

발간등록번호

안내서-1124-02



건강기능식품 기능성 원료  
**프로바이오틱스 안전성 평가 가이드**  
- WHO/FAO 가이드라인을 중심으로 -

2022. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원



## 지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

**명칭**

건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드(민원인 안내서)  
- WHO/FAO 가이드라인을 중심으로 -

**등록  
대상  
여부**

- |                                                                                                                                       |                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?                                                             | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| ☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다.<br>(사유 : _____ ) |                                                                       |
| <input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?                                             | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| <input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?                                                                                 | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| <input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?                                                                     | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| <input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?                                                                                     | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| <input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?                                                                    | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| ☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.                                            |                                                                       |

**지침서  
·  
안내서  
구분**

- |                                                                                                                   |                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)                         | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| <input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용) | <input checked="" type="checkbox"/> 예<br><input type="checkbox"/> 아니오 |

**기타  
확인  
사항**

- |                                                                             |                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까? | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| ☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.    |                                                                       |

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2022년 9월

담 당 자     김 규 현  
확 인(부서장) 이 혜 영



이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가를 위해 제출자로 범위, 내용 및 관련 시험법 등을 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2022년 09월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성 되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 영양기능연구과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4425

팩스번호: 043-719-4420



## 제·개정 이력

| 연번 | 제·개정번호      | 승인일자        | 주요내용 |
|----|-------------|-------------|------|
| 1  | 안내서-1124-01 | 2021.06.30. | 제정   |
| 2  | 안내서-1124-02 | 2022.09.29. | 개정   |
| 3  |             |             |      |
| 4  |             |             |      |
| 5  |             |             |      |



## » 목 차

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| I. 프로바이오틱스 정의 및 특성 .....            | 1  |
| II. 안전성 제출자료 .....                  | 3  |
| III. 안전성 평가 절차 및 판정(안) .....        | 8  |
| IV. 안전성 평가 시험방법 .....               | 9  |
| 1. 항생제 내성 .....                     | 9  |
| 2. 용혈활성 .....                       | 20 |
| 3. 독성 생성 .....                      | 21 |
| 4. 대사적 특성 .....                     | 23 |
| V. 독성시험 시 고려사항 .....                | 26 |
| VI. 제출자료 작성사례 .....                 | 30 |
| VII. 참고문헌 .....                     | 35 |
| VIII. 부록(참고자료) .....                | 38 |
| 1. 국내·외 관리 동향 .....                 | 38 |
| 2. WHO/FAO 안전성 평가 가이드라인(2002) ..... | 39 |
| 3. 시험전문 시험·검사기관 등 .....             | 50 |



## I 프로바이오틱스 정의 및 특성

### ○ FAO/WHO 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드라인

2002년 국제연합식량농업기구(Food and Agriculture Organization, FAO) 및 세계 보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 식품 영역에서의 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드라인을 개발하였음

가이드라인에 따르면 임상적 근거로서 건강상의 이득이 되는 프로바이오틱스의 특이적 균주를 규명하고, 기능성 메커니즘을 확인할 수 있는 실험실 연구 및 인간 대상 임상시험을 '통하여 건강상의 이득을 구체화할 것을 권장하고 있음

또한, 프로바이오틱 균주(probiotic strain)에 대한 최소한의 안전성 평가를 실시하도록 권장하고 있음

### ○ 프로바이오틱스 정의

일정량 섭취했을 때 인체에 유용한 보건 효과를 나타내는 살아있는 미생물 종을 말함

Live microorganisms that, when consumed in adequate amounts confer a health benefit on the host

#### < 참고 >

- 2002년, WHO/FAO 프로바이오틱스 정의; Live microorganisms which when consumed in adequate amounts confer a health benefit on the host
- 2013년, ISAPP가 WHO/FAO와 함께 2002년 개정 내용을 업데이트; Live microorganisms that, when consumed in adequate amounts confer a health benefit on the host

\* ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

## ○ 프로바이오틱스 특성

반드시 생균이어야 하며, 장관 내에서 유용한 효과가 있어야 하고, 독성이 없으며 비병원성(Non-pathogen) 이어야 함

실제 적용 제품에서 고유의 인체에 유용한 보건효과가 입증되어야 하며, 전통 발효식품 유래라도 인체에 유익한 보건효과에 대한 과학적 근거가 부족하면 동 범주에 해당되지 않음

장 내에서 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid) 등을 생성하여 장내 환경을 산성화시켜 유해균을 감소시키며, 유산균이 대부분을 차지함

### < 참고문헌 >

1. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, WHO/FAO(2002)
2. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP):  
ISAPP consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014

## II

## 안전성 제출자료

- (기본 제출자료) 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 고시된(species) 균주(strain) 또는 고시되지 아니한 균주를 기능성 원료로 인정(개별인정형)받고자 하는 경우, 기본적으로 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제14조 (제출자료 내용 및 요건) 제7호 (안전성에 관한 자료)에 따른 자료(국내·외 인정·사용현황 등)를 제출하여야 함
  - 균주의 안전성 평가를 위해 전장유전체 염기서열과 분석자료, 균주 기탁증 등 균주 특이성 확인 자료와 '항생제 내성, 용혈활성, 독성 생성여부, 대사적 특성 자료 제출'
    - ⇒ 균주의 strain 명까지 확인되어야 함
- (추가 제출자료) 균주의 고시여부, 식경험 유무 그리고 부작용 정보 등에 따라 독성시험자료 등을 제출
  - ⇒ 「건강기능식품의 기준 및 규격」 제 3. 개별 기준 및 규격(2-51 프로바이오틱스)에 따라 동일하게 제조하여 유통·판매하고 있고, 부작용 보고 등이 없는 경우 독성시험자료를 생략할 수 있음

### ○ 기본 제출자료

원료의 특성을 확인할 수 있는 전장유전체(complete genome 수준) 염기서열(fastq 파일 등) 및 유전체 분석(염기서열 비교·분석, phylogenetic systematic analysis 등)자료, 균주 기탁증 등이 제출되어야 함

이때 균주는 strain 명까지 확인되어야 하며, 식품 중 프로바이오틱스에 대한 안전성 평가 가이드라인(WHO/FAO)에 따른 항생제 내성, 용혈활성, 독성 생성여부 및 대사적 특성 자료가 제출되어야 함

# 예시

유전체 분석 자료, 전장유전체(fastq 파일 등) 자료

## ※ 유전체 분석 자료

# Lactobacillus 0000

## General Report for Genome Sequence Analysis

This file has been automatically generated by the CLGenomic™ program (<http://www.chunlab.com/genomic>).

Chunlab, Inc. provides comprehensive genomics and bioinformatics solutions for genome sequencing, comparative genomics, transcriptomics and microbial community analysis. For more information, please visit <http://www.chunlab.com/>.

ErTaxon-e name : Lactobacillus curvatus  
Property :  
Strain :  
Taxonomy (ErTaxon-e) :  
Original Name : Lactobacillus curvatus  
ErGenome Accession : 10379.LC7601.1

Genome size : 1,898,189 bp  
GC ratio : 43.75 %  
Number of chromosomes : 0  
Number of plasmids : 0  
Number of contigs : 66  
Number of scaffolds : 0  
Number of rRNA genes : 6  
Number of ORFs : 1,094  
Method : Illumina\_MiSeq\_300\_PE  
Method reads : 6200970  
Method coverage : 806.47  
Assembler : CLCbio CLC Genomics Workbench 7.8  
Coverage : 806.47  
N50 : 65,358  
Sequences : 10379.LC7601.1.000  
Comment :

### \* Functional categories based on COG(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)

| COG   | Description                                                  | Number of Genes | %      |
|-------|--------------------------------------------------------------|-----------------|--------|
| J     | Translation, ribosomal structure and biogenesis              | 142             | 9.28%  |
| K     | Transcription                                                | 135             | 8.81%  |
| L     | Replication, recombination and repair                        | 140             | 9.18%  |
| D     | Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning   | 22              | 1.57%  |
| O     | Posttranslational modification, protein turnover, chaperones | 61              | 3.23%  |
| M     | Cell wall/membrane/envelope biogenesis                       | 96              | 6.17%  |
| N     | Cell motility                                                | 6               | 0.39%  |
| P     | Inorganic ion transport and metabolism                       | 61              | 3.99%  |
| T     | Signal transduction mechanisms                               | 43              | 2.81%  |
| C     | Energy production and conversion                             | 69              | 3.66%  |
| G     | Carbohydrate transport and metabolism                        | 131             | 8.98%  |
| H     | Amino acid transport and metabolism                          | 99              | 6.56%  |
| I     | Nucleotide transport and metabolism                          | 78              | 5.10%  |
| H     | Coenzyme transport and metabolism                            | 46              | 2.94%  |
| I     | Lipid transport and metabolism                               | 44              | 2.85%  |
| Q     | Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism | 7               | 0.46%  |
| R     | General function prediction only                             | 196             | 12.81% |
| S     | Function unknown                                             | 187             | 12.22% |
| Total |                                                              | 1620            | 100%   |

# Lactobacillus 00000

801

## General Report for Genome Sequence Analysis

This file has been automatically generated by the CLGenomic™ program (<http://www.chunlab.com/genomic>).

Chunlab, Inc. provides comprehensive genomics and bioinformatics solutions for genome sequencing, comparative genomics, transcriptomics and microbial community analysis. For more information, please visit <http://www.chunlab.com/>.

ErTaxon-e name : Lactobacillus plantarum  
Property :  
Strain :  
Taxonomy (ErTaxon-e) :  
Original Name : Lactobacillus plantarum  
ErGenome Accession : 10379.LF1032.1

Genome size : 3,188,366 bp  
GC ratio : 44.61 %  
Number of chromosomes : 0  
Number of plasmids : 0  
Number of contigs : 40  
Number of scaffolds : 0  
Number of rRNA genes : 4  
Number of ORFs : 3,039  
Method : Illumina\_MiSeq\_300\_PE  
Method reads : 4910566  
Method coverage : 406.37  
Assembler : CLCbio CLC Genomics Workbench 7.8  
Coverage : 406.37  
N50 : 170,209  
Sequences : 10379.LF1032.1.000  
Comment :

### \* Functional categories based on COG(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)

| COG   | Description                                                  | Number of Genes | %      |
|-------|--------------------------------------------------------------|-----------------|--------|
| J     | Translation, ribosomal structure and biogenesis              | 145             | 6.29%  |
| K     | Transcription                                                | 266             | 11.11% |
| L     | Replication, recombination and repair                        | 117             | 6.08%  |
| D     | Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning   | 26              | 1.13%  |
| O     | Posttranslational modification, protein turnover, chaperones | 67              | 2.47%  |
| M     | Cell wall/membrane/envelope biogenesis                       | 137             | 6.92%  |
| N     | Cell motility                                                | 10              | 0.43%  |
| P     | Inorganic ion transport and metabolism                       | 117             | 6.05%  |
| T     | Signal transduction mechanisms                               | 76              | 3.30%  |
| C     | Energy production and conversion                             | 106             | 4.60%  |
| G     | Carbohydrate transport and metabolism                        | 268             | 11.80% |
| H     | Amino acid transport and metabolism                          | 203             | 8.77%  |
| I     | Nucleotide transport and metabolism                          | 84              | 3.66%  |
| H     | Coenzyme transport and metabolism                            | 70              | 3.13%  |
| I     | Lipid transport and metabolism                               | 63              | 2.73%  |
| Q     | Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism | 13              | 0.56%  |
| R     | General function prediction only                             | 220             | 13.99% |
| S     | Function unknown                                             | 231             | 10.03% |
| Total |                                                              | 2358            | 100%   |

## ○ 추가 제출자료

균주의 고시 여부, 식경험 유무 그리고 부작용 정보 등에 따라 개별적으로 독성시험자료 등 제출 여부가 달라질 수 있음

### 가. 고시된 균주

#### (1) 17종(species)

「건강기능식품의 기준 및 규격」 제 3. 개별 기준 및 규격(2-51 프로바이오틱스)에 고시된 균종 17종으로서, 식경험도 있고 부작용 보고 등이 없다면 독성시험자료를 생략할 수 있음

반면에 고시된 균종(species)의 균주라 하더라도 식경험이 부족하거나 부작용 국내·외 문헌 등 독성 보고사례, 인정·유통 현황 중 부작용 사례 등이 있는 경우 독성시험자료가 요구될 수 있음

- *Lactobacillus* : *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*
- *Lactococcus* : *Lc. lactis*
- *Streptococcus* : *S. thermophilus*
- *Bifidobacterium* : *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis* ssp. *lactis*

※ 고시 제2021-65호(2021.7.29.), 시행일(2024.1.1.)

|                            | 종류(학명)                                                                                                          |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i>       | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> |
| <i>Lactocaseibacillus</i>  | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>                                                     |
| <i>Limosilactobacillus</i> | <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i>                                                                         |
| <i>Lactiplantibacillus</i> | <i>L. plantarum</i>                                                                                             |
| <i>Ligilactobacillus</i>   | <i>L. salivarius</i>                                                                                            |
| <i>Lactococcus</i>         | <i>Lc. lactis</i>                                                                                               |
| <i>Enterococcus</i>        | <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>                                                                          |
| <i>Streptococcus</i>       | <i>S. thermophilus</i>                                                                                          |
| <i>Bifidobacterium</i>     | <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>                  |

## (2) 2종(species)

「건강기능식품의 기준 및 규격」 제 3. 개별 기준 및 규격(2-51 프로바이오틱스)에 고시된 2개의 균종은 항생제 내성/독성 유전자 확인 시험 [「건강기능식품의 기준 및 규격」 개정 고시, 제2018-67호('18. 9. 5.)] 자료를 제출하여야 함

### ■ *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

※ *Enterococcus* 속 균주의 항생제 및 독성유전자 확인 시험(「건강기능식품의 기준 및 규격」 개정 고시, 제2018-67호)

#### (1) 검사대상 항생제 및 독성 인자 목록

##### [항생제 목록]

|    | 항생제명            | Microbiological cut-off values(mg/L) |
|----|-----------------|--------------------------------------|
| 1  | Ampicillin      | 2                                    |
| 2  | Vancomycin      | 4                                    |
| 3  | Gentamycin      | 32                                   |
| 4  | Kanamycin       | 1024                                 |
| 5  | Streptomycin    | 128                                  |
| 6  | Erythromycin    | 4                                    |
| 7  | Clindamycin     | 4                                    |
| 8  | Tylosin         | 4                                    |
| 9  | Tetracycline    | 4                                    |
| 10 | Chloramphenicol | 16                                   |

\* 항생제 최소억제농도 검사(MIC Test, Minimal inhibitory concentration Test) 후 한계치(cut-off value) 이하일 경우 적합

##### [독성인자 목록]

|   | 독성인자                  |
|---|-----------------------|
| 1 | Cytolysin             |
| 2 | Aggregation substance |
| 3 | Hyaluronidase         |
| 4 | Gelatinase            |

#### (2) 검사방법

##### [항생제 내성 유전자 확인 검사]

- ① *Enterococcus* 속 균주 유전자의 전체 게놈 서열 분석(Full genome sequencing)
- ② 제시된 10종 항생제의 내성 유전자 확인

- ③ 항생제 최소억제농도 검사(MIC Test, Minimal inhibitory concentration Test)
- Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI) 또는 European Union on Antimicrobial Susceptibility Testing(EUCAST) 방법 및 이와 동등한 방법에 따라 시험
  - \* EFSA에서 제시한 cut-off value 기준 적용(EFSA Journal 2012; 10(6): 2740)

[독성 유전자 확인 검사]

- ① *Enterococcus* 속 균주 유전자의 전체 게놈 서열 분석(Full genome sequencing)
  - ② Cytolysin, Aggregation substance, Hyaluronidase, Gelatinase의 규명된 병원성 유전자 확인
  - ③ (생화학적 시험) Cytolysin, Aggregation substance, Hyaluronidase, Gelatinase 확인시험, 용혈성 확인 시험, 혈소판 응집 반응 시험
  - ④ 단회투여독성시험
- \* 우수실험운영규정(Good Laboratory Practice, GLP)에 따라 운영된 기관이 OECD에서 정하고 있는 독성시험방법에 준하여 시험

## 나. 고시되지 않은 균주

### (1) 식경험이 있는 균주

「건강기능식품의 기준 및 규격」 제 3. 개별 기준 및 규격(2-51 프로바이오틱스)에 고시되지 않은 균종(species)이지만, 외국에서 식경험이 있는 균주(예: FDA GRAS 등재 균주), 전통 발효식품 등을 통해 장기간 식경험이 있는 균종(예: *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 등)인 경우 부작용 보고 등이 없다면 독성시험자료를 생략할 수 있음

### (2) 식경험이 없는 균주

「건강기능식품의 기준 및 규격」 제 3. 개별 기준 및 규격(2-51 프로바이오틱스)에 고시되지 않은 균종(species)으로 식경험도 없는 균종(토양 및 환경 등에서 분리된 균종 등)은 독성시험자료(단회투여, 90일 반복투여, 유전독성시험자료)를 제출해야 함

### III 안전성 평가 절차 및 판정(안)

- 전장유전체 염기서열 및 유전체 분석자료 등을 통해 균주의 특이성을 확인하여 균주의 사용 가능 여부를 판단하며,
- 고시된 균주(19종), 식경험이 있는 고시되지 않은 균주 및 식경험이 없는 고시되지 않은 균주인 경우,
  - 안전성 평가항목별(항생제 내성, 용혈활성, 독성 생성 및 대사적 특성) 분석 결과, 1개 이상의 평가항목(항목별 판단기준 적용)에서 이상이 확인되는 경우에는 안전하지 않은 균주로 판단함
  - 고시된 균주 중 *Enterococcus* 속 균주는 항생제 내성 및 독성 유전자 확인시험을 통해 유전자 유무를 확인하여야 함
- 또한, 식경험이 없는 고시되지 않은 균주는 안전성 평가 이후 독성여부를 평가하여 균주의 사용 가능 여부를 최종적으로 판단함

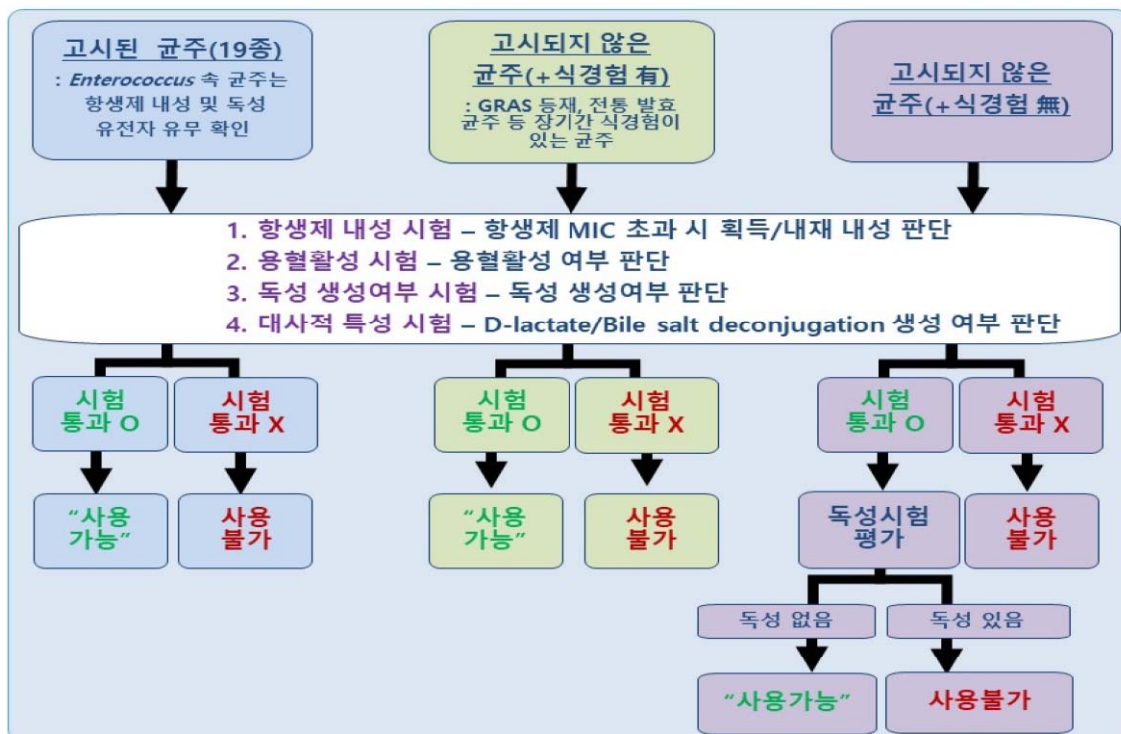


그림 1. 안전성 평가 판단 절차(안)(요약)

## IV 안전성 평가 시험방법

※ 본 가이드에서 제시된 시험방법은 프로바이오틱스 안전성 평가 관련 시험 진행 시 도움을 드리고자 안내하는 것으로, 반드시 지켜야 하는 의무사항은 아님을 알려드리며, 과학적으로 이와 동등하거나 그 이상인 시험방법이 있는 경우에는 이용 가능함

### 1. 항생제 내성

- 항생제 내성 유전자를 가지고 있으면 세균 감염 시 항생제의 효과가 나타나지 않을 수 있어 위험하고, 장 내에서는 항생제 내성 유전자의 전이가 많이 일어날 수 있으므로 미생물이 가진 항생제 내성의 특성을 파악하는 것은 무엇보다 중요함
- 미국 CDC에서는 strip 기반의 항생제 내성 최소항생제억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 시험의 편리성과 결과 균일성에 E-TEST 방법을 추천하고 있음
  - MIC 확정 후 EFSA (European Food Safety Authority) 기준에 따라 미만인 경우에는 사용이 가능할 수 있으나, 초과되는 경우에는 획득성 또는 내재성 내성여부를 판단해야 함
  - EFSA의 MIC cut-off value는 표 1과 같음(참고문헌 12)

표 1. EFSA의 MIC cut-off value (mg/L)

|                                                               | ampicillin | vancomycin     | gentamicin | kanamycin | streptomycin | erythromycin | clindamycin | tetracycline | chloramphenicol | tylosine |
|---------------------------------------------------------------|------------|----------------|------------|-----------|--------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|----------|
| <i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative <sup>a</sup>   | 1          | 2 <sup>b</sup> | 16         | 16        | 16           | 1            | 1           | 4            | 4               | -        |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> group                        | 1          | 2              | 16         | 64        | 16           | 1            | 1           | 4            | 4               | -        |
| <i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative <sup>c</sup> | 2          | n.r.           | 16         | 32        | 64           | 1            | 1           | 8            | 4               | -        |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>                                  | 2          | n.r.           | 8          | 64        | 64           | 1            | 1           | 16           | 4               | -        |
| <i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative           | 4          | n.r.           | 16         | 64        | 64           | 1            | 1           | 8            | 4               | -        |
| <i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>                       | 2          | n.r.           | 16         | 64        | n.r.         | 1            | 2           | 32           | 8               | -        |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                                | 4          | n.r.           | 16         | 64        | 32           | 1            | 1           | 8            | 4               | -        |
| <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>                          | 4          | n.r.           | 32         | 64        | 64           | 1            | 1           | 4            | 4               | -        |
| <i>Bifidobacterium</i>                                        | 2          | 2              | 64         | n.r.      | 128          | 1            | 1           | 8            | 4               | -        |
| <i>Pediococcus</i>                                            | 4          | n.r.           | 16         | 64        | 64           | 1            | 1           | 8            | 4               | -        |
| <i>Leuconostoc</i>                                            | 2          | n.r.           | 16         | 16        | 64           | 1            | 1           | 8            | 4               | -        |
| <i>Lactococcus lactis</i>                                     | 2          | 4              | 32         | 64        | 32           | 1            | 1           | 4            | 8               | -        |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>                             | 2          | 4              | 32         | 64        | 64           | 2            | 2           | 4            | 4               | -        |
| <i>Bacillus spp</i>                                           | n.r.       | 4              | 4          | 8         | 8            | 4            | 4           | 8            | 8               | -        |
| <i>Propionibacterium</i>                                      | 2          | 4              | 64         | 64        | 64           | 0.5          | 0.25        | 2            | 2               | -        |
| Other Gram +                                                  | 1          | 2              | 4          | 16        | 8            | 0.5          | 0.25        | 2            | 2               | -        |
| <i>Enterococcus faecium</i>                                   | 2          | 4              | 32         | 1024      | 128          | 4            | 4           | 4            | 16              | 4        |

n.r. not required, <sup>a</sup> including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, <sup>b</sup> not required for *L. salivarius*

<sup>c</sup> including *L. fermentum*

표 2. 항생제별 용매 및 희석 용액

| Antimicrobial Agent | Solvent                                                                                                    | Diluent                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                     | Unless otherwise stated, use a minimum amount of the listed solvent to solubilize the antimicrobial powder | Finish diluting the final stock solution as stated below |
| Ampicillin          | Phosphate buffer, pH 8, 0.1 mol/L                                                                          | Phosphate buffer, pH 6, 0.1 mol/L                        |
| Vancomycin          | Water                                                                                                      | Water                                                    |
| Gentamicin          | Water                                                                                                      | Water                                                    |
| Kanamycin           | Water                                                                                                      | Water                                                    |
| Streptomycin        | Water                                                                                                      | Water                                                    |
| Erythromycin        | 95% ethanol or glacial acetic acid                                                                         | Water                                                    |
| Clindamycin         | Water                                                                                                      | Water                                                    |
| Tetracycline        | Water                                                                                                      | Water                                                    |
| Chloramphenicol     | 95% ethanol                                                                                                | Water                                                    |
| Tylosine            | DMSO                                                                                                       | DMSO                                                     |

## ※ EFSA MIC cut-off value에 따른 판정 방법(참고문헌 12)

### ○ EFSA 항생제 내성 가이드라인

(Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance)\_EFSA Journal 2012;10(6):2740

- FDA : 2019년 2월 GRAS로 등재된 프로바이오틱스의 항생제 내성 평가 시 EFSA기준을 따름(GRN Notice 847)
- 평가방법

#### [1단계] Quantitative MIC<sup>1)</sup> determination (Microbiological cut-off values)

- MIC가 cut-off 이하 : 사용가능
- MIC가 cut-off 초과 : 추가 확인 필요(2)

\* 단, *E. faecium*이 ampicillin MIC가 2를 초과하는 경우는 병원 관련 균주로 사용불가

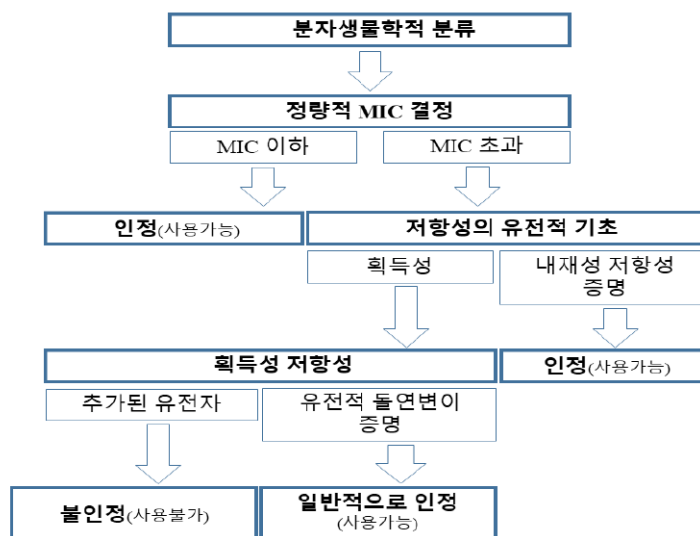
<sup>1)</sup>Minimal Inhibitory Concentration : 미생물의 번식을 억제하는 항생제의 최소 농도  
CLSI, ISO, EUCAST 등에 상응하는 기준으로 검사

#### [2단계] Genetic basis of resistance (후천적/내재적 내성 여부 판단)

- Intrinsic resistance : 같은 종(학명)에 동일하게 존재하는 내성인 경우, 즉 신청 미생물 종의 내재적인 특징인 경우 사용가능
- Acquired resistance : 추가 확인 필요(3)

#### [3단계] Acquired resistance(항생제 내성 획득 경로)

- Genomic mutation : 고유유전자의 돌연변이로 항생제 내성을 획득한 경우 사용 가능
- Added genes : 사용불가. 항생제 내성 유전자의 외부 유입 여부 검토 시 기존에 알려진 항생제 내성 유전자와 비교하여 해당 유전자의 부재를 증명하는 것으로는 내성 유전자의 외부 유입이 없음을 판단할 수 없음



[항생제 내성 확인 의사결정도]

## 1-1. Agar dilution assay

※ Clinical & Laboratory Standards Institute [(CLSI : 임상검사표준연구소)의 M07 문서] 또는 European Union on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 방법 및 이와 동등한 방법에 따라 시험(참고문헌 13)

### (1) 항생제 용액 제조

- ① EFSA에서 규정된 항생제에 맞는 용매 선정
- ② 항생제별 Stock solution 제조(표 2. 참조)
- ③ Syringe Filtration(0.2  $\mu$ m filter)을 통한 항생제 용액의 멸균

### (2) Agar dilution plate 준비

- ① 시험 균주에 적합한 배지 선정
- ② 한천배지(1.8% 한천)를 제조하여 Autoclave 후, 온열 수조 내에서 45~50°C로 조정
- ③ 항생제 용액을 무첨가(대조군)부터 농도를 두 배씩 증가시켜 한천배지에 첨가 (\*농도예시: 0, 2<sup>0</sup>, 2<sup>1</sup>, 2<sup>2</sup>, 2<sup>3</sup>, 2<sup>4</sup>.....)
- ④ 항생제가 첨가된 한천배지를 Petri dish에 20 ml씩 분주 후 실온에서 고형화함

### (3) 균주 접종(Spotting)

- ① 시험하고자 하는 균주( $1 \times 10^7$  CFU/ml) 1  $\mu$ L를 한천배지 표면에 Spotting함  
: 최종 접종 균수 ( $1 \times 10^4$  CFU/spot)

### (4) 혐기배양

- ① 접종한 균주가 한천배지에 잘 스며들도록 혐기 조건에서 30분간 상온 방치
- ② 37°C의 혐기 조건에서 46~48시간 배양함

### (5) MIC 확정

- ① 콜로니가 형성되지 않는 최저농도를 MIC로 확정(그림 2)

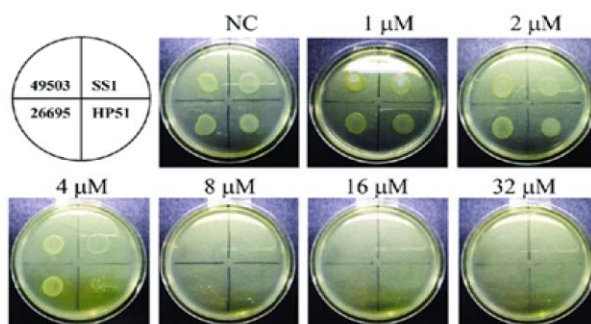


그림 2. Agar dilution assay 예시

### (6) 판정 기준

: 9개의 항생제에 대해서 EFSA MIC cut-off 기준(표 1) 보다 미만인 경우에는 사용이 가능할 수 있으나, 기준보다 수치 초과 시 획득/내재내성 판단

## 1-2. Broth microdilution assay

※ Clinical & Laboratory Standards Institute [(CLSI : 임상검사표준연구소)의 M07 문서] 또는 European Union on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 방법 및 이와 동등한 방법에 따라 시험(참고문헌 13)

### (1) 항생제 용액 제조

- ① EFSA에서 규정된 항생제에 맞는 용매 선정
- ② 항생제별 Stock solution 제조(표 2. 참조)
- ③ Syringe Filtration(0.2  $\mu$ m filter)을 통한 항생제 용액의 멸균

### (2) Broth microdilution plate 준비

- ① 시험 균주에 적합한 배지 선정
- ② 선정된 액체배지를 Autoclave 후, 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주
- ③ 항생제 용액을 무첨가(대조군)로부터 농도를 두배씩 증가시켜 액체 배지가 담긴 well에 각각 첨가 (\*농도예시: 0,  $2^0$ ,  $2^1$ ,  $2^2$ ,  $2^3$ ,  $2^4$ .....)

### (3) 균주 접종 (Spotting)

- ① 시험하고자 하는 균주 ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) 10  $\mu$ L를 각 well에 접종함  
: 최종 균수 ( $5 \times 10^4$  CFU/well) 및 well 당 최종 접종 균수 ( $5 \times 10^5$  CFU/ml)

### (4) 혐기배양

- ① 37°C의 혐기 조건에서 46~48시간 배양함

### (5) MIC 확정

- ① MIC는 항생제를 넣지 않은 대조군과 육안으로 비교하거나 viewing device를 사용하여 확인함
- ② 그림과 같이 첫번째 spot이 시작되기 전 농도를 MIC로 확정(그림 3)

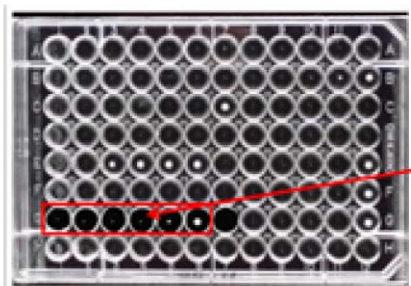


그림 3. Broth microdilution assay 예시

### (6) 판정 기준

- : 9개의 항생제에 대해서 EFSA MIC cut-off 기준(표 1) 보다 미만인 경우에는 사용이 가능할 수 있으나, 기준보다 수치 초과 시 획득/내재내성 판단

### 1-3. E-TEST<sup>®</sup>

※ 가장 보편적으로 사용되는 antibiotics strip이며, 미국 CDC에서도 사용하고 있음

#### (1) 균주 준비

- ① 0.5~1.0 McFarland ( $1.5 \sim 3 \times 10^8$  CFU/ml) 농도로 균주를 희석 후 준비

#### (2) 균주 접종

- ① 균주 적정 한천배지(1.8%)를 제조하여 Autoclave 후, 실온에서 고형화함
- ② 멸균된 면봉을 균주가 담긴 액체배지에 적신 후 꺼냄
- ③ 꺼낸 면봉을 한천배지에 lawn이 형성되도록 streaking함
- ④ 접종한 균주가 한천배지에 잘 스며들도록 혐기 조건에서 10~20분간 상온 방치

#### (3) Strip 배치

- ① 시험하고자 하는 항생제 strip을 한천배지 위에 위치 시킴
- ② Strip간의 거리가 너무 가까울 경우 MIC 측정에 문제가 생길 수 있으므로 적절한 거리를 유지하여 배치함

#### (4) 혐기배양

- ① 37°C의 혐기조건에서 46~48시간 배양함

#### (5) MIC 확정

- ① 그림 4와 같이 균이 자라지 않은 strip 부위의 가장 밑 부분을 MIC로 확정



그림 4. E-TEST MIC 판정 예시

#### (6) 판정 기준

: 9개의 항생제에 대해서 EFSA MIC cut-off 기준(표 1) 보다 미만인 경우에는 사용이 가능할 수 있으나, 기준보다 수치 초과 시 획득/내재내성 판단

## ※ 획득성/내재성 내성 판단 방법

※ 획득/내재 내성을 판단하기 위해서 생물정보학(Bioinformatics) 기반 4가지 방법을 제안하고자 함

### (1) HGTree 기반 판단 방법(참고문헌 14)

- Horizontal Gene Transfer (HGT) event를 구별할 수 있는 대표적인 방법으로는 한 Genome 내에 존재하는 GC%, dN/dS 등 특정 Genomic Signature의 불균일 함이 관찰되는 경우 판별하는 방법(HGT-DB, HGT-Finder) 및 Phylogenetic distance와 Taxonomy의 불일치를 관찰하는 방법(DarkHorse DB) 등이 있음
- 이러한 방법 중 재구성된 Gene Tree와 Species Tree의 불일치를 통해 HGT event를 발견하는 Horizontal gene transfer database (HGTree DB)를 기반으로 하는 생물정보학적 분석을 활용한다면 전장유전체를 기반으로 한 폭넓은 유전자에 대한 획득내성 구분이 가능
- 획득내성과 내재내성을 구분하기 위하여 전장유전체를 활용하여 HGTree DB를 기반으로 구분하는 방법을 제안하고자 함(그림 5)

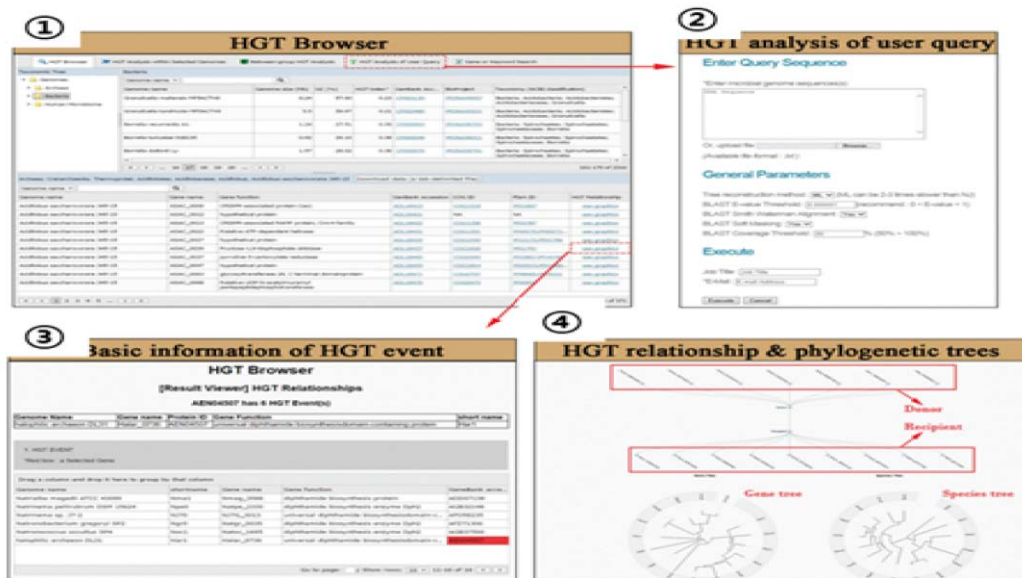


그림 5. HGTree 사용 방법 (1) HGTree DB so 항생제 내성 유전자 검색 기능 (2) 해당 균주의 전장유전체 정보입력으로 HGTree 분석을 시작 (3) HGT event가 발생한 유전자에 대한 결과 확인 (4) phylogenetic tree 기반 항생제내성 유전자의 상호관계 및 전파경로 파악으로 획득내성/내재내성 구분

- 획득내성의 경우 크게 conjugation, transduction, mobile element에 의해서 내성 유전자를 얻게 되므로 HGT 기반의 판별에 더하여 아래와 같은 추가적 방법들을 통해 구체적 전파경로를 파악할 수 있으며, HGT event의 분석 결과를 바탕으로 항생제 내성 유전자의 전파경로 파악 가능

## (2) Conjugation에 의한 획득/내재 내성 판단<sup>(참고문헌 15)</sup>

※ Plasmid에 의한 Conjugation 메커니즘 기반의 획득내성 전파 여부를 확인하기 위하여 PlasmidFinder 웹 기반 프로그램을 이용하는 방법

- ① PlasmidFinder 2.1 프로그램 기반([cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder](http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder)) 사이트에 접속 및 분석하고자 하는 전장유전체 FASTA 형식의 파일을 업로드 후 분석 진행
- ② 그림 6과 같은 결과 화면으로부터 검출된 Plasmid 관련 서열의 이름, 일치도 (Identity) 및 Accession number 등을 얻을 수 있음
- ③ 해당 Accession number를 클릭하여 NCBI에서 공개된 Plasmid 염기서열 및 유전자 정보를 할 수 있음
- ④ Annotation된 NCBI Genbank 정보로부터 해당 Plasmid 내에 항생제 내성 유전자와 *tra* 유전자가 있는지 확인
- ⑤ Plasmid 내에 *tra* 유전자 존재 및 항생제 내성 유전자 존재 시 획득내성으로 판단

## PlasmidFinder 2.1

Service
Instructions
Output
Article abstract
Citations

Software version: 2.0.1 (2020-07-01)  
Database version: (2021-11-29)  
[Test sequence](#)

The database is curated by:  
**Henrik Hasman and Alessandra Carattoli**  
(click to contact)

**Select database**  
Gram Positive  
Enterobacteriales

**1. Gram Positive / Enterobacteriales 중  
검색에 사용할 DB 선택 (복수 선택 가능)**

**Select threshold for minimum % identity**  
95 %

**Select minimum % coverage**  
60 %

**Select type of your reads**  
Only data from one single isolate should be uploaded. If raw sequencing reads are uploaded KMA will be used for mapping. KMA supports the following sequencing platforms: Illumina, Ion Torrent, Roche 454, SOLiD, Oxford Nanopore, and PacBio.  
Assembled or Draft Genome/Contigs\* ( )

Choose File(s)

**2. 업로드 할 파일을 선택**

Name
Size
Progress
Status

Upload
Remove

**3. 해당 버튼을 누르면 파일을 업로드 한  
뒤 자동으로 분석 시작**

## PlasmidFinder-2.0 Server - Results

Organism(s): *Enterobacteriales, Gram Positive*

| Enterobacteriales |          |                         |                                                                          |                    |      |                  |
|-------------------|----------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid           | Identity | Query / Template length | Contig                                                                   | Position in contig | Note | Accession number |
| IncFIA(HI1)       | 100      | 388 / 388               | gij7800243jgcjAF250878.1j Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence | 157357..157744     |      | AF250878         |
| IncHI1A           | 99.76    | 420 / 420               | gij7800243jgbjAF250878.1j Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence | 39702..40121       |      | AF250878         |
| IncHI1B(R27)      | 100      | 540 / 540               | gij7800243jgcjAF250878.1j Salmonella typhi R27 plasmid complete sequence | 54421..54960       | R27  | AF250878         |

**4. 해당 Accession을 누르면 대응되는 NCBI  
의 Genbank 페이지로 넘어갈 수 있음**

그림 6. PlasmidFinder 결과 화면 예시

### (3) Transduction에 의한 획득/내재 내성 판단(참고문헌 16)

※ Prophage에 의한 Transduction 메커니즘 기반의 획득내성 전파 여부를 확인하기 위하여 PHAST 웹 기반 프로그램을 이용하는 방법

- ① PHAST (phast.wishartlab.com) 사이트에 접속하여 분석하고자 하는 전장유전체의 FASTA 파일 업로드 또는 Genbank Accession이 존재할 경우 해당 이름을 넣고 분석 진행
- ② 결과 화면에서 Detailed file을 클릭하여 Phage 서열이 검출된 각 영역과 해당 영역 내에서 발견된 Bacterial DB 또는 Genbank 서열에 해당하는 유전자(회색으로 표시된 각 줄)가 있는지 확인
- ③ 그림 7과 같이 검출된 유전자 내에 항생제 내성 유전자가 있는지 확인
- ④ Prophage 내에 항생제 내성 유전자 존재 시 획득내성으로 판단

**1. Genbank accession이 존재하는 경우 해당 번호를 기입하고 Submit**

**2. 사용자가 자신의 파일을 가지고 있는 경우 파일을 업로드 또는 염기 서열을 아래에 붙여 넣고 Submit**

**3. Detailed file을 클릭하여 자세한 결과 확인**

**4. Input으로부터 Prophage 서열이 관찰된 부분 (연두) / Bacterial Gene이 관찰된 부분 (회색) 확인**

**5. 해당 영역에서 Matching된 염기 서열의 자세한 정보 확인 및 우측의 클릭 버튼에서 염기 서열 다운로드 가능**

| #  | CDS POSITION               | BLAST HIT                                                                                | E-VALUE | SEQUENCE              |
|----|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------|
| 1  | 863948..863965             | attL1 TAAAAACAAAATAAAAG                                                                  | 0.0     | <a href="#">Click</a> |
| 2  | complement(869313..870290) | PHAGE_Parame_FR483; hypothetical protein FR483_N0935; LA14_0914; phage(gi155370191)      | 1e-25   | <a href="#">Click</a> |
| 3  | 870425..870513             | (rRNA                                                                                    | 0.0     | <a href="#">Click</a> |
| 4  | complement(870706..871656) | PHAGE_Lactob_Sha1; phage integrase; LA14_0916; phage(gi15459524)                         | 7e-72   | <a href="#">Click</a> |
| 5  | complement(871876..872076) | hypothetical protein; LA14_0917                                                          | 0.0     | <a href="#">Click</a> |
| 6  | complement(872079..872732) | PHAGE_Lactob_U965; putative superinfection immunity protein; LA14_0918; phage(gi1179219) | 2e-05   | <a href="#">Click</a> |
| 7  | complement(873261..873599) | PHAGE_Lactob_U965; putative repressor; LA14_0919; phage(gi1179224)                       | 1e-26   | <a href="#">Click</a> |
| 8  | 873763..873966             | PHAGE_Lactob_U965; putative cro repressor; LA14_0920; phage(gi1179225)                   | 1e-16   | <a href="#">Click</a> |
| 9  | 874226..875617             | amino acid permease domain protein; LA14_0921                                            | 0.0     | <a href="#">Click</a> |
| 10 | 875745..876701             | PHAGE_Bacill_ECP76; putative thymidylate synthase; LA14_0922; phage(gi10492791)          | 6e-79   | <a href="#">Click</a> |
| 11 | 876711..877214             | PHAGE_Bacill_pHAGATE; putative dihydrofolate reductase; LA14_0923; phage(gi448260875)    | 6e-18   | <a href="#">Click</a> |
| 12 | 8990009..899026            | attR TAAAAACAAAATAAAAG                                                                   | 0.0     | <a href="#">Click</a> |

그림 7. PHAST 결과 화면 예시.

(4) Mobile element에 의한 획득/내재 내성 판단(참고문헌 17)

※ Mobile element에 의한 획득내성 전파 여부를 확인하기 위하여 Mobile Element Finder 웹 기반 프로그램을 이용하는 방법

- ① Mobile Element Finder (cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder) 사이트에 접속 및 분석을 원하는 전장유전체의 FASTA 파일 업로드
- ② ResFinder 기반의 항생제 내성 유전자의 탐색 여부를 묻는 옵션에 체크
- ③ 분석을 진행하여 그림 8과 같은 결과로부터 #MGEs 열 정보를 참조하여 MGE가 발견된 서열 및 해당 서열의 Resistance 유전자 정보를 확인
- ④ Mobile element 염기서열 안에 원하는 항생제 내성 유전자가 있는지 확인하여 존재 시 획득내성으로 판단

**MobileElementFinder**

Software version: v1.0.3 (2020-10-09)  
Database version: v1.0.2 (2020-06-09)

MobileElementFinder identifies mobile genetic elements and their relation to antimicrobial resistance genes and virulence factors.

Example sequence

Annotate accessory genes (Optional)  
If you want to use databases currently not supported by MobileElementFinder, please download the mobile element sequences and upload them to the service of choice

☒ Acquired Antimicrobial Resistance genes (ResFinder) **1. AMR 또는 VF 유전자를 함께 검색하기 위해 선택 또는 해제**  
☒ Virulence genes (VirulenceFinder)

**2. 업로드 할 파일을 선택**

**3. 해당 버튼을 누르면 파일을 업로드 한 뒤 자동으로 분석 시작**

**MobileElementFinder Results**

Sample name: DTU2017-818-contigs-test  
Date: 2022-09-02\_12:23  
MGEfinder version: 1.0.0  
MGEdb version: 1.0.2  
Displaying: 19 of 149 mobile elements

**4. MGE와 AMR이 함께 관찰된 경우를 확인할 수 있음**

| Contig                            | Plasmid          | #MGEs | Resistance | Virulence       |
|-----------------------------------|------------------|-------|------------|-----------------|
| NODE_64_length_19224_cov_7.736... | Inc11            | 3     | tet(A)     |                 |
| NODE_72_length_7006_cov_10.258... |                  | 0     | tet(B)     |                 |
| NODE_94_length_2336_cov_10.495... |                  | 0     | sul2       |                 |
| NODE_169_length_89559_cov_10.1... |                  | 2     | blaTEM-1C  |                 |
| NODE_90_length_3094_cov_18.102... |                  | 1     | blaCTX-M-1 |                 |
| NODE_56_length_16010_cov_9.207... |                  | 0     | strABCD    | iucC, iutA, ... |
| NODE_66_length_10147_cov_19.66... | IncFIB(AP001916) | 0     |            | ompT, hlyF      |
| NODE_82_length_4717_cov_11.130... |                  | 0     |            | mchC, mchB      |

그림 8. MobileElementFinder 결과 화면 예시

## 2. 용혈활성

- 균주가 용혈활성을 가지고 있으면 숙주의 적혈구를 파괴시키므로 이를 확인하여 안전성을 평가해야 함

※ 시험방법은 미국 American Society for Microbiology 가이드라인 참고(참고문헌 18)

### 1) 혈액 한천 배지(TSA Blood agar) 제조

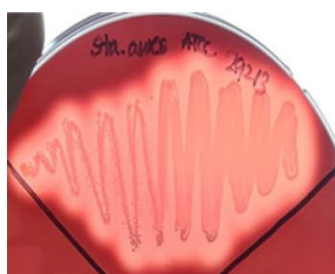
- ① 다음과 같은 조성으로 배지를 만든 후 autoclave 후 온열수조내에서 40~50°C로 조정
  - Pancreatic digest of casein USP 15.0 g
  - Papaic digest of soy meal USP 5.0 g
  - NaCl 5.0 g
  - Agar 15.0 g
  - Distilled water 1,000 ml
- ② 5%의 멸균된 sheep blood를 첨가함
- ③ 혈액이 첨가된 배지를 20 ml씩 분주 후 실온에서 고형화함

### 2) 균주 접종

- ① 해당 균주를 혈액 한천배지에 streaking함

### 3) Hemolysis 결과 분석

- ① 용혈반응을 확인하기 위해서는 반드시 투과광으로 관찰해야 함(그림 9)
- ② α-hemolysis : 적혈구 헤모글로빈의 Methemoglobin을 감소시켜 녹색 콜로니 형성  
β-hemolysis : 적혈구를 파괴하여 투명한 콜로니 형성  
γ-hemolysis : 용혈(hemolysis)현상이 확인되지 않음



용혈활성을 가지는 병원균



용혈활성이 없는 프로바이오틱스

그림 9. 용혈 활성 결과 예시

### 4) 용혈활성 기준 판정

: Positive control과 비교하여 용혈활성을 가지는 경우 사용 불가

### 3. 독성 생성

- 프로바이오틱스가 독성을 생성할 경우 인체에 유해한 결과를 초래할 수 있으므로 세포를 기반으로 *in vitro*를 통해 확인해야 함
- LDH (Lactate dehydrogenase) assay는 독성에 의해 세포가 파괴된 후 나오는 LDH의 양을 측정하여 세포의 사멸도를 측정함  
(그림 10)

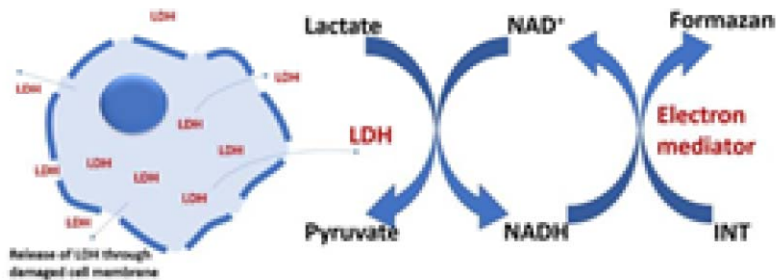


그림 10. LDH 시험 원리

- LDH assay<sup>(참고문헌 19)</sup>

#### 1) 세포배양 및 준비

- ① 멸균된 DMEM 배지에 오염을 방지하기 위해 Penicillin-Streptomycin solution (100 U/mL)을 첨가
- ② 활성화 시킨 Caco-2 또는 HT-29 cell line ( $10^4$  cells)을 100  $\mu$ L의 준비된 DMEM 세포 배지에 접종
- ③ 96 well plate의 각 well에 접종된 세포 배지를 옮긴 후 5% CO<sub>2</sub> 37°C에서 24시간 배양
- ④ 배양 후 배지 제거 후 1% BSA가 포함된 PBS로 2회 washing 후 새로운 세포 배지 100  $\mu$ L 첨가

## 2) 균주 접종

- ① 각 well에 시험균주( $10^7 \sim 10^9$  CFU)를 접종하고 5% CO<sub>2</sub> 37°C에서 24시간 배양
- ② 비교군으로서 Positive control (Lysate 용액 첨가 - 계면활성제) 및 Negative control (No lysate solution, No bacterial cell addition) 준비

## 3) LDH assay (kit 사용)

- ① 5분간 원심분리 후 (250 x g), 50  $\mu$ L의 상층액을 새로운 96well plate에 옮김
- ② 50  $\mu$ L LDH reaction mix를 넣고 30분간 상온에서 배양 후 NADH를 생성
- ③ 생성된 NADH가 INT-Formazan(colorless)을 Formazan(purple)로 변환시킴
- ④ 변화된 색깔을 450 nm에서 흡광도 측정 후, 공식에 따라 cytotoxicity (%) 계산

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Test sample} - \text{Negative cont.}}{\text{Positive cont.} - \text{Negative cont.}} \times 100$$

## 4) 독성 생성 판정 기준

- ① 독성을 생성하는 비교군 균주(control)선정
- ② 비교군보다 정량 값이 비슷하거나 유의적으로 높게 나올 시 사용 불가

#### 4. 대사적 특성

- 인체의 경우 L-lactate는 대사가 가능하지만, 이성질체인 D-lactate의 경우 대사가 불가능함
- 프로바이오틱스의 경우 L-lactate를 D-lactate로 변환하는 효소인 DL-lactate racemase를 가지고 있어 효소 활성이 강한 경우에는 신생아나 어린아이 및 선천성단장증후군(short bowel syndrome) 환자에게 D-lactate가 축적되어 산독증(acidosis)을 유발시킬 수 있음
- Bile salt의 경우 지방을 유화시켜 lipase의 작용을 촉진하여 지방산 분해에 도움을 주며, 프로바이오틱스에 존재하는 bile salt hydrolase는 bile salt로부터 프로바이오틱스를 보호하여 장내 정착을 늘리기도 하지만, bile salt를 deconjugation 시켜 bile salt의 유화기능을 없애기 때문에 지방산 분해를 어렵게 함
- 또한, deconjugation 된 bile salt의 경우 다른 장내 미생물의 대사에 의해 독성을 가진 2차 대사산물이 생성되며, 이는 잠재적으로 위험성을 가질 수 있음

#### 4-1. D-lactate production 방법 (참고문헌 21)

##### 1) 샘플준비

- ① 시험균주를 37°C에서 24시간 배양 후 상층액을 확보함
- ② Kit에 제공된 D-lactate를 기반으로 standard 샘플 준비

##### 2) D-lactic acid production test (kit 사용)

- ① 준비된 샘플 50  $\mu$ L 을 96well plate의 각 well에 분주한 후 50  $\mu$ L의 reaction mix (D-lactate assay buffer 46  $\mu$ L, D-lactate assay substrate 2  $\mu$ L, D-lactate enzyme mix 2  $\mu$ L)를 분주함
- ② 상온에서 30분간 배양
- ③ 변화된 색깔을 450 nm에서 흡광도 측정 후 공식에 따라 D-lactate 양을 측정

- 샘플의 D-lactate 양(La, nmol) =  $\frac{\text{측정 흡광도값} - (y\text{절편값})}{\text{표준곡선의 기울기}}$
- 샘플의 D-lactate 농도(nmol/ $\mu$ L) = La/100  $\mu$ L

##### 3) D-lactate 판정 기준

: D-lactate의 생성 유무에 따라 racemase 효소 양성/음성으로 판정

※ (참고) 양성의 경우 신생아, 어린아이, short bowel syndrome 환자에게 위험할 수 있으므로 섭취 시 주의사항 등에 관련 문구 명시 필요

## 4-2. Bile salt deconjugation 방법 (참고문헌 22)

### 1) 한천배지에서 BSH (Bile salt hydrolase) 활성 시험 준비

- ① 0.5%의 taurodeoxycholic acid (TDCA; bile acid, Sigma)가 첨가된 MRS 한천배지를 준비

### 2) 한천배지에서 BSH (Bile salt hydrolase) 활성 시험 및 분석

- ① 시험균주를 0.5%의 TDCA가 첨가된 MRS 한천배지에 streaking 후 혐기 조건에서 37°C에서 2일간 배양
- ② BSH activity가 있는 균주의 경우 콜로니 주변에 불투명한 하얀색 콜로니가 형성됨(그림 11)

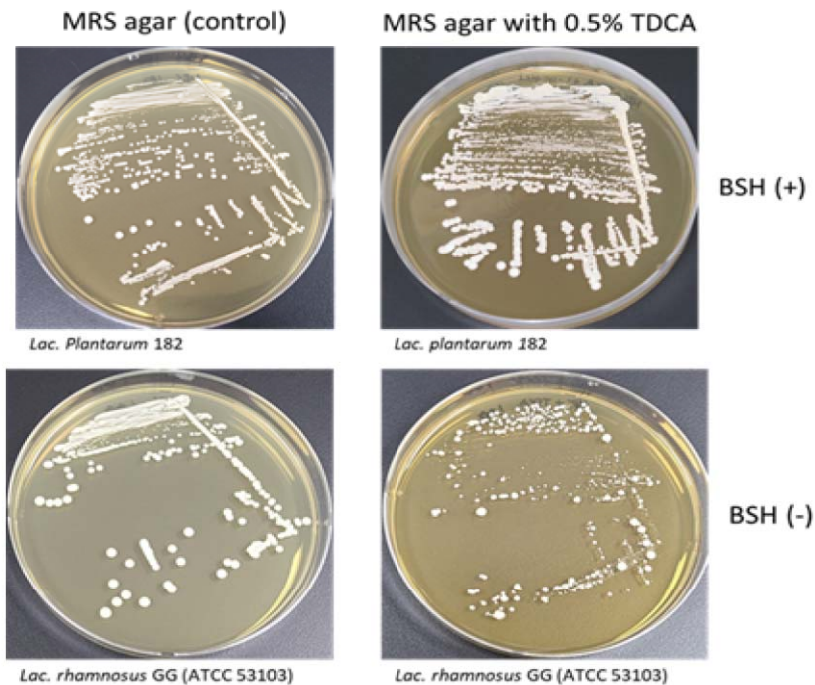


그림 11. Bile salt deconjugation test 결과 예시

### 3) BSH 판정 기준

: Bile salt deconjugation의 생성 유무에 따라 Bile salt hydrolase 효소 양성/음성으로 판정

※ (참고) 양성의 경우 deconjugation된 bile salt의 2차 대사산물이 독성을 가질 수도 있으므로 과다 섭취하지 않도록 주의 권고 필요

※ 본 가이드에서 제시된 고려사항은 프로바이오틱스 독성시험 진행 시 도움을 드리고자 안내하는 것으로, 'OECD 독성시험 가이드라인 등'을 토대로 일부 정리한 자료로, 반드시 지켜야 하는 의무사항은 아님을 알려드리며, 과학적으로 이와 동등하거나 그 이상인 경우에는 이용이 가능함

## 1. 프로바이오틱스 독성시험을 위한 동물모델 표준화 및 최적화

### 1) 시험동물의 표준화

가) 유전자 돌연변이가 없는 일반 동물 사용

나) 선형동물(ex, *C. elegans*), 곤충(*Drosophila*), 물고기(zebrafish), 설치류 등 많은 동물이 사용되지만, 생리적 연관성과 시험의 비용, 기간, 현실성을 고려하여 설치류로 표준화

다) 주령의 경우 다양한 논문을 참고하여 5~6주령 동물로 기준선정

### 2) 동물시험조건 표준화 및 최적화

가) 반드시 강제경구투여(oral gavage)

\* 시험물질을 stomach tube를 사용하여 위관영양법(gavage)으로 투여함

나) 독성시험 투여 균주 수는 통일되어야 하며, 단위는 CFU/kg/day로 선정함

다) 생균수를 최소  $10^7 \sim 10^9$  CFU/kg/day 이상의 양으로 투여함

라) 균주 1개당 10마리 이상의 동물로 진행하여야 하며, 암수의 비율을 1:1로 해야 함

마) 투여 기간은 최소 2주 이상이며, 매일 투여해야 함

## 2. 프로바이오틱스 독성시험방법

### 1) 단회투여독성시험

- 가) 시험동물은 설치류 또는 비설치류 중 1종을 선택하여야 함
- 나) 경구투여는 원칙적으로 강제투여로 하고, 통상 투여 전 일정시간 동물을 절식시키며, 프로바이오틱스 생균(최소  $10^{11}$  CFU/kg)을 다른 농도별로 시험동물에 투여함
- 다) 섭취 후 2주 동안 관찰하여 사망 여부를 통해 치사량 확인
- 라) 시험기간 중 3회 이상의 체중 측정과 반드시 매일 정해진 시간 내에 임상증상 관찰
- 마) 단회투여독성시험 후 시험 결과에는 다음 내용이 포함되어야 함
  - 개략의 치사량
  - 매일 임상증상을 관찰기록
  - 시험기간 중 3회 이상의 체중 측정 기록
  - 관찰기간 종료 후 육안적 해부소견
  - 육안적 이상소견이 관찰된 장기·조직에 대하여 필요시 병리조직학적 검사

### 2) 90일 반복투여독성시험

- 가) 시험동물은 설치류 또는 비설치류 중 1종을 선택하여야 함
- 나) 프로바이오틱스 생균(최소  $10^9$  CFU/kg)을 시험동물에 90일간 매일 1회 투여
- 다) 투여 후 체중, 사료 섭취량, 음수 섭취량 측정 후 기록
- 라) 시험 종료 후 장기 무게, 혈액검사, 뇨검사, 병리조직학적 검사(육안 및 현미경), 기타 기능 검사를 통해 독성 평가

### 3) 유전독성시험

- 가) 프로바이오틱스 생균(최소  $10^{11}$  CFU/kg)을 최소 3회 이상 투여 후, 설치류의 골수나, 말초혈액 세포에서 유발되는 염색체의 손상 정도 파악
- 나) 염색체 조각이나 염색체 전체를 포함하는 소핵의 형성 여부로 cytogenetic damage 측정

#### ○ 박테리아를 이용한 돌연변이복귀시험

- 살모넬라균 또는 대장균을 이용한 돌연변이복귀시험으로 프로바이오틱스 생균을 이용해서는 시험을 진행할 수 없으므로 사균을 이용하여 진행해야 함  
→ 생균을 대상으로 하는 박테리아를 이용한 돌연변이복귀시험은 어려움(오염)

#### ○ 배양세포를 이용한 염색체 또는 소핵시험

- 생균을 세포에 직접 분주하여야 하고, 균주가 살아있는 상태로 평가를 수행해야 하므로 독성시험이 불가능함  
→ 향후 시험적인 검증절차가 선행되어야 함

### ※ (참고) NGS 기반 메타게놈/메타샷건 기술 기반 안전성 평가 방법

#### 1) 메타게놈 분석 기반 안전성 평가

- 가) *16S rRNA* amplicon sequencing 기술을 통한 장내 균총 분석
- 나) 생물정보학 분석을 통한 장내 균총 조성 분석 및 비교 분석을 통한 시험동물 영향도 평가
- 다) 프로바이오틱스 제품 내 또는 복합균주 내 균주 종류 파악 및 조성 분석 가능
- 라) 균주 섭취 후 분변의 메타게놈 분석을 기반으로 유익균/유해균 비율을 확인하여 안전성을 평가

## 2) 메타샷건 분석 기반 복합균주 신속 동정 방법

가) Total DNA random sequencing 기술을 활용한 복합균주 제품 내 특정 프로바이오틱스 신속 검출 및 동정

나) 메타샷건 분석 정보의 활용

- 복합균주 내 특정 균주의 부분 전장유전체 확보용이
- 특정균주의 부분 전장유전체 기반 항생제 내성 및 독성 유전자 검출

다) 메타샷건 기술을 기반으로 제품 내 복합균주의 오염도 확인 및 존재 비율에 대해서 확인

라) 제품 내 독성 및 항생제 내성 유전자 확인 가능

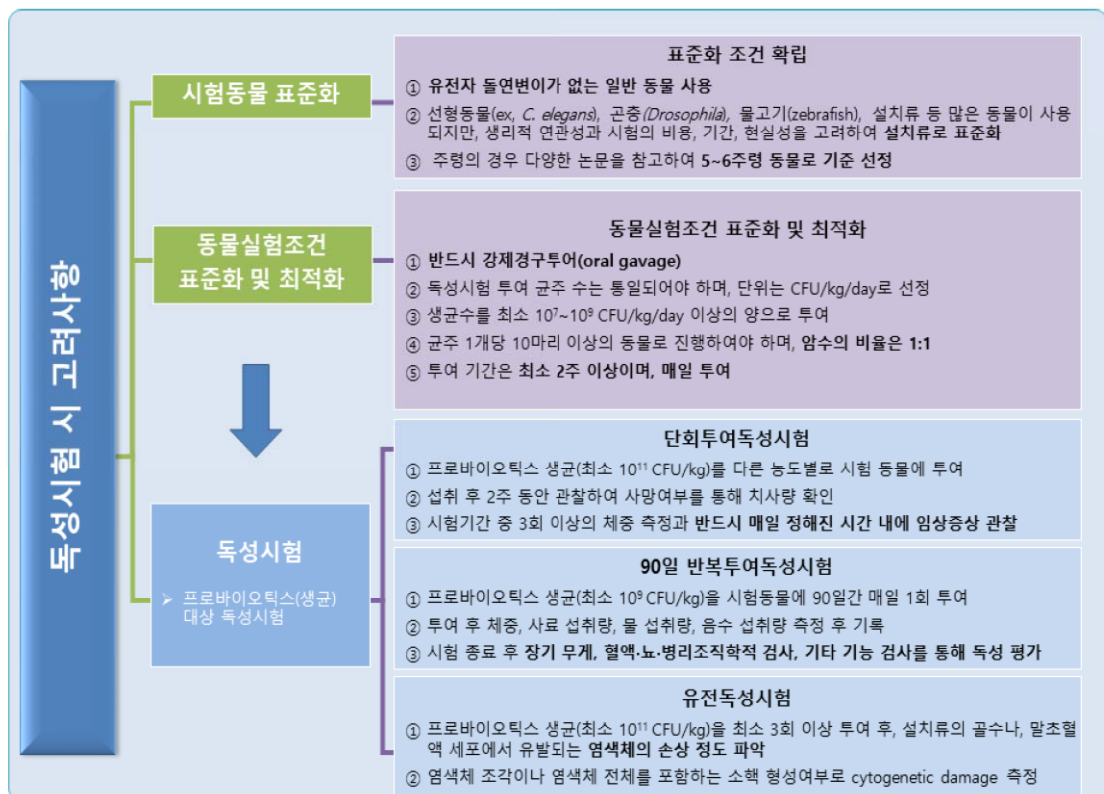


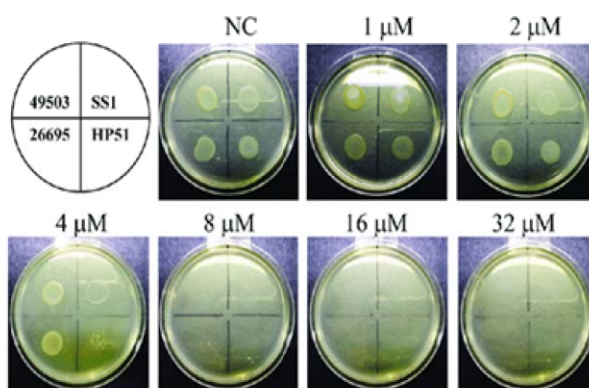
그림 12. 독성시험 시 고려사항(요약)

## 【항생제 내성】

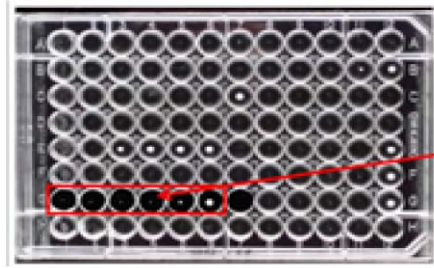
- 시험방법 : Agar dilution assay, Broth microdilution assay, E-test® 등의 항생제 내성 평가를 통해 MIC(최소 항생제억제농도) 확정 후 EFSA MIC cut-off 기준과 비교
- 시험결과 : 유럽식품안전청 지침에 따른 9가지 항생제에 대해 내성이 없는 것으로 나타남

## · MIC 측정 결과

| Antimicrobail Agent | Minimal Inhibitory Concetration<br><i>Latobacillus</i> OOOO( $\mu\text{g/mL}$ ) | Microbiological breakpoints( $\mu\text{g/mL}$ )<br>FEEDAP 2012 <i>Lactobacillus</i> obligate<br>homofermentative |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ampicillin          | <0.03125                                                                        | 1                                                                                                                |
| Chloramphenicol     | 0.25                                                                            | 4                                                                                                                |
| Clindamycin         | 0.25                                                                            | 1                                                                                                                |
| Erythromycin        | 0.125                                                                           | 1                                                                                                                |
| Gentamicin          | 1                                                                               | 16                                                                                                               |
| Kanamycin           | 4                                                                               | 16                                                                                                               |
| Streptomycin        | 4                                                                               | 16                                                                                                               |
| Tetracycline        | 0.125                                                                           | 4                                                                                                                |
| Vancomycin          | 0.0625                                                                          | 2                                                                                                                |



(Agar dilution assay 예시)



(Broth microdilution assay 예시)



(E-TEST MIC 예시)

- 항생제 내성 관련 유전자 분석

*L. 0000 0000* 균주의 전장유전체 분석 결과를 CARD 내 RGI(Resistance Gene Identifier)와 Resfinder 데이터베이스를 활용하여 분석한 결과 항생제 내성 관련 유전자가 존재하지 않는 것으로 나타남

표 3. CARD RGI 분석 결과

| Strain                  | Perfect Hits | Strict Hits | Loose Hits |
|-------------------------|--------------|-------------|------------|
| <i>L. plantarum</i> 000 | 0            | 0           | 181        |
| <i>E. faecium</i> 000   | 3            | 7           | 166        |
| <i>E. faecium</i> 000   | 6            | 5           | 175        |
| <i>E. faecalis</i> 000  | 5            | 6           | 184        |

Perfect : matches reference sequence / Strict : similarity within model / Loose : similarity outside of model

표 4. Resfinder 분석 결과 (*L. plantarum* 000 )

| Class                         | 000 | Class                             | 000 |
|-------------------------------|-----|-----------------------------------|-----|
| Aminoglycoside (22)           | -   | Nitroimidazole (1)                | -   |
| Beta-lactam (27)              | -   | Oxazolidinone (1)                 | -   |
| Lincosamide (2)               | -   | Peroxides (1)                     | -   |
| Macrolide (8)                 | -   | Pleuromutilin (1)                 | -   |
| Phenicol (3)                  | -   | Polymyxin (1)                     | -   |
| Tetracycline (5)              | -   | Pseudomonic acid (1)              | -   |
| Aldehydes (1)                 | -   | Quaternary ammonium compounds (1) | -   |
| Aminocyclitol (1)             | -   | Rifamycin (2)                     | -   |
| Fluoroquinolone (3)           | -   | Steroid antibacterial (1)         | -   |
| Folate pathway antagonist (2) | -   | Streptogramin a (4)               | -   |
| Fosfomycin (1)                | -   | Streptogramin b (3)               | -   |
| Glycopeptide (2)              | -   | Under_development (1)             | -   |

( ) : 각 class에 속한 항생제 개수

(CARD RGI, Resfinder 분석 결과 예시)

- 항생제 내성 이동성 분석

*L. 0000 0000* 균주의 유전체를 PlasmidFinder, PHASTER, ISfinder 등의 분석을 통해 유전자의 횡적 이동과 관련성이 높은 매개 수평 유전자(플라스미드, prophage, insertion sequence element) 보유 여부를 확인한 결과 매개 수평 유전자가 없는 것으로 확인되어 항생제 내성의 횡적 이동은 일어나지 않을 것으로 판단됨

Home Services Instructions Output

### PlasmidFinder-2.0 Server - Results

Organism(s): *Gram Positive*

| NT, Rep      |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| Rep, trans   |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| Rep1         |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| Inc18        |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| Rep3         |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| RepA, N      |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| Rep1         |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

| Rep2         |          |                         |        |                    |      |                  |
|--------------|----------|-------------------------|--------|--------------------|------|------------------|
| Plasmid      | Identity | Query / Template length | Config | Position in config | Note | Accession number |
| No hit found |          |                         |        |                    |      |                  |

[extended output](#)

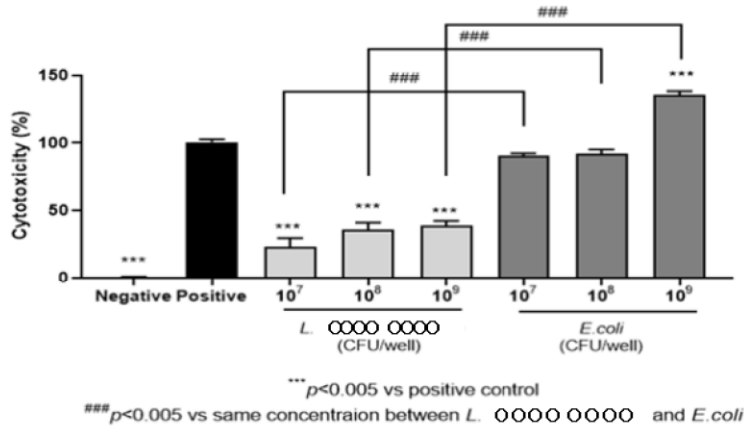
Input Files:

[Results as text](#) [Results as csv](#) [Hits in genome map](#) [Plasmid sequences](#)

(PlasmidFinder 분석 결과 예시)

### 【독성 생성여부】

- 시험방법 : LDH assay를 통한 세포독성 평가
- 시험결과 : *L. 0000 0000* 균주는 Positive control과 비교 시 유의적으로 낮은 세포독성이 나타남



### - 독성 생성 유전자 확인

*L. 0000 0000* 균주의 whole genome sequence에 데이터베이스 (VirulenceFinder 2.0, ToxFinder 1.0, PathogenFinder 1.1, DBETH 등)를 활용하여 독성 유전자 존재 여부를 분석한 결과 독성 유전자가 존재하지 않는 것으로 나타남

표 7. VirulenceFinder 2.0 스크리닝 결과

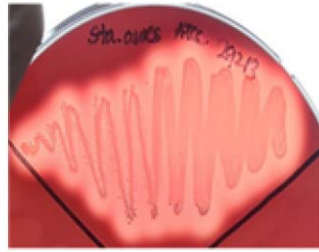
| Gene                                 | Result <i>Lactobacillus 0000</i> |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Shiga-toxin genes                    | No hit found                     |
| Virulence genes for Escherichia coli | No hit found                     |
| Virulence genes for Listeria         | No hit found                     |
| Hostimm genes for S. aureus          | No hit found                     |
| Toxin genes for S. aureus            | No hit found                     |
| Exoenzyme genes for S. aureus        | No hit found                     |
| Virulence genes for Enterococcus     | No hit found                     |

### 【용혈 활성】

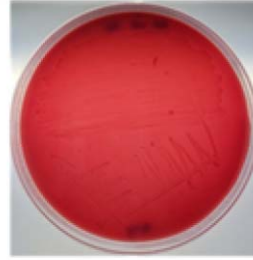
- 시험방법 : 혈액 한천 배지에 *L. 0000 0000* 균주를 접종하여 용혈 활성을 평가
- 시험결과 : 아래 표의 조건으로 배양하였을 때 용혈로 인한 혈액한천상의 반응이 나타나지 않아 용혈현상이 없는 음성( $\gamma$ -hemolysis)으로 확인함

표9. 용혈성 확인 조건

| 균주                        | 종식 배지                                     | 배양 조건            |
|---------------------------|-------------------------------------------|------------------|
| <i>Lactobacillus 0000</i> | Tryptic Soya Agar<br>+5% 양 혈액 (Bio-Media) | 36℃, 48시간, 혐기 조건 |



용혈활성을 가지는 병원균

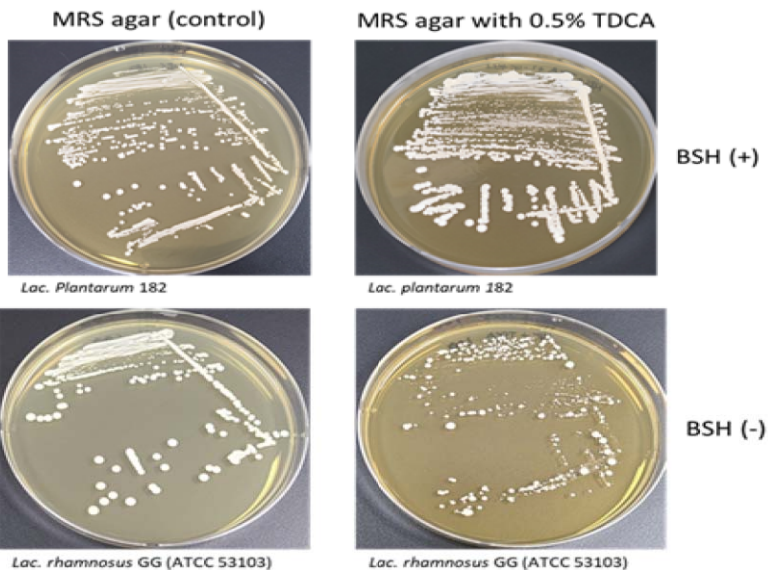


용혈활성이 없는 프로바이오틱스

(용혈 활성 결과 예시)

### 【대사적 특성】

- D-lactate 생산 여부
  - 시험방법 : D-lactic acid production test(kit 사용)를 통해 D-lactate 양 측정
  - 시험결과 : *L. 0000 0000* 균주는 L(+)-lactate(0.0 g/L)와 D(-)-lactate(0.0 g/L)의 광학이성질체를 생산하는 것으로 나타남
    - ※ D-lactate 생성 시 섭취 시 주의사항(단장증후군 등)에 반영
- Bile salt deconjugation 생산 여부
  - 시험방법 : 한천배지에서 BSH(Bile salt hydrolase) 활성 시험을 통해 BSH 활성 분석
  - 시험결과 : *L. 0000 0000* 균주는 Bile salt hydrolase 효소 양성으로 확인됨
    - ※ Bile salt hydrolase 효소 양성 시 섭취 시 주의사항(과다섭취)에 반영



(Bile salt deconjugation test 결과 예시)

- 1) 마이크로바이옴 기능성 제품인 프로바이오틱스의 최근 트렌드 및 연구 기술개발 동향과 주요 이슈, 2019, 이성희
- 2) 마이크로바이옴과 헬스케어 혁신: 프로바이오틱스 산업 전망, 2019, 한국 바이오협회
- 3) 프로바이오틱스 기술동향, 2018, 과학기술일자리진흥회
- 4) GRAS notice 758 for *Lactobacillus helveticus* R0052, 2018, FDA
- 5) Probiotics: Achieving a Better Regulatory Fit, 2014, Food Drug Law J.
- 6) On a genetic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production, 2003, European Commission
- 7) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002, WHO/FAO
- 8) 2019년 해외시장 맞춤 조사, 2019년, 한국농수산물유통공사
- 9) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotics, 2014, Nature reviews gastroenterology & hepatology
- 10) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus* Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, 2020, Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.
- 11) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100), 2018, Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).
- 12) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance, 2012, EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed
- 13) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07, 2015, Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).

- 14) HGTree: database of horizontally transferred genes determined by tree reconciliation, 2016, Nucleic Acids Res.
- 15) PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmid, 2014, Methods mol. Bio.
- 16) PHAST: A Fast Phage Search Tool, 2011, Nucleic Acids Research
- 17) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder, 2020, Journal of Antimicrobial Chemotherapy
- 18) Blood agar plates and hemolysis protocols, 2005, ASM protocol.
- 19) Inhibitory Effects of Probiotic *Lactobacillus* on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29, 2017, molecules
- 20) In vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk, 2019, microorganisms
- 21) Safety Evaluation of Oral Care Probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by Phenotypic and Genotypic Analysis. 2019, Inter. J. Mol. Sci.
- 22) Development of differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp., 1989, Appl. Environ. Microbiol.
- 23) Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*, 2004, J. Clin. Microbiol.
- 24) Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*, 2003, J Clin Microbiol.
- 25) linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant *enterococci*, 2000, Inter. J. Med. Microbiol.

- 26) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use, 2007, J. Antimicrob. Chemother.
- 27) Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Fecal Samples by PCR, 1997, J Clin Microbiol.
- 28) High-level aminoglycoside resistance in group A, B, G, D (*Streptococcus bovis*), and viridans *streptococci*, 1982, Antimicrob. Agents Chemother.
- 29) OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 420/423/425, 2001/2001/2008, OECD
- 30) Safety Assessment of Probiotics, 2009, Prebiotics and Probiotics Science and Technology
- 31) Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotics strains of lactic acid bacteria, 2000, Food and Chemical Toxicology
- 32) Immunostimulatory probiotics *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis, 2005, International Journal of Food Microbiology
- 33) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 2019, United Nations
- 34) OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 407/408/409, 2008/2018/1998, OECD
- 35) Test Guideline No. 471, 2020, OECD
- 36) OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 473/474/475, 2016/2016/2016, OECD

## 1. 국·내외 관리 동향

## [ 국내·외 프로바이오틱스 관리 동향 요약 ]

| 구분        | 대한민국                                                                                                                                               | 미국                                                                                                                           | 유럽연합                                                                                                                                          | 국제기구                                                                          | 호주                                                              | 캐나다                                               | 일본                                  | 중국                             |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 주체        | 식약처<br>(MFD)                                                                                                                                       | FDA                                                                                                                          | EFSA,<br>규제기관                                                                                                                                 | WHO/FAO                                                                       | 식약처<br>(TGA)                                                    | Health<br>Canada                                  | 소비자청                                | 식·의약품<br>감독관리국<br>(SFDA)       |
| 규정        | 건강기능식품에<br>관한 법률                                                                                                                                   | Dietary<br>Supplement<br>Health &<br>Education<br>(DSHEA)                                                                    | 식품보충제·영양 및<br>건강강조<br>표시 규정<br>등                                                                                                              | 안전성<br>평가<br>가이드라인                                                            | -                                                               | -                                                 | -                                   | 보건식품<br>관리변법                   |
| 분류        | 프로바이오틱스<br>(고시형<br>균주 19종,<br>비고시형<br>균주)                                                                                                          | 용도에<br>따라 식품,<br>의약품,<br>식이보충제<br>(식품에<br>의도적으로<br>첨가하는<br>경우는<br>식품첨가물로<br>분류)                                              | 미생물<br>건강보조<br>식품                                                                                                                             | 프로바이오틱스<br>정의                                                                 | 보완의학                                                            | 식품,<br>천연건강<br>기능제품                               | 특정보건용<br>식품                         | 보건식품<br>(특정보건<br>기능을 가진<br>식품) |
| 심사·<br>평가 | 기준규격,<br>안전성,<br>기능성 등<br>평가                                                                                                                       | GRAS 승인<br>(첨가물로<br>분류된 균주<br>사용)                                                                                            | 미생물<br>안전평가<br>시스템<br>(QPS)                                                                                                                   | 균주(Strain)<br>: 최소한의<br>안전성<br>평가                                             | -                                                               | -                                                 | 유효성·안전성<br>심사<br>(의학·영양학<br>적 근거자료) | 보건식품<br>인허가<br>시스템             |
| 기타        | (고시형균주)<br>제조기준,<br>규격,<br>최종제품의<br>요건에<br>충족되면<br>누구나<br>제조가능<br><br>(개별인정형<br>균주)<br>영업자가<br>균주<br>특이성,<br>안전성(평가),<br>기능성 등을<br>과학적으로<br>입증해야 함 | NDI인<br>경우 판매<br>75일전<br>FDA에<br>판매계획<br>신고 및<br>안전성<br>입증자료<br>제출,<br>GRAS<br>등재된<br>균주의<br>항생제<br>내성 평가<br>시 EFSA<br>기준 따름 | 4 단계<br>안전성 입증<br>① 동정<br>가능<br>② 안전성<br>관련<br>과학문헌,<br>인체사용정<br>보 필수 등<br>③ 병원성<br>특성 배제<br>④ 최종<br>용도 정의<br>/<br>EFSA<br>항생제<br>내성<br>가이드라인 | 균주<br>특이성<br>규명,<br>기반연구·<br>인체적용시<br>험을 통해<br>기능성의<br>작용기전을<br>구체화할<br>것을 권장 | 식품의약품<br>등록시스템<br>(ARTG)<br>: 제품목록,<br>의약품<br>정보,<br>균주정보<br>제시 | 기능성<br>내용,<br>안전성,<br>품질<br>(안정성),<br>표시 기준<br>제시 | -                                   | -                              |

## 2. WHO/FAO 안전성 평가 가이드라인(2002)

Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food  
London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002



Food and Agriculture Organization  
of the United Nations



World Health Organization

---

# Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food

Report of a Joint FAO/WHO Working Group on  
Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food

London Ontario, Canada  
April 30 and May 1, 2002

The opinions expressed in this report are those of the participants of the Working Group and do not imply any opinion on the part of FAO and WHO

## 1. Introduction

The Joint FAO/WHO Expert Consultation on **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food** held in Córdoba, Argentina from 1-4 October, 2001 recognized that there is a need for guidelines to set out a systematic approach for the evaluation of probiotics in food leading to the substantiation of health claims. Consequently, a Working Group was convened by FAO/WHO to generate guidelines and recommend criteria and methodology for the evaluation of probiotics, and to identify and define what data need to be available to accurately substantiate health claims. The aims of the Working Group were to identify and outline the minimum requirements needed for probiotic status. Consequently, guidelines were prepared to meet this objective.

## 2. Scope

The report of the **Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food** addressed probiotics in food, and excluded reference to the term biotherapeutic agents, and beneficial microorganisms not used in food (<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>). The Working Group adopted the same scope as the Expert Consultation, and specifically excluded genetically modified organisms (GMOs).

## 3. Guidelines for Probiotics

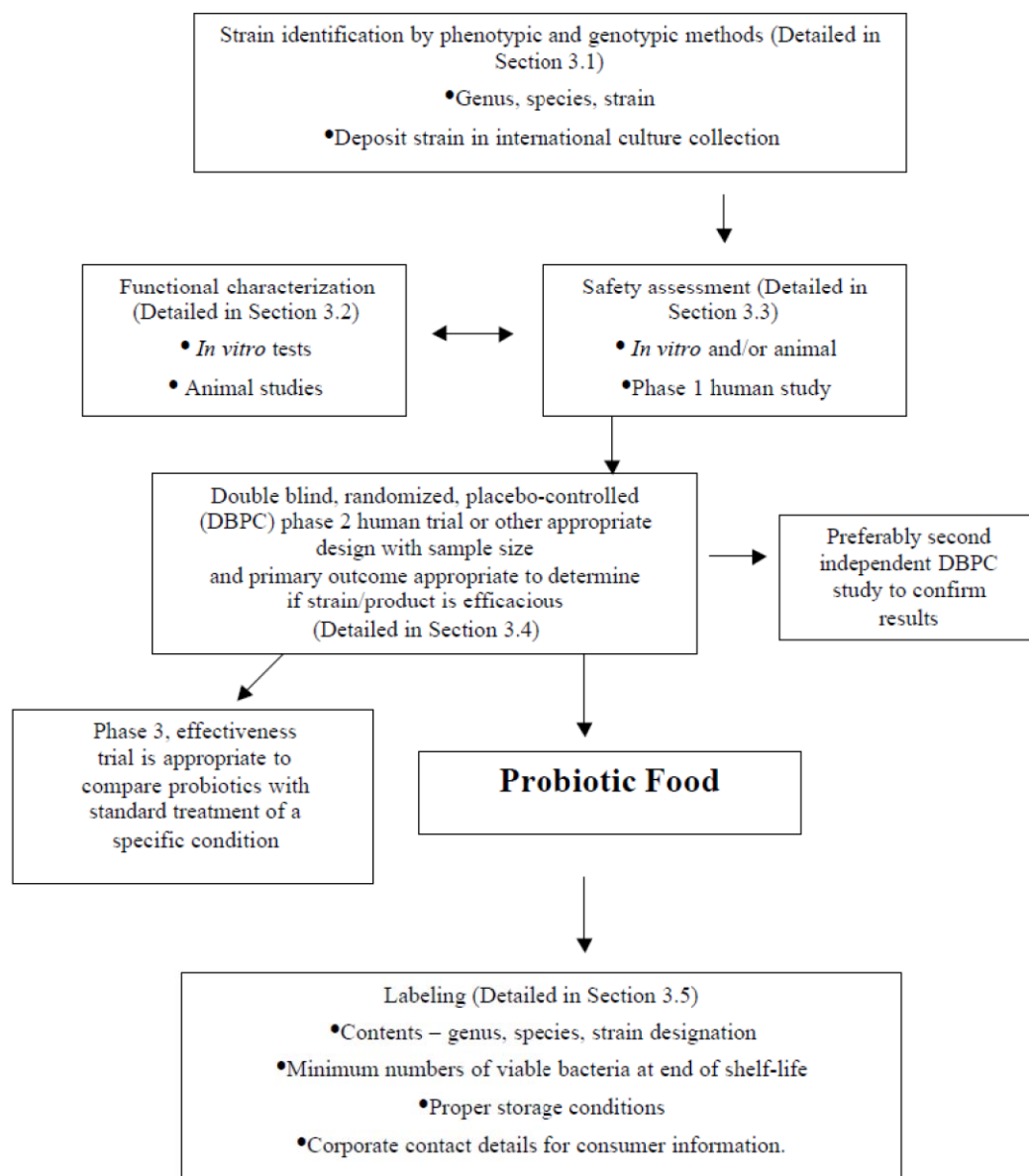
In order to claim that a food has a probiotic effect, the guidelines set forth in this report should be followed. A scheme outlining these guidelines for the evaluation of probiotics for food use is shown in Fig. 1. This was the basis for discussions and details are specified in the following sections of this report.

### 3.1. *Genus/species/strain*

It was recognized that it is necessary to know the genus and species of the probiotic strain. The current state of evidence suggests that probiotic effects are strain specific. Strain identity is important to link a strain to a specific health effect as well as to enable accurate surveillance and epidemiological studies. A possible exception is the ability in general of *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to enhance lactose digestion in lactose intolerant individuals. In this case, or in other cases where there is suitable scientific substantiation of health benefits that are not strain specific, individual strain identity is not critical.

Speciation of the bacteria must be established using the most current, valid methodology. It is recommended that a combination of phenotypic and genetic tests be used.

**Figure 1. Guidelines for the Evaluation of Probiotics for Food Use**



Nomenclature of the bacteria must conform to the current, scientifically recognized names. Protracted use of older or misleading nomenclature is not acceptable on product labels. The use of incorrect names does not properly identify the probiotic bacterium in the product and forces consumers and regulatory agencies to make assumptions about the identity of the real bacterium being sold. Current nomenclature can be retrieved as follows:

- Approved Lists of Bacterial Names (Int. J. Syst. Bacteriol, 1980,30:225-420) also available in <http://www.bacterio.cict.fr/>
- Validation Lists, published in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (or International Journal of Systematic Bacteriology, prior to 2000)

DNA-DNA hybridization is the reference method to specify that a strain belongs to a species; however, as it is time consuming and beyond the resources of many laboratories, requiring a large collection of reference strains, the use of DNA sequences encoding 16S rRNA is suggested as a suitable substitute. In this case, it is recommended that this genotypic technique be combined with phenotypic tests for confirmation.

Patterns generated from the fermentation of a range of sugars and final fermentation products obtained from glucose utilization are key phenotypes that should be investigated for identification purposes.

Strain typing has to be performed with a reproducible genetic method or using a unique phenotypic trait. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) is the gold standard. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) can also be used, but is less reproducible. Determination of the presence of extrachromosomal genetic elements, such as plasmids can contribute to strain typing and characterization.

It is recommended that all strains be deposited in an internationally recognized culture collection.

### 3.2. *In vitro* tests to screen potential probiotics.

*In vitro* tests are critical to assess the safety of probiotic microbes (see Section 3.3).

In addition, *in vitro* tests are useful to gain knowledge of strains and the mechanism of the probiotic effect. However, it was noted that the currently available tests are not fully adequate to predict the functionality of probiotic microorganisms in the human body. It was also noted that *in vitro* data available for particular strains are not sufficient for describing them as probiotic. Probiotics for human use will require substantiation of efficacy with human trials. Appropriate target-specific *in vitro* tests that correlate with *in vivo* results are recommended. For example, *in vitro* bile salts resistance was shown to correlate with gastric survival *in vivo* (Conway et al., 1987). A list of the main currently

used *in vitro* tests for the study of probiotic strains is shown in Table 1. All of these tests require validation, however, with *in vivo* performance.

Table 1. Main currently used *in vitro* tests for the study of probiotic strains

---

|                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------|
| Resistance to gastric acidity                                        |
| Bile acid resistance                                                 |
| Adherence to mucus and/or human epithelial cells and cell lines      |
| Antimicrobial activity against potentially pathogenic bacteria       |
| Ability to reduce pathogen adhesion to surfaces                      |
| Bile salt hydrolase activity                                         |
| Resistance to spermicides (applicable to probiotics for vaginal use) |

---

3.3. *Safety considerations: Requirements for proof that a probiotic strain is safe and without contamination in its delivery form*

Historically, lactobacilli and bifidobacteria associated with food have been considered to be safe (Adams & Marteau, 1995). Their occurrence as normal commensals of the mammalian flora and their established safe use in a diversity of foods and supplement products worldwide supports this conclusion. However, probiotics may theoretically be responsible for four types of side-effects (Marteau, 2002):

1. Systemic infections
2. Deleterious metabolic activities
3. Excessive immune stimulation in susceptible individuals
4. Gene transfer

Documented correlations between systemic infections and probiotic consumption are few and all occurred in patients with underlying medical conditions. The following is a list (including some microbes used in non-food applications) of infections reported to be associated (although not necessarily proven) with the consumption of commercial products:

- Two cases of *L. rhamnosus* traced to possible probiotic consumption (Rautio et al., 1999; Mackay et al., 1999).
- Thirteen cases of *Saccharomyces* fungemia due to vascular catheter contamination (Hennequin et al., 2000).
- *Bacillus* infections linked to probiotic consumption include three reports (Spinosa et al., 2000; Oggioni et al., 1998; Richard et al., 1988) detailing seven cases of *B. subtilis* bacteremia, septicemia and cholangitis, all in patients with underlying disease.

No cases of infections from *Bifidobacterium* have been reported. *Enterococcus* is emerging as an important cause of nosocomial infections and isolates are increasingly vancomycin resistant. The Working Group recognizes that some strains of *Enterococcus* display probiotic properties, and may not at the point of inclusion in a product display vancomycin resistance. However, the onus is on the producer to prove that any given probiotic strain is not a significant risk with regard to transferable antibiotic resistance or other opportunistic virulence properties.

In recognition of the importance of assuring safety, even among a group of bacteria that is Generally Recognized as Safe (GRAS), the Working Group recommends that probiotic strains be characterized at a minimum with the following tests:

1. Determination of antibiotic resistance patterns
2. Assessment of certain metabolic activities (e.g., D-lactate production, bile salt deconjugation)
3. Assessment of side-effects during human studies
4. Epidemiological surveillance of adverse incidents in consumers (post-market)
5. If the strain under evaluation belongs to a species that is a known mammalian toxin producer, it must be tested for toxin production. One possible scheme for testing toxin production has been recommended by the EU Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN, 2000)
6. If the strain under evaluation belongs to a species with known hemolytic potential, determination of hemolytic activity is required

Assessment of lack of infectivity by a probiotic strain in immunocompromized animals would add a measure of confidence in the safety of the probiotic.

#### *3.4. In vivo studies using animals and humans*

In some cases, animal models exist to provide substantiation of *in vitro* effects and determination of probiotic mechanism. Where appropriate, the Working Group encourages use of these prior to human trials.

The principal outcome of efficacy studies on probiotics should be proven benefits in human trials, such as statistically and biologically significant improvement in condition, symptoms, signs, well-being or quality of life; reduced risk of disease or longer time to next occurrence; or faster recovery from illness. Each should have a proven correlation with the probiotic tested.

Probiotics have been tested for an impact on a variety of clinical conditions (see Expert Consultation Report, Section 5.3). Standard methods for clinical evaluations are comprised of Phase 1 (safety), Phase 2 (efficacy), Phase 3 (effectiveness) and Phase 4 (surveillance). Phase 1 studies focused on safety are discussed in Section 3.3 above. Phase 2 studies, generally in the form of randomized, double blind, placebo-controlled (DBPC) design, measure efficacy compared with placebo. In addition, phase 2 studies measure adverse effects. A general recommendation for the testing of probiotic foods is that the placebo would be comprised of the food carrier devoid of the test probiotic. Sample size needs to be calculated for specific endpoints. Statistically significant differences must apply to biologically relevant outcomes.

Probiotics delivered in food generally are not tested in Phase 3 studies, which are concerned with comparison with a standard therapy. When a claim is made for a probiotic altering a disease state, the claim should be made based on sound scientific evidence in human subjects.

In Phase 2 and 3 studies, the Working Group recognizes the value of validated quality of life assessment tools.

It is recommended that human trials be repeated by more than one Center for confirmation of results.

No adverse effects related to probiotic administration should be experienced when food is considered. Adverse effects should be monitored and incidents reported.

The Working Group recommends that information accumulated to show that a strain(s) is a probiotic, including clinical trial evidence be published in peer-reviewed scientific or medical journals. Furthermore, publication of negative results is encouraged as these contribute to the totality of the evidence to support probiotic efficacy.

Further information on the generation and use of clinical information to substantiate health effects can be found at [www.ftc.gov/bcp/online/pubs/buspubs/dietsupp.htm#IIb](http://www.ftc.gov/bcp/online/pubs/buspubs/dietsupp.htm#IIb)

### 3.5. *Health claims and labeling*

Currently in most countries, only general health claims are allowed on foods containing probiotics. The Working Group recommends that specific health claims on foods be allowed relating to the use of probiotics, where sufficient scientific evidence is available, as per the guidelines set forth in this report. Such specific health claims should be permitted on the label and promotional material. For example, a specific claim that states that a probiotic 'reduces the incidence and severity of rotavirus diarrhea in infants' would be more informative to the consumer than a general claim that states 'improves gut health'. This would better comply with Codex General Guidelines on Claims (CAC/GL 1-1979 (Rev. 1-1991) to avoid misleading information.

It is recommended that it be the responsibility of the product manufacturer that an independent third party review by scientific experts in the field be conducted to establish that health claims are truthful and not misleading.

The Working Group recommends that the following information be described on the label:

- Genus, species and strain designation. Strain designation should not mislead consumers about the functionality of the strain
- Minimum viable numbers of each probiotic strain at the end of the shelf-life
- The suggested serving size must deliver the effective dose of probiotics related to the health claim
- Health claim(s)
- Proper storage conditions
- Corporate contact details for consumer information

#### **4. Recommendations**

1. Adoption of the definition of probiotics as ‘Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host’.
2. Use and adoption of the guidelines in this report should be a prerequisite for calling a bacterial strain ‘probiotic’.
3. Regulatory framework to allow specific health claims on probiotic food labels, in cases where scientific evidence exists, as per the guidelines set forth in this report.
4. Promotion of these guidelines at an international level.
5. Good manufacturing practices (GMP) must be applied in the manufacture of probiotic foods with quality assurance, and shelf-life conditions established.
6. Further development of methods (*in vitro* and *in vivo*) to evaluate the functionality and safety of probiotics.

## **5. List of Abbreviations**

**CAC/GL:** Codex Alimentarius Commission/General Guidelines on Claims

**DBPC:** Double blind, randomized, placebo-controlled

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations

**GMO:** Genetically Modified Organism

**GMP:** Good manufacturing practices

**GRAS:** Generally Recognized as Safe

**PFGE:** Pulsed Field Gel Electrophoresis

**RNA :** Ribonucleic Acid

**RAPD:** Randomly Amplified Polymorphic DNA

**SCAN:** EU Scientific Committee on Animal Nutrition

**WHO:** World Health Organization

## 6. References

- Adams MR, Marteau P (1995): *On the safety of lactic acid bacteria*. Int J Food Micro, 27: 263-264.
- Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR (1987): *Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells*. J Dairy Sci, 70: 1-12.
- Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL, Berche P (2000): *Possible role of catheters in Saccharomyces boulardii fungemia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 19: 16-20.
- Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JMT (1999): *Lactobacillus endocarditis caused by a probiotic organism*. Clin Microbiol Infect, 5: 290-292.
- Marteau P (2002): *Safety aspects of probiotic products*. Scand J Nutr, (In Press).
- Oggioni MR, Pozzi G, Balensin PE, Galieni P, Bigazzi C (1998): *Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis*. J Clin Microbiol, 36: 325-326.
- Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, Koskela M (1999): *Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG*. Clin Infect Dis, 28: 1159-60.
- Richard V, Auwera P, Snoeck R, Daneau D, Meunier F (1988): *Nosocomial bacteremia caused by Bacillus species*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 7: 783-785.
- SCAN (2000): *Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Safety of Use of Bacillus Species in Animal Nutrition*. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. > <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out41.pdf>
- Spinosa MR, Wallet F, Courcol RJ, Oggioni MR (2000): *The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to Bacillus in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic?* Microb Ecol Health Dis, 12: 99-101.

## **Annex 1**

### **List of Participants**

**ARAYA, Magdalena**, Institute of Nutrition and Food Technology (INTA), Macul 5540  
– Macul, Santiago, Chile  
Tel: +56 2 678 1468  
Fax: +56 2 221 4030  
E-mail: [maraya@uec.inta.uchile.cl](mailto:maraya@uec.inta.uchile.cl)

**MORELLI, Lorenzo**, Istituto di Microbiologia UCSC, Via Emilia Parmense 84, 29100  
Piacenza, Italy  
Tel: +39 0523 599248  
Fax: +39 0523 599246  
E-mail: [morelli@pc.unicatt.it](mailto:morelli@pc.unicatt.it)

**REID, Gregor**, Lawson Health Research Institute, 268 Grosvenor St, London, Ontario  
N6A 4V2, Canada (Chairperson)  
Tel: +1 519 646 6100 x 65256  
Fax: +1 519 646 6110  
E-mail: [gregor@uwo.ca](mailto:gregor@uwo.ca)

**SANDERS, Mary Ellen**, Dairy and Food Culture Technologies, 7119 S. Glencoe Ct.,  
Centennial, CO 80122, USA  
Tel: +1 303 793 9974  
Fax: +1 303 771 6201  
E-mail: [mesanders@msn.com](mailto:mesanders@msn.com)

**STANTON, Catherine**, Teagasc, Dairy Products Research Centre, Moorepark, Fermoy,  
Co Cork, Ireland (Rapporteur)  
Tel: +353 25 42442  
Fax: +353 25 42340  
E-mail: [cstanton@moorepark.teagasc.ie](mailto:cstanton@moorepark.teagasc.ie)

### **FAO/WHO SECRETARIAT**

**PINEIRO, Maya**, Food Quality and Standards, Food and Nutrition Division, FAO,  
Via Delle Terme di Caracalla, Rome 00100, Italy  
Tel: +39 06 570 53308  
Fax: +39 06 570 54593  
E-mail: [maya.pineiro@fao.org](mailto:maya.pineiro@fao.org)

**BEN EMBAREK, Peter**, Food Safety Program, WHO, 20, Avenue Appia, CH-1211  
Geneva 27, Switzerland  
Tel: +41 22 791 42 04  
Fax: +41 22 791 48 07  
E-mail: [benembarekp@who.int](mailto:benembarekp@who.int)

### 3. 식품전문 시험·검사기관 등

#### 1) 식품전문 시험·검사기관 5개소(미생물 검사)

| 연번 | 지정번호  | 기관명                                      | 대표자명 | 소재지                                                                                | 전화                 | 팩스                | 시험검사항목                                                                   |
|----|-------|------------------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1  | 제001호 | 한국식품<br>산업협회<br>부설<br>한국식품과학<br>연구원      | 이효율  | 경기도 의왕시<br>봇들로 50(포일동)                                                             | 02-3470-<br>8200   | 02-523-<br>2072   | 이화학, 미생물,<br>잔류농약,<br>잔류동물용의약품,<br>유전자변형식품의<br>정성검사,<br>식품조사처리확인,<br>방사능 |
| 2  | 제026호 | 한국식품<br>산업협회<br>부산지원                     | 이효율  | 부산광역시 남구<br>수영로 309(대연동)                                                           | 051-628-<br>7915   | 051-628-<br>7953  | 이화학, 미생물,<br>잔류농약,<br>잔류동물용의약품,<br>유전자변형식품의<br>정성검사                      |
| 3  | 제035호 | (주)한국분석<br>기술연구원                         | 이태훈  | 부산광역시 동구<br>대영로 267<br>해광빌딩(초량동)                                                   | 051-466-<br>1231   | 051-466-<br>3298  | 이화학, 미생물,<br>잔류농약,<br>잔류동물용의약품,<br>유전자변형식품의<br>확인검사                      |
| 4  | 제038호 | (사)한국건강<br>기능식품협회<br>부설<br>한국기능<br>식품연구원 | 정명수  | 경기도 성남시<br>분당구 대왕판교로<br>700번지<br>코리아바이오파크<br>B동 A-B03호,<br>B101~102호,<br>B301~302호 | 031-628-<br>2400   | 031-628-<br>0400  | 이화학, 미생물,<br>잔류농약,<br>잔류동물용의약품,<br>방사능,<br>유전자변형식품,<br>식품조사처리확인          |
| 5  | 제045호 | 한국<br>에스지에스<br>(주)                       | 이인섭  | 경기도 의왕시<br>맑은내길 67,<br>301호, 302호,<br>303호,<br>304호(오전동)                           | 031-689-<br>8612~7 | 070-4332<br>-1659 | 이화학, 미생물,<br>잔류농약,<br>잔류동물용의약품,<br>유전자변형식품의<br>정성검사, 방사능                 |

## 2) 자가품질위탁 시험·검사기관 58개소(미생물 검사)

| 연번 | 지정번호  | 기관명                           | 대표자명        | 소재지                                          | 전화             | 팩스           | 시험검사항목                                                     |
|----|-------|-------------------------------|-------------|----------------------------------------------|----------------|--------------|------------------------------------------------------------|
| 1  | 제009호 | 한국장류협동조합                      | 임태기         | 서울특별시 송파구<br>삼전로 7길 6                        | 02-424-3141~4  | 02-424-3145  | 이화학, 미생물                                                   |
| 2  | 제019호 | (주)현대<br>그린푸드<br>식품위생연구소      | 박홍진         | 경기도 용인시<br>수지구 문인로 30                        | 031-525-2131~9 | 031-525-2493 | 이화학, 미생물,<br>식품용수등의<br>노로바이러스,<br>유전자변형식품의<br>확인검사         |
| 3  | 제023호 | (재)한국건설<br>생활환경<br>시험연구원(KCL) | 조영태         | 서울특별시 금천구<br>가산디지털<br>1로199(가산동)             | 02-2102-2571   | 02-855-1802  | 이화학, 미생물                                                   |
| 4  | 제025호 | 삼성웰스토리(주)<br>식품연구소            | 한승환         | 경기도 용인시<br>기흥구 용구대로<br>2442-1(마북동, 외<br>6필지) | 031-288-5017   | 031-288-0811 | 이화학, 미생물,<br>방사능,<br>식품용수등의<br>노로바이러스,<br>유전자변형식품의<br>확인검사 |
| 5  | 제033호 | (재)전북바이오<br>융합산업진흥원           | 김동수         | 전북 전주시 덕진구<br>원장동길 111-18                    | 063-210-6537   | 063-210-6559 | 이화학, 미생물                                                   |
| 6  | 제039호 | 수원여자대학교<br>식품분석연구센터           | 차보숙         | 경기도 화성시<br>봉담읍 주석로 1098                      | 031-290-8217~8 | 031-290-8220 | 이화학, 미생물                                                   |
| 7  | 제050호 | (주)산업공해연구소                    | 이기채,<br>이혜선 | 서울시 금천구<br>디지털로 130<br>남성프라자<br>1008-1010    | 02-2026-1252   | 02-2026-1268 | 이화학, 미생물,<br>잔류농약                                          |
| 8  | 제060호 | 건국바이오(K-BIO,<br>식·의약 연구센터)    | 원형식         | 충북 충주시<br>충원대로 268<br>상허연구동 514호             | 043-840-3871   | 043-840-3872 | 이화학, 미생물                                                   |
| 9  | 제065호 | (재)창녕양파장류<br>연구소              | 한정우         | 경상남도 창녕군<br>대지면 우포2로<br>1085                 | 055-532-3921   | 055-532-3922 | 이화학, 미생물                                                   |
| 10 | 제068호 | (주)아워홈<br>식품연구센터              | 구지은         | 서울특별시 강서구<br>마곡중앙10로 91<br>7층                | 02-6966-9438   | 02-6713-6539 | 이화학, 미생물,<br>식품용수등의<br>노로바이러스,<br>방사능                      |
| 11 | 제069호 | 한서대학교<br>산학협력단<br>식품분석센터      | 김현성         | 충남 서산시<br>한서1로 46 이학관<br>103호                | 041-660-1776   | 041-660-1775 | 이화학, 미생물                                                   |

| 연번 | 지정번호  | 기관명                                   | 대표자명 | 소재지                                                                        | 전화                                 | 팩스                | 시험검사항목                        |
|----|-------|---------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 12 | 제075호 | 에스피씨(주)<br>식품생명공학연구소                  | 황재복  | 서울특별시 관악구<br>관악로 1<br>서울대학교 203동<br>5층<br>(501,503,505,506호)               | 02-870-<br>7426                    | 02-870-<br>7499   | 이화학, 미생물                      |
| 13 | 제079호 | 주식회사<br>유로핀즈우슬                        | 한재성  | 대전광역시 유성구<br>테크노2로<br>328(탑립동)                                             | 042-936-<br>1212                   | 042-936-<br>1220  | 이화학, 미생물                      |
| 14 | 제080호 | 서원대학교<br>산학협력단<br>친환경바이오 소재<br>및 식품센터 | 이인철  | 충북 청주시 흥덕구<br>무심서로 377-3<br>서원대학교<br>제2자연관 215호 외                          | 043-299-<br>8156~7                 | 043-299-<br>8158  | 이화학, 미생물                      |
| 15 | 제081호 | 한국인터텍테스팅<br>서비스(주)                    | 김주용  | 서울특별시 성동구<br>성수동 아차산로<br>5길<br>7(성수동2가,아주디<br>지텔타워 1층)                     | 02-6090-<br>9521                   | 02-3409-<br>0505  | 이화학, 미생물                      |
| 16 | 제083호 | (재)진안홍삼연구소                            | 김태영  | 전북 진안군 진안읍<br>홍삼한방로 41                                                     | 063-432-<br>0193                   | 063-432-<br>0910  | 이화학, 미생물,<br>잔류농약             |
| 17 | 제088호 | 푸드스트(주)<br>식품분석센터                     | 유주열  | 경기도 이천시<br>부발읍 중부대로<br>1763번길 45, 3층                                       | 031-8011<br>-3804                  | 031-8011<br>-3840 | 이화학, 미생물,<br>식품용수등의노로<br>바이러스 |
| 18 | 제090호 | 재단법인<br>경북바이오<br>산업연구원                | 한진관  | 경북 안동시 풍산읍<br>산업단지 2길 5                                                    | 054-850-<br>6901,<br>6914~<br>6916 | 054-850-<br>6999  | 이화학, 미생물                      |
| 19 | 제091호 | (재)금산인삼약초<br>산업진흥원                    | 김영수  | 충남 금산군 금산읍<br>인삼광장로 25                                                     | 041-750-<br>1631                   | 041-750-<br>1629  | 이화학, 미생물                      |
| 20 | 제092호 | 동해안해양생물자원<br>연구센터                     | 변희국  | 강원도 강릉시<br>죽헌길 7(지변동)<br>강릉원주대학교<br>공동실험실습관 4층                             | 033-640-<br>2730                   | 033-643-<br>3832  | 이화학, 미생물                      |
| 21 | 제093호 | (주)오에이티씨<br>(OATC Inc.)               | 방상구  | 서울특별시 금천구<br>범안로 1130,<br>디지털엠피아빌딩<br>801~806호,<br>905~912호,<br>1010~1011호 | 070-4044<br>-8832                  | 070-4032<br>-1902 | 이화학, 미생물                      |

| 연번 | 지정번호  | 기관명                           | 대표자명        | 소재지                                                                   | 전화                 | 팩스                | 시험검사항목                         |
|----|-------|-------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|
| 22 | 제094호 | (사)KOTITI<br>시험연구원            | 김정수         | 경기도 성남시<br>중원구 둔촌대로<br>541번길 29 2층<br>(상대원동)                          | 02-3451-<br>7446   | 02-3451-<br>7464  | 이화학, 미생물,<br>식품용수 등의<br>노로바이러스 |
| 23 | 제096호 | 씨제이프레시웨이(주)<br>고객품질안전센터       | 정성필         | 경기도 이천시<br>마장면 덕평로 811                                                | 031-776-<br>5640   | 031-631-<br>7352  | 이화학, 미생물,<br>식품용수 등의<br>노로바이러스 |
| 24 | 제097호 | (사)한국인삼제품<br>협회               | 송래섭         | 서울특별시 종로구<br>창경궁로 16가길 8                                              | 02-3672-<br>8502~4 | 02-3672-<br>8505  | 이화학, 미생물                       |
| 25 | 제099호 | (주)디아이분석센터                    | 류옥균,<br>이영준 | 경기도 의정부시<br>가능로 9, 2,3,4층<br>(가능동, 수신빌딩)                              | 031-836-<br>5123   | 031-836-<br>5124  | 이화학, 미생물                       |
| 26 | 제100호 | (주)세스코시험분석<br>센터              | 전찬혁         | 서울특별시 강동구<br>상일로10길 36, 8층<br>(상일동)                                   | 02-2140-<br>3515   | 02-426-<br>6052   | 이화학, 미생물                       |
| 27 | 제101호 | (주)바이오푸드랩                     | 이용표         | 서울특별시 구로구<br>디지털로30길 28,<br>1410호~1414호<br>(구로동,<br>마리오타워)            | 070-7410<br>-1400  | 070-7410<br>-1430 | 이화학, 미생물                       |
| 28 | 제102호 | (주)동원에프앤비<br>식품안전센터           | 김재욱         | 서울특별시 서초구<br>마방로고 60, 2층                                              | 02-589-<br>6842    | 02-589-<br>3396   | 이화학, 미생물                       |
| 29 | 제104호 | 중앙생명연구원(주)                    | 박명희         | 경기도 남양주시<br>별내면 청학로<br>54번길 50                                        | 031-844-<br>1720   | 031-844-<br>0854  | 이화학, 미생물                       |
| 30 | 제105호 | 제일분석센터(주)                     | 이은미         | 서울특별시 구로구<br>디지털로<br>272(구로동) 한신 IT<br>타워 909, 910, 912,<br>913, 914호 | 02-868-<br>8188    | 02-868-<br>4610   | 이화학, 미생물                       |
| 31 | 제107호 | (주)동진생명연구원                    | 이창흠         | 경남 창원시 의창구<br>차룡로 48번지 61                                             | 055-293-<br>5440   | 055-293-<br>6980  | 이화학, 미생물,<br>식품용수 등의<br>노로바이러스 |
| 32 | 제109호 | (재)전남바이오산업<br>진흥원<br>식품산업연구센터 | 고철중         | 전남 나주시<br>동수농공단지길<br>30-5(동수동)                                        | 061-336-<br>9620   | 061-336-<br>9627  | 이화학, 미생물                       |

| 연번 | 지정번호  | 기관명                             | 대표자명        | 소재지                                        | 전화                 | 팩스                | 시험검사항목                         |
|----|-------|---------------------------------|-------------|--------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|
| 33 | 제110호 | 한국표준시험분석<br>연구원(주)              | 안무현         | 경기도 안산시<br>단원구 광덕4로<br>250, 씨티프라자<br>5층    | 031-493-<br>3547   | 031-493-<br>1959  | 이화학, 미생물                       |
| 34 | 제112호 | 계명대학교<br>전통미생물자원개발<br>및 산업화연구센터 | 이삼빈         | 대구광역시 달서구<br>달구벌대로 1095<br>첨단산업지원센터        | 053-580-<br>6446   | 053-580-<br>6465  | 이화학, 미생물                       |
| 35 | 제113호 | 한국김치.절임식품<br>공업협동조합             | 김경배         | 서울특별시 송파구<br>백제고분로<br>509(대중빌딩 6층)         | 02-2203-<br>8729   | 02-419-<br>4581   | 이화학, 미생물                       |
| 36 | 제114호 | (주)한국바이오분석<br>연구원               | 박준식         | 경기도 군포시<br>엘에스로로 163,<br>중산빌딩 6층           | 031-602-<br>9000   | 031-604-<br>9001  | 이화학, 미생물                       |
| 37 | 제115호 | 한결분석센터<br>주식회사                  | 김진호         | 경남 사천시<br>구암두문로 80                         | 055-853-<br>4045~6 | 055-853-<br>4048  | 이화학, 미생물                       |
| 38 | 제119호 | 부경대학교<br>식품분석센터                 | 오정환         | 부산광역시 남구<br>용당동 신선로 365                    | 051-629-<br>7356   | 051-629-<br>7360  | 이화학, 미생물                       |
| 39 | 제120호 | (주)아이에스에이<br>연구원                | 최영훈         | 경기도 수원시<br>영통구 삼성로<br>168번길 38(4층,<br>매탄동) | 031-212-<br>0063   | 031-212-<br>0622  | 이화학, 미생물                       |
| 40 | 제121호 | 미크론분석기술센터                       | 김효정         | 경기도 화성시<br>화산중앙로 64번길<br>3, 204호(송산동)      | 031-225-<br>8284   | 031-237-<br>8284  | 미생물                            |
| 41 | 제122호 | 주식회사 다솔<br>식품분석연구소              | 최원석         | 경기도 하남시<br>초광산단로 126,<br>2층(광암동)           | 02-441-<br>5448    | 070-8709<br>-5549 | 이화학, 미생물,<br>식품용수 등의<br>노로바이러스 |
| 42 | 제125호 | 주식회사 씨티케이                       | 임채광,<br>김태환 | 경기도 용인시<br>기흥구 신정로<br>41번길 52-17           | 031-702-<br>3155   | 031-624-<br>9501  | 이화학, 미생물                       |
| 43 | 제127호 | (주)하동녹차연구소<br>식품분석센터            | 조경환         | 경남 하동군<br>섬진강대로 3748-14                    | 055-880-<br>6540   | 055-880-<br>6549  | 이화학, 미생물                       |

| 연번 | 지정번호  | 기관명                       | 대표자명 | 소재지                                                                       | 전화               | 팩스               | 시험검사항목                |
|----|-------|---------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| 44 | 제128호 | 뷰로베리타스<br>씨피에스코리아<br>주식회사 | 김선아  | 경기도 안양시<br>동안구 별말로 126,<br>8층(전체), 9층<br>902호,<br>908~915호(관양동,<br>오비즈타워) | 031-688-<br>8000 | 031-360-<br>0276 | 이화학, 미생물              |
| 45 | 제130호 | 동명생명과학원<br>주식회사(지점)       | 민석진  | 광주광역시 북구<br>첨단벤처소로38번길<br>11-5 (월출동)                                      | 062-351-<br>1005 | 062-351-<br>1006 | 이화학, 미생물,<br>잔류농약     |
| 46 | 제132호 | (주)한국유로핀즈<br>분석서비스        | 한재성  | 경기도 군포시<br>산본로 101번길 13                                                   | 031-361-<br>7706 | 031-361-<br>7798 | 이화학, 미생물              |
| 47 | 제134호 | 한국식품안전관리<br>인증원           | 조기원  | 충북 청주시 흥덕구<br>오송읍 오송생명5로<br>156                                           | 043-928-<br>0179 | 043-928-<br>0029 | 이화학, 미생물,<br>잔류동물용의약품 |
| 48 | 제135호 | (주)한국분석센터                 | 김윤아  | 부산광역시 동구<br>고관로 46(부림빌딩,<br>4층)                                           | 051-714-<br>4691 | 051-714-<br>4692 | 이화학, 미생물              |
| 49 | 제136호 | 중부대학교<br>산학협력단            | 이주현  | 충남 금산군 추부면<br>대학로 201<br>중부대학교<br>산학협력관 2층                                | 041-750-<br>6320 | 041-750-<br>6573 | 이화학, 미생물              |
| 50 | 제139호 | 제주대학교<br>생명과학<br>기술혁신센터   | 김세재  | 제주특별자치도<br>제주시 제주대학로<br>102                                               | 064-754-<br>2136 | 064-726-<br>3539 | 이화학, 미생물              |
| 51 | 제140호 | 순창군미생물산업<br>사업소           | 정도연  | 전북 순창군 순창읍<br>민속마을길 61                                                    | 063-650-<br>5426 | 063-650-<br>5429 | 이화학, 미생물              |
| 52 | 제141호 | (주)캠바이오                   | 이헌무  | 부산광역시 동래구<br>명안로 77번길<br>25(명장동)                                          | 051-711-<br>7170 | 051-711-<br>7169 | 이화학, 미생물              |
| 53 | 제142호 | 한국식품산업<br>클러스터 진흥원        | 김영재  | 전북 익산시 왕궁면<br>국가식품로 100                                                   | 063-720-<br>0500 | 063-720-<br>0619 | 이화학, 미생물              |
| 54 | 제143호 | 디에이치유(DHU)바<br>이오융복합시험센터  | 박수진  | 경북 경산시<br>한의대로 1<br>바이오센터 2층                                              | 053-819-<br>1495 | 053-819-<br>1496 | 이화학, 미생물              |
| 55 | 제144호 | (재)목포수산식품<br>지원센터         | 김종식  | 전남 목포시<br>고하대로 719번길<br>52(연산동)                                           | 061-276-<br>1671 | 061-276-<br>1673 | 이화학, 미생물              |

| 연번 | 지정번호  | 기관명                 | 대표자명 | 소재지                                    | 전화               | 팩스               | 시험검사항목   |
|----|-------|---------------------|------|----------------------------------------|------------------|------------------|----------|
| 56 | 제145호 | (주)휴먼바이오            | 정주영  | 충남 공주시<br>한적2길 52-103,<br>2~4층         | 041-881-<br>9200 | 041-881-<br>9201 | 이화학, 미생물 |
| 57 | 제149호 | 대전대학교<br>산학협력단      | 이영환  | 대전광역시 동구<br>대학로 62,<br>대전대학교<br>산학협력단  | 042-280-<br>2826 | 042-280-<br>2624 | 이화학, 미생물 |
| 58 | 제151호 | 포항시 수산물<br>품질관리 연구소 | 이강덕  | 경북 포항시 남구<br>구룡포읍<br>구룡포길117번길<br>28-8 | 054-270-<br>2855 | 054-270-<br>2740 | 미생물      |

본 안내서는 식품의약품안전평가원([www.nifds.go.kr](http://www.nifds.go.kr)) 또는 식품안전나라([www.foodsafetykorea.go.kr](http://www.foodsafetykorea.go.kr)) 누리집에서 전문을 내려받으실 수 있습니다.

## 건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드

- FAO/WHO 가이드라인을 중심으로 -

발 행 일 : 2022년 9월

발 행 인 : 식품의약품안전평가원장 서경원

편집위원장 : 식품위해평가부장 윤혜정

편 집 위 원 : 이혜영, 윤태형, 권광일, 김규현, 서은채, 이유경, 고경욱,  
정유경, 이미영, 홍은경, 안정선, 최정호, 이세윤, 이민아,  
전혜련

※ '20년 프로바이오틱스 유전자 특성 및 안전성 확인 방법 연구  
(서울대학교 이주훈 교수)

발 행 처 : 식품의약품안전평가원 영양기능연구과

주 소 : 28159 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187  
Tel. 043-719-4425, Fax. 043-719-4420

# 건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드

- WHO/FAO 가이드라인을 중심으로 -

NATIONAL INSTITUTE OF FOOD AND DRUG SAFETY EVALUATION



**[부패·공익신고 안내]** ※ 신고자의 비밀을 보장합니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 "국민소통 > 국민신문고·제안 > 국민신문고" 코너
- ▶ 청렴포털([www.clean.go.kr](http://www.clean.go.kr)) 또는 국민신문고 홈페이지([www.epeople.go.kr](http://www.epeople.go.kr))