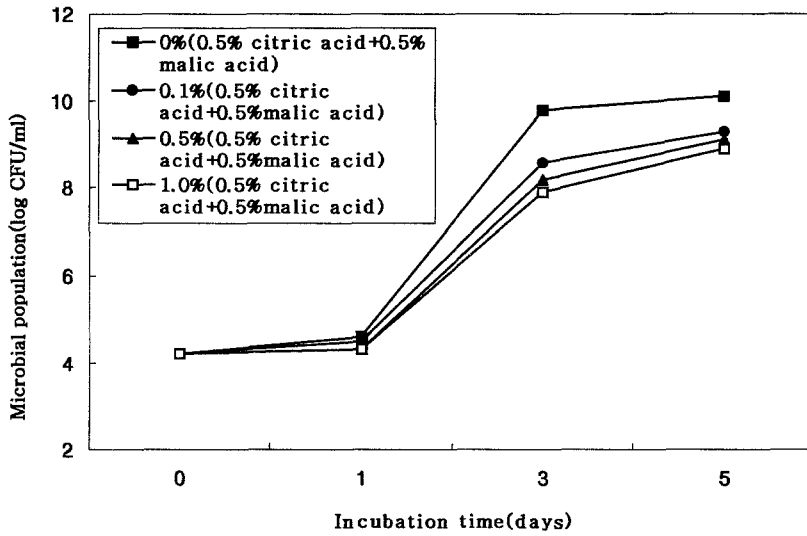


Fig. 7. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by combination of citric acid and malic acid

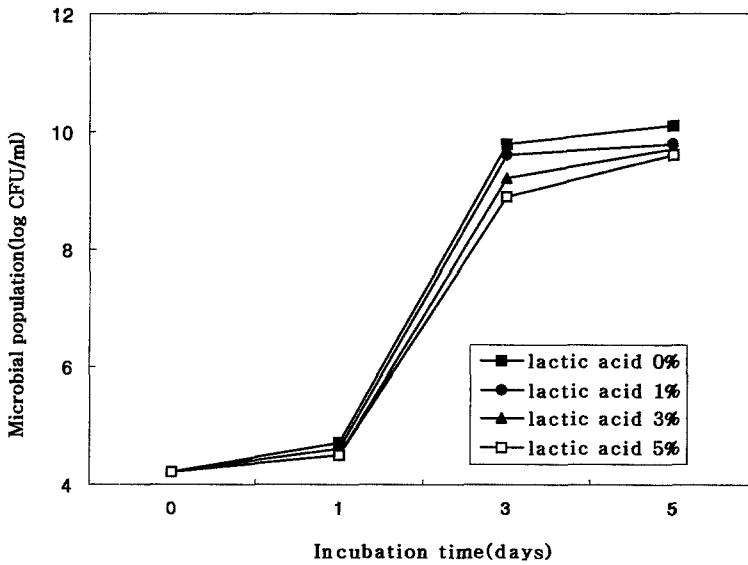


Fig. 8. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by various concentrations of lactic acid

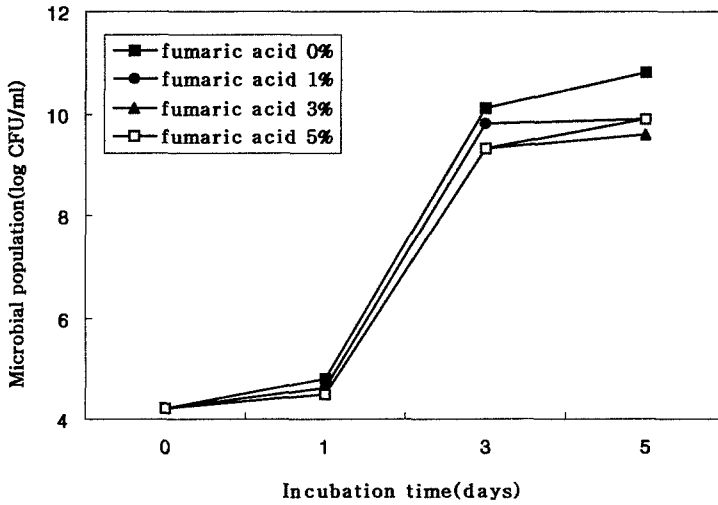


Fig. 9. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by various concentrations of fumaric acid

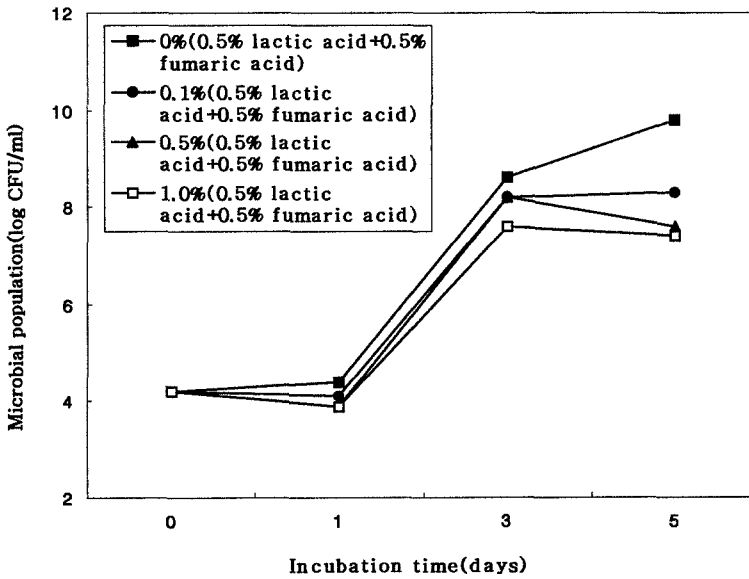


Fig. 10. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by combination of lactic acid and fumaric acid

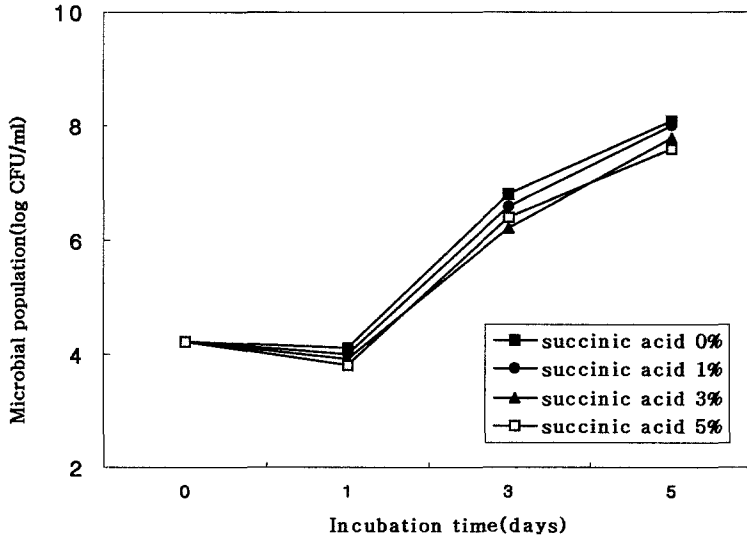


Fig.11. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by various concentrations of succinic acid

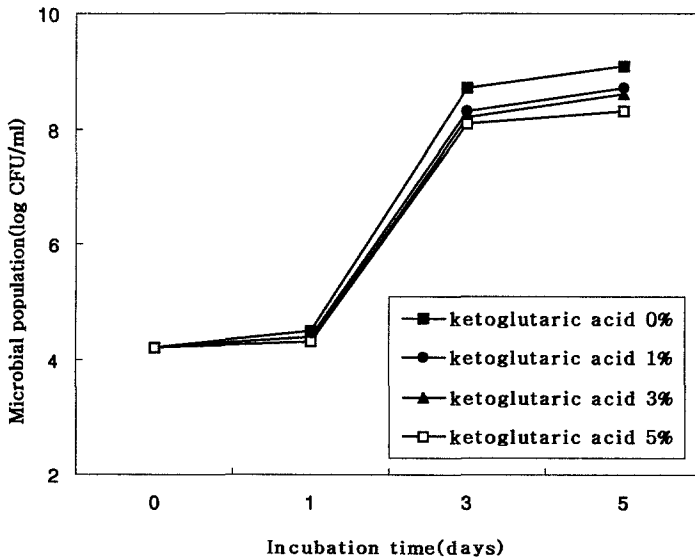


Fig.12. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by various concentrations of ketoglutaric acid

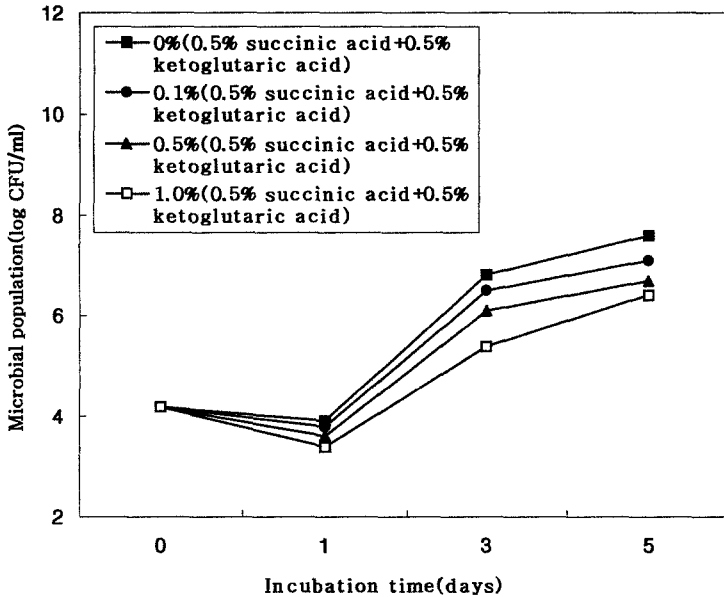


Fig. 13. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by combination of succinic acid and ketoglutaric acid

### 3. 유기산, 보존료와 생육관계

상기 연구결과를 기초로 유기산류는 *H. pylori*의 생육에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되었다. 그러나 조합하는 경우에는 다소 항균력에 상승효과가 있는 것으로 확인되었기 때문에 유기산류의 항균작용에 대한 상승효과를 검토하게 되었다. 우선 실험결과를 토대로 구연산, 사과산, 젓산, 푸말산, 숙실산, 케토글루타민산 등 유기산류의 항균력 실험 중 일반적으로 많이 사용되고 있으며 상승작용에 사용되고 있는 일부 유기산류(구연산, 사과산, 숙실산)를 대상으로 보존료와 조합실험을 행하였다. 유기산류의 첨가량은 각각 0.5%, 보존료도 각각 0.5%를 기준으로 보존료의 통상 식품에 사용량을 초과하지 않도록 첨가량을 조절하였다. 그 결과(Table 1) 유기산류는 어떤 보존료와 혼합하여도 항균력에 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 구연산의 경우 소르빈산과 조합한 경우에는 *H. pylori* 생육이 많이 억제되었으며 그 다음이 구연산+안식향산, 구연산+프로피온산 순으로 균에 대한 항균력이 감소되었다. 또 사과산의 경우에는 구연산과 비슷한 경향을 나타내었는데 가장 좋은 항균력 억제 효과는 소르빈산, 안식향산, 프로피온산 순이었다. 이러한 경향은 숙실산의 경우에도 비슷한 경향으로 나타났다. 이러한 사실은 보존료가 유기산과 조합할 때 비핵리부분을 더 많이 증가시켜 항균제의 세포내 투과력을 높여 줄 것으로 생각되며 이러한 결과는 식품보존료의 식품에의 사용량을 격감시키는데 기여할 것으로 생각된다. 이러한 작용기작은 유기산형 항균제에서도 이미 확인된 현상이다.

Table 1. Inhibition of *H. pylori* growth by combination of various organic acids and preservatives(unit : log CFU)

days		0	1	3	5
organic acid					
citric acid	+sorbic acid	4.2	4.6	9.7	10.1
	+propionic acid	4.2	4.5	8.6	9.3
	+benzoic acid	4.2	4.3	8.2	9.1
	control	4.2	4.3	7.9	8.9
malic acid	+sorbic acid	4.2	4.6	9.7	10.1
	+propionic acid	4.2	4.5	9.1	9.3
	+benzoic acid	4.2	4.5	8.5	8.7
	control	4.2	4.3	8.1	8.6
succinic acid	+sorbic acid	4.2	4.6	7.4	8.7
	+propionic acid	4.2	4.5	7.5	8.3
	+benzoic acid	4.2	4.4	6.5	7.2
	control	4.2	4.3	6.1	6.4

#### IV. 요약

*Helicobacter pylori*의 생육과 각종 유기산의 식품보존료로서의 효과를 검토하였다. 우선 보존료로 현재 식품첨가물로 사용되고 있는 소르빈산(sorbic acid), 프로피온산(propionic acid), 안식향산(benzoic acid) 등의 *H. pylori*에 대한 항균능력을 검토한 결과 소르빈산, 프로피온산, 안식향산의 *H. pylori*에 대한 항균효과가 관찰되었으며 안식향산은 소르빈산이나 프로피온산과 비교했을 때는 별로 큰 효과를 나타내지 못하였다. 보존료의 조합에 대한 *H. pylori*의 생육억제효과는 0.5% 소르빈산과 0.5% 프로피온산을 조합하는 경우 나타났으며 다른 조합군과 비교할 때 큰 차이를 나타내지 못하였다. 유기산과 *H. pylori*의 생육관계에서는 단독 첨가시에는 항균력이 크게 나타나지 않고 조합하는 경우에만 좋은 항균력을 나타내었다. 유기산, 보존료와 *H. pylori* 생육관계는 유기산류는 어떤 보존료와 혼합하여도 항균력에 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 구연산의 경우 소르빈산과 조합한 경우에는 *H. pylori*생육이 많이 억제되었으며 그 다음이 구연산+안식향산, 구연산+프로피온산 순으로 균에 대한 항균력이 감소되었다. 또 사과산과 숙실산은 구연산과 비슷한 경향을 나타내었다.

## 참고문헌

1. 이광호, 조명제, 김종배, 최상경, 김영채 : 위십이지장 염증성 질환과 *Campylobacter pylori*에 관한 연구. 대한미생물학회지. 23(1), 9-16, 1988
2. Barthel J.S., Westblum T.U., Havey A.D. and Conzalez F.Z. : Gastritis and *Campylobacter pylori* in healthy, asymptomatic volunteers. Arch. Intern. Med. 148, 1141-51, 1988
3. Morris A. and Nicholson G. : Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting pH. Am. J. Gastroenterol. 82, 192-9, 1987
4. Fizgibbons P.L., Dooley C.P., Cohen H. and Appleman M.D. : Prevalence of gastric metaplasia, inflammation, and *Campylobacter pylori* on the duodenum of members of a normal population. Am. J. Gastroentrol. 83, 1168-70, 1988
5. Havey A.D., Gonzalez P.J. and Everett E.D. : Pyloric *Campylobacter*-like organisms in asymptomatic volunteers. Gastroenterology. 90, 1338, 1986
6. Marshall B.J., Goodwin C.S. : Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 68, 1987
7. Doll peto : The cause of cancer. J. Nat. Can. Inst. 66, 1191-1308, 1981