

한국인 여성 및 식품 유래 유산균의 생리적 특성 및 지방분화 억제효과

강창호^{1*}, 정올아¹, 한설화¹, 김진성¹, 김용경¹, 박혜민¹, 최수임², 백남수¹

In vitro Probiotic Evaluation of Potential Antiobesity Lactic Acid Bacteria Isolated from Human Vagina and Shellfish

Chang-Ho Kang^{1*}, Yulah Jeong¹, Seul Hwa Han¹, Jin-Seong Kim¹, YongGyeong Kim¹, Hye Min Park¹, Soo-Im Choi², and Nam-Soo Paek¹

Received: 18 June 2018 / Revised: 10 August 2018 / Accepted: 13 August 2018

© 2018 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Obesity is the most common health problem in developed countries and is considered a significant risk factor for many major human diseases. This study aimed to evaluate the inhibitory effect of lactic acid bacteria isolated from the human vagina and shellfish on adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. The activity of separated 221 strains on pancrease lipase was measured and 15 strains were first screened. The level of adipogenesis of these strains in the 3T3-L1 cells was measured by Oil Red O staining assay. Five strains including *Lactobacillus plantarum* (2 strains) and *L. fermentum* (3 strains) showed good adipocyte differentiation inhibitory activity. Also, the selected strains were resistant to bile acid up to 3% and their autoaggregation rates were as high as 50%. These *Lactobacillus* strains with probiotics potential may be useful for prevention or treatment of obesity, but further *in vitro* and *in vivo* studies on these strains are still required.

Keywords: lactic acid bacteria, antiobesity, probiotic, *Lactobacillus* spp.

1. INTRODUCTION

유산균은 특별한 생리활성능력을 가지고 있으며, 일반적으로 안전한 균주 (GRAS, generally regarded as safe bacteria)로 취급되고 있다. 유산균은 다양한 발효식품의 생산에 사용하고 있을 뿐만 아니라, 기능성과 프로바이오틱스 특성을 가지는 유제품과 발효과채 제품에 널리 사용되고 있다 [1]. 최근에는 화학보조제를 대체하는 천연보조제에 대한 소비자의 수요가 증가함에 따라 그 대안방안으로 부각되고 있다. 프로바이오틱스는 숙주동물의 건강에 매우 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물로, 장내 미생물의 균형을 개선하고 영양분의 흡수를 증진시킨다 [2]. 또한, 프로바이오틱스는 장내환경에서 병원성미생물의 항균작용을 나타내는 특성을 가지고 있다 [3]. 프로바이오틱스에는 다양한 미생물이 포함되지만, *Lactobacillus* 속과 *Bifidobacterium* 속이 가장 많은 분포를 차지하고 있다. *Lactobacilli* 속은 일반적으로 유제품, 육류, 과채 및 시리얼 제품의 발효공정에 사용되고 있다.

비만은 심장병, 암, 관절염, 당뇨병의 주요 원인으로 알려져 있으며, 비만을 해결하기 위한 대중의 인식은 증가함에도 불구하고, 비만환자들은 지속적으로 증가하고 있는 추세이다 [4]. 비만은 지방분화 (adipogenesis)의 결과로 지방세포의 수가 증가하고 지방세포의 지질함량이 증가함에 따라 나타난다. 지방세포 (adipocyte)는 초과된 칼로리를 중성지방 (triglycerides)으로 합성하고 저장하는데 주요역할을 하며, 지방분화의 결과로 지방세포의 크기와 숫자가 증가하고 세포 내 지질축적이 가속화된다 [5]. 유산균은 기존의 연구를 통해 면역 반응 조절효과와 항암 및 항산화 효과가 우수하다고 알려져 있다 [6]. 게다가, 유산균은 과체중 성인의 지방조직에서 지

¹(주)메디오젠
MEDIOPEN, Co., Ltd., Seoul 04146, Korea
Tel: +82-2-858-3017, Fax: +82-2-858-3018
e-mail: changho-kang@naver.com

²덕성여자대학교 식물자원연구소
³Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University,
Seoul 01369, Korea

방세포의 수를 조절하는 효과가 있다고 알려져 있으며 [7], 동물시험 모델에서도 지방분화 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다 [8].

본 연구는 한국인 인체 유래 유산균으로부터 분리·선별된 유산균의 지방분화 억제효과와 프로바이오틱스로서의 가능성을 확인하고자 한다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 균주 및 유산균 시료

본 연구팀의 선행연구 [9]를 통해 분리한 한국인 여성의 질 및 식품유래 유산균을 사용하여 본 연구를 수행하였다. 실험 시료는 유산균주를 37°C에서 18시간 배양한 배양액을 원심 분리 (1,100×g, 4°C, 3분)한 후, phosphate-buffer saline (PBS, pH 7)에 2번 세척하였다. 세척한 유산균주는 동결건조 후 PBS로 10 mg/mL 농도로 재현탁한 후, sonicator (VCX 400, Sonics & Materials Inc., CT, USA)를 이용하여 균질화하였다. 균질화된 유산균주는 원심분리 (1,100×g, 4°C, 15분)한 후, 시료로 사용하였다.

2.2. 췌장 Lipase 활성 억제능 측정

본 연구에서의 lipase 억제활성은 Lee 등의 방법 [10]을 변형하여 측정하였다. Porcine pancreatic lipase (Sigma, USA)를 이용하여 lipase 활성저해 정도를 측정하였다. 시료를 0.1 mg/mL의 농도로 희석한 후에 0.167 mM *p*-nitrophenylpalmitate (PNP; Sigma, USA)용액, 0.061 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 0.3 mg/mL lipase 용액과 함께 plate에 넣어 25°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, blank는 enzyme를 증류수로, control은 시료를 용매로 대체하였다. Lipase 억제활성은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Lipase inhibition activity(\%)} = \{1 - (\text{시료의 흡광도} / \text{control의 흡광도})\} \times 100$$

2.3. 3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, MD, USA)에서 구입하였다. 3T3-L1 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, NY, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂/95% air가 공급되는 조건에서 배양하였다.

3T3-L1 지방전구세포의 분화를 유도하기 위하여 각 96 well plate에 1.25×10⁵ cell/well로 분주하고, 2일 후 배지를 교환하여 4일째에 세포가 완전히 융합상태가 되도록 한다. 10% FBS DMEM 배지에 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, and 1 μg/mL insulin) 용액을 처리하여 분화를 유도하였다. 지방세포의 분화는 6일 후 완료하여 실험을 진행하였다. 양성대조군은 지방분화 억제가 우수하다고

알려진 baicalin (100 μM)을 사용하였다 [11].

2.4. 세포 생존율 측정 (MTT assay)

유산균 시료에 대한 3T3-L1 세포 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법 [12]을 이용하였다. 3T3-L1 세포는 16×10⁴ cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하고, 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 DMEM배지 100 μL에 농도별로 희석한 유산균 시료 (100, 1,000 μg/mL)를 각각 첨가하여 24시간 배양한 다음, 5 mg/mL로 제조한 MTT (Sigma, USA) 용액 20 μL를 첨가하고, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고, 200 μL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후, microplate reader (Bio-Rad Model 550; Hercules, CA, USA)로 546 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Oil-Red O 염색

3T3-L1 세포 내 생성된 지질의 축적량은 세포 내 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil Red O (Sigma, USA)를 사용하여 측정하였다 [13]. 지방분화가 끝난 후, 배지를 제거한 뒤에 PBS로 2번 세척하고, 10% formalin으로 4°C에서 1시간 동안 고정하였다. 고정된 3T3-L1 세포를 60% isopropanol (in PBS)로 2번 세척하고 0.5% Oil Red O 용액으로 30분 동안 실온에서 염색하였다. 염색 후, 염색액을 제거하고 증류수를 이용하여 2번 세척하였다. 정량은 증류수를 제거하여 완전히 마른 well에 isopropyl alcohol을 첨가한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 선별된 유산균주의 동정 및 SEM 분석

선별된 유산균주는 MRS 액체배지에서 37°C에서 24시간 배양한 후 그람염색 [14]을 실시하여 위상차 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 선별된 유산균주의 동정을 위하여 16S rRNA gene sequencing을 수행하였으며 [15], 유전자의 증폭은 the universal rRNA gene primers (27F and 1492R)를 사용하였고, 각 과정은 Sol-Gent Co. (Daejeon, Korea)을 통하여 진행하였다. 이후 분석된 16S rRNA sequencing 결과는 National Center for biotechnology Institute (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 통해 Genbank database와 비교하여 동정하였다 [16].

선별된 유산균주의 세포의 형태를 관찰하기 위해 1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 용액에 4°C, 24시간 동안 고정화 과정을 거친 후, 에탄올에 탈수시켜 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, S-4300, Hitach, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2.7. 선별된 유산균주의 내산성 및 내담즙성 측정

선별된 유산균주의 장내 환경과 같은 인공 위산 및 인공담즙에 대한 내성을 확인하기 위해 Maragkoudakis의 방법 [17]으로 실험하였다. 선별된 유산균주를 18시간 동안 배양한 후,

원심분리 (2,000×g, 4°C, 5분)하여 PBS로 2번 세척하였고, 10⁸ CFU/mL 농도로 현탁하여 내성 실험에 사용하였다. 인공위산에 대한 내성을 확인하기 위하여 PBS (pH 2, 3, 4)에 pepsin (Sigma-aldrich, USA)의 최종농도가 3 g/L가 되도록 첨가한 후, 유산균 현탁액을 추가하여 37°C에서 3시간 배양한 후 생균수를 확인하였다. 인공담즙염 내성은 PBS (pH 7, 8)에 pancreatin (Sigma-aldrich, USA)의 최종농도가 1 g/L가 되도록 첨가한 후, 유산균 현탁액을 추가하여 37°C에서 4시간 배양한 후 생균수를 확인하였다.

2.8. 선별된 유산균주의 Autoaggregation

장내 세포 내 부착능력을 간접적으로 확인하기 위하여 Pascual의 연구 [18]를 변형하여 autoaggregation 실험을 진행하였다. 선별된 유산균주를 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 원심분리 (4,000×g, 4°C, 5분)하여 PBS로 2번 세척하였다. 최종농도가 OD₆₀₀ 1.0이 되도록 재현탁한 후, 현탁액 5 mL을 10 초간 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.

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

2.9. 선별된 유산균주의 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines를 따라 MHA 배지를 이용 disc method에 의해 수행하였다. 선별된 유산균주를 MRS 액체배지에서 배양한 후, 10⁴ CFU/mL 정도의 균체를 MHA 배지에 도달한 후, 항생제 디스크 (BBL, Becton Dickinson, USA)를 올려놓았다. 37°C에서 24시간 배양한 후 억제환의 크기를 mm 단위로 측정하여 표준지표에 따라 판정하였다. 사용한 항생제 디스크는 ampicillin (AM, 10 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), cefotetan (CTT, 30 µg), cephalothin (CF, 30 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), cefepime (CEP, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), gentamicin (GM, 10 µg), kanamycin (K, 30 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), rifampin (RA, 5 µg), streptomycin (S, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25 µg/23.75 µg), vancomycin (VA, 30 µg)을 사용하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 지방분화세포 억제활성 균주의 선발

비만의 예방 및 치료방법에 대해서 다양한 접근방식이 알려져 있다 [19]. 이들 중, 효과적인 췌장 lipase 억제능은 장내 지방 흡수 억제로 인해 비만 예방에 효과가 있다고 알려져 있다 [20]. 분리된 221 균주를 대상으로 췌장 lipase 효소 활성 억제능

이 높은 14 균주를 1차 선별하였으며, MG242 균주가 22.45%로 가장 높은 억제활성을 나타내었다 (Table 1). 억제활성이 높은 14 균주에 대해서 3T3-L1 세포에 세포독성을 나타내는지 측정하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 1,000 µg/mL 농도 수준 이하에서 세포의 생존력에 영향을 주지 않아 세포독성이 없는 것으로 확인되었다 (Table 1). 또한 이들 선별 균주의 배양상등액을 1,000 µg/mL 농도로 배지에 첨가하여 3T3-L1 아지방세포의 지방세포로의 분화과정에서의 분화 억제활성을 Oil Red O 염색법으로 확인하였다.

지방세포분화 (adipogenesis)과정은 매우 복잡한 분화과정으로 성장인자, 사이토카인, 호르몬 등의 신호에 의해 전지방세포에서 다양한 지방세포로 전환된다 [21]. 본 연구에서는 양성대조군으로 지방세포 분화 억제 활성이 있다고 알려진 baicalin (100 µM)을 사용하였으며, 생성된 지방구 (lipid drop) 함량을 MDI 처리군과 비교하였다. MDI 처리군의 지질함량이 100%일 때, 양성대조군인 baicalin 처리군은 81.40%의 상대적 지질함량을 나타내었다. 유산균주 처리군에서는 MG242가 67.23%로 가장 우수한 지방분화억제 효과를 확인할 수 있었으며, MG4244 (71.90%), MG4270 (73.14%), MG4261 (75.52%)의 순으로 억제효과가 나타났다 (Table 1). 기존의 연구결과 [22]에 따르면, *Lactobacillus* spp.가 장내세균인 대장균과 살모넬라에 억제효과가 있다고 알려져 있으며, 최근에는 지방분화 억제효능이 밝혀지고 있다. 최 등의 연구 [23]에 따르면, *Bifidobacterium breve*를 구강으로 섭취하였을 때 3T3-

Table 1. The Effect of anti-lipase activity and Oil red O stained in 3T3-L1 adipocytes of selected lactic acid bacteria

Strains	Anti-lipase activity (%)	Lipid accumulation (% of control)	MTT assay (Inhibition rate)
MG242	22.45	67.32	91.52
MG4227	12.24	84.46	92.52
MG4231	12.24	80.04	99.63
MG4244	11.22	71.90	108.42
MG4261	10.53	75.52	98.85
MG4270	11.84	73.14	88.60
MG5008	10.53	83.15	80.49
MG5013	12.24	81.50	97.00
MG5029	11.84	83.45	88.07
MG5033	10.53	77.02	92.75
MG5040	10.53	82.94	81.15
MG5055	10.53	75.56	84.06
MG5087	11.84	78.74	96.32
MG5098	14.47	80.71	88.07

Table 2. Identification of strains by 16S rRNA sequencing

Isolates	Strain	Homologous microorganism
Human vagina	MG4231	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MG4244	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MG4261	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	MG4270	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Crassostrea gigas</i>	MG5087	<i>Lactobacillus plantarum</i>

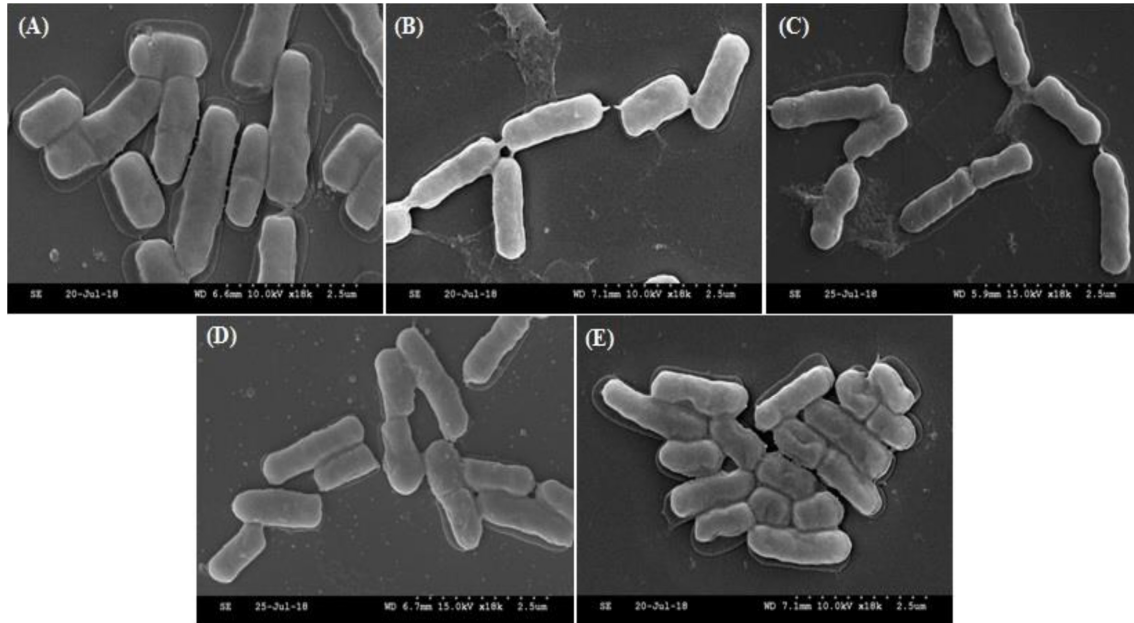


Fig. 1. SEM images of selected strains. (A) *L. fermentum* MG4231, (B) *L. fermentum* MG4244, (C) *L. fermentum* MG4261, (D) *L. plantarum* MG4270, (E) *L. plantarum* MG5087.

L1 지방세포의 분화를 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

3.2. 선별 유산균주의 동정

최종 선별된 지방분화세포 억제활성능이 있는 5 균주에 대한 동정을 진행하였으며, *L. plantarum* 2종과 *L. fermentum* 3종으로 동정되었다. 선별된 5 균주에 대한 세포의 형태는 주사전자현미경을 통하여 관찰하였으며 모두 간균의 형태인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). *L. plantarum*과 *L. fermentum*는 식품의약품안전처 건강기능식품의 기준 및 규격 [24]에 등재되어 안전성이 확인된 균주이다.

3.3. 선별된 유산균주의 내산성 및 내담즙성

프로바이오틱스 균주는 산성 위, 다양한 효소, 장내 담즙염 등 다양한 스트레스 환경을 통과하여 생존하여야 한다 [25]. 위에서의 낮은 pH 환경과 pepsin의 항균작용은 장내환경에 세균이 들어오는데 있어 효과적인 장벽으로 작용하고 있다. 본 연구에서는 MG4231, MG4244, MG5087이 다른 균주에 비해서 인공 위액 환경에서 높은 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 산성 pH는 많은 미생물을 사멸시키는 작용을 하기에 인체 내 위를 통과하는 것은 프로바이오틱스 미생물을 선택하는 주요 기준이 된다. 일반적으로 미생물이 위를 통과하는 시간은 3시간 이내인 것으로 알려져 있다

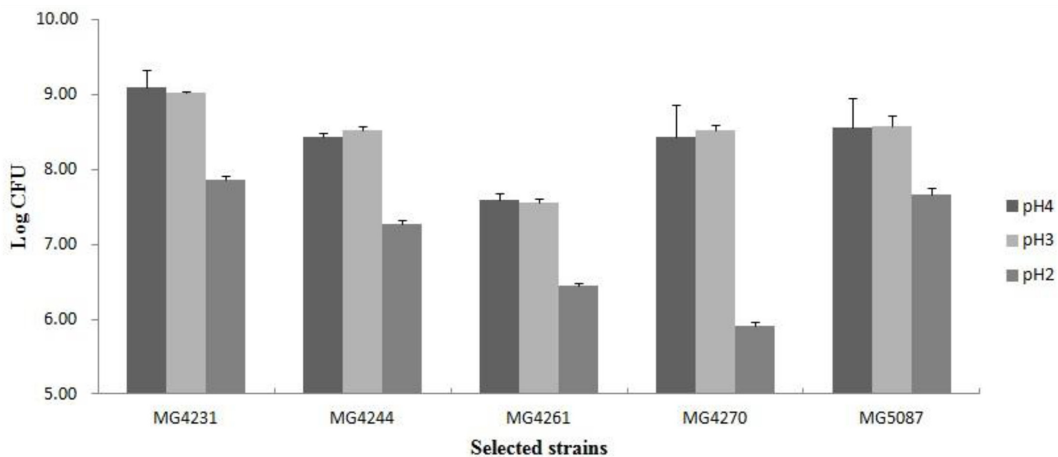


Fig. 2. Survival of selected strains in simulated gastric fluid conditions.

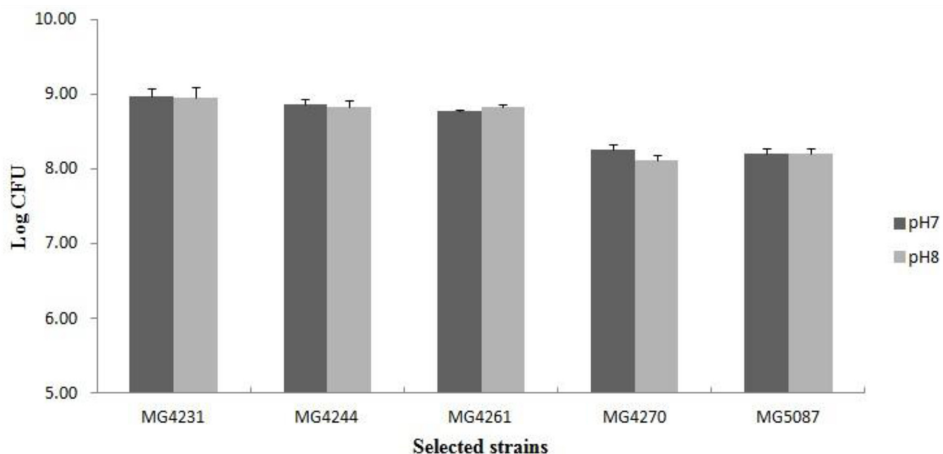


Fig. 3. Survival of selected strains in simulated intestinal fluid conditions.

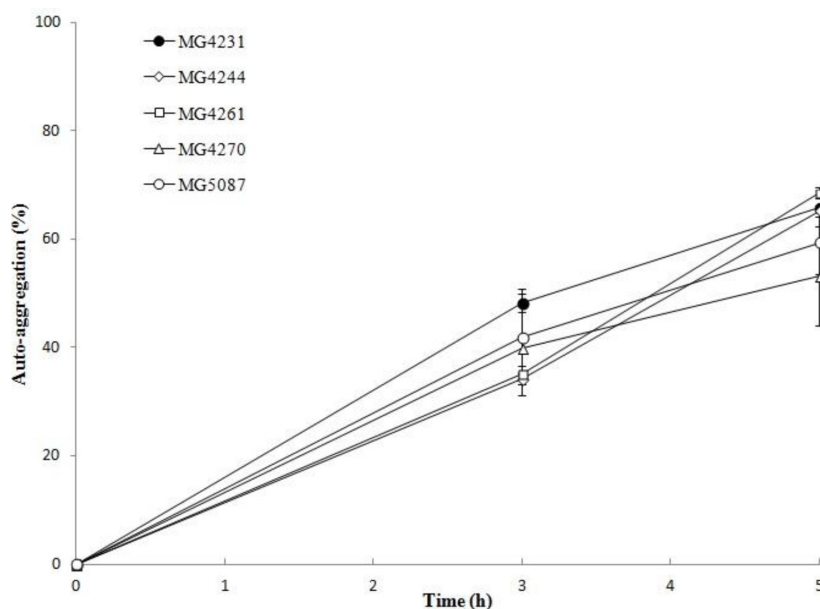


Fig. 4. Comparison of the autoaggregation ability during 5 h of selected strains.

[26]. 담즙산은 십이지장에서 분비되는 물질로 세균의 세포막을 파괴하여 성장을 억제하기 때문에 프로바이오틱스의 기능을 하기 위해서는 담즙에 대한 내성을 지니고 있어야 한다 [27]. 0.3% 농도의 담즙산에서 생존해야지만 인간의 위 장관에서도 생존할 수 있다고 보고되고 있다 [28]. 인공 장내 환경에서는 선별된 균주가 모두 높은 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 담즙염과 pancreatin에 대한 내성은 소장에서 유산균이 생존하는데 있어 주요한 특성으로 알려져 있다 [28].

3.4. 선별된 유산균주의 Autoaggregation

Autoaggregation 능력은 세포 부착능을 간접적으로 확인할 수 있는 방법으로, Del [29]의 연구결과에 따르면, autoaggregation

능력이 높은 균주가 실제 세포부착 능력 또한 높다고 알려져 있다. 본 연구에서 선별된 5 균주에 대한 장내 부착성을 확인하기 위해 autoaggregation 실험을 진행하였다 (Fig. 4). MG4261, MG4231, MG4244 균주가 각각 65.9 ± 0.3 , 65.3 ± 0.9 , $68.6 \pm 0.9\%$ 로 가장 높은 autoaggregation 능력을 보였다.

3.5. 선별된 유산균주의 항생제 내성

유산균은 프로바이오틱스로서 유익한 측면에서의 장점과 더불어 기회감염균으로의 가능성에 대해 확인해 보아야 한다 [30]. 선별된 유산균주에 대한 항생제 내성 특성은 Table 3과 같다. 본 연구에서는 선별된 유산균주가 CTT, GM, K, S, CIP, NA, VA에 내성을 나타내는 것을 확인할 수 있으며, 반대로 AM, C, SXT에는 대부분 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 기

Table 3. Antimicrobial resistance of selected strains

Antimicrobials	MG4231	MG4244	MG4261	MG4270	MG5087
<i>β</i> -Lactams					
Ampicillin (AM)	S ¹	S	S	S	S
Cefotaxime (CTX)	S	S	R	R	S
Cefepime (CEP)	S	S	S	R	I
Cefotetan (CTT)	R ²	R	R	R	I
Cephalothin (CF)	S	S	S	I	S
Aminoglycosides					
Gentamicin (GM)	R	R	R	R	R
Kanamycin (K)	R	R	R	R	R
Streptomycin (S)	R	R	R	R	R
Quinolones and fluoroquinolones					
Ciprofloxacin (CIP)	R	R	R	R	R
Nalidixic acid (NA)	R	R	R	R	R
Sulphonamides					
Sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT)	S	S	S	S	R
Tetracyclines					
Tetracyclin (TE)	S	S	S	I	S
Phenicol					
Chloramphenicol (C)	S	S	S	S	S
Transpeptidation/translocation					
Erythromycin (E)	I ³	S	S	S	S
Glycopeptide					
Vancomycin (VA)	R	R	R	R	S
Nucleic acid inhibition					
Rifampin (RA)	I	S	I	R	S

¹sensitive, ²resistant, ³intermediate.

존의 연구결과 [31]에 따르면, *L. plantarum*의 경우 다양한 항생제에 내성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. Wang의 연구결과 [32]에서도 분리된 유산균의 항생제 내성빈도가 높은 것으로 보고되고 있다. Tulumoglu의 연구결과 [33]에 따르면, 분리된 *L. fermentum* 균주가 S, K, NA, VA 내성을 가지고 있는 것으로 보고하고 있다.

4. CONCLUSION

본 연구는 인체유래 유산균주로부터 지방세포 분화억제 능력이 있는 유산균주를 분리 및 동정하고, 이들 유산균주의 생리적 특성을 규명하여 상업적으로 이용가능성을 검토하고자 하였다. 기존의 선행연구를 통해 확보된 유산균주 221 균주 중 췌장 lipase 효소 활성 억제능이 우수한 14 균주를 1차 선별하였으며, 이 중 3T3-L1 지방세포주에 대한 지방세포 분화 억제능이 우수한 균주 5종을 최종 선별하였다. 16S rRNA sequencing 결과 *L. plantarum* 2종, *L. fermentum* 3종으로 동정되었으며, 모두 식품의 원료로 사용 가능한 안정성이 입증된 균주로 확인되었다. 선별된 유산균주는 인공위액과 인공담즙에 대한 내성이 우수하였으며, autoaggregation능력이 평균 60.3%로 장내 부착성이 우수할 것이라 사료된다. 본 연구를 통해 선별된 유산균주들은 추가 연구를 통해 향후 프로바이

오티크 분야에 주요한 소재원으로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

REFERENCES

- Karahan, A. G., G. B. Kilic, A. Kart, H.S. Aloglu, Z. Oner, S. Aydemir, O. Erkus, and S. Harsa (2010) Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* 93: 1-11.
- Fuller, R (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Akbar, A. and A. K. Anal (2014) Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat. *Food Control* 38: 88-95.
- Hwang, J. H., S. W. Lee, K. H. Han, H. J. Seo, and J. D. Kim (2013) Anti-angiogenesis and Anti-adipogenesis effects of *Anthriscus radix* extract. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 18: 164-172.
- Salminen, M. K., S. Tynkkynen, H. Rautelin, M. Saxelin, M. Vaara, P. Ruutu, S. Sarna, V. Valtonen, and A. Jarvinen (2002) *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin. Infect. Dis.* 35: 1155-1160.

6. Choi, S. S., Y. Kim, K. S. Han, S. You, S. Oh, and S. H. Kim (2006) Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 452-458.
7. Kadooka, Y., M. Sato, K. Imaizumi, A. Ogawa, K. Ikuyama, Y. Akai, M. Okano, M. Kagoshima, and T. Tsuchida (2010) Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 636-643.
8. Takemura, N., T. Okubo, and K. Sonoyama (2010) *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp. Biol. Med.* 235: 849-856.
9. Chang, C. E., S. I. Pavlova, L. Tao, E. K. 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. Lee, Y. P., G. H. Chung, and J. S. Rhee (1993) Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1169: 156-164.
11. Guo, X. and K. Liao (2000) Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene.* 251: 45-53.
12. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 62: 55-63.
13. Ramirez-Zacarias, J. L., F. Castro-Munozledo, and W. Kuri-Harcuch (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochem.* 97: 493-497.
14. Claus, D (1992) A standardized gram staining procedure. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 451-452.
15. Chun, J., J. H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, and B. K. Kim (2007) EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2259-2261.
16. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
17. Maragkoudakis, P.A., G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot, and E. Tsakalidou (2006) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16: 189-199.
18. Pascual, L. M., M. B. Daniele, F. Ruiz, W. Giordano, C. Pájaro, and L. Barberis (2008) *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 141-148.
19. Birari, R. B. and K. K. Bhutani (2007) Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug. Discov. Today* 12: 879-889.
20. Hirose, M., T. Ando, R. Shofiqur, K. Umeda, Y. Kodama, S.V. Nguyen, and T. Goto (2013) Anti-obesity activity of hen egg anti-lipase immunoglobulin yolk, a novel pancreatic lipase Inhibitor. *Nutr. Metab.* 10: 70-75.
21. Cristancho, A. G., and M. A. Lazar (2011) Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 722-734.
22. Pascual, M., M. Hugas, J. I. Badiola, J. M. Monfort, and M. Garriga (1999) *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4981-4986.
23. Choi, I., Y. Kim, Y. Park, H. Seog, and H. Choi (2007) Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by *Bifidobacterium breve*. *Biofactors* 29: 105-112.
24. Ministry of Food and Drug Safety, The standard for health functional food. <http://www.mfds.go.kr>. (2014).
25. Morelli, L (2007) *In vitro* assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *Int. Dairy J.* 17: 1278-1283.
26. Succi, M., P. Tremonte, A. Reale, E. Sorrentino, L. Grazia, S. Pacifico (2005) Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiol.* 244: 129-137.
27. Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, j. Mättö, and T. Mattila-Sandholm (2000) Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.
28. 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: 3045-3051.
29. Del Re, B., B. Sgorbati, M. Miglioli, and D. Palenzona (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 438-442.
30. Temmerman, R., B. Pot, G. Huys, and J. Swings (2003) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 1-10.
31. Zago, M., M.E. Fornasari, D. Carminati, P. Burns, V. Suarez, G. Vinderola, J. Reinheimer, and G. Giraffa (2011) Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28: 1033-1040.
32. Wang, C. Y., P. R. Lin, C. C. Ng, and Y. T. Shyu (2010) Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe.* 16: 578-585.
33. Tulumoglu, S., H. I. Kaya, and O. Simsek (2014) Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe.* 30: 120-125.