

한국여성의 질에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901의 *Gardnerella vaginalis*와 *Candida albicans*에 대한 억제효과 및 특성 규명

백남수^{1*}, 이윤엽¹, 한설화¹, 강창호², 소재성²

Characterization and Inhibitory Activity of *Lactobacillus plantarum* MG989 and *Lactobacillus fermentum* MG901 Isolated from Vaginal Microbiota of Korean Women against *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans*

Nam-Soo Paek^{1*}, Youn Yeop Lee¹, Seul Haw Han¹, Chang-Ho Kang², and Jae-Seong So²

Received: 11 January 2016 / Revised: 15 February 2016 / Accepted: 17 February 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Vaginitis, also known as vaginal infection and vulvovaginitis, is an inflammation of the vagina and possibly vulva. The three main kinds of vaginitis are bacterial vaginosis, vaginal candidiasis, and trichomoniasis. The purpose of this study was to characterize *Lactobacillus plantarum* MG989 and *L. fermentum* MG901 isolated from the vaginas of healthy Korean women in terms of their inhibitory activity against the vaginitis associated pathogens such as *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans*. Co-culture experiments showed that the two *Lactobacillus* strains MG989 and MG901 significantly reduced the viability of *G. vaginalis* and *C. albicans*. Also, the two strains were resistant to bile acid up to 1% and their auto-aggregation rates were as high as 83.33%. Further studies are underway to demonstrate that the two strains can be applied as pharmaceutical agents for recovering healthy vaginal ecosystem.

Keywords: Vaginitis, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Lactobacillus plantarum* MG989, *Lactobacillus fermentum* MG901

1. INTRODUCTION

질염 (Vaginitis)이란 질의 염증으로 비정상적인 질 분비물이 나오는 상태를 말한다 [1]. 질염의 원인으로는 여러 종류가 지목되고 있는데, 감염, 알레르기, 화학적 자극 (피임약 등), 물리적 자극, 임신, 항생제의 과다투여로 질 내 정상균까지 파괴되는 경우, 폐경 (호르몬 변화, 위축성) 등 질을 자극하는 많은 요인이 있다 [2]. 평소에는 에스트로겐이 질 상피세포의 글리코젠을 유지하면서 정상 질 내 세균총 (유산균)을 유지하나, 폐경이나 난소 절제, 항생제 투여 등은 질 내 산도를 변화시키고 이 때문에 유산균 대신 병원균이 번식하기 시작하여 질염으로 발전된다. 질염의 종류는 세균성 질염 (bacterial vaginosis), 칸디다 질염 (Candidiasis), 트리코모나스 질염 (Trichomonas vaginitis)이 있으며, 이 중 세균성 질염과 칸디다 질염이 전체 발병률의 70~80%를 차지한다 [3, 4].

세균성 질염 (bacterial vaginosis)이란 질 내의 건강을 유지하는 유산균총이 감소하여 혐기성 병원균인 *Gardnerella va-*

¹(주)메디오젠

¹MEDIOPEN, Co., Ltd., Seoul 04157, Korea
Tel: +82-2-858-3017, Fax: +82-2-858-3018
e-mail: nspaek@mediopen.co.kr

²인하대학교 생물공학과

²Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea

ginalis, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* spp. 등이 질 내에서 증식하면서 발생하게 되는 질병이다 [4]. 질 내에서 혐기성 병원균이 증식하게 되면 질 내 휘발성 아민 화합물이 증가하며, 이는 세균성 질염 특유의 악취를 유발하게 된다 [5]. 또한 산성으로 유지되는 질 내 산도가 높아져 임신 관련 질병 및 성병 감염의 위험을 높인다고 알려져 있다 [6,7]. 칸디다 질염 (Candidiasis)이란 질 내부의 효모균이 증식하면서 발생하는데, 가장 흔한 원인균은 *Candida albicans*로 알려져 있다 [8]. 일반적으로 약 75%의 여성이 살아가는 동안 한번 이상 질과 외음부의 칸디다성 질염을 겪으며, 45%의 여성이 1년에 2회 이상의 재발을 겪는다고 알려져 있다 [9]. 장기간 항생제를 사용할 때 잘 생기며 임신부나 당뇨병 환자에게 자주 발생하는 질병으로, 재발률이 높은 것이 문제가 되고 있다. 세균성 질염과 칸디다 질염의 치료는 주로 metronidazole, clindamycin 등의 항생제를 복용 또는 주입하는 방법이 사용되고 있지만, 치료 후에도 지속적으로 재발하는 문제점이 있다 [10].

따라서 기존의 항생제 사용의 보완방안으로 병원균의 제거뿐만 아니라 질 내 환경을 개선하여 질염이 재발하는 것을 방지하는 방안 등이 연구되고 있으며, 그 대안 방안으로 살아있는 생균제인 프로바이오틱스를 사용하는 방법이 주목을 받고 있다. 여성 질 내에 존재하는 유산균은 그람양성으로 포도당을 발효시켜 젖산을 생성하여 질 내 산도를 pH 4.5 이하로 유지하여 병원체로부터 질 감염을 방지하고 건강한 질 상태를 유지하는 역할을 한다 [11,12]. 보호기전으로 점액에 부착하여 병원체의 유입을 방해하는 장벽을 형성하거나 항균물질은 과산화수소, 젖산, bacteriocin 또는 bacteriocin 유사물질 등을 생성하여 질 내 환경을 건강하게 유지한다 [13].

따라서 본 연구에서는 세균성 질염과 칸디다 질염의 치료 및 재발방지를 위한 대체방안의 일환으로 한국 여성의 질에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901의 프로바이오틱스로의 가능성을 확인하였고, 질염의 주요 원인균인 *Gardnerella vaginalis*와 *Candida albicans*에 대한 억제효과를 확인하였다. 또한 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901의 담즙염에 대한 내성 및 autoaggregation 특성을 확인하여 프로바이오틱스로서의 기능 확인을 통해 관련 연구의 기초 자료로 사용하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 균주 및 시료

한국 여성의 질로부터 분리한 *Lactobacillus* spp. 중 항균활성이 우수한 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901을 선발하여 본 연구를 수행하였다. *Lactobacilli* MRS (Difco, MI, USA) 배지를 사용하여 37°C에서 정치배양하였다. 유산균주는 MRS 액체 배지에 24시간 정치배

양한 배양액을 OD₆₀₀ 1.0 (10⁸~10⁹ CFU/mL)으로 조정하여 새로운 MRS 배지에 1% 접종하였다. 18시간 동안 배양한 배양액을 원심분리 (4,000×g, 4°C, 5분)한 후, 0.22 μm 필터를 이용하여 얻어진 제균된 상등액 (CFS, cell free supernatant)을 실험에 사용하였다.

Gardnerella vaginalis KCTC5096의 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 정치배양하였다. *Candida albicans* SC5314의 배양은 YM 배지 (1% glucose, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract)를 사용하였으며, 37°C에서 배양하였다.

2.2. *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균활성

본 연구에서는 액체배지 희석법으로 이용해 세균성 질염의 주요 원인균인 *G. vaginalis*에 대한 항균활성을 확인하였다. *G. vaginalis*에 대한 항균 효과를 확인하기 위하여, 유산균주의 상등액 (CFS)을 10% 말 혈청이 포함된 5 mL BHI 배지에 10% 첨가한 후, *G. vaginalis*를 OD₆₀₀ 0.5로 조정하여 1% 접종하였다.

*G. vaginalis*에 대한 선별된 유산균주와 혼합배양을 통한 항균 효과를 확인하기 위하여, MRS 액체 배지에 24시간 정치배양한 배양액 5 mL과 *G. vaginalis* (10⁵ CFU/mL) 배양액 5 mL을 혼합하였다. 각 항균효과 확인 실험은 24시간 동안 혐기배양한 후 *G. vaginalis*의 생균수를 아래와 같이 측정하여 선별균주의 항균효과를 확인하였다.

항균효과 (%) = [대조군 (CFU/mL) 실험군 (CFU/mL)] / 대조군 (CFU/mL) × 100

2.3. *Candida albicans*에 대한 항진균활성

액체배지 희석법으로 칸디다 질염의 주요 원인균인 *Candida albicans* SC5314에 대한 항진균 활성을 확인하였다. *C. albicans*에 대한 항진균활성을 확인하기 위하여, 유산균주의 배양상등액 (CFS) 5 mL를 5 mL YM 배지에 첨가한 후, 10⁴~10⁵ CFU/mL로 조정된 *C. albicans*를 접종하여 20시간 동안 배양하였다.

*C. albicans*에 대한 유산균주의 혼합배양을 통한 항진균활성은 MRS 액체 배지에 24시간 정치배양한 배양액 (10⁵ CFU/mL) 5 mL과 *C. albicans* (10⁵ CFU/mL) 배양액 5 mL 혼합한 후, 20시간 동안 배양하면서 *C. albicans*의 생균수를 측정하여 항진균활성을 확인하였다

2.4. 유산균주의 담즙염 내성

섭취하는 유산균이 질 염증 개선에 효과가 있었다는 연구에 기초하여 [14], 선별된 유산균주의 장내 환경과 같은 담즙염에 대한 생존력을 확인하기 위해 Guo 등의 방법으로 실험을 진행하였다 [15]. 선별된 유산균주를 MRS 배지에 24시간 전배양한 후, OD₆₀₀ 1.0으로 조정하여 새로운 MRS 배지에 1%

접종하여 18시간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (4,000×g, 4°C, 5분)한 후 얻어진 균체는 phosphate-buffer saline (PBS, pH 7)으로 2번 세척하였고, OD₆₀₀ 1.0 (10⁸~10⁹ CFU/mL)으로 조정하여 담즙염에 대한 내성 실험에 사용하였다. 담즙염 내성은 0.3~1.0% oxgall (Difco, MI, USA)을 포함한 MRS 배지에 유산균주의 희석액을 1% 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 생균수를 확인하였다.

2.5. Autoaggregation

유산균주의 장내 세포 내 부착능력을 간접적으로 확인하기 위하여 Kassa 등의 연구를 변형하여 autoaggregation 실험을 진행하였다 [16]. MRS 배지에 각각 *L. plantarum* MG989와 *L. fermentum* MG901을 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, PBS로 2번 세척하였고, OD₆₀₀ 1.0 (10⁸~10⁹ CFU/mL)으로 조정하여 균주 현탁액 5 mL을 10초간 진탕한 뒤 5시간 동안 방치하면서 autoaggregation을 확인하였다. 처리 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.

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

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균활성

건강한 질 내에는 수많은 유산균이 존재하고 있으며, 이들의 분포가 인종, 연령, 환경에 따라 변하는 것으로 알려져 있다 [11,17]. 유산균주의 분포가 다르기에 한국여성에서 분리한

유산균주의 특성을 연구하는 것이 국내 여성에 맞는 질염치료 유산균 제제를 연구하는데 있어 중요하다. 이에 본 연구에서는 국내 건강한 여성의 질에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901을 사용하였다.

세균성 질염을 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 질 염증을 일으킨다고 알려져 있다 [18]. 본 연구에서 MG989와 MG901을 세균성 질염의 주요 원인균인 *G. vaginalis*를 대상으로 항균력을 확인하였다. 실험 결과 (Fig. 1) MG989와 MG901의 상등액 (CFS)의 항균효과는 각각 99.4%, 98.9%로 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 혼합배양을 통한 항균활성은 MG901 69.2%, MG989 42.8%로 각각 조사되었다. 유산균은 배양과정 중 젖산, 과산화수소, 박테리옌 등을 생산하며, 이를 통해 항균효과를 보이는 것으로 알려져 있다 [19].

3.2. *Candida albicans*에 대한 항진균활성

가임 기간에 있는 여성의 약 5%가 재발성 칸디다 질염에 걸리며, 치료 후에도 증세가 완전히 사라지지 않는 경우가 많다 [20]. 본 연구에서 MG989와 MG901의 칸디다 질염의 주요 원인균인 *C. albicans*에 대한 항진균활성을 상등액과 혼합배양을 통해 확인하였다. MG989와 MG901 배양 상등액 (CFS)의 항진균활성은 Fig. 2와 같다. 20시간 배양 후, *C. albicans*만 배양한 실험결과 (CONTROL) 대비 MG901은 84.5%의 항진균활성을 나타냈으며, MG989는 99.9%의 항진균활성을 보였다. MG989와 MG901의 혼합배양을 통한 항진균활성 결과는 Fig. 3과 같다. 20시간 혼합 배양 후, *C. albicans*만 배양한 실험결과 대비, MG901은 98.5%의 항진균활성을 나타냈으며, MG989는 99.9%의 항진균활성을 보였다. 특히 *C. albicans*와

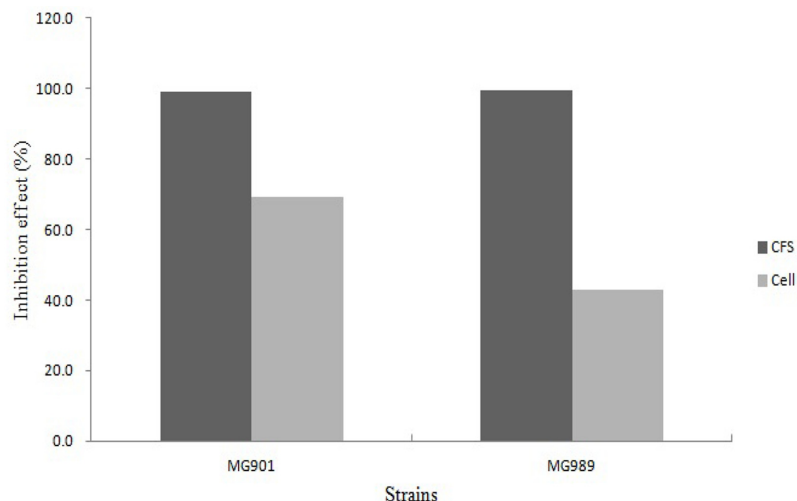


Fig. 1. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* MG989 and *Lactobacillus fermentum* MG901 against *Gardnerella vaginalis*. *CFS, cell free supernatant.

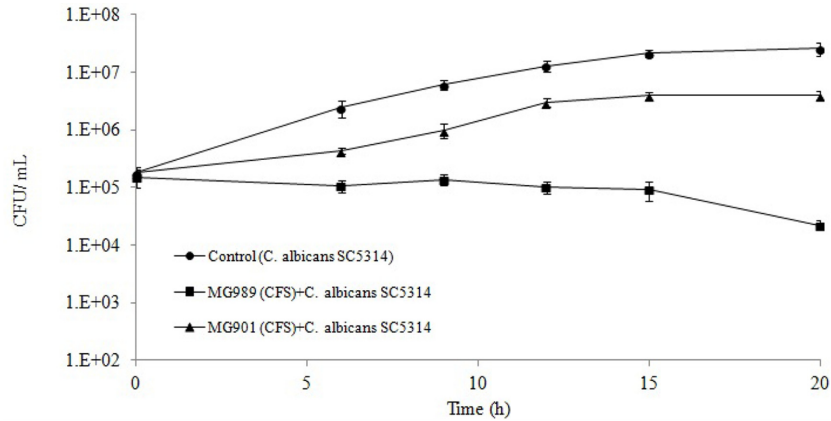


Fig. 2. Enumeration (log CFU/mL) of *Candida albicans* SC5314 for 6, 9, 12, 15, and 24 h incubation at 37°C, alone or challenged with: (i) *C. albicans* (10^5 CFU/mL); (ii) CFS (1:1 v/v) from *Lactobacillus plantarum* MG989 (10^5 CFU/mL); (iii) CFS (1:1 v/v) from *Lactobacillus fermentum* MG901 (10^5 CFU/mL). *CFS, cell free supernatant.

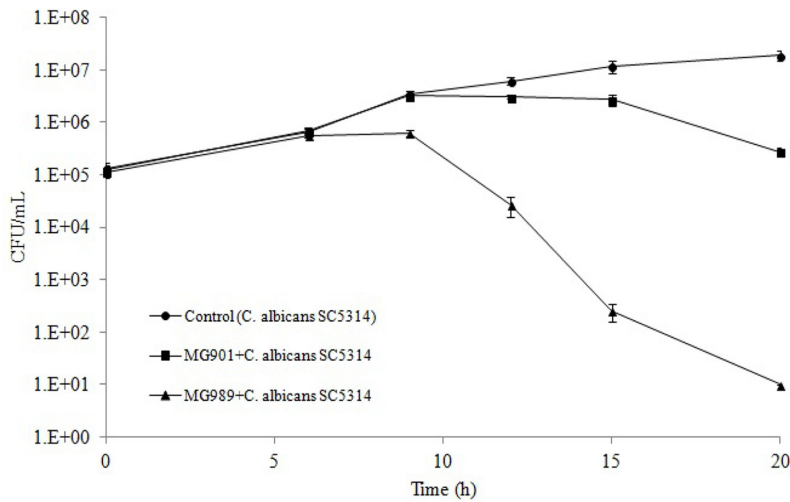


Fig. 3. Enumeration (log CFU/mL) of *Candida albicans* SC5314 for 6, 9, 12, 15, and 24 h incubation at 37°C, alone or challenged with: (i) *C. albicans* (10^5 CFU/mL); (ii) *Lactobacillus plantarum* MG989 (10^5 CFU/mL); (iii) *Lactobacillus fermentum* MG901 (10^5 CFU/mL).

MG901의 혼합배양 시에는 20시간 후에 *C. albicans*의 생균 수가 10 CFU/mL이하로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 *C. albicans*는 호기성으로 배양하는 동안에 산을 생성하며, 배지의 pH를 낮추기도 한다 [21]. Köhler 등의 연구 결과에 따르면, 낮은 pH상태에서 유산균이 생성한 젖산은 *C. albicans*을 성장을 억제하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [22].

3.3. 담즙염에 대한 내성

프로바이오틱스로 사용되는 유산균이 장내 극한 환경에서 생존하기 위해서는 쓸개에서 분비되는 담즙에 대한 내성을 지녀야 한다 [23]. 일반적으로 유산균의 담즙염에 대한 내성을 확인하기 위해서는 일반적으로 0.3%의 담즙염이 사용되

고 있는데 [24], 본 연구에서는 1% 담즙염 농도까지 MG989와 MG901의 내성을 확인하였다 (Fig. 4). 일반적인 체내 담즙염 농도인 0.3%에서 MG901과 MG989의 생균수는 각각 2.8×10^7 CFU/mL, 2.0×10^6 CFU/mL을 보였으며, 1%의 담즙염 농도에서도 MG901과 MG989의 생균수는 각각 5.9×10^7 CFU/mL, 1.0×10^6 CFU/mL로 확인되어, 담즙염에 대해 내성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. Lin 등의 연구결과에 따르면, 0.3% 담즙염에서 유산균들의 생균수가 10^4 CFU/mL 이하로 담즙염에 민감하다고 알려져 있다 [25].

3.4. Autoaggregation

프로바이오틱스로 사용되는 유산균의 경우, 체내에서 지속적으로 생존하기 위해서 장 및 질 세포에 부착할 수 있는 세

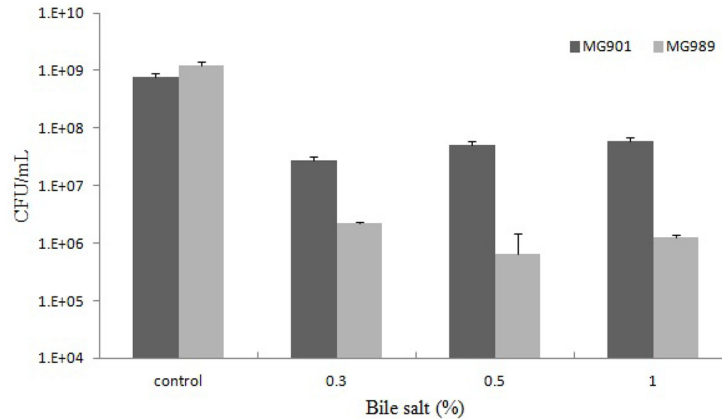


Fig. 4. Survival rate of *Lactobacillus plantarum* MG989 and *Lactobacillus fermentum* MG901 on bile salt.

Table 1. Percentages of autoaggregation (%) of *Lactobacillus plantarum* MG989 and *Lactobacillus fermentum* MG901

| Strain | Autoaggregation (%) | |
|--------------------------------------|---------------------|------------|
| | 4 h | 24 h |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> MG901 | 63.13±1.28 | 83.33±2.14 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> MG989 | 42.72±1.37 | 73.33±3.43 |

포 부착능이 요구된다. Autoaggregation 능력은 세포 부착능을 간접적으로 확인할 수 있는 방법으로, Osset 등의 연구결과에 따르면, 유산균이 질 상피세포에 잘 부착할수록 병원체의 부착을 방지하는 능력이 더 크다고 알려져 있다 [26]. MG901과 MG989의 장내 부착능을 알아보기 위하여 autoaggregation 실험을 진행하였다 (Table 1). MG901과 MG989는 24시간 후에 각각 83.33, 73.33%의 autoaggregation 효능을 나타내었다. Malik 등의 연구결과에 따르면, *L. plantarum* CMPG 5300의 *in vitro* 상의 autoaggregation이 약 70%로 나타났으며, *in vivo* 상인 질 상피세포에서의 부착능도 50%로 *in vitro* 상의 결과와 *in vivo* 상의 결과가 연관된다고 보고되었다 [27].

4. CONCLUSION

본 연구는 한국 여성 질에서 분리한 유산균인 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901을 통해 질염의 주요 원인균인 *Gardnerella vaginalis*와 *Candida albicans*에 대한 억제효과를 확인하였다. MG989와 MG901의 배양 상등액과 혼합배양 처리 시 *G. vaginalis*와 *C. albicans*에 억제효과를 나타내었다. 담즙염에 대한 내성과 autoaggregation을 확인한 결과, MG989와 MG901은 1% 담즙염까지 생존률을 유지하며, 각각 83.33, 73.33%의 autoaggregation 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 *Lactobacillus plantarum* MG989와 *Lactobacillus fermentum* MG901 균주는 향후 한국 여성에게 맞는 유산균을 이용한 질염치료 방법 및 치료제제의 개발에 있어서의 주요한 소재자원으로 활

용될 수 있을 것이라 기대된다.

REFERENCES

- Egan, M. E. and M. S. Lipsky (2000) Diagnosis of vaginitis. *Am. Fam. Physician* 62: 1095-1104.
- Northrup, C. (2010) Women's bodies, women's wisdom: Creating physical and emotional health and healing. pp. 297-299. Bantam, NY, USA.
- Petrova, M. I., E. Lievens, S. Malik, N. Imholz, and S. Lebeer (2015) *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front. Physiol.* 6: 81.
- Mastromarino, P., B. Vitali, and L. Mosca (2013) Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol.* 36: 229-238.
- 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.
- Verstraelena, H. and A. C. Senok (2005) Vaginal lactobacilli, probiotics, and IVF. *Reprod. Biomed. Online* 11: 674-675.
- 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.
- Berman, J. and P. E. Sudbery (2002) *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* 3: 918-930.
- Wenzel, R. P. (1995) Nosocomial candidiasis: Risk factors and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1531-1534.
- 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.
- Redondo-Lopez, V., R. L. Cook, and J. D. Sobel (1990) Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal microflora. *Rev. Infect. Dis.* 12: 856-872.

12. Sharpe, M. E. (1981) The genus *Lactobacillus*. pp. 1653-1679. In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and L. Schlegel (eds.). *The prokaryote: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag, NY, USA.
13. Vallor, A. C., A. D. A. May, E. H. Stephen, and L. H. Sharon (2001) Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J. Infect. Dis.* 184: 1431-1436.
14. Bastani, P., A. Homayouni, S. Ziyadi, and V. G. Tabrizian (2012) Dairy probiotic foods and bacterial vaginosis: A review on mechanism of action. pp. 445-456. In: E.C. Rigobelo (ed.). *Probiotics*. Intech, USA.
15. 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.
16. 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.
17. Pavlova, S. I., A. O. Kilic, S. S. Kilic, J. S. So, M. E. Nader-Macias, J. A. Simoes, and L. Tao (2002) Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* 92: 451-459.
18. 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.
19. Borge, S., J. Silva, and P. Teixeira (2013) The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 289: 479-489.
20. Sobel, J. D. (2007) Vulvovaginal candidosis. *The Lancet* 369: 1961-1971.
21. Samaranyake, L. P., A. Hughes, D. A. Weetman, and T. W. MacFarlane (1986) Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J. Oral Pathol.* 15: 251-254.
22. Köhler, G. A., S. Assefa, and G. Reid (2012) Probiotic Interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2012: 14.
23. 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: 386-392.
24. 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: 3045-5301.
25. 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.
26. Osset, J., R. M. Bartolomé, E. García, and A. Andreu (2001) Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 183: 485-491.
27. Malik, S., M. I. Petrova, I. J. J. Claes, T. L. A. Verhoeven, P. Busschaert, M. Vanechoutte, B. Lievens, I. Lambrichts, 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.