

Review Article

프로바이오틱스 제품의 과학적 품질관리를 위한 최신 기술의 활용

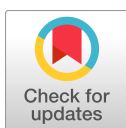
김병용*

(주)천랩 마이크로바이옴연구소

Recent Research Technologies for Quality Control of Commercial Probiotics

Byung-Yong Kim*

Microbiome Research Centre, ChunLab Inc.



Received: Dec. 9, 2019
Revised: Dec. 18, 2019
Accepted: Dec. 20, 2019

*Corresponding author :
Byung-Yong Kim
Microbiome Research Centre,
ChunLab Inc., JW Tower,
Seoul 06725, Korea
Tel: +82-2-875-2501,
E-mail: byungyong.kim@chunlab.com

ORCID
Byung-Yong Kim
https://orcid.org/0000-0002-4229-8859

Abstract

Probiotics have been shown to benefit human health through their role in improving the health of our body, especially gastrointestinal tracts. Probiotic bacteria are commonly incorporated into a variety of functional foods or drug formulations. Despite the extensive commercial exploitation of probiotic bacteria, there are still major knowledge gaps regarding the precise molecular composition and labeling of products. Several studies have reported issues concerning the accuracy of labeling of commercial probiotic products, including inaccurate taxonomy and cell counting. The study of microbiology and genomics has been accelerated by the invention of new technologies such as next generation sequencing (NGS) and flow cytometry (FACS). Recent many studies showed that NGS and FACS technology can be also applied for quality control of commercial probiotics. Here, we review advantages and limitations of current technologies for quality control of commercial probiotics. Principles and applications of new technologies are also introduced as alternative tools for the same purposes.

Keywords

probiotics, quality-control, microbiome, next-generation sequencing, flow cytometry

서론

110년 전 노벨생리의학상 수상자인 메치니코프 (Elie Metchnikoff) 박사가 유산균 섭취를 수명 연장의 비결로 소개한 이후, 프로바이오틱스 (Probiotics) 연구는 연구자들의 많은 관심을 받으며, 의학과 산업 분야에서 중요한 영역으로 자리 잡았다. 현재의 프로바이오틱스는 요거트, 치즈, 김치 등의 발효 식품에서 건강보조제, 의약품, 화장품의 형태로 실생활에 다양하게 활용되고 있다. 최근에는 프로바이오틱스가 인간 마이크로바이옴 (microbiome)과 깊은 연관성이 있는 것으로 알려지면서, 장내 환경을 변화시키는 조절제로서의 기능에 대해 주목을 받고 있다 (Sanders *et al.*, 2018). 프로바이오틱스의 섭취는 소화 촉진은 물론, 과민성 대장증후군 (IBS), 염증성 장질환 (IBD) 등 여러 질환의 개선에 도움을 주고, 감염

성 질환이나 유해세균의 억제 기능도 하는 것으로 알려져 있다. 인체의 면역시스템을 증진시켜 아토피, 류마티스 등의 면역질환에도 효능을 보인다 (Maurya *et al.*, 2014).

위와 같은 이유로 프로바이오틱스 시장은 빠르게 성장하고 있다. 2017년 전 세계 프로바이오틱스 시장은 대략 456억 달러 (한화 50조)원 정도로 추산되며, 매년 7% 성장율이 예상되고 있다. 미국에서만 한 해 390만 명의 성인들이 프로바이오틱스 제품을 섭취하고 있고, 전체 의사의 60%가 프로바이오틱스를 환자의 처방에 활용하고 있다 (Market and Markets, 2017). 국내에서도 2017년에 이미 시장규모 2,000억 원을 넘어섰고, 전체 건강기능식품 시장에서 홍삼에 이어 두번째로 인기있는 상품이 되었다.

그러나 한편에서는 프로바이오틱스의 효능과 안전성에 대한 논란이 끊이지 않고 있다. 프로바이오틱스의 임상적 효능이 확실치 않다는 연구들도 종종 보고되고 있으며, 심지어 부작용에 대한 연구들도 꾸준히 보고되고 있다(Zmora *et al.*, 2018). 미국 식약청(FDA)과 유럽 식품안전청(EFSA)에서는 질병 치료에 대한 프로바이오틱스의 임상적 근거들에 대해서 아직도 공식적으로 인정하고 있지 않다. 이에 따라 유럽과 미국에서는 프로바이오틱스 제품에 대해 질병의 예방과 치료 효능을 표기하는 것을 금지하고 있으며, 건강기능식품 보충제(supplement)로만 허용하고 있다. 국내의 경우는 프로바이오틱스의 임상적 효능을 정장작용과 배변활동 촉진으로 제한하고 있고, 지정 고시된 19종의 미생물에 한해서만 건강기능식품의 형태로 판매가 가능하다. 이들 고시형 19종 이외의 미생물 종을 제품에 활용하거나, 특별한 임상적 효능을 표기하기 위해서는 유효성과 안전성에 대한 복잡한 심사 과정을 거쳐 식약처로부터 개별인정형 제품으로 별도의 허가를 받아야 한다.

빠르게 성장하는 프로바이오틱스 시장 규모에 따라 부작용의 사례도 점점 늘어나고 있다. 건강기능식품 이상사례를 신고 받는 식품안전정보원 신고센터에 접수된 프로바이오틱스 제품 고발 건 수가 2013년부터 2017년까지 총 801건에 해당하며, 이 수치는 매년 증가하고 있다(연합뉴스, 2018). 이런 이유로 2018년 식약처는 프로바이오틱스를 포함한 기능성 원료 9종을 대상으로 상시적 재평가를 실시한다고 밝혔다(식약처, 2018). 최근 상업용으로 판매되는 프로바이오틱스 제품들 중에서 품질관리가 일정하게 되지 않는 사례가 종종 연구 결과를 통해서 밝혀지고 있다. 가령, 제품내에 표기된 최소 균주 함유량에 미달하는 사례, 미생물의 동정이 잘못되어 있는 사례, 제품내에 표기되어 있지 않은 균주의 오염 사례 등이다 (Morovic *et al.*, 2016). 심지어는 곰팡이가 오염된 제품의 섭취 후 영유아의 사망까지 초래한 사건도 있었다 (Vallabhaneni *et al.*, 2015).

최근 차세대 염기서열분석기술(NGS: Next-generation sequencing) 등의 발전은 기존 미생물 연구의 패러다임을 바꾸었으며, 식품과

의약품의 품질관리와 안전성 검사 등의 목적으로도 활용이 가능해지고 있다(Jackson *et al.*, 2019). 국내 식약처에서도 제품 내에 존재하는 미생물 종(species)의 존재를 NGS 기술로 분석하여 제출할 것을 의무화하였다. 이와 같은 기술적, 사회적 배경은 프로바이오틱스 제품의 품질관리를 높이기 위한 국내외의 연구와 기술동향에 대해 깊은 고찰의 필요성을 제기한다. 본 논문에서는 프로바이오틱스 제품의 국내외의 규제 현황과, 현재 사용되는 기술의 한계점, 과학적 품질관리를 위한 새로운 기술의 도입과 활용에 대해서 소개하고자 한다.

본 론

프로바이오틱스 제품의 라벨 규정

2001년 세계보건기구(WHO)와 국제식량농업기구(FAO)는 프로바이오틱스를 ‘적정량을 섭취했을 때 체내 건강에 유익한 역할을 하는 살아 있는 미생물’ 이라고 정의하였다(FAO/WHO, 2002). 이 가이드라인에서는 제품의 라벨 정보에 미생물의 과학적 표기를 강조하고 있다. 모든 국가가 그것을 반드시 지켜야 하는 것은 아니지만, 학계에서는 그 규정이 일반적으로 널리 인정되고 있다.

주요 내용은 다음과 같으며, 국제프로바이오틱스협회 (ISAPP)의 홈페이지에도 여러 언어로 번역되어 소개하고 있다 (<https://isappscience.org/for-consumers/infographics/>).

- i. 프로바이오틱스 제품에 넣은 균주는 최근 분류학적 명명에 기반한 속명(genus)과 종명(species)을 라벨에 표기해야 한다.
- ii. 균주명(strain name)도 제품의 라벨에 명시해야 한다. 명시한 균주명으로 제품에 함유된 개별균주의 이력을 추적하거나, 출판된 연구물의 진위 여부를 확인할 수 있다.
- iii. 제품의 사용기간 동안 생존하는 균주수를 표기한다. 보통 배양법을 통한 집락형성단위(CFU, colony-forming unit)로 표기하지만, 공인된 다른 실험법을 통해서도 가능하다.
- iv. 제품의 사용기한을 제품의 라벨에 표기한다.
- v. 건강 효능에 대한 설명은 별도로 표기하지 않는다. 다만 판매자가 제품에 대한 효능을 표기하기를 원한다면 제품내 복용량에 대한 임상시험 결과로 증명해야 한다.
- vi. 제품의 적절한 보관방법을 설명한다.
- vii. 제품사용에 대한 안내와 상담을 위해서 제조사의 연락처를 제품에 표기한다.

프로바이오틱스 균주의 분류, 동정

프로바이오틱스 제품에 사용되는 균주는 현재의 미생물 분류 체계에 맞추어 속명과 종명으로 동정되어야 한다. 올바른 분류, 동정을

위해서는 사용된 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열을 획득후에, 표준균주의 16S rRNA 유전자와 비교 계통유전학적 분석을 실시한다. 이때 BLAST를 통한 유전자 확인을 위해서는 유전체 공용 데이터베이스인 NCBI (National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), RDP (Robosomal Database Project: <http://rdp.cme.msu.edu/>), EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 등의 주요 데이터베이스를 활용한다. 이때 최근 분류체계에 따라서 표준균주들과의 정확한 상동성 검색을 위해서는 EzBioCloud 데이터베이스의 활용을 권장한다. 상업용 프로바이오틱스 균주들 중에서 가장 많이 사용되는 *Lactobacillus* 속(genus) 균주들은 200여 종이 속할 정도로 매우 높은 생리적 특성과 유전적 다양성을 보이고 있다. 최근 발표된 Salvetti 등 (2018)의 연구 논문에서는 비교유전체 분석 결과로 *Lactobacillus* 속을 포함한 근연 종 그룹이 10개의 소그룹(phylogroup)으로 구분되며, 대략 23개의 속(genus)들로 재분류될 수 있다고 제시하였다. 실험 기법의 발전과 분류 연구의 진전에 따라, 미생물 종의 재분류는 빈번히 이루어진다. 전세계적으로 가장 많은 연구가 된 유산균 중 하나인 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) 균주의 경우, 최초에는 *L. acidophilus*로 동정되었다가 이후 *L. casei*로 재분류가 되었으며, 현재는 *L. rhamnosus*가 되었다. *Bifidobacterium lactis*의 경우에는 현재 *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis*로 재분류가 되었으며, *Bifidobacterium infantis*의 경우에도 *Bifidobacterium longum*으로 재분류가 되었다(Parte, 2018). 이와 같이 미생물 종의 명칭은 고정된 것이 아니므로, 프로바이오틱스 균주를 활용한 연구논문이나 특허 출원시에는 현재의 분류체계와 일치하는 지 여부를 면밀히 검토해야 한다.

프로바이오틱스 균주의 유전체 분석

최근 차세대 염기서열분석기술 (NGS)의 발달로 생물체의 유전체

분석이 간편해졌다. 2005년 Roche 454 시퀀싱 플랫폼인 파이로 시퀀싱(pyrosequencing)이 미생물 유전체 분석에 활용된 이후에 다양한 NGS 장비와 시퀀싱 플랫폼이 등장했다. 현재는 일루미나(Illumina), 써모피셔 이온 토렌트(Ion Torrent), 퍼시픽 바이오(PacBio), 옥스퍼드 나노포어(Oxford Nanopore)가 주요 시퀀싱 장비로 활용되고 있다. 미생물 유전체 분석에 활용되는 주요 장비는 Table 1과 같다.

기술적 특성의 차이로 한 개의 시퀀싱 장비를 통해서 미생물 유전체의 완전해독이 쉽지 않다. 일반적으로 다른 형태의 데이터를 생산하는 두 개 이상의 플랫폼을 혼합하여 분석하는 것이 완전해독을 위한 효율적인 방법이다. 이때 염기서열의 긴 해독(long-read sequencing)이 용이한 PacBio사의 Sequel 장비나 Oxford Nanopore사의 MinION 장비를 사용하는 것이 유용하다. 이들 장비들은 긴 서열을 시퀀싱할 수 있는 장점이 있어 유전체 내에서 반복서열로 생기는 유전체조각(contig)의 수를 현저하게 감소시킨다. 그러나 긴 서열 해독이 가능한 장비들은 짧은 서열 해독(short-read sequencing) 장비들보다 상대적으로 오류 정도(error rate)가 높다. 이 오류를 보정할 목적으로 해독 길이는 짧지만 정확성이 매우 높은 일루미나의 iSeq이나 MiSeq 장비로 정확성을 높이는 것이 필요하다. 서로 다른 장비의 시퀀싱 데이터를 조합할 때는 Canu, SPAdes, Pilon와 같은 공개 유전체 조립 프로그램들의 것이 해독의 효율성과 정확성을 높이는데 유용하게 활용된다.

유전체를 완전 해독해야 하는 시료는 최초의 모균주(master cell)를 대상으로 한다. 일단 고품질의 완전유전체(complete genome sequence) 데이터를 획득하면 완성된 유전체 데이터를 참조유전체(reference genome)로 활용한다. 모균주가 배양된 이후에 계대 배양을 통해서 실제 제품의 생산과정에 활용되는 균주들은 부분유전체 해독(draft genome sequencing)이나 PCR 방법을 통해서 돌연변이의 발생 여부를 확인하게 된다.

직접 제품에서 메타게놈 DNA를 추출하여 amplicon 방식이나

Table 1. Comparison of major NGS sequencing platforms for microbial genomic analysis

Sequencing platform	Mean read length (bp)	Data output (Gb)	Sequencing run time (hours)	특징
Illumina iSeq 100	2 × 150	0.3-1.2	9-17.5	저렴한 장비, 높은 정확성
Illumina MiSeq	2 × 300	0.3-15	4-55	비교적 긴 서열해독, 높은 정확성
Ion Torrent S5	400	0.6-15	~19	빠른 해독 시간
PacBio Sequel	10-20 kb	5-10	~4	매우 긴 해독서열
Oxford Nanopore MinION	13-20 kb	15~30	~48	매우 긴 해독서열

shot-gun 방식으로 메타게놈 시퀀싱을 분석할 수도 있다. 추출된 DNA는 해당 종의 포함 여부뿐만 아니라, 오염을 검출하는 수단으로도 활용이 가능하다. 메타게놈 분석법은 개별 생산단위의 변화 (lot-to-lot variation)를 측정하는 제품 QC 모니터링 목적으로 가능한 장점이 있어 GMP 시설을 셋팅하는 방법에도 유용하다. 또한 개별 균주의 유전체 분석 데이터는 프로바이오틱스 균주의 분류, 동정에 활용될 수도 있고, 안전성과 독성평가의 근거 자료로 활용할 수도 있다.

프로바이오틱스 균주의 정량법

프로바이오틱스의 균주는 살아있는 미생물로 정의하기에 판매되는 제품 내 균주들에 대한 정량실험은 필수적이다. 2002년도에 발표된 FAO/WHO 프로바이오틱스 가이드라인에는 제품의 유통 기한 내 최소 생존균수를 표기하도록 권장하고 있다. 미국은 통상의 건강보조식품은 1회 섭취량별 증량으로 라벨에 표기하지만, 프로바이오틱스의 경우는 CFU/g 형태로 표기할 것을 FDA가 최근 고시하였다.

일반적으로 미생물의 생존력을 검정하기 위해서는 고체배지에서 집락수(CFU; colony-forming unit)를 계수하거나, 액체배지에서 탁도(turbidity)를 측정한다. 제품의 라벨에는 고체배지에서 계수한 집락수를 제품내 균주의 정량법으로 표기한다. 그러나, 제품 내에 여러 균주들이 혼합된 경우라면 단일 배지에서 모든 미생물들이 성장하여 계수를 하는 것이 불가능할 수 있다. 미생물이 휴면상태(dormancy)로 존재하여 생장이 안되거나, 균주들마다 성장 요구 조건이 다르기 때문이다. 휴면상태의 미생물은 일시적으로 생장이 정지된 상태이며, 불리한 환경에서는 포자(spore) 형성과 같은 형태적 변화가 생긴다. 만일 미생물이 최적의 외부환경이 되면 다시 원래대로 성장상태로 전환된다. 비배양성 생존상태(VBNC; Viable but nonculturable)도 미생물의 정확한 생존력을 측정하는데 어려움을 준다. VBNC 상태는 최적의 환경에서도 자라지 못하는 미생물의 상태이기 때문에 일반적인 휴면상태와는 구별된다. 이런 VBNC 상태에서의 미생물 생존 기작은 아직도 과학적으로 충분히 밝혀져 있지 않다. 프로바이오틱스 제품에서 활용되는 균주들은 대량배양, 농축, 동결건조, 분말화 등의 제조공정 과정에서 많은 스트레스를 받게 되어 종종 VBNC 상태로 전환된다는 연구 보고가 있다(El Arbi *et al.*, 2011; Majeed *et al.*, 2018).

유통기한동안 프로바이오틱스 균주의 생존력에 영향을 주는 요소는 매우 다양하다. 제품의 매질, 포장 방법, 수분활성도, 보관온도, 유통방법 등이 주요 영향인자이다. 일반적으로 냉장유통, 저산소, 낮은 수분활성도가 제품의 유통기한을 늘릴 수 있다고 알려져 있다. 이런 이유들로 CFU 측정법은 실제 생존하는 균주의 정확한 정

량법으로 활용하는 데 일정 정도의 한계를 갖는다.

고체배지 배양을 통한 균주 정량시험법: 배지계수법 (Plate count method)

고체배지 상의 배양 집락수를 계산하여 측정한 세균수의 측정법 (Plate count method)은 19세기 이래로 가장 널리 사용된 방법이며, 현재도 ISO (International Standards Organisation), IDF (International Dairy Federation), USP(United States Pharmacopeia)는 이 방법을 표준으로 사용한다. 실제 대부분 프로바이오틱스 균주의 효능 검증을 위한 임상 연구에서도 배양을 통한 CFU 측정으로 세포 정량을 수행한다. 따라서 제품의 표기에서도 임상연구와 연계된 측정법을 제시한다. 이 방법은 단순 생존 세균의 계수에 용이하며, 프로바이오틱스 균주의 정의에도 부합한다. 또한 효능시험에도 CFU 단위로 용량을 설정하기 때문에 임상시험에도 용이하며, 전문가나 소비자들이 제품에 관련된 효능 정보를 이해하는데도 편리한 장점이 있다.

그럼에도 불구하고, 이 방법은 완벽한 정량을 어렵게 하는 단점들이 있다. 매우 다양한 성장 패턴을 보이는 프로바이오틱스 균주들이 모두 자랄 수 있는 배지는 없다. 실제로 프로바이오틱스를 생산하는 제조공장에서 활용하는 배양법도 각기 다른 방법들을 사용한다. 때로는 최적배양을 위한 조건 설정에 오랜 시간과 노력이 필요하다. 만일 프로바이오틱스 균주가 혐기성이라면 호기성 균주들보다도 배양과정에 더 많은 노력이 필요하다. 또한 정량을 위한 실험과정도 CFU 결과 값에 많은 영향을 준다. 동결 건조된 제품의 전처리시에 삼투압, pH, 활성산소, 균질도 등에 따라서 CFU 결과가 상당히 달라진다(Champagne *et al.* 2011). 앞서 기술한 것처럼 휴면 상태나 VBNC와 같은 상태의 미생물은 CFU로 측정이 불가능하다는 단점도 있다. 시료제조 방법, 실험수행자, 실험장비도 적지 않은 오차를 발생시킨다. 이런 단점들로 배양법을 통한 정량시험은 실험실내 반복성이나 실험실간 비교를 통한 재현성이 떨어지는 문제점을 일으킨다. 이와 같은 이유들로 배양을 통한 프로바이오틱스 생존균수의 측정법에 대한 단일 표준화 설정이 매우 어렵다.

배양법에 의한 정량법의 문제점을 개선하기 위해서는 ISO 실험법에 근거하여 재현성을 보여주는 95% 신뢰구간에서 오차범위를 정확하게 설정해야 한다. 또한 반복성과 재현성을 높이기 위해서는 균주별 맞춤 배양법, 실험자의 교육, 장비와 배지의 표준화에 대한 조건 확립이 필수적이다.

비배양 실험을 통한 균주 정량시험법: 유동세포분석법(Flow cytometry)

배지계수법을 통한 프로바이오틱스 정량실험의 한계점을 극복하기

위한 대안으로 여러가지 분자세포생물학적 실험기법들이 시도되었다. FAO/WHO 가이드라인(2002)에서도 최소균주수의 평가 실험법으로 배양법을 통한 CFU 측정법만으로 제한하지는 않았고, 효능과 안전성 평가를 위한 새로운 기술의 도입을 받아들인다.

지금까지 시도되었던 많은 비배양적 실험 중에서 대표적인 실험법이 유동세포분석법으로서, 지난 20년 동안 미생물 분야에서 강력한 연구 방법으로 활용되어 왔다. 유동세포분석(Flow cytometry; FACS) 장비는 세포의 구조와 기능을 구분하여 측정할 수 있어서 실제 세포의 생존 여부를 판별할 수 있다. 균주의 생존능과 동시에 세포 활성, 형태 변이, 생리 특성, 성장 단계 등의 정보를 획득할 수 있는 장점이 있다. 대용량 고속분석도 가능하여 1초당 수천개의 세포를 분석할 수 있다. 세균 세포수의 측정이 매우 높은 정확도로 1시간 이내에 3만배 측정이 가능하다. 또한 죽은 세포나 휴면세포, VBNC 세포도 검출이 가능하다. 이런 이유로 유동세포분석법은 미생물의 검출, 정량 및 군집분석 등의 연구에 유용하게 활용될 수 있다(Van Nevel *et al.*, 2017). 2015년에 ISO에서는 유동세포분석법을 세포수와 생존력을 측정하는 실험기법으로 인정한 바 있다(International Standards Organisation, 2015). 국제낙농협회(IDF)에서도 스타터(starter) 배양, 유제품의 사용 균주 정량에 FACS 장비를 활용할 수 있다고 인정하였다(International Dairy Federation, 2015). 이 경우에는 CFU 대신 전체형광단위(TFU; Total Florescent Units), 활성형광단위(AFU; Active Fluorescent Units)로 표기한다. 그러나, 유동세포분석법이 세균정량법의 표준으로 인정받기 위해서는 TFU나 AFU측정법이 기존 CFU 법과 어떤 상관성이 있는지 많은 연구들을 통해 구체적으로 확인되어야 한다. 일반적으로 신규 생산된 제품의 경우에는 CFU와 AFU의 비가 1:1로 나오지만 보관기간이 길어지면서 CFU 수가 감소되며, AFU 혹은 TFU의 값이 상대적으로 높은 수치를 보인다.

복합 균주 제품의 정량시험법

한 제품내에 여러 개의 균주(strain)가 혼합되어 있는 경우에는 정량시험법의 적용이 더 어려워진다. 각각의 균주들은 배지 요구성과 생존 환경이 달라서 단일 배지에서 모든 균주를 배양하는 것은 불가능하기 때문이다. 이를 위해 특정 종만 자랄 수 있는 선택배지를 활용하여 균주를 배양하는 방법도 있다. 이 경우에 특정 영양성분이나 배양환경, 항생물질 등을 첨가하여, 특정 종의 선택적 배양을 용이하게 한다(International Standards Organization, 2010). 그러나, 실제로 종 수준(species-level)이나 균주 수준(strain-level)에서 선택적 배양을 하는 것은 매우 어렵기 때문에, 복합 균주가 포함된 제품에서 균주 별로 선택적 배양법으로 계수하는 것은 적합치 않다. 이런 경우에 분자생물학적 방법이 대안이 될 수 있다.

전장 유전체분석법(WGS), real-time 정량 PCR법, chip 기반 digital PCR 기술, 차세대 염기서열분석법(NGS) 기술의 발달로 균주별 정량이 가능해졌다(Hansen *et al.*, 2018).

최근, 항체 검출 반응과 FACS를 이용하여 아종(subspecies)수준 이하에서 생존과 비생존 균주들을 구분하여 정량한 사례가 있다(Chiron *et al.*, 2018). 전장 메타게놈 샷건 시퀀싱(whole- metagenome shotgun sequencing)을 통한 분석법도 복합 균주의 조성과 동정에 매우 유용한 방법임이 밝혀졌다(Seol *et al.*, 2019). 2018년, 식품의약품안전처(KFDA)도 복합균주 제품의 검사를 NGS 방법을 통해서 제시할 것을 권고한 바 있다. 현재는 NGS 장비를 활용한 메타게놈 시퀀싱 기술은 제품내 포함된 프로바이오틱스 균주들의 조성을 확인할 수 있는 상대적 정량에만 주로 활용된다.

이와 같이 비배양적 접근을 통한 분자생물학적 방법이 배양법의 한계와 단점을 극복해 주는 보완책이 된다. 그러나, 이 방법들도 역시 현재 표준화된 방법은 없으며, 향후 더 발전된 연구 기법으로 개선, 보완될 필요가 있다.

제품의 오염확인 및 안전성 검사

프로바이오틱스 제품의 오염문제는 제품의 안전성과도 연결되는 매우 중요한 문제이다. 오염은 생산, 유통과정에서 유입되는 유해 병원균일 수도 있고, 생산과정상에서 비정상적으로 포함되는 미생물일 수도 있다. 오염이 발생한다는 것은 제품의 품질관리 수준이 낮다는 증거이고, 소비자의 신뢰를 떨어뜨릴 수 있는 심각한 문제이다. 안전하고, 신뢰할 수 있는 제품에는 유해 미생물이 없는 것은 물론이고, 제품의 라벨에 표시되어 있지 않은 미생물도 검출되지 않아야 한다. 이를 위해 미국에서는 건강보조식품의 생산을 cGMP 시설에서 생산하도록 규정하고 있다. 유럽의 경우는 인체 사용을 위한 LBP(live biotherapeutic product)의 경우에 미생물 오염 측정법과 계수법에 대한 규정을 만들어 2019년 4월부터 회원국들에게 적용한다(European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, 2018). 그러나, 생산과정에 발생하는 오염의 유형과 검출 시험법, 안전성 검사법 등에 대해서는 상세히 규정하지 않고 있다.

최근 국내 식약처에서도 건강기능식품과 의약품에 사용되는 제품 내에서 장구균(*Enterococcus*) 속에 해당하는 균주들에 대한 항생제 내성과 독성검사를 유전체 데이터와 생리 생화학적 시험을 통해 증명하는 프로바이오틱스 안전성 검사규정을 고시하였다(식품의약품안전처, 2018). 이들 균주들이 항생제 내성 유전자나 독성 유전자를 많이 가진 것으로 알려져 있어 국외에서도 사용을 엄격히 제한하고 있다. 이 고시에 의해서 국내 제조사는 판매 제품 중에 *Enterococcus* 속(genus)에 해당하는 균주가 포함되면, 이 균주에

Table 2. Safety test for *Enterococcus* strains suggested by Ministry of Food and Drug Safety, (KFDA, 2018)

검사법	항생제 내성 검사	독성 검사
유전체 분석	전장 유전체 분석 - Full genome sequencing	전장 유전체 분석 - Full genome sequencing
검사대상 유전자	10종 항생제 내성 유전자 - 앰피실린, 반코마이신, 겐타마이신, 가나마이신, 스트렙토마이신, 에리스로마이신, 클린다마이신, 티로신, 테트라사이클린, 클로르암페니콜	4종 독성 유전자 - Cytolysin, aggregation substance, hyaluronidase, gelatinase
생화학적 시험	10종 항생제 MIC 검사 시험 - CLSI 또는 EUCAS 방법과 동등한 시험법*	6종 독성 검사 시험 - Cytolysin, aggregation substance, hyaluronidase, gelatinase 시험, 용혈성 확인시험, 혈소판 응집반응시험

*EFSA, 2012 10(6): 2740.

대한 안전성 검사를 실시해야 한다(Table 2). 이 고시에서는 전장 유전체(WGS) 검사를 통해서 10종 항생제 내성과 4종 독성 유전자를 확인하도록 규정하였다. 10종의 항생제는 앰피실린, 반코마이신, 겐타마이신, 가나마이신, 스트렙토마이신, 에리스로마이신, 클린다마이신, 티로신, 테트라사이클린, 클로르암페니콜이다. 4종 독성 유전자는 Cytolysin, Aggregation substance, Hyaluronidase, Gelatinase이다. 또한 MIC test와 생화학적 검사를 통해 항생제 최소 억제 농도 검사와 독성 유전자의 발현 여부를 확인한다. 그러나, 내성 및 독성 발현에 관여하는 유전자가 매우 다양하고 광범위해서, 유전자의 단순 검출 여부로 판단하기에는 명확하지 않은 점이 있어서 추후에 구체적인 시험기준과 판별근거가 추가적으로 제시되어야 할 것이다.

결론

인체 마이크로바이옴에 미치는 긍정적 영향이 알려지면서 프로바이오틱스가 건강기능식품과 의약품으로 활용가치가 높아지고, 전 세계적으로 수요가 급증하고 있다. 그러나 아직도 제품의 품질관리를 위한 국제적인 표준시험법이나 안전 기준은 명확하게 마련되어 있지 않다. 이것은 제품표기에 대한 과학적인 검증을 원하는 소비자의 요구를 충족시키지 못하는 결과로 이어진다.

일반적인 화학제품과 달리 살아있는 미생물의 특성상 효능과 안전성 검증, 제품의 품질관리가 까다로울 수밖에 없다. 관계 당국의 적절한 규제와 제도가 늦어진다고 하더라도 제조사가 먼저 소비자들의 요구와 기대에 부합하려는 노력을 하는 것이 필요할 것이다. 더 나아가 제 3의 검사 기관을 이용해서 제품에 대한 과학적 검증을 하는 것도 소비자의 신뢰를 높이는 데 큰 도움이 된다. 빠르게 발전하는 새로운 장비의 등장과 기술은 이러한 흐름의 촉매제가 될 것이다. 실제로 차세대 염기서열분석기술(NGS)의 발전은 전장유전체 분석, 메타게놈분석 등을 용이하게 하여 제품에 사용된 균주

의 정확한 동정, 조성, 안전성 검사 등에 매우 유용하게 활용할 수 있는 방법을 제공하고 있다. 유동세포분석법(FACS)과 같은 분자생물학 기술의 활용도 기존 배양중심의 한계를 극복하고, 생존 균주의 계수와 분포까지 검증할 수 있는 효율적인 방법이다.

다만, 새로운 기술의 도입은 기존 기술과의 유사점, 차이점들을 비교 분석하여 높은 상관성을 제시하는 연구 자료를 바탕으로 해야 한다. 그런 기반위에서 신기술은 임상시험을 포함한 연구개발, 생산, 판매, 유통까지의 전 단계에 활용될 수 있다. 결국, 새로운 기술들의 활용은 과학적 데이터에 기반한 품질관리를 통해 소비자들의 신뢰를 높이는 데 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

요약

프로바이오틱스는 위장관을 비롯한 인체의 건강을 증진시키는 유익균으로 알려져 있으며, 다양한 건강기능식품과 의약품으로 이용되고 있다. 그러나, 전 세계적으로 빠르게 증가하는 사용량에도 불구하고, 제품 규격에 맞는 품질관리는 아직도 충분치 않은 것으로 보고되고 있다. 실제로 라벨표기와 동일하지 않은 균주의 조성, 생존 균주수, 균주의 오동정, 오염 등에 관한 이상 사례가 여러 연구를 통해 밝혀진 바도 있다.

차세대 염기서열분석기술(NGS), 유동세포분석기(Flow cytometry)와 같은 최신 기술과 장비의 발전은 프로바이오틱스 제품의 품질을 좀 더 효율적으로 관리하는데 유용한 수단을 제공한다. 본 논문에서는 프로바이오틱스 제품 관리에 사용되는 현재 기술들의 장점과 단점을 고찰하고, 한계점을 극복하기 위한 최신 기술의 활용에 대해서 소개하였다.

References

1. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, and

- Charalampopoulos D (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 185-193.
2. Chiron C, Tompkins TA, and Burguiere P (2018) Flow cytometry: A versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain probiotic products. *J. Appl. Microbiol.* **124**, 572-584.
3. El Arbi A, Ghorbal S, Delacroix-Buchet A, and Bouix M (2011) Assessment of the dynamics of the physiological states of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 during growth by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* **111**, 1205-1211.
4. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (2018) Ph. Eur. Supplement 9.7 (<https://www.edqm.eu/en/news/pheur-supplement-98-available-now>).
5. FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. (http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).
6. Hansen SJZ, Morovic W, DeMeules M, Stahl B, and Sindelar CW (2018) Absolute enumeration of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM((R)) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bl-04 ((R)) via chip-based digital PCR. *Front. Microbiol.* **9**, 704.
7. International Dairy Federation (2015) Milk and Milk Products - Starter Cultures, Probiotics and Fermented Products - Quantification of Lactic Acid Bacteria by Flow Cytometry. International Standard, ISO 19344: 2015, IDF 232:2015. (<https://www.iso.org/standard/64658.html>).
8. International Standards Organisation [ISO] (2010) Milk Products - Enumeration of Presumptive Bifidobacteria - Colony Count Technique at 37 Degrees C. ISO 29981:2010 (IDF 220:2010). Geneva: International Standards Organisation.
9. International Standards Organisation [ISO] and International Dairy Federation (2015) Milk and Milk Products - Starter Cultures, Probiotics and Fermented Products - Quantification of Lactic Acid Bacteria by Flow Cytometry. International Standard, ISO 19344: 2015, IDF 232:2015. (<https://www.iso.org/standard/64658.html>).
10. Jackson SA, Schoeni JL, Vegge C, Pane M, Stahl B, Bradley M, Goldman VS, Burguiere P, Atwater JB, and Sanders ME (2019) Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. *Front. Microbiol.* **10**, 739. doi: 10.3389/fmicb.2019.00739
11. Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Punnapuzha A, Philip S, and Mundkur L (2018) Rapid assessment of viable but non-culturable *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in commercial formulations using flow cytometry. *PLoS ONE*, **13**(2):.e0192836.
12. MarketsandMarkets (2017) Probiotics Market by Application (Functional Food and Beverages [Dairy, Non-Dairy Beverages, Baked Goods, Meat, Cereal], Dietary Supplements, Animal Feed), Source [Bacteria, Yeast], Form [Dry, Liquid], End User [Human, Animal], and Region - Forecast to 2022. Report code: FB 2269.
13. Maurya P, Mogra R, and Bajpai P (2014) Probiotics: an approach towards health and disease. *Trends Biosci* **7**(20), 3107-3113.
14. Morovic W, Hibberd AA, Zabel B, Barrangou R, and Stahl B (2016) Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases. *Front. Microbiol.* **7**, 1747. doi: 10.3389/fmicb.2016.01747
15. Parte AC (2018) LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**, 1825-1829. doi: 10.1099/ijsem.0.002786
16. Salvetti E, Harris HMB, Felis GE, and O'Toole PW (2018) Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**:e00993-18.
17. Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, and Hutkins R (2018) Probiotics for human use. *Nutr. Bull.* **43**, 212-225.
18. Seol D, Jhang SY, Kim H, Kim S-Y, Kwak H-S, Kim SH, Lee W, Park S, Kim H, Cho S and Kwak W (2019) Accurate and strict identification of probiotic species

- based on coverage of whole-metagenome shotgun sequencing data. *Front. Microbiol.* **10**, 1683. doi: 10.3389/fmicb.2019.01683
19. Vallabhaneni S, Walker TA, Lockhart SR, Ng D, Chiller T, Melchreit R, Brandt ME, Smith RM (2015) Notes from the field: fatal gastrointestinal mucormycosis in a premature infant associated with a contaminated dietary supplement-Connecticut, MMWR Morb. *Mortal. Wkly. Rep.* **64**, 155-156.
 20. Van Nevel S, Koetzsch S, Proctor CR, Besmer MD, Prest EI, Vrouwenvelder JS, Knezev A, Boon N, and Hammes F (2017) Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Res.* **113**, 191-206. doi: 10.1016/j.watres.2017.01.065
 21. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S and Federici S (2018) Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell*, **174**(6), 1388-1405.
 22. 연합뉴스 (2018) 건강기능식품 이상사례 신고, 5년간 6배증가 (2018.7.26일자, <https://www.yna.co.kr/view/AKR20180726030100017>)
 23. 식품의약품안전처 (2018) 자일리톨, 글루코사민 등 기능성 원료 16종 재평가 실시 (https://www.mfds.go.kr/brd/m_99/view.do?seq=40746).
 24. 식품의약품안전처 (2018) 「건강기능식품의 기준 및 규격」 일부 개정고시 (https://www.mfds.go.kr/brd/m_207/view.do?seq=14285).