

한국 여성의 질에서 분리한 유산균의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균효과 및 특성 규명

김용경¹, 강창호¹, 신유진¹, 백남수², 소재성^{1*}

Characterization and Antimicrobial Activity against *Gardnerella vaginalis* of Vaginal *Lactobacillus* spp. Isolated from Korean Women

YongGyeong Kim¹, Chang-Ho Kang¹, YuJin Shin¹, Nam-Soo Paek², and Jae-Seong So^{1*}

Received: 21 July 2015 / Revised: 16 September 2015 / Accepted: 22 October 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Bacterial vaginosis (BV) is caused by microbial imbalance of the vaginal ecosystem and overgrowth of anaerobic bacteria. The antibiotic treatment often results in very high recurrence of BV because it disturbs the vaginal ecosystem. The high recurrence rates suggest a need for alternative therapeutic methods and probiotics are being recognized as alternative or additional treatment method for BV. The purpose of this study was to investigate how human vaginal isolates of *Lactobacillus* spp. inhibit the BV-associated pathogen *Gardnerella vaginalis*. Results show that selected strains significantly reduced the viability of *G. vaginalis*. Among these selected strains KLB410 and KLB416 were further selected based on acid/bile tolerance and identified through 16S rRNA gene sequencing being *Lactobacillus plantarum*. Further studies are underway to demonstrate that the selected strain can be applied as potential probiotics for recovering vaginal ecosystem.

Key words: Bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, Probiotics, *Lactobacillus* spp.

1. INTRODUCTION

세균성 질증 (bacterial vaginosis)이란 질 내의 건강을 유지하는 유산균총이 감소하여 혐기성 병원균인 *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* spp. 등이 질 내에서 증식하면서 발생하게 되는 질병이다 [1]. 질 내에서 혐기성 병원균이 증식하게 되면 질 내 휘발성 아민 화합물이 증가하며, 이는 세균성 질증 특유의 악취를 유발하게 된다 [2]. 또한 산성으로 유지되는 질 내 산도가 높아져 임신 관련 질병 및 성병 감염의 위험을 높인다고 알려져 있다 [3,4].

이러한 세균성 질증의 치료는 주로 metronidazole, clindamycin 등의 항생제를 복용 또는 주입하는 방법이 사용되고 있지만, 지속적으로 재발하는 문제점이 있다 [5]. 따라서 기존의 항생제 사용의 보완방안으로 병원균의 제거뿐만 아니라 질 내 환경을 개선하여 세균성 질증이 재발하는 것을 방지하는 방안 등이 연구되고 있으며, 그 대안 방안으로 살아 있는 생균제인 프로바이오틱스를 사용하는 방법이 주목을 받고 있다 [6]. 건강한 여성의 질에는 다양한 유산균들이 존재하는데, 이러한 유산균들은 젖산을 생성하고 아민 화합물을 분해하여 질 내 산도를 낮추며, 과산화수소, 박테리옌 등의 항균물질을 생산하여 병원균 감염을 막고 질 내 환경을 건강하게 유지시킨다 [7]. 선진국을 중심으로 요거트, 유산균 캡슐을 섭취하거나 탐폰, 질정의 형태로 유산균을 질 내 주입하는 등, 질 내 환경개선을 도와주는 다양한 형태의 프로바이오틱스에 대한 연구 [8]가 진행되고 있다. 하지만 국내에서는 유산균을 통한 질 내 환경 개선에 대한 연구가 매우 미비한 수준이다.

¹인하대학교 생물공학과

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea

Tel: +82-32-860-7516, Fax: +82-32-872-4046

e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

²(주)메디오젠

²MEDIOGEN, Co., Ltd, Seoul 121-040, Korea

따라서 본 연구는 세균성 질증의 치료 및 재발방지를 위한 대체방안의 일환으로 한국 여성의 질에서 분리한 유산균의 프로바이오틱스로의 가능성을 확인하고, 세균성 질증의 주요 원인균인 *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균효과를 확인하였다. 또한 항균활성이 우수한 유산균주를 선별하여 산성과 담즙염에 대한 내성 및 autoaggregation 특성을 확인하여 프로바이오틱스로서의 기능 확인을 통해 관련 연구의 기초 자료로 사용하고자 한다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균효과

본 연구에서는 한국 여성의 질에서 분리한 유산균 90여종 [9]을 사용하였으며, 액체배지 희석법을 이용해 세균성 질증의 주요 원인균인 *Gardnerella vaginalis* KCTC5096 (*G. vaginalis*)에 대한 항균력을 확인하였다. 유산균주의 배양은 MRS 배지 (Difco, MI, USA)를 사용하였으며, MRS 액체 배지에 24시간 정치배양한 배양액을 OD₆₀₀ 1.0 (10⁸~10⁹ CFU/mL)으로 조정하여 새로운 MRS 배지에 1% 접종하였다. 18시간 동안 배양한 후, 원심분리 (4,000 × g, 4°C, 5분) 하여 0.22 μm 필터를 이용하여 상등액을 여과하여 본 실험에 사용하였다. *G. vaginalis*의 배양은 10% 말 혈청 (Horse serum, Life technologies corp., NY, USA)을 함유한 BHI 배지 (Difco, MI, USA)를 사용하였으며, Anaerocult A (Merck, Germany)로 혐기상태로 37°C에서 24시간 정치배양하였다. *G. vaginalis*에 대한 항균효과는 각각의 유산균주의 상등액을 10% 말 혈청이 포함된 5 mL BHI 배지에 10% 첨가한 후, *G. vaginalis*를 OD₆₀₀ 0.5로 조정하여 1% 접종하였다. 24시간 동안 혐기배양한 뒤 *G. vaginalis*의 생균수를 아래와 같이 측정하여 분리균주의 *G. vaginalis*에 대한 항균효과를 확인하였다.

$$\text{항균효과 (\%)} = [\text{대조군 (CFU/mL)} - \text{실험군 (CFU/mL)}] / \text{대조군 (CFU/mL)} \times 100$$

2.2. 선별된 유산균주의 산성 및 담즙염 내성 확인

섭취하는 유산균이 질증 개선에 효과가 있었다는 연구 [8]에 기초하여, *G. vaginalis*에 대한 항균효과가 높은 유산균주를 선별한 뒤 장내 환경과 같은 산성 및 담즙염에 대한 생균력을 확인하기 위해 Guo의 방법 [10]으로 실험을 진행하였다. 선별된 유산균주를 MRS 배지에 24시간 전배양 한 뒤, OD₆₀₀ 1.0으로 조정하여 새로운 MRS 배지에 1% 접종하여 18시간 배양하였다. 배양액은 원심분리 (4,000 × g, 4°C, 5분)한 후, phosphate-buffer saline (PBS, pH 7)에 2번 세척하였고, OD₆₀₀ 1.0 (10⁸~10⁹ CFU/mL)으로 조정하여 각각 산성과 담즙염에 대한 내성 실험에 사용하였다. 산성에 대한 내성을 확인하기 위하여 유산균 희석액 1 mL를 9 mL PBS (pH 2와 7)에 첨가 후 진탕한 뒤 37°C에서 3시간 배양한 후 생균수를 확인하였다. 최종 선별된 유산균은 pH 2에서 7까지 산성에 대한 내성

을 확인하였다. 담즙염 내성은 1% oxgall (Difco, MI, USA)을 포함한 MRS 배지에 유산균 희석액을 1% 접종하고 37°C에 24시간 배양한 후 생균수를 확인하였다.

2.3. Autoaggregation

*G. vaginalis*에 대한 항균 효과가 우수한 유산균주를 선별하여 장내 세포 내 부착능력을 간접적으로 확인하기 위하여 Kassa의 연구 [11]를 변형하여 autoaggregation 실험을 진행하였다. MRS 배지에 유산균을 전 배양한 배양액을 OD₆₀₀ 1.0으로 조정하여 새로운 5 mL MRS 배지에 1% 접종한 뒤, 18시간 배양하여 실험에 사용하였다. 배양한 유산균은 원심분리 (4,000 × g, 4°C, 5분)한 후, PBS에 2번 세척하였고, OD₆₀₀ 1.0 (10⁸~10⁹ CFU/mL)으로 조정하여 균주 현탁액 5 mL을 10초간 진탕한 뒤 5시간 동안 방치하면서 autoaggregation을 확인하였다. 실험 시작 직후 (A0)와 5시간 후 (A), 각각 0.1 mL의 상등액을 취해 0.9 mL PBS와 혼합한 뒤 600 nm에서 흡광도를 측정 (A0, A)하였고, 다음 계산식에 따라 autoaggregation을 계산하였다.

$$\text{Autoaggregation (\%)} = \frac{(A0 - A)}{A0} \times 100$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균효과

세균성 질증을 일으키는 주요 원인균 중 *G. vaginalis*는 통성 혐기성 세균으로 질 내에서 증식하면서 질 내 산도를 pH 4.5 이상으로 높이고, 이로 인해 다른 병원성 세균이 증식할 수 있는 환경을 만들면서 세균성 질증을 일으킨다고 알려져 있다 [12]. 최근에는 *G. vaginalis*는 biofilm 부착력이 뛰어나고 부착 후 다른 세균성 질증 균들의 부착을 증진시킨다고 보고되고 있다 [13]. 따라서 본 연구에서는 국내 여성의 질에서 분리한 유산균주를 질증의 주요 원인균인 *G. vaginalis*를 대상으로 항균력 실험을 진행하였다. 분리된 유산균주 90종에 대한 *G. vaginalis*의 항균 효과는 평균 45.02% 였으며 이중 높은 항균력을 나타내는 9 균주 (KLB403, KLB404, KLB407, KLB408, KLB409, KLB410, KLB411, KLB413, KLB416)의 항균 효과는 평균 99.27%이었다 (Fig. 1). 유산균은 배양과정 중 젖산, 과산화수소, 박테리옌 등을 생산하며, 이를 통해 항균 효과를 보이는 것으로 알려져 있으며 [7], 1차 선별한 9 균주는 이러한 항균물질 생산능이 다른 분리균주보다 높은 균주로 사료되며 앞으로 정확한 항균물질에 대한 연구가 필요하다.

3.2. 선별 균주의 산성 및 담즙염에 대한 내성 확인

일반적으로 프로바이오틱스에 사용되는 유산균은 섭취 시 위와 장을 거치며 생균력이 낮아지게 되므로 낮은 산도와 담즙염에 대한 내성능력은 유용 미생물로 사용하기 위하여 필

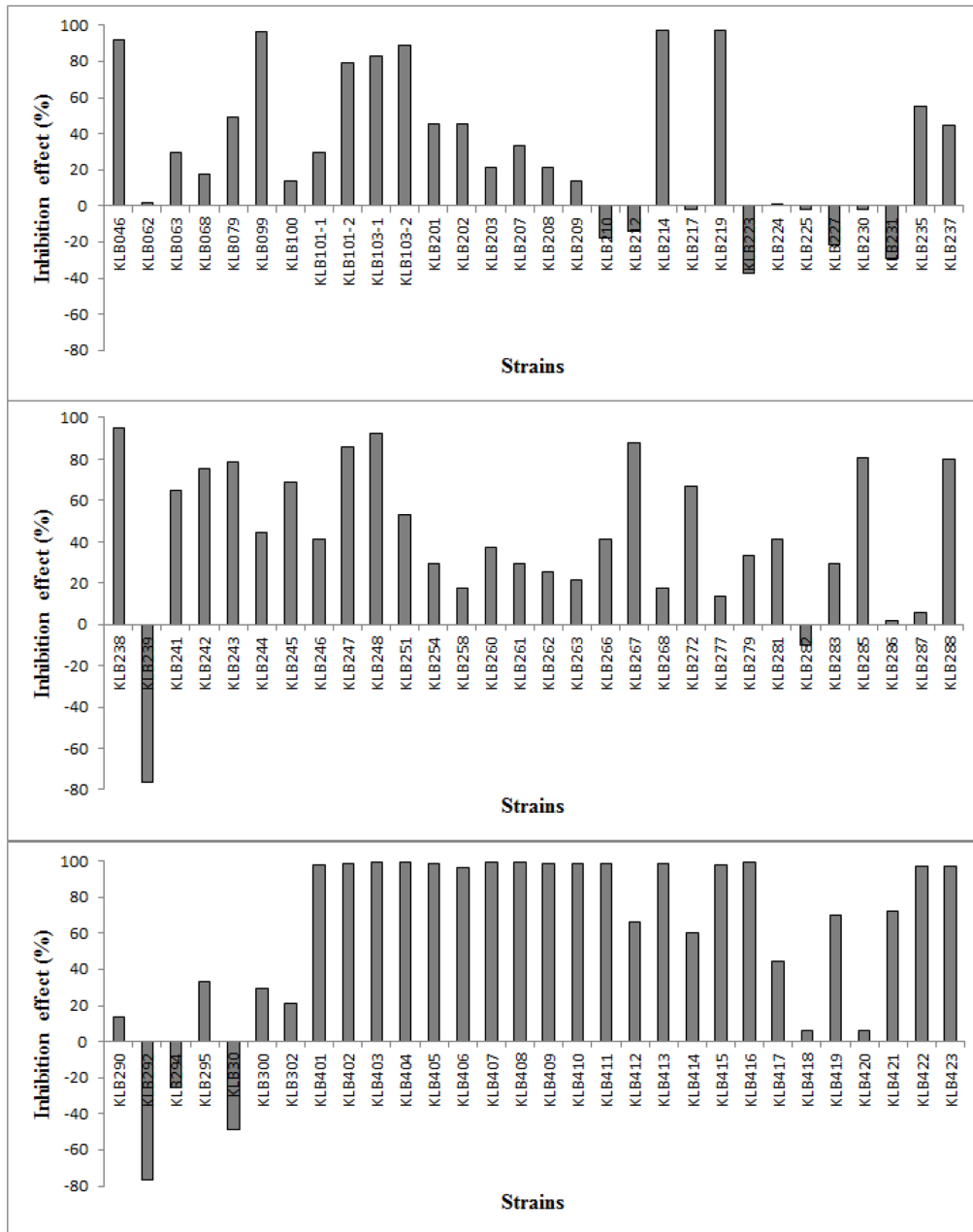


Fig. 1. Inhibition effect of cell free supernatants of vaginal lactobacilli antagonistic to *Gardnerella vaginalis*.

수적으로 지켜야 하는 요소이다 [14]. 따라서 본 연구에서는 *G. vaginalis*에 대해 높은 항균 효과를 보인 9 균주에 대해서 산성 및 담즙염에 대한 내성을 확인하였다 (Table 1).

산성에 대한 내성실험의 결과, pH 2에서 KLB413 (4.73 log CFU/mL)과 KLB416 (4.66 log CFU/mL) 균주를 제외한 7 균주에서는 10⁴ CFU/mL 이하의 생균수를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 pH 7에서의 생균수 대비 pH 2에서의 생균수가 가장 높은 균주는 KLB416으로 0.17%의 생존률을 나타내었다. KLB416은 pH 7에서 pH 4까지 생균수에 변화가 없지만, pH가 낮아질수록 생균수가 감소하는 것을 확인할 수 있

었다 (Fig. 2). Guo [10]와 Tasi [15]의 연구에서도 본 연구와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 체내 위액의 pH는 대략 3.0으로 유지되며, 일반적으로 pH 3에서 3시간 이상 생균수를 유지하면 산성에 높은 내성을 보이는 것으로 알려져 있다 [10]. Mishra의 연구 [16]에서 프로바이오틱스로 사용되는 여러 균주들의 산성에 대한 내성을 살펴보면, pH 2에서 모든 균주가 10⁴ CFU/mL 이하의 생균수를 보이는 것을 확인할 수 있는데, 본 연구에 사용된 KLB416 균주의 경우 pH 3에서 6.47 log CFU/mL, pH 2에서 4.66 log CFU/mL의 생균수를 유지하여 산성에 대해 우수한 내성능력을 가지고 있는 것을

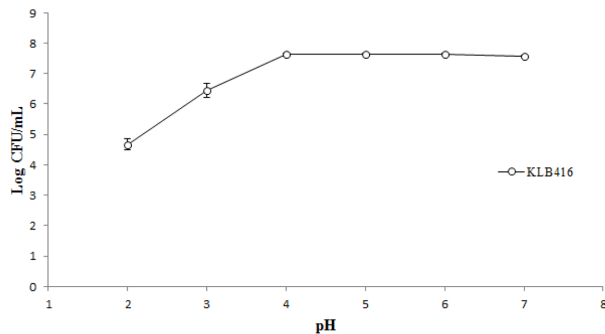
Table 1. Effect of pH and bile salt on the survival of selected strains

Selected strains	pH tolerance ¹⁾		Bile-salts tolerance ²⁾	
	pH 7	pH2	0%	1%
KLB403	7.72 ± 0.04	<2 ³⁾	9.63 ± 0.02	8.29 ± 0.03
KLB407	7.61 ± 0.02	3.02 ± 0.36	9.61 ± 0.11	8.11 ± 0.00
KLB408	7.56 ± 0.02	3.88 ± 0.02	9.45 ± 0.01	8.25 ± 0.05
KLB409	7.70 ± 0.01	3.79 ± 0.06	9.51 ± 0.07	8.06 ± 0.06
KLB410	7.64 ± 0.00	3.83 ± 0.11	9.40 ± 0.02	8.40 ± 0.04
KLB411	7.53 ± 0.03	3.55 ± 0.02	9.54 ± 0.03	7.67 ± 0.30
KLB413	8.36 ± 0.02	4.73 ± 0.02	9.27 ± 0.01	7.47 ± 0.19
KLB416	7.46 ± 0.01	4.66 ± 0.19	9.45 ± 0.01	8.00 ± 0.04

¹⁾The pH tolerance results are shown the viable counts (log CFU/mL) of each isolate at pH 7 and pH 2 for 3 h.

²⁾Bile-salts tolerance results are shown as the viable counts (log CFU/mL) of each isolate at MRS media with 0 % and 1 % Oxgall at 37°C for 24 h.

³⁾Below 2.00 log CFU/mL.

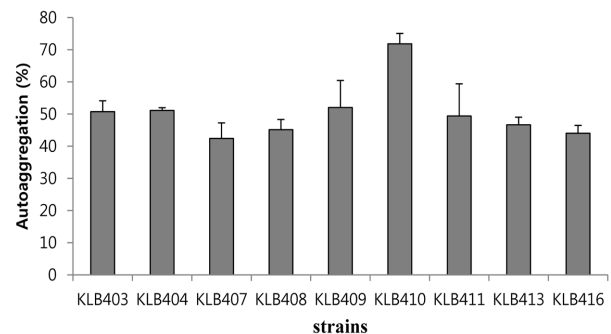
**Fig. 2.** Survivability of KLB416 in acid condition for 3 h.

확인할 수 있다.

프로바이오틱스에 사용되는 유산균이 위에서 견디기 위해 산성 내성을 지녀야 한다면 장내 극한 환경에서 생존하기 위해서는 쓸개에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 지녀야 한다 [14]. 일반적으로 유산균의 담즙염에 대한 내성을 확인하기 위해서는 일반적으로 0.3%의 담즙염이 사용되고 있는데 [17], Lin의 연구 결과 [18]에서 0.3% 담즙염에서 유산균들의 생존수가 10^4 CFU/mL 이하로 담즙염에 민감하다고 알려져 있다. 그러나 본 연구에서 선별된 9 균주들은 1% 담즙염 농도에서도 평균 8.03 log CFU/mL의 매우 높은 생존수를 보여, 담즙염에 대해 매우 우수한 내성을 보이는 것을 확인할 수 있다.

3.3. Autoaggregation

프로바이오틱스로 사용되는 유산균의 경우, 체내에서 지속적으로 작용하기 위해서 장 및 질 세포에 부착할 수 있는 세포부착능이 요구된다 [19]. Autoaggregation 능력은 세포 부착능을 간접적으로 확인할 수 있는 방법으로, Del [19]과 Kos [20]의 연구결과에 따르면, autoaggregation 능력이 높은 균주가 실제 세포 부착능력 또한 높다고 알려져 있다. 이에 *G. vaginalis*에 높은 항균능력을 보이는 9 균주를 대상으로 장내 부착성을 알아보기 위하여 autoaggregation 실험을 진행하였다

**Fig. 3.** The autoaggregation ability for 5 h.

(Fig. 3). 선별된 9 균주에 대한 autoaggregation 능력은 평균 50.36%였으며 이 중 KLB410 균주가 71.82%로 가장 높은 autoaggregation 능력을 나타내었다. Malik의 연구결과 [21]에 따르면, *L. plantarum* CMPG5300의 *in vitro* 상의 autoaggregation이 약 70%로 나타났으며, *in vivo* 상인 질 상피세포에서의 부착능도 50%로 *in vitro* 상의 결과와 *in vivo* 상의 결과가 연관되어 있다고 보고되었다. 세포부착능이 뛰어난 균주는 세포에 자리를 잡아 병원균의 세포 부착을 막아 감염을 막는 특성을 가지는 것으로 알려져 있으며 [7], 본 연구에서 선별된 KLB410 균주 또한 질 내 세포에 높은 부착능력을 통해 추가적인 병원균 감염을 예방할 수 있을 것이라 사료된다.

3.4. 계통수 분석

본 연구에서 *G. vaginalis*에 높은 항균능력을 보인 9 균주 중, 산성 환경에서 내성이 우수한 KLB416 균주와 autoaggregation 능력이 우수한 KLB410 균주의 16S rRNA gene sequencing 결과, *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다 (Fig. 4). *L. plantarum* KLB410과 *L. plantarum* KLB416 균주는 각각 National Center of Biotechnology Information으로부터 accession number KM670024 (KLB416), KT236093 (KLB410)을 부여받았다. *L. plantarum*은 유제품, 고기, 발효된 채소에 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라, 사람의 체내에도 상존하는 균

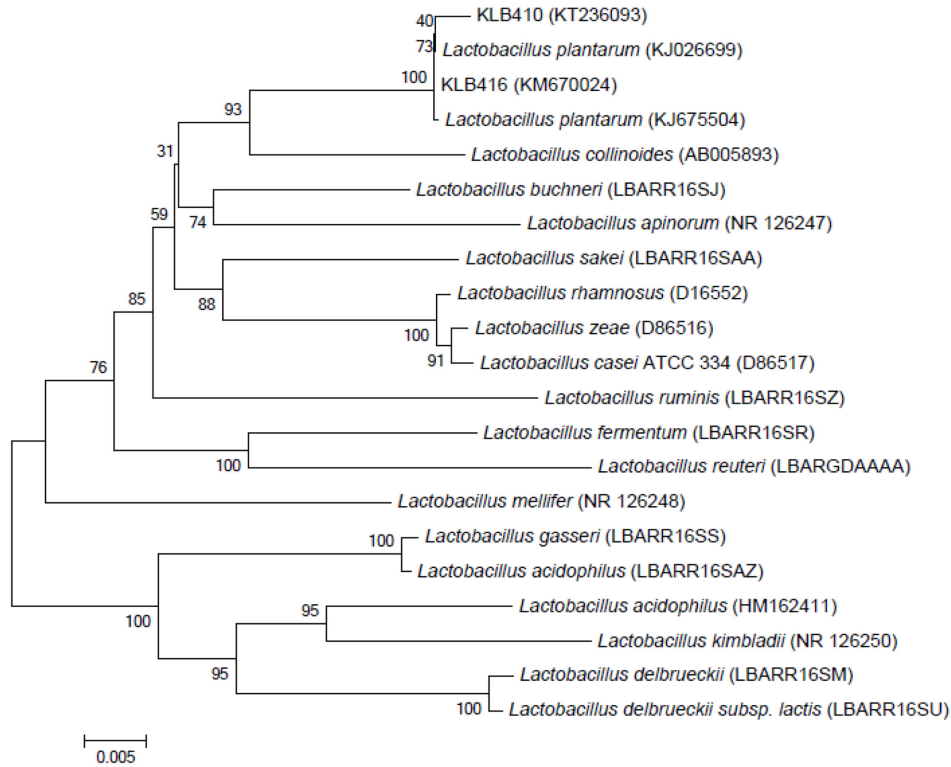


Fig. 4. Phylogenetic analysis of selected *Lactobacillus* spp. compared to other lactobacilli.

주로 잘 알려져있다 [22]. 또한 *L. plantarum*는 식품의약품안전처 건강기능식품의 기준 및 규격 [23]에 등재되어 안전성이 확인된 균주이다.

4. CONCLUSION

본 연구는 한국 여성 질에서 분리한 유산균을 통해 세균성 질증의 치료 일환으로 주요 원인균인 *Gardnerella vaginalis*에 대해 항균효과를 확인하였다. 항균효과가 높은 9 균주의 *G. vaginalis*에 대한 평균 항균효과는 99.27%였으며, 항균효과가 우수한 균주를 대상으로 추가적인 특성 확인을 위해 산성 및 담즙염에 대한 내성과 autoaggregation을 확인하였다. 산성 환경에서 내성이 가장 우수한 KLB416 균주와 autoaggregation 능력이 가장 우수한 KLB410 균주는 모두 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었으며, *L. plantarum*은 건강기능식품의 기준 및 규격에 등재되어 있는 균주로 그 안전성이 이미 입증되어 있다. 이에 최종 선별된 *L. plantarum* KLB410 균주와 *L. plantarum* KLB416 균주는 향후 질 건강을 위한 프로바이오틱스 개발 분야에 주요한 소재자원으로 활용될 수 있을 것이라 기대된다. 추후 선별된 유산균주는 프로바이오틱스로 개발하기 위하여 위액과 장액에서의 안정성 실험 및 동결 건조 보호제 최적화 연구를 진행할 것이다.

REFERENCES

1. Mastromarino, P., B. Vitali, and L. Mosca (2013) Bacterial vaginosis: A review on clinical trials with probiotics. *New Microbiologica* 36: 229-238.
2. Chen, K. C., P. S. Forsyth, T. M. Buchanan, and K. K. Holmes (1979) Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginitis. *J. Clin. Invest.* 63: 826-835.
3. Verstraelena, H., and A. C Senok (2005) Vaginal lactobacilli, probiotics, and IVF. *Reprod. Biomed. Online* 11: 674-675.
4. Wiesenfeld, H. C, S. L. Hillier, M. A. Krohn, D. V. Landers, and R. L. Sweet (2003) Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36: 663-668.
5. Bradshaw, C. S., A. N. Morton, J. Hocking, S. M. Garland, M. B. Morris, L. M. Moss, L. B. Horvath, I. Kuzevska, and C. K. Fairley (2006) High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J. Infect. Dis.* 193: 1478-1486.
6. Falagas, M. E., G. I. Betsi, and S. Athanasiou (2007) Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 657-664.
7. Borge, S., J. Silva, and P. Teixeira (2013) The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 289: 479-489.
8. Bastani, P., A. Homayouni, S. Ziyadi, and V. G. Tabrizian (2012) Dairy Probiotic Foods and Bacterial Vaginosis: A Review on Me-

- chanism of Action. pp. 445-456. In: Probiotics, Rigobelo, E. C. (Ed.), Intech., USA.
9. Chang, C. E., S. I. Pavlova, L. Tao, E. Kim, S. C. Kim, H. S. Yun and J. S. So (2002) Molecular Identification of Vaginal *Lactobacillus* spp. Isolated from Korean Women. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 312-317.
 10. Guo, X. H., J. M. Kim, H. M. Nam, S. Y. Park and J. M. Kim (2010) Screening lactic acid bacteria from swine origins for multi-strain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe* 16: 321-326.
 11. Kassa, I. A., M. Hamze, D. Hober, N. E. Chihib and D. Drider (2014) Identification of Vaginal Lactobacilli with Potential Probiotic Properties Isolated from Women in North Lebanon. *Microb. Ecol.* 67: 722-734.
 12. Borchardt, K. A., B. S. Adly, R. F. Smith, J. Eapen, and C. B. Beal (1989) Importance of *Gardnerella vaginalis* as an aetiological agent in bacterial vaginosis. *Genitourin. Med.* 65: 285.
 13. Machado, A., K. K. Jefferson, and N. Cerca (2013) Interactions between *Lactobacillus crispatus* and Bacterial Vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 12004-12012.
 14. Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins (2001) *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 386S-392S.
 15. Tasi, C. C., H. Y. Hsieh, H. H. Chiu, Y. Y. Lai, J. H. Liu, B. Yu (2005) Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 185-194.
 16. Mishra, V., and D. N. Prasad (2005) Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 109-115.
 17. Gilliland, S. E., T. E. Staley, and L. J. Bush (1984) Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67: 3045-3301.
 18. Lin, W. H., C. F. Hwangb, L. W. Chenc, and H. Y. Tsen (2006) Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.* 23: 74-81.
 19. Del, R. B. Sgorbati, M. Moglioli and D. Palenzona (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:438-442.
 20. Kos, B., J. Šušková, S. Vuković, M. Šimpraga, J. Frece and S. Matošić (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94: 981-987.
 21. Malik, S., M. I. Petrova, I. J. J. Claes, T. L. A. Verhoeven, P. Busschaert, M. Vaneechoutte, B. Lievens, I. Lambrechts, R. J. Siezen, J. Balzarini, J. Vanderleyden and S. Lebeer (2013) The highly auto-aggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain CMPG5300 is sortase dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 4576-4585.
 22. Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Turchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. E. J. Fiers, W. Stiekema, R. M. K. Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. N. Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos, and R. J. Siezen (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1990-1995.
 23. Ministry of Food and Drug Safety, The standard for health functional food. <http://www.mfds.go.kr>. (2014).