pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 6, pp. 531~535 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.6.531

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

*Leuconostoc mesenteroides*를 이용한 브로콜리 발효물에 의한 *Clostridium difficile*의 생육 제어

이영덕 · 문기성[1]*
서원대학교 식품공학과, [1]한국교통대학교 생명공학과

Growth Inhibition of *Clostridium difficile* by Fermented Broccoli with *Leuconostoc mesenteroides*

Young-Duck Lee and Gi-Seong Moon[1]*
Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju, Korea
[1]Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea
(Received October 27, 2017/Revised November 6, 2017/Accepted November 15, 2017)

ABSTRACT - In this study, *Leuconostoc mesenteroides* CJNU0041 was isolated from Korean traditional food *kimchi* and antimicrobial activity of fermented broccoli with the isolate was tested against pathogenic *Clostridium difficile*. *L. mesenteroides* CJNU0041 showed higher glucosidase activity than other isolates. As the results of physiological properties such as pH and viable cell count during broccoli fermentation with *L. mesenteroides* CJNU0041, we confirmed that 48 hours was optimal fermentation time. As the results of metabolite analysis by HPLC, metabolites were changed during the fermentation. Especially, the growth of *C. difficile* was inhibited by the fermented broccoli. Therefore, *L. mesenteroides* CJNU0041 might be a candidate for improving the functionality of natural materials by lactic acid fermentation.

Key words : *L. mesenteroides*, *C. difficile,* Biocontrol, Fermentation, Inhibition

*Clostridium difficile*은 혐기성 그람양성 세균이며 포자를 형성하는 것으로 보고되어 있고, 장내에서 증식하며 다양한 병원성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 대장 내에서 과증식 할 경우 독소를 생성하면서 급성 대장염 등을 유발시키는 것으로 보고되고 있다[1]. 국내에서는 1997년대에 위막성 대장염 환자에게서 *C. difficile*의 독소가 확인되면서 항생제 내성 대장염의 원인으로 밝혀졌으며, 생후 1개월 이내의 신생아에게 자주 검출되는 것으로 보고되고 있다[2,3]. *C. difficile*의 주요 감염원인은 암피실린(ampicillin), 아목시실린(amoxicillin), 세팔로스포린(cephalosporin), 클린다마이신(clindamycin) 등과 같은 광범위한 항생제의 남용에 의한 결과로서, 이와 같은 항생제들은 *C. difficile*의 과증식을 유도하고, 증식된 *C. difficile*은 대장 내에 존재하는 유익균의 성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다. 그리고, 대장점막에 염증을 유도하며, 항생제 유발설사, 위막성 대장염, *C. difficile*에 의한 설사(*C. difficile*-associated diarrhea, CDAD) 등과 같은 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다[4-6]. 그리고, *C. difficile*에 의한 독성 인자로는 대표적으로 장독소(enterotoxin)인 toxin A와 세포독소(cytotoxin)인 toxin B를 생산하는 것으로 보고되고 있다[7,8]. 최근 이러한 CDAD를 개선 또는 치료하기 위해서 반코마이신(vancomycin), 메트로니다졸(metronidazole) 등과 같은 항생제를 사용하여 일차적으로 치료하고 있으나, 항생제 오·남용으로 인해 *C. difficile*의 항생제 내성으로 인해 재발률이 크게 증가하여 장염이나 설사의 발생빈도가 높아지고 있다[1]. 그러므로 *C. difficile*의 치료 또는 예방을 위해서 기존에 항생제를 대체할 수 있는 유산균 제재, 천연물 소재 등의 개발이 필요하다[9]. 최근에는 국내에서도 천연물 소재를 활용하여 *C. difficile*의 생육 제어 효과를 확인한 보고가 있었으나, 유산균 제재를 이용한 *C. difficile*에 대한 제어, 치료제 등의 응용에 대한 연구는 미비한 상황이다. 하지만 해외에서는 유산균 probiotics를 활용하여 *C. difficile*의 치료제로 사용하여 효과를 확인한 연구 등 *C.*

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

difficile 관련된 연구를 다수 진행 중에 있다. 유산균은 과거부터 현재까지 오랜 시간 동안 식품 발효에 사용되어 왔으며, 발효 동안 생산되는 다양한 영양 물질, 향기 성분, 항균 물질 등 식품의 풍미와 제품 수명에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 그리고 probiotics로서 사람의 장내에 서식하면서 장내 균총 개선, 면역 조절 작용, 콜레스테롤 저하, 병원성 세균들의 생육 억제, 유당 불내증 개선 등의 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[10,11]. 또한, 최근 다양한 임상 결과를 통해 probiotics와 이것들이 생산하는 bacteriocin 등의 물질들이 다양한 질환들에 대해 예방적 효과와 치료적 효과가 있는 것으로 알려져 있다[12,13]. 따라서 본 연구에서는 *C. difficile*의 제어를 위해 김치로부터 신규의 *Leuconostoc mesenteroides*를 분리하였고, 이를 이용한 브로콜리 발효물을 제조하여 *C. difficile* 억제에 활용하고자 하였다.

Materials and Methods

사용 균주 및 유산균 분리

본 실험에 사용된 *C. difficile* KCTC 5009는 생물자원센터 (KCTC, Jeongeup, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. *C. difficile*의 배양을 위한 액체 배지로는 Reinforced Clostridial Medium (Difco Laboratory, Detroit, MI, US)를 사용하였으며, 고체배지는 Brucella agar에 hemin과 vitamin K를 첨가하여 사용하였다. 그리고, 유산균의 배양은 0.05% L-cystein (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 만든 Lactobacilli MRS broth 또는 MRS agar (Difco Laboratory)에서 37°C, 24 hours 혐기적으로 배양하였다. 유산균을 분리하기 위해 김치 시료 25 g을 225 mL의 0.1% peptone water에 혼합 하고, stomacher를 이용하여 균질화한 후 10진 희석을 하여 MRS agar에 도말 후 37°C에서 48-72 hours 배양하였다. 그리고 배양된 집락들 중 형태학적으로 상이한 것을 선택하여 MRS agar에 평판 획선하여 배양하여 순수 분리하였다.

분리된 유산균의 β-glucosidase 활성 분석

분리된 김치 유산균의 β-glucosidase 활성을 분석하기 위해 Esculin agar법을 통해 확인하였다. Esculin agar는 0.1% esculin, 0.05% ferric citrate (Sigma-aldrich), 2.5% heart infusion, 1.5% agar (Difco Laboratory)로 제조하였으며, esculin agar에 배양된 유산균들을 1 μL 접종한 후 24 hours, 48 hours 동안 배양하였다. 그리고, 검정색 환의 생성 정도를 비교하여 β-glucosidase 활성이 우수한 유산균을 확보하여 이를 *C. difficile*의 항균 활성 검정에 적용하였다.

16S rRNA 염기서열 분석을 통한 동정

분리된 유산균의 최종적인 동정을 위해 16S rRNA 서열 분석을 수행하였다. 염기 서열은 국내 생명공학회사 (Macrogen Co. Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 16S rRNA 유전자 상동성 분석은 National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)의 BLAST search program을 이용하여 DNA database와 비교하였다. 그리고 계통학적 분석은 NCBI에서 제공하는 유산균 표준 균주의 16S rRNA 염기서열과 비교하여 염기서열간의 유연 관계를 EMBL-EBI에서 제공하는 Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)를 사용하여 확인하였다.

유산균을 이용한 브로콜리 발효물과 현탁액 조성 비교

분리된 유산균 중 β-glucosidase 활성이 우수한 균주를 사용하여 브로콜리 분말 40 g에 800 mL의 증류수를 가해 5% 브로콜리 현탁액을 제조하고, 고압멸균기에서 브로콜리 현탁액을 멸균 처리하였다. 멸균한 브로콜리 현탁액에 0.5%의 분리 유산균 배양액(v/v)을 접종하고 3 L 발효조 (Fermentec, Cheongju, Korea)에서 발효시켰으며, 발효되는 공정 중에 브로콜리 추출물에 접종된 균주의 세포 성장 및 pH 변화를 측정하였다. 그리고, 브로콜리 현탁액과 브로콜리 발효물에 대한 대사산물 변화를 분석하기 위해서 PDA검출기가 구비된 HPLC (YL9100, Younglin, Kyunggi, Korea)를 사용하였으며, 실험 조건은 용매 A는 멸균수, 용매 B는 메탄올을 이용하였다. 그리고, 30°C에서 반응을 진행하였으며, 1 단계는 0~20분에서 용매 A 100%, 2단계에서는 20-75분으로 용매 A 100%에서 용매 B로 농도 기울기를 하였으며, 마지막 3단계에는 75-85분으로 용매 B 100%로 수행한 후 발효물의 조성 차이를 확인하였다.

브로콜리 발효물의 *C. difficile* 생육 억제

브로콜리 발효물을 이용하여 *C. difficile*에 대한 항균 활성 유무를 확인하였다. 이를 위해 제조된 브로콜리 발효물에서 상등액을 수득하여 상등액을 10배 농축하여 브로콜리 발효 농축액을 제조하였다. 그리고, *C. difficile* 배양액이 도말된 배지 위에 브로콜리 현탁액과 브로콜리 발효 농축액을 각각 2 μL 씩 분주한 후 억제환을 확인하여 생육 저해효과를 확인하였다.

Results and Discussion

분리된 유산균 특성과 β-glucosidase 활성 분석

김치로부터 유산균의 분리를 위해 MRS agar에서 배양된 유백색 집락을 선발하였다.

분리된 유산균을 대상으로 하여 β-glucosidase의 활성을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. Esculin agar 상에서 β-glucosidase 활성은 분리된 유산균 대부분이 활성을 나타냈지만, 이 중 CJNU0041이 배양 후 12 hours부터 활성을

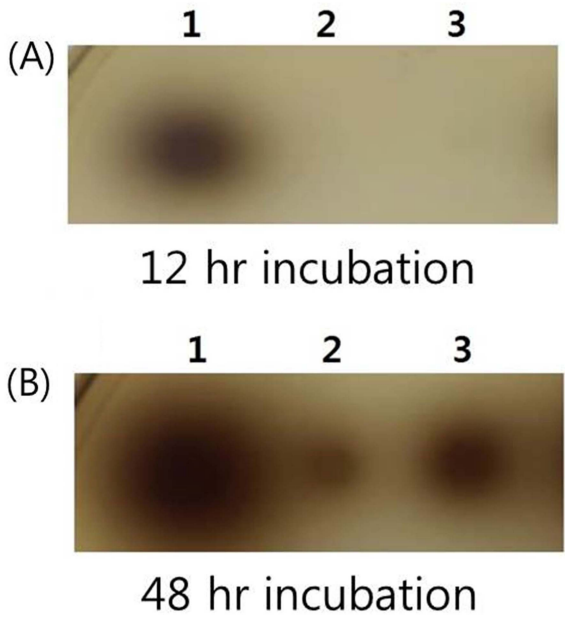

Fig. 1. β-glucosidase activity of lactic acid bacteria from Kimchi. 1: CJNU0014, 2: CJNU0044, 3: CJNU0048.

나타내고 있었으며, 24 hours, 48 hours 후에 활성이 증가되는 것으로 확인되었다. 일반적으로 식물체에는 다양한 폴리페놀류 등을 보유하고 있으며, 유산균은 이러한 배당체를 분해할 수 있는 α-galactosidase와 β-glucosidase 등의 다양한 효소를 보유하고 있다는 보고가 있다[14]. 그리고, 이러한 특성은 유산균을 활용해 생물전환 등을 통해 다양한 hydroxytrosol, pyrogall 등의 항산화 물질이나 4-vinyl phenol 등의 풍미 성분의 생산, 인삼, 콩 등의 다양한 phytochemicals에 존재하는 배당체 및 식물체 유래 기능성 배당체의 비배당체화를 통해 생물 활성 증진에 대한 연구도 보고되어 있다. 이러한 유산균의 특성은 식품 산업 또는 제약 산업에 활용이 용이 할 것이다[15-17]. 그러므로, 본 연구에서 우수한 β-glucosidase 활성을 가지고 있는 CJNU0041을 이용하여 항균활성, 항산화 등의 다양한 생리 활성 기능을 갖는 발효물을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

16S rRNA 염기서열 분석을 통한 동정

β-glucosidase 활성이 우수했던 CJNU0041의 최종 동정을 위해 16S rRNA 염기 서열에 대해 NCBI의 BLAST 분석 결과 *L. mesenteroides*와 상동성이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 유산균들과의 phylogenetic tree 분석을 수행한 결과 *L. mesenteroides*와 계통학적으로 가장 유사한 것으로 나타났다(Fig. 2). *L. mesenteroides*는 그람양성, 통성혐기성 세균으로, 형태학적 특성은 생육 조건에 따라 차이를 나타내기도 하지만 주로 구균의 형태를 나타내는 것으로 알려져 있다[18]. 그리고, 다양한 야채, 육제품, 유제품 등의 식품의 발효, 낙농제품의 향미 및 가스 생산, 산업 또

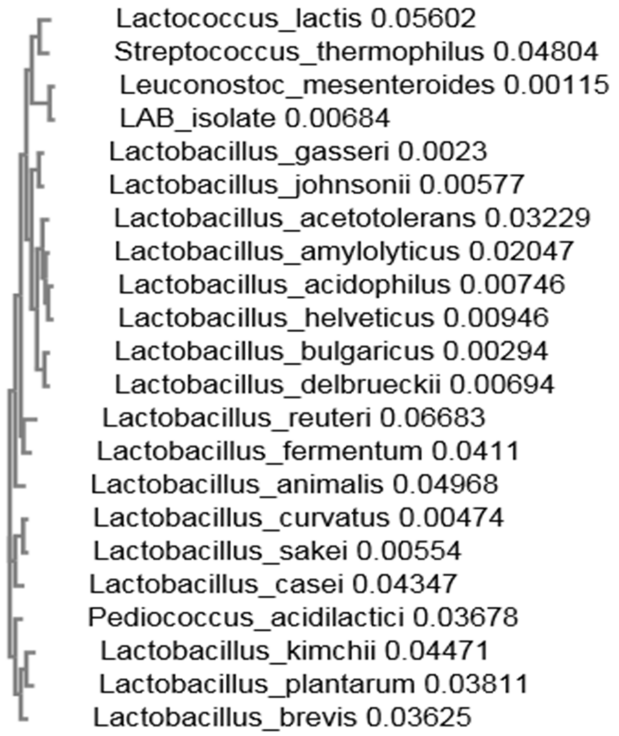

Fig. 2. Phylogenetic relation between *L. mesenteroides* CJNU0014 and other *Lactobacillus spp.* based on 16S rRNA gene sequence.

는 임상용 dextran 및 고급 폴리머 생산, mannitol 생산, 유지 산업의 생물학적 보존제 생산, 기능성 식품으로서의 잠재적 역할 등 산업적으로 매우 중요한 것으로 보고되고 있다[19].

L. mesenteroides CJNU0041을 이용한 브로콜리 발효물과 현탁액 조성 특성

분리된 *L. mesenteroides* CJNU0041을 이용하여 브로콜리 발효하면서 pH의 변화와 생균수를 확인한 결과(결과 미제시), 발효 초기에는 약 pH 5 수준이었으며 생균수는 약 6.1 log CFU/mL이었다. 그리고, 발효 24 hours 후에는 pH가 약 3.0 수준으로 낮아졌고 생균수가 약 9.0 log CFU/mL 으로 증가하였으나, 48 hours에서는 다시 초기 균수 수준인 6.0 log CFU/mL 수준으로 낮아진 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 일반적으로 *L. mesenteroides*가 산에 대한 내성이 다른 유산균들에 비해 상대적으로 낮아서 기인하거나[20], 발효 시에 생산되는 여러 가지 항균 물질에 의한 것으로 판단된다. 따라서, 발효를 위한 기간은 *L. mesenteroides* CJNU0041의 생육 정도와 β-glucosidase 활성을 분석했을 때 48 hours 동안 발효가 적정할 것으로 사료된다. 그리고, 브로콜리 발효물을 HPLC 분석을 통해 발효 산물에 대한 패턴을 확인한 결과 Fig. 3과 같다. 브로콜리 현탁액과 *L. mesenteroides* CJNU0041을 이용한 브로콜리 발효물의 대사 산물은 상이한 것으로 나타났다. 대

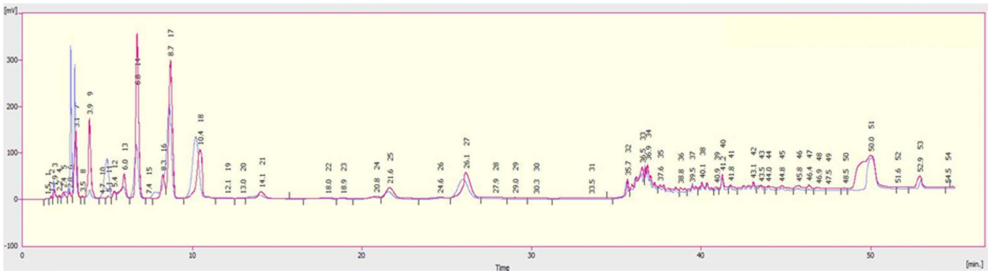

Fig. 3. Metabolite pattern of broccoli solute and fermented broccoli by HPLC. Pink line: broccoli solute, Blue line: Fermented broccoli.

Fig. 4. Inhibition of *C. difficile* by supernatant of (A) Broccoli solute and (B) fermented broccoli.

체적으로 발효 후에 생물 전환이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 추후 LC/MS/MS 등의 수행을 통해 metabolomics 분석을 하여 발효 후에 물질들의 특성과 차이점에 대한 분석이 필요할 것으로 사료된다.

브로콜리 발효물의 *C. difficile* 생육 억제

*C. difficile*에 대한 항균 효과를 확인한 결과, *L. mesenteroides* CJNU0041를 24 hours 배양한 배양 상등액에 의한 *C. difficile*의 생육 억제 효과가 있는 것으로 나타났다(결과 미제시). 그리고, *L. mesenteroides* CJNU0041을 활용한 브로콜리 발효물에 의한 *C. difficile*의 생육 억제를 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. 브로콜리가 포함된 현탁액을 접종한 경우 *C. difficile*에 대한 저해환이 형성되지 않았으며, 반면에 브로콜리 발효액을 접종했을 때는 *C. difficile*에 대한 억제환이 뚜렷하게 형성된 것을 확인할 수 있어, 브로콜리 발효 농축액이 *C. difficile* 균주의 생육을 효과적으로 저해한다는 사실을 확인할 수 있었다. 최근 *C. difficile*은 세계적으로 설사 입원환자의 주요 원인 세균으로 알려져 있으며 지속적으로 증가 추세에 있다[21,22]. 주로 항생제와 연관된 *C. difficile* 대장염(Clostridium difficile colitis, CDC) 등의 원인으로 보고되었고 위막성 대장염이나 항생제 관련 설사의 주 원인 세균으로 주목 받고 있다[4-6]. 국내에서는 현재 정확한 보고는 없으나 최근 수년간 증가하는 양상이며, *C. difficile*에 의한 중증 사례에 대해서도 증가되고 있다[23,24]. 그리고 *C. difficile*에 대한 치료를 위해 다양한 항생제가 사용되고 있으나 항생제 오남용 등으로 인해 재발율이 증가하고 있다[25]. 그러므로 *C. difficile*의 치료 또는 예방을 위해서 기존에 항생제를 대체할 수 있는 유산균 제재 등의 개발이 필요할 것이다. 해외에서는 *C. difficile*의 치료 및 예방을 위한 기초연구와 임상연구가 상당 부분 진행되고 있는데, 대표적으로 *Lactobacillus* spp.에 의한 *C. difficile* 생육 억제[26], *L. plantarum*을 이용한 임상 분리 *C. difficile*에 대한 효과[27], *C. difficile* 감염 제어를 위한 bacteriocin, bacteriophage, probiotics에 의한 생물학적 해법[28] 등이 보고되어 있다. 국내에서는 연구가 매우 미진하게 진행되고 있는 실정이며, *Bifidobacterium*과 천연물에 의한 *C. difficile* 제어[29], 유산균을 이용한 *C. difficile* 항균 효과 평가[30] 등 매우 제한적인 것으로 확인되었다. 또한, 활용 가능한 유산균에 대한 보고도 매우 미미한 것으로 판단된다. 따라서 본 연구를 통해 분리된 *L. mesenteroides* CJNU0041의 *C. difficile*의 생육 제어를 위한 유산균으로 활용이 가능할 것이며, 또한 *L. mesenteroides* CJNU0041를 이용한 브로콜리 발효물의 생육 억제 효과는 식품 산업에 적용이 쉽게 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였음. 또한, 실험 수행에 도움을 준 정예진 선생님에게도 감사를 드립니다.

국문 요약

본 연구에서는 김치로부터 *L. mesenteroides* CJNU0041을 분리하여 16S rRNA 염기서열 분석을 통해, 동정하였으며, β-glucosidase 활성이 우수한 것으로 나타났다. *L. mesenteroides* CJNU0041를 이용한 브로콜리 발효 동안 생균수와 pH 및 β-glucosidase 활성에 대해 분석한 결과, 발효 시간은 48 hours이 적당한 것으로 판단되었다. 또한, 발효 후 생물 전환이 일어남을 HPLC 분석을 통해 확인하였다. 그리고, *L. mesenteroides* CJNU0041의 브로콜리 발효물에서 *C. difficile*에 대한 생육 억제 효과를 확인 할 수 있었다. 따라서, 본 연구를 통해 분리된 신규 *L. mesenteroides* CJNU0041을 *C. difficile*의 생육 제어를 위

한 유산균 제재화가 가능할 것으로 판단되며, 브로콜리 발효물도 다양한 식품에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Al-Jashaami, L.S., DuPont, H.L. Management of *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterol. Hepatol*. **12**, 609-616 (2016).
2. Kelly, C.P., Pothoulakis, C., Lamont, J.T. *Clostridium difficile* colitis. *New Engl. J. Med*., **330**, 257-262 (1994).
3. McFarland L.V., Mulligan M.E., Kwok, R.Y., Stamm, W.E. Nocosomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *New Engl. J. Med*., **320**, 204-210 (1989).
4. Bartlett, J.G. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin. Infect. Dis*. **18**, 5265-5275 (1994).
5. Cartmill, T.D., Panigrahi, H., Worsley, M.A., McCann, D.C., Nice, C.N., Keith, E. Management of diarrhoea due to Clostridium difficile. *J. Hosp. Infect*. **27**, 1-15 (1994).
6. Freeman, J., Wilcox, M.H. Antibiotics and *Clostridium difficile*. *Microbes Infect*. **1**, 377-384 (1999).
7. Ackermann, G., Loffler, B., Tang-Feldman, Y.J., Cohen, S.H., Silva, J., Rodloff, A.C. Cloning and expression of *Clostridium difficile* toxin A gene(*tcdA*) by PCR amplication and use of an expression vector. *Mol. Cell. Probe* **18**, 271-274 (2004).
8. Pothoulakis, C. Effect of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. *Ann. NY Acad. Sci.* **915**, 347-356 (2000).
9. Jung, S.M., Choi, S.I., Park, S.M. Heo, T.R. Antimicrobial Effect of Achyranthes japonica Nakai Extracts against *Clostridium difficile*. *Korean J. Food Sci. Technol*., **39**, 564-568 (2007).
10. Leroy, F. De Vuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol*., **15**, 67-78 (2004).
11. Vyas, U., Ranganathan, N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Gut and beyond. *Gastroenterol. Res. Pract*., **2012**, 1-16 (2012).
12. Jeppsson, B., Mangell, P., and Thorlacius, H.: Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections. *Nutri*., **3**, 604-612 (2011).
13. Wallace, T.C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M.D., Gibson, G., Hentges, E., and Sanders, M.E.: Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev*., **69**, 392-403 (2011).
14. Rodriguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gomez-Cordoves, C., Mancheno, J.M., Munoz, R.. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol*., **132**, 79-90 (2009).
15. Chi, H., Kim, D.H., and Ji, G.E. Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from Panax ginseng by food microorganisms. *Biol. Pharm. Bull*., **28**, 2102-2105 (2005).
16. Kim, H.S., Kim, J.Y., Park, M.S., Zheng, H., Ji, G.E.. Cloning and expression of β-glucuronidase from *Lactobacillus brevis* in *E. coli* and application in bioconversion of baicalin and wogonoside. *J. Microbiol. Biotechnol*., **19**, 1650-1655 (2009).
17. Rekha, C.R., Vijayalakshmi, G. Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *J. Appl. Microbiol*., **109**, 1198-1208 (2010).
18. Holzapfel, W.H., Schillinger, U...The genus Leuconostoc. The prokaryotes (Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., K.H.S chleifer, eds.). *Springer-Verlag*, Berlin, 1508-1534 (1992).
19. Vijayendra, S.V.N., Palanivel, G., Mahadevamma, S., Tharanathan, R.N.. Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic acid fermented milk product. *Carbohydr. Polym*., **72**, 300-307 (2008).
20. Kim, Y.H., Kim, H.J., Kin, J.Y., Choi, T.B., Kang, S.M. Strain Improvement of *Leuconostoc mesenteroides* as a Acid-Resistant Mutant and Effect on Kimchi fermentation as a Starter. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*., **33**, 41-5 (2005).
21. Pepin, J. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *Cmaj*., **171**, 466-72 (2004).
22. Dallal, R.M. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann. Surg*., **235**, 363-72 (2002).
23. Byun, T.J., et al., Clinical characteristics and changing epidemiology of Clostridium difficile-associated disease (CDAD). *Korean J. Gastroenterol*., **54**, 13-9 (2009).
24. Cheong, H.S. Therapeutic efficacy of metronidazole for patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Korean J Med*., **72**, 639-646 (2007).
25. Kim, S.J. Molecular characterization of toxin A-negative, toxin B positive variant strains of *Clostridium difficile* isolated in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*., **67**, 198-201 (2010).
26. Naaber, P., Smidt, I., JelenaŠtšepetova, Brilene. T., Annuk, H., Mikelsaar M. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *J. Med., Microbiol.* **53**, 551-554 (2004).
27. Ratsep, M., Naaber, P., Kõljalg, S., Smidt, I., Shkut, E., Sepp, E. Effect of *Lactobacillus plantarum* Strains on Clinical Isolates of *Clostridium difficile* in vitro. *J. Prob. Health.,* **2014**, 1-5 (2014).
28. Rea, M.C., Alemayehu, D., R. Ross, P., Hill, C. Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol*., **62**, 1369-1378 (2013).
29. Jung, S.M., Choi, S.I., Park, S.M., Heo, T.R. Synergistic Antimicrobial Effect of Achyranthes japonica Nakai Extracts and *Bifidobacterium Supernatants* Against *Clostridium difficile*. *Korean J. Food Sci. Technol*., **39**, 564-568 (2007).
30. Lee, J.S., Chung, M.J., Seo, J.G. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against *Clostridium difficile*. *Toxicol. Res*., **29**, 99-106 (2013).