청렴韓세상

농생명마이크로바이옴 유래 식품원료 안전성 평가 가이드라인(안)

<생균>



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

Ⅰ 미생물 원료 안전성 평가 가이드라인 구성

1-1 농생명 마이크로바이옴 분류
1-2 미생물 원료 인정 신청 대상의 범위
1-3 원료 특성별 제출자료 구성

Ⅱ 공통 자료 제출 항목

2-1 기원 및 개발 경위, 국내·외 인정, 사용현황 등에 관한 자료
  가. 균주 기원 / 사용 이력
  나. 전장유전체 염기서열
  다. 안전성 관련 유전체 분석 자료
  라. 미생물 동정
  마. 균주 기탁증
2-2 제조방법에 관한 자료
  가. 배양 과정 및 제조 공정
2-3. 원료의 특성에 관한 자료
  가. 유해물질 시험 분석
  나. 일일섭취량 추정

Ⅲ 안전성 평가 제출 항목

3-1 항생제 내성 평가
3-2 용혈 활성 평가
3-3 독소 생성 여부 평가 (LDH assay)
3-4 대사적 특성 (D-lactate/Bile salt deconjugation/Biogenic amine)
3-5 항균 활성 평가

Ⅳ 독성평가 제출 항목

4-1 단회투여 독성 시험
4-2 90일 반복투여 독성 시험
4-3 유전 독성 시험 (복귀돌연변이 시험, *In-vitro* 소핵 시험)

Ⅴ 요약

Ⅵ 참고자료

Ⅰ 미생물 원료 안전성 평가 가이드라인 구성

○ 농생명 마이크로바이옴 유래 자원은 생균, 사균체, 대사체로 분류할 수 있음

○ 해당 가이드라인(안)은 생균에 대한 안전성 평가에 대해 서술함

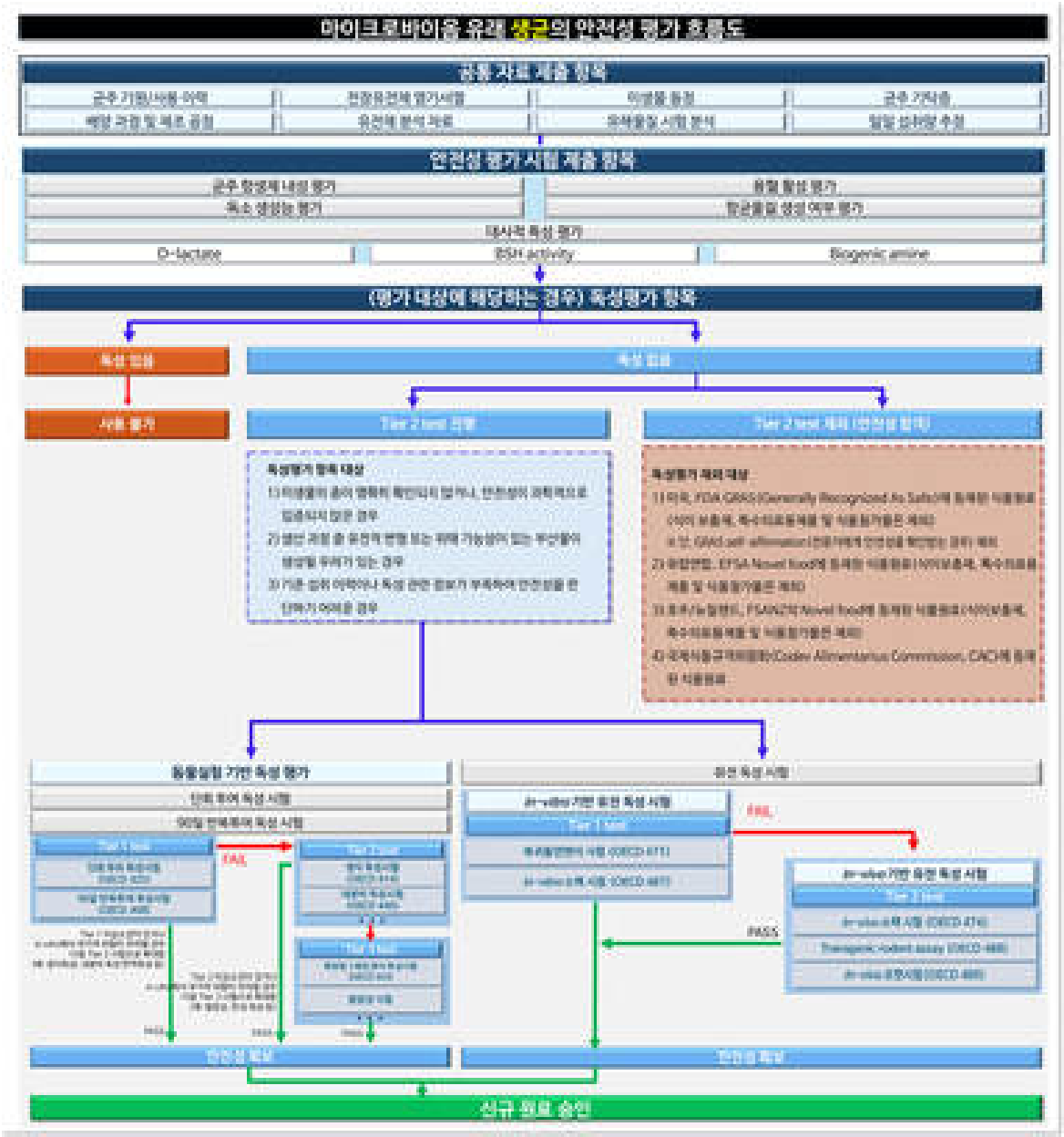


그림 1. 농생명 마이크로바이옴 유래 생균 원료의 안전성 평가 절차

1-1 농생명 마이크로바이옴 분류

○ 마이크로바이옴 유래 자원 3가지에 대한 세부 분류는 생균, 사균체, 대사체로 구성됨 **<그림 2>**

1) 생균

○ 농생명 마이크로바이옴 유래 생균은 살아있는 미생물을 의미하며, 식경험 유무에 따라서 분류됨

○ 식경험이 없는 농생명 마이크로바이옴 유래 생균은 국외 공인기관(EFSA 등)에서 제시하는 'Novel Food'와 동일한 범주로 분류됨

○ 생균의 분류는 <표 1>과 같음

표 1. 농생명 마이크로바이옴 유래 자원 분류 - 생균

농생명 마이크로바이옴 유래 생균	
고시형 균주	고시형 균주
	Enterococcus spp.
비고시형 균주	식경험이 있는 균주
	식경험이 없는 균주

2) 사균체

○ 농생명 마이크로바이옴 유래 사균체는 생균 자원을 가열 등 살균과정을 통해 생명활동을 불활성화한 자원으로, 농생명 마이크로바이옴 유래 생균과 동일하게 식경험 유무에 따라서 분류됨

○ 식경험이 없는 농생명 마이크로바이옴 유래 사균체는 국외 공인기관에서 제시하는 'Novel Food'와 동일한 범주로 분류됨

○ 사균체의 분류는 <표 2>과 같음

표 2. 농생명 마이크로바이옴 유래 자원 분류 - 사균체

농생명 마이크로바이옴 유래 사균체	
고시형 균주	고시형 균주
	Enterococcus spp.
비고시형 균주	식경험이 있는 균주
	식경험이 없는 균주

3) 대사체

❍ 농생명 마이크로바이옴 유래 대사체는 미생물이 다양한 환경에서 식품 성분을 대사하거나 자체적으로 생성하는 모든 대사산물을 포함함

❍ 2023년 ISAPP는 posbiotics의 정의에서 대사산물의 역할과 범위를 언급하며, 미생물 유래 대사산물(바이오매스를 포함하지 않는 경우)은 postbiotics의 정의에 부합하지 않으며,이를 Microbial metabolite로 구분하여 이해해야 한다고 주장함

❍ ISAPP에 따르면, 대사체의 분류는 <표 3>과 같음

표 3. 농생명 마이크로바이옴 유래 자원 분류 - 대사체

번호	마이크로바이옴 유래 대사체	참고문헌
1	Bioactive peptides	Food Research International (2020) **136:**109502
2	Secreted proteins, peptides	Gastroenterol Hepatology (2019) **10(6):**324-326
3	Secreted biosurfactants (Laurostearic acid), Aggregation promoting factor (APF)	Nature Communications (2020) **11:** 6344
4	Neurotransmitter (GABA)	Biomolecules (2021) **11(7):**1000
5	Polysaturated fatty acids ((Arachidonic acid, docosahexaenoic acid, linoleic acid, linolenic acids, Omega-3-fatty acids)	Obesity Medicine (2020) **19:**100248
6	Polypeptides (Bacitracin, Nisin, Reuterin)	Foods (2021) **10(7):**1590
7	Bacteriocins: lanthionine-containing bacteriocins (class I) and the nonlanthionine-containing bacteriocins (class II)	International Journal of Molecular Sciences (2021) **22(24):**13475
8	Vitamin B complex (Biotin, cobalamin, folate, niacin, pantothenic acid, pyridone, riboflavin, thiamine)	Intech **(2016)** 135-148
9	Aromatic amino acids, Polyamines (Putrescine, cadaverine, spermidine, and spermine)	Trends in Food Science & Technology (2021) **108:**11-26
10	Lactocepin	Probiotic and Antimicrob Protein (2021) **14:**426-448
11	Retinoic acid, Long chain fatty acids, Trimethylamine – N-Oxide (TMO), Conjugated linoleic acid (cla)	Food Science and Technology (Campinas) (2021) **41(1):**254-266
12	Superoxide dismutase, catalase, Enterocins, Serpins, Histamine	Probiotic and Antimicrob Protein, (2021) **14:**426-448
13	Functional proteins, teichoic acids, p40 and p75 proteins.	Cogent Food & Agriculture (2016) **2(1):**1268742 Frontiers in Microbiology (2019) **10:**1420.

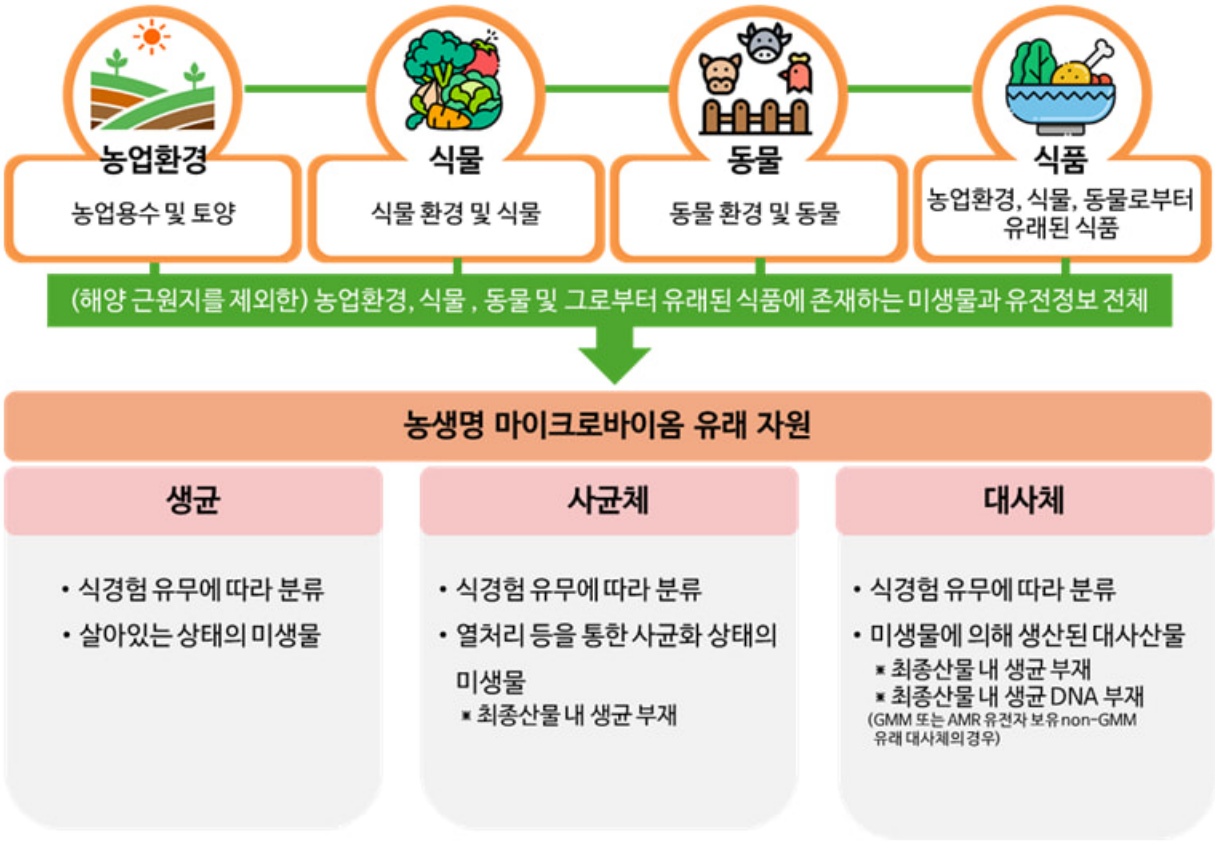


그림 2. 농생명 마이크로바이옴 유래 자원(생균, 사균체, 대사체)에 대한 분류

1-2 미생물 원료 인정 신청 대상의 범위

○ 식품원료로 사용되는 경우만 해당함

○ 국내에서 새로 원료로 사용하려는 미생물

○ 「식품의 기준 및 규격」에 고시되어 있지 않고 국내 섭취경험이 없는 원료로 가공과정을 거치지 않은 원재료 또는 가열·건조·분쇄 등의 가공과정을 거친 원료를 의미함

○ 국외에서 섭취근거가 있는 원료라 하더라도 국내 섭취경험이 없는 경우

○ 「식품의 기준 및 규격」에 고시되어 있으나 특정 식품 유형에 제한적으로 사용 가능한 원료를 다른 용도 및 수준으로 사용하고자 할 경우도 포함됨

○ 미생물로부터 추출 농축 분리 배양 등의 방법으로 얻은 것으로서 식품으로 사용하려는 원료

○ 유전자변형 미생물 및 그 유래 원료는 본 가이드라인(안)의 대상이 아니므로, 별도의 규정에 따라 평가함

1-3 원료 특성별 제출자료 구성

○ 신청하려는 신규 미생물 원료의 특성에 따라 제출해야 하는 자료의 범위가 달라짐

○ 안전성 입증이 필요한 위험요소가 다를 수 있으므로, 본 가이드라인(안)에 기술된 항목에만 국한되어 있는 것은 아님

○ 해당 가이드라인(안)은 생균 원료의 제출자료 구성을 다음과 같이 제시함

○ 모든 분석은 신청하는 원료 (시험평가방법에 따라 원균주)를 대상으로 진행되어야 하며, 균주 및 원료의 특성에 따라 추가적인 분석자료를 요구할 수 있음

1) 공통 자료 제출 항목
   ① 균주 기원/사용 이력 ② 전장유전체 염기서열 ③ 안전성 관련 유전체 분석 자료
   ④ 미생물 동정 ⑤ 균주 기탁증 ⑥ 배양 과정 및 제조 공정 ⑦ 유해물질 시험 분석
   ⑧ 일일섭취량 추정
2) 안전성 평가 시험 제출 항목
   - 생균
   ① 항생제 내성 ② 용혈 활성 ③ 독소 생성 여부 평가 (LDH assay)
   ④ 대사적 특성: D-lactate 생성 ⑤ 대사적 특성: Bile salt deconjugation 평가
   ⑥ 대사적 특성: Biogenic amine 생성 평가 ⑦항균 활성
3) 독성평가 제출 항목
   ① 단회투여 독성시험 ② 90일 반복투여 독성시험
   ③ 유전 독성 시험: 복귀돌연변이 시험 ④ 유전 독성 시험: *In-vitro* 소핵 시험

Ⅱ 공통 자료 제출 항목

○ 신청하고자 하는 원료의 특성에 관계없이 모두 제출해야 하는 자료임

2-1. 기원 및 개발 경위, 국내·외 인정, 사용현황 등에 관한 자료

가. 균주 기원 / 사용 이력

1) 기원 및 개발 경위

○ 기원

- 미생물 원료가 나라, 지역마다 여러 이름으로 불리어질 수 있기에 표준화된 이름인 학명을 기재하며, 학명은 속명(genus name)과 종명(specific name)으로 표기하며, 균주명(strain name)은 학명 뒤에 일반체로 작성함

  * 학명은 속명 이하(속, 종, 변종·아종·품종 등)만을 표기하는 이명법(Binomial Nomenclature)을 사용하고, 국제세균명명규약(ICNB, International Code of Nomenclature of Bacteria)를 따름

- 같은 속에 병원성 미생물이 있는지, 분류학적으로 병원성 미생물과 구분이 되는지, 같은 속 내 독소 유전자를 보유하고 있는 미생물 종이 있는지 등이 기재되어야 함.

○ 개발경위

- 언제, 어느 나라에서, 어떤 경위로 분리/개발되었는지 작성함
- 특성에 따라 사용목적이 다양하므로, 사용목적을 명확히 해야 함

2) 국내·외 인정·허가 현황

○ 제외국의 인정·허가 현황 및 기준·규격

- 다른 국가에서 인정·허가된 사례(US FDA GRAS, EU EFSA QPS 등)가 있다면 언제, 어떤 내용(사용조건, 기준·규격 등)으로 인정되었는지, 인정·허가를 증빙할 수 있는 자료 (예: 인정서, 허가서 사본 및 인정 사항 등이 명시된 해당 국가 식품관련 부처 홈페이지 자료 등)를 첨부함
- 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC) 등 국제기구에서 검토 중인 경우에는 검토 단계, 안전성 평가 결과, 기준·규격 등 진행 사항을 기재함
- 다른 국가에서 식품 외에 생약(herbal medicine) 및 식이보충제(dietary supplement) 등으로 인정·허가된 현황 및 기준·규격도 조사하여 작성함

3) 국내·외 사용현황

○ 국내에서 지역 한정적으로 민간에서 해당 원료를 식품 등으로 사용했다는 자료가

있는 경우, 사용 지역 및 기간, 사용 방법 및 목적, 사용량 및 빈도 등 관련 내용을 첨부함

○ 국외에서 식품 등으로 사용실적이 있는 경우에는 사용국가 및 사용현황 (사용용도, 유통량, 제조회사, 섭취실태 등)을 작성함

* 식품원료 사용가능 여부 판단을 위해 '식품으로 섭취한 경험 (history of safe use)'은 중요하므로, 가능한 많은 자료(판매 기간, 섭취 인구 및 섭취량 등)을 조사하여 첨부함

나. 전장유전체 염기서열

○ 원료 미생물의 전장유전체 염기서열을 complete genome 수준의 염기서열로 제출

○ Complete genome 수준의 염기서열을 얻기 위해서는 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS)기술을 활용한 분석이 필요함 **<그림 3>**

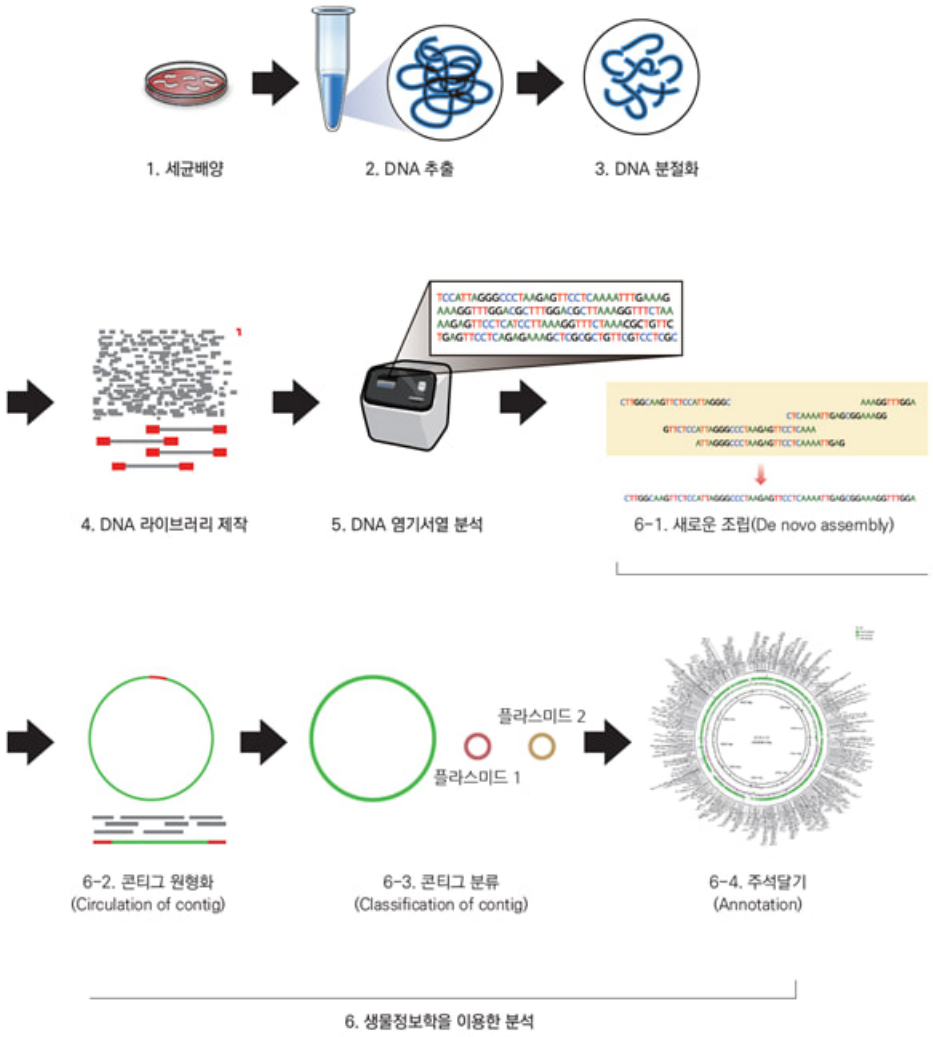


그림 3. 전장유전체 염기서열 수집 과정 예시[1)]

1) 「Next Generation Sequencing 기반 유전자 검사의 이해(심화용)」(식품의약품안전평가원, 2020)

○ 현재 주로 NGS 분석에 사용되는 기술은 Pacbio, Nanopore 또는 Illumina Hiseq, Miseq 등이 있음

* 국내에는 위와 같은 전장유전체 염기서열 분석 서비스를 의뢰할 수 있는 회사가 다수 존재하며, 통상적으로 업체에 원료 균주 또는 상업용 kit를 이용해 추출한 2 μg 이상의 원료 균주 gDNA 제공 시 genome sequencing이 가능함

○ NGS에 대한 보다 구체적인 평가 방법은 「Next Generation Sequencing 기반 유전자 검사의 이해(심화용)」(식품의약품안전평가원, 2020)을 참고할 수 있음

○ 전장유전체 데이터의 경우 다음과 같은 형식으로 제출함[2)]

- 원시데이터(Raw data)의 경우, FASTQ 또는 비슷한 형식으로 제출함
- 조립된 데이터(Assembled data)의 경우, FASTA 또는 비슷한 형식으로 제출함

다. 안전성 관련 유전체 분석 자료

○ 전장유전체 정보는 잠재적으로 우려되는 유전자의 존재 여부를 확인할 수 있음

○ 확보한 전장유전체 정보를 기반으로 안전성과 관련된 유전자 데이터베이스를 활용하여 유전체 속에 들어있는 항생제 내성, 독성/병원성, 이동성 유전자 분석 결과를 제출하여야 함

1) 항생제 내성 유전자

○ 분석 시 최소 2종 이상의 항생제 내성 데이터베이스를 활용하며, 사용한 데이터베이스명 및 버전 정보를 명확히 기재해야함

○ Identity ≥ 80%, Coverage ≥ 70%를 기본 판정 기준으로 적용함

○ 데이터베이스 정보가 제한적인 균주에 대해서는 HMM 기반 탐색 도구를 병행하여 유전자 존재 여부를 확인할 것을 권장함

○ **항생제 내성 유전자 데이터베이스 예시**

: CARD(Comprehensive Antibiotic Resistance Database), Resfinder, AMRFinderPlus 등이 있음

2) 독성/병원성 유전자

○ 분류군에 따라 알려진 독성 인자를 암호화하는 유전자 또는 독성 생성 관련 대사 경로의 존재 여부를 확인해야함

○ Identity ≥ 80%, Coverage ≥ 70%을 보이는 쿼리 서열 일치 결과를 보고해야함

○ Coverage가 70% 미만이더라도 동일 유전자에 대해 Identity ≥ 80%인 fragment가 2개 이상 확인되는 경우 보고하며, full-length 유전자 존재 여부를 추가 확인해야함

○ **독성/병원성 유전자 데이터베이스 예시**

: 독성/병원성 유전자 데이터베이스 예시는 DBETH (Database of Bacterial ExoToxins for Human Health), VFDB (Virulence Factor Database) 등이 있음

---

2) European Food Safety Authority (EFSA). (2021). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. EFSA Journal, 19(7), e06506.

3) 이동성 유전자

: ACLAME(A CLAssification of Mobile genetic Elements)

: MEF(Mobile Element Finder)

❍ 항생제 내성, 독성/병원성, 이동성 유전자 분석 결과 제출 시 사용한 데이터베이스와 사용 버전을 함께 제출하여야 함

❍ 유전체 분석 결과 안전성 위해요소 관련 유전자가 발견된 경우 해당 유전자의 기능적 무해성을 증명하는 추가 연구자료 제출이 필요하며, 이를 제출하지 못할 경우 식품원료로 사용할 수 없음

라. 미생물 동정

(1) DNA 바코드 분석

❍ DNA 바코드 분석은 생물 종의 DNA 염기서열 중 특정 생물 종만이 가지는 고유의 염기서열 부위(DNA 바코드)를 확인함으로써 해당 종 여부를 판별하는 방법임

❍ 일반적으로 종 판별에 이용되는 DNA 바코드로는 세균의 경우 16S rRNA(ribosomal RNA)가 있음 <표 4>

표 4. 생물별로 종 판별에 이용되는 DNA 바코드

평가 대상	DNA 바코드
세균	16S rRNA

❍ 16S rRNA 유전자는 원핵생물 리보솜의 30S subunit을 구성하는 필수 요소로서 생존에 핵심적인 역할을 하므로 진화 속도가 매우 느리며, 이러한 보존성으로 인해 박테리아 분류 및 동정의 표준 마커로 활용됨 **<그림 4>**

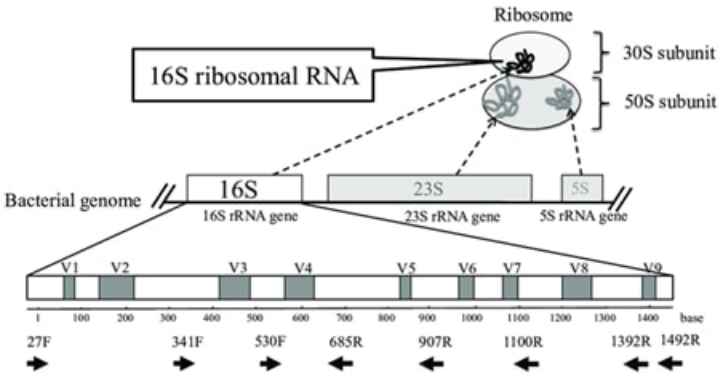
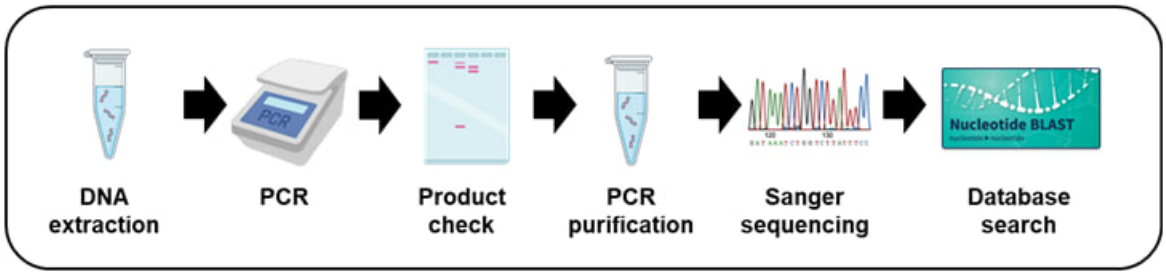


그림 4. 16S rRNA 서열 구성[3)]

3) Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. Journal of UOEH, 38(3), 223-232.

❍ DNA 바코드 분석은 미생물로부터 추출한 DNA를 아래 **<표 5>**에 있는 프라이머를 이용하여 해당 종 고유의 바코드 부분만을 증폭시킨 후, 생어 시퀀싱(Sanger sequencing) 방법 등을 통해 염기서열 정보를 확보하고, 이를 NCBI Nucleotide BLAST 등 데이터베이스에 등록된 염기서열과 비교하는 과정을 거침 **<그림 5>**



• **Universal primer sets**
-16S rRNA (16S ribosomal RNA) for bacteria
- ITS (internal transcribed spacer) for fungi

• **Species identification crieteria**
- BLASTN
Query coverage > 98%
Identity ≥ 99%

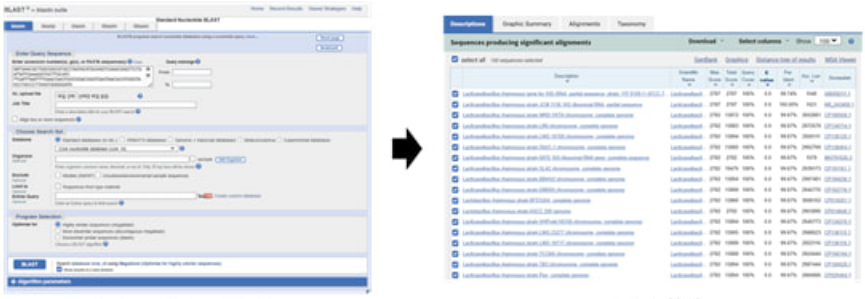
그림 5. DNA 바코드 분석 개요 예시

* 국내에는 16S rRNA 동정 서비스를 제공하는 업체가 다수 존재함
* 사용하려는 프라이머 서열이 다른 경우, 서열과 함께 근거가 될 수 있는 참고문헌을 첨부해야 함

표 5. 종 분석 프라이머 서열

평가 대상	프라이머	서열 (5' → 3')
세균	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
	1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T

❍ 16S rRNA 염기서열 비교 분석을 통한 미생물 동정 결과를 첨부하여야 함 **<그림 6>**



Nucleotide BLAST에 염기서열 기입

결과 확인

그림 6. *Lacticaseibacillus rhamnosus*의 16S rRNA 염기서열 BLAST 분석 예시

❍ 16S rRNA 및 ITS 염기서열 비교 분석으로 균주의 분류학적 위치를 충분히 확정할 수 없는 경우 추가 자료를 요구할 수 있음

(2) 전장유전체 정보를 활용한 Average Nucleotide Identity(ANI) 분석

○ 전장유전체 염기서열 자료를 바탕으로 동정된 미생물이 속한 종 및 분류학적으로 가까운 종들과의 ANI 분석을 시행하면 더욱 신뢰성 높은 동정 결과를 얻을 수 있음 **<그림 7>**

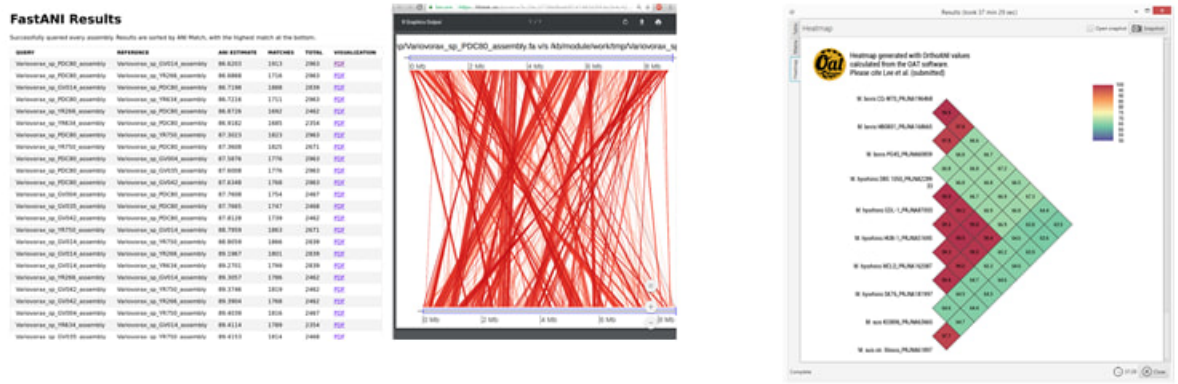


그림 7. Average Nucleotide Identity(ANI) 분석 예시

(좌) FastANI 예시[2], (우) EzBioCloud 사에서 제공하는 ANI calculator[4]

○ ANI 분석은 유전체 간 염기서열의 동일성을 분석하는 방법으로, 최근에는 mash를 활용한 분석보다 fastANI를 활용한 분석이 더 효율적이라는 평가를 받고 있음

○ fastANI를 위해서는 분석하고자 하는 유전체 정보와 비교하고자 하는 reference 균주의 유전체가 필요함

○ fastANI를 적용하기 위해서는 최소 80%의 뉴클레오타이드 동일성이 필요하므로 16S rRNA 기반 동정에서 판별된 정보를 바탕으로 분류학적으로 가까운 균주들을 reference균주로 설정하여 ANI 분석을 진행하여야 함

○ fastANI의 자세한 사용법은 아래 개발자 홈페이지에서 확인할 수 있음 (https://github.com/ParBLiSS/FastANI)

○ ANI 분석은 FastANI뿐만 아니라, ANI Calculator(OrthoANI 기반 도구) 등 유전체 비교 도구를 활용하여도 무방함. 제출 시에는 사용한 버전, reference 균주 정보 및 분석 결과(ANI 값)를 함께 제출하여야 함

4) Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J. M., Kwon, S.J. & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie van Leeuwenhoek. 110:1281–1286

마. 균주 기탁증

○ 미생물 기탁제도는 미생물을 공인된 기탁기관에 기탁함으로써 발명의 재현성을 뒷받침하고, 제3자가 기탁된 미생물을 분양받아 해당 발명을 재현할 수 있는 환경을 제공하여 특허출원명세서의 기재사항을 보완하기 위한 제도임

○ 원료로 사용할 균주를 특허미생물 기탁기관에 기탁 후 기탁기관으로부터 균주기탁을 증명할 수탁번호 및 수탁증을 제출하여야 함
* 우리나라의 특허미생물 기탁기관은 다음과 같음 **<표 6>**

표 6. 국내 특허미생물 기탁기관 리스트

번호	특허미생물 기탁기관	홈페이지
1	한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)	https://kctc.kribb.re.kr/
2	한국미생물보존센터 (KCCM)	http://www.kccm.or.kr/
3	한국세포주연구재단 (KCLRF)	https://cellbank.snu.ac.kr/eng/
4	농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물은행 (KACC)	https://genebank.rda.go.kr/initMain.do

○ 미생물 기탁제도와 관련된 법령은 「미생물기탁기관의 등록 및 운영에 관한 고시」, 특허청고시 제2022-28호 참고

2-2. 제조방법에 관한 자료

가. 배양 과정 및 제조 공정

○ 원재료에서부터 해당원료의 생산에 이르기까지 전체 제조과정을 알기 쉽도록 단계별로 표준화된 공정 흐름도를 작성함

○ 각 단계별 세부적인 제조방법을 작성함

- 제조단계별 구체적 작업 내용 및 조건(온도, 압력, 시간 등)에 대한 설명(사진 포함)

  * 추출 등의 공정을 거친 경우 제조단계별 수율, 농축에 관한 자료 등도 함께 제출함

- 독성이 있는 것으로 알려진 경우 독성물질을 제거하는 방법 등

  * 독성물질 등의 잔류에 대한 기준, 그 시험법 및 시험법에 대한 검증 자료 등도 포함함

○ 다음의 자료를 추가적으로 작성함

- 배양조건(배양액의 조성, 온도, 시간 등)과 배양방법(시드배양, 본배양) 등 배양단계에 대한 구체적 내용을 작성해야 함
  (예시: MRS 배지, 37℃, 24 h, 본배양, shaking incubator, anaerobic)

○ 미생물 처리 형태는 생균, 사균, 대사체 중 해당하는 상태를 명시해야 하며, 사균화를 실시한 경우 사균 처리방법, 추출을 실시하는 경우 생균 제거방법을 포함하여 기술해야함

- 사균화 처리 시 열처리, 화학적 처리 등의 구체적 방법과 온도, 시간, 압력 등의 조건을 기재

- 추출 공정 시 생균 제거를 위한 여과, 원심분리 등의 방법과 조건을 기재

○ 배양액과 미생물의 분리 제거 여부 및 배양액 제거 시 적용하는 방법을 기술해야함

- 배양액 제거 방법으로 원심분리, 여과 등을 사용하는 경우 구체적 조건을 제시
  (예시: 배양액을 미생물과 분리, 원심 분리 (8,000 RCF, 10 min)후 여과)

○ 미생물 저장 및 보관 방법과 저장 중 변질, 오염 등을 관리하는 방법을 포함해야함

- 저장 온도, 저장 형태 등을 명시
  (예시: -80℃ 동결 건조 후 –20℃에서 보관)

- 해당 미생물을 식품원료로 사용하여 제조된 최종 제품에서 미생물 균주의 존재/부재를 확인할 수 있는 방법을 함께 제시하여야 함
  (예시: 균주 특이적 프라이머 정보 및 PCR 조건 제출)
  (부재의 경우 '농생명마이크로바이옴 유래 식품원료안전성 평가 가이드라인(안)-사균체·대사체-최종 산물 내 원료 균주 생균 부재 확인'을 참고함)

2-3. 원료의 특성에 관한 자료

가. 유해물질 시험 분석

○ 식품의약품안전처에서 지정한 국내 식품위생검사기관에서 수행해야함

○ 3롯트 이상의 원료에 대한 시험성적서 또는 검사성적서를 제출하여야함

○ 분석이 필요한 항목은 다음과 같음

- 중금속(납, 카드뮴)
- 미생물(대장균군, 일반세균)
- 원료의 특성에 따라 필요 시 잔류농약, 비소, 수은, 곰팡이독소 등 추가적인 분석결과, 중금속 오염원 및 저감화 자료가 필요할 수 있음

※ 유해물질은 **<표 7>**과 같이 국내 식품위생검사기관에서 실시하여야 하며, 식품 등 시험·검사기관 지정 현황은 [식약처 홈페이지>정책정보>시험검사기관>시험검사기관 지정현황>분야별선택>식품]을 참고할 수 있으며, 관련된 자세한 사항은 식약처 검사제도과(043-719-1822)에 문의가능함

표 7. 식품위생검사기관 (예시)

기관명	시험검사항목
한국식품산업협회 부설 한국식품과학연구원	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사, 식품조사처리확인, 방사능
한국식품산업협회 부산지원	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사
(주)한국분석기술연구원	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 유전자변형식품의 정성검사
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원	이화학, 미생물, 잔류농약, 잔류동물용의약품, 방사능, 유전자변형식품, 식품조사처리확인

나. 일일섭취량 추정

○ 사용대상식품은 「식품의 기준 및 규격(식약처 고시)」에 명시되어 있는 식품의 유형으로 정해야 함

* 예 : 발효유, 농후발효유 등

○ 신청원료의 사용용도(사용대상식품) 및 사용량을 제안하고, 해당 원료에 대한 연령별 평균 섭취량, 고 소비군의 극단 섭취량을 계산함

* 사용량을 설정한 필요가 없다고 판단한 경우에는 그 근거자료를 명확하게 제시해야함

○ 섭취량 평가를 위한 근거자료로 '국민건강영양조사 (보건복지부)', '한국인영양섭취기준(한국영양학회)', '식품수급표 (농촌경제연구원)', '식품성분표 (농촌진흥청)' 등의 자료로 한국인에 대한 자료를 우선으로 하며, 관련 자료가 없는 경우 외국의 자료 혹은 과학적이고 객관적인 문헌을 이용해야 함

<섭취량 평가 예시>

1. 독성시험을 통한 신청 원료 A의 최대무독성량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level) 값을 확인하고 일일섭취허용량(ADI, Acceptable Daily Intake) 값을 구함
   - A 균의 NOAEL 값이 $3*10^{11}$ CFU/kg bw/day 라면, ADI 값은 NOAEL 값을 안전계수 100으로 나눈 $3*10^{9}$CFU/kg bw/day

* 안전계수는 동물시험에 의한 독성시험 결과 얻어진 NOAEL 값을 인간에게 적용할 수 있도록 사용되는 계수로 동물 종 사이의 감수성의 차이를 1/10, 인간에 있어서의 감수성의 차이를 1/10으로 하여 100으로 설정함

* 안전계수는 독성시험 방법, 결과 등에 따라 추가적인 안전계수를 더할 수 있음

2. 신청 원료 A의 섭취량을 예측하기 위해서는 최근 국민건강영양조사 자료 중 발효유의 연령별·성별 평균섭취량 및 극단 섭취량(상위 95%) 자료를 찾고, 신청 원료 A의 사용량에 따른 연령별·성별 평균 및 극단 섭취군의 A 원료 섭취량을 계산함
   - 신청 원료 A의 사용량이 발효유 10^{9} CFU/100g이고, 6~8세 남성의 평균 섭취량이 200g/day 일 경우 6~8세 남성의 A 일일 섭취량은 둘을 곱한 $2*10^{9}$ CFU/day

3. 국내 인구집단의 체중자료를 구하고, 신청 원료 A의 상한섭취량(=ADI * 평균체중)을 계산
   - 6~8세 남성의 평균체중은 25 kg 이므로 상한 섭취량은 $7.5*10^{10}$ CFU/day

4. 신청원료 A의 상한섭취량에 대한 평균섭취량 및 극단섭취량의 비율을 구한 후 평균 및 극단섭취량이 상한섭취량을 상회하지 않음을 확인함
   - 6~8세 남성의 상한섭취량에 대한 평균섭취량의 비율은 ($2*10^{9}$ CFU/day) / ($7.5*10^{10}$ CFU/day) 로 2.67%에 해당함
   - 모든 연령별 성별 그룹에서 상한섭취량에 대한 평균섭취량 및 극단섭취량의 비율이 100%를 상회하지 않는 경우 안전성에 문제가 없는 것으로 판단할 수 있음

Ⅲ 안전성 평가 시험 제출 항목

3-1. 항생제 내성 평가

○ 항생제 내성 유전자를 가진 미생물은 패혈증을 비롯한 감염 질환 등에서 항생제로 균을 제어할 수 없기에 치명적인 결과를 초래할 수 있음

○ 또한 항생제 내성 유전자는 주위에 있는 다른 미생물에게도 전달될 수 있으므로 원료 균주로부터 다른 고위험 병원균으로 항생제 내성 유전자가 전달될 가능성도 무시할 수 없음

○ 따라서 식품 원료로 사용될 균주의 항생제 내성을 파악하고, 만약 내성이 존재한다면 이러한 내성이 전달될 수 있는 종류의 것인지 파악해야 함

○ 항생제 내성 표현형은 해당 항생제의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 값을 통해 분석됨

○ 균주의 MIC를 평가하는 방법으로는 CLSI의 agar dilution assay, broth microdilution assay,[5] CDC가 추천하는 antibiotic strip(ETEST®) 등이 있으며, 자세한 절차는 아래에서 제시됨

○ 균주에 따라 EFSA가 제시한 기준값과 실제로 분석된 MIC 값을 비교하여 MIC 값이 EFSA 기준보다 더 낮을 경우 사용 가능하며, 초과하는 경우는 획득/내재 내성을 판단해야 함

○ 속/종에 따라 cut-off value가 정해져 있지 않은 균들의 경우 Gram 양성이면 *Cornybacterium*의 cut-off value를, Gram 음성이면 *Enterobacteriaceae*의 cut-off value를 기준으로 삼음

○ EFSA의 cut-off value 기준은 **<표 8>**과 같음[6]

○ 획득/내재 내성은 앞서 제출한 전장유전체 정보 분석을 통해 이루어지며 자세한 방법은 아래에 제시됨

○ 항생제별 용매 및 희석 용액은 **<표 9>**와 같음[7]

○ 항생제 내성 평가는 오염, 균주의 활성도, 탁도 등의 변수에 따라 결과의 정확성이 저하될 수 있으므로 매 시험마다 정도관리 균주(QC Strain)을 포함하여야 함

○ 정도관리(QC)를 통해 평가의 재현성과 정밀도, 사용 시약과 배지의 성능 관리, 검사자 숙련도 및 결과 판독의 정확성을 모니터링하고 정도관리 균주의 결과가 허용 범위[8][9]를

5) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07, 2024, Clinical & Laboratory Standards Institute(CLSI)
6) 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
7) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 2025, Clinical & Laboratory Standards Institute(CLSI)
8) CLSI, Performance Standars, op.cit.

벗어난 경우 평가를 재실시해야 함

표 8. EFSA 가이드라인 기준 항생제 MIC cut-off value 기준

Microbiological cut-off values (mg/L)	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol	tylosine
Lactobacillus obligate homofermentative[a]	1	2[b]	16	16	16	1	1	4	4	n.r.
Lactobacillus acidophilus group	1	2	16	64	16	1	1	4	4	n.r.
Lactobacillus obligate heterofermentative[c]	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4	n.r.
Lactobacillus reuteri	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4	n.r.
Lactobacillus facultative heterofermentative	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.
Lactobacillus plantarum/pentosus	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8	n.r.
Lactobacillus rhamnosus	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4	n.r.
Lactobacillus casei/paracasei	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4	n.r.
Bifidobacterium	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.
Pediococcus	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.
Leuconostoc	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	n.r.
Lactococcus lactis	2	4	32	64	32	1	1	4	8	n.r.
Streptococcus thermophilus	2	4	32	64	64	2	2	4	4	n.r.
Bacillus	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	n.r.
Propionibacterium	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	n.r.
Cornybacterium and Other Gram positive	1	4	4	16	8	0.5	0.25	2	2	n.r.
Enterococcus faecium	2[d]	4	32	1024	128	4	4	4	16	4
Enterobacteriaceae and other Gram negative	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	8	n.r.	n.r.

n.r. not required.

[a] including *L. delbrueckii, L. helveticus*

[b] not required for *L. salivarius*

[c] including *L. fermentum*

[d] MIC > 2 mg/L: hospital-associated pathogenic clade; not allowed

9) One Health 항생제 내성균 다부처 공동대응사업, 2019~2023, 질병관리청

표 9. 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	Broth

○ 평가방법

[1단계] MIC cut-off test (Agar dilution assay, Broth microdilution assay, E-TEST)

- MIC ≤ cut-off : 사용 가능
- MIC > cut-off : 2단계 진행

[2단계] 획득/내재 내성 확인

- 내재 내성 : 같은 종(학명)에 동일하게 존재하는 내성인 경우, 즉 미생물 종의 내재적인 특징인 경우 사용 가능
- 획득 내성 : 3단계 진행

[3단계] 항생제 내성 획득 경로 확인

- 유전적 돌연변이 : 고유 유전자의 돌연변이로 항생제 내성을 획득한 경우 사용 가능
- 획득한 유전자 : 사용 불가. 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

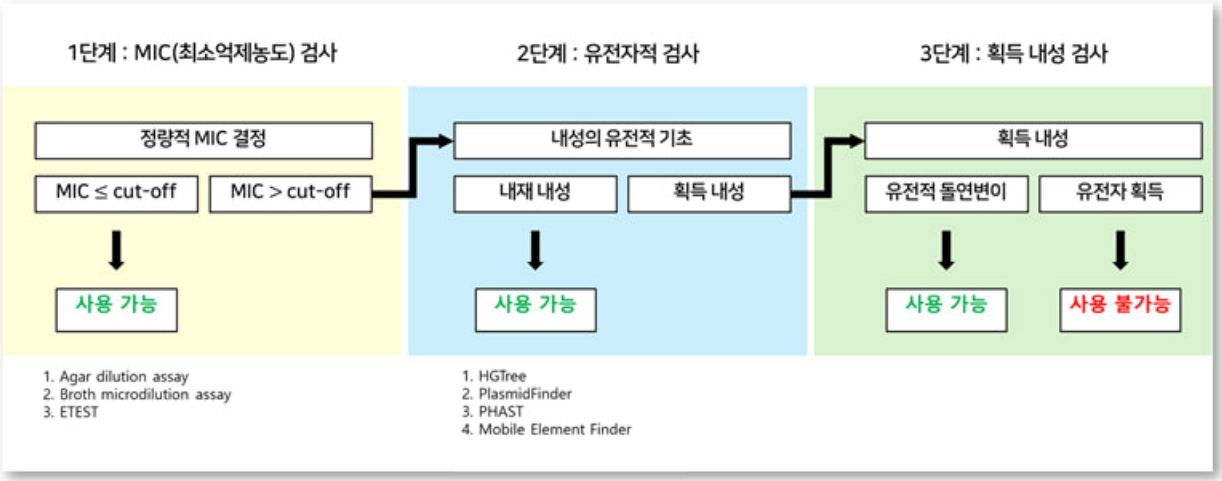


그림 8. 항생제 내성 확인 결정도

가. 항생제 내성 평가 방법

① Agar dilution assay

1) 항생제 용액 제조

① EFSA에서 규정된 항생제에 맞는 용매 선정 **<표 9. 참조>**

② 항생제별 stock solution 제조

③ Syringe filtration(0.2 μm 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)로부터 농도를 두 배씩 증가시켜 한천배지에 첨가 (*농도예시: 0, 2^0, 2^1, 2^2, 2^3, 2^4.....)

④ 항생제가 첨가된 한천배지를 petri dish에 20ml씩 분주 후 실온에서 고형화함

3) 균주 접종 (Spotting)

① 시험하고자 하는 균주(1x10^7 CFU/ml) 1μL를 한천배지 표면에 spotting 함

- 최종 접종 균 수 (1x10^4 CFU/spot)
- 대조군을 시작으로 낮은 농도부터 순차 접종한 뒤 마지막으로 대조군에 다시 접종하여 오염 및 항생제 잔류를 확인함

4) 배양

① 접종한 균주가 한천배지에 잘 스며들도록 30분간 상온 방치

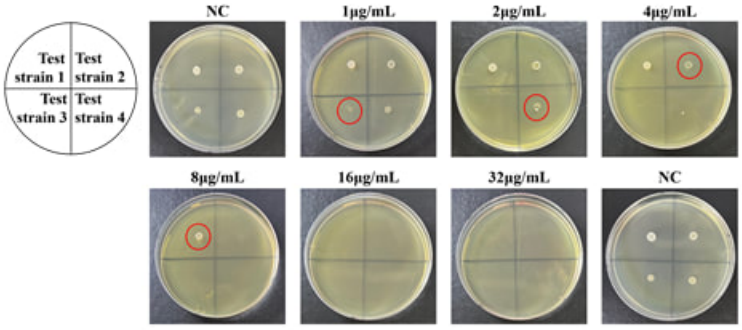
② 균주의 배양 조건에 따라 35±2°C의 호기 또는 혐기 조건에서 16~20시간 배양함 (반코마이신의 경우 24시간 배양)

③ 균주가 충분히 배양되지 않은 경우 최대 48시간까지 추가 배양함

5) MIC 확정

① 콜로니가 형성되지 않는 최저농도를 MIC로 확정 **<그림 9>**

② 단일 집락이나 접종으로 인한 흔적은 무시함



TEST STRAIN	MIC (μg/mL)
1	16
2	8 (접종 흔적 무시)
3	2
4	4 (단일 집락 무시)

그림 9. Agar dilution assay 예시

6) 판정 기준

① 9개의 항생제(*Enterococcus faecium*의 경우 tylosine을 포함한 10개)에 대해서 EFSA 기준 cut-off 기준 **<표 8>**과 비교하여 **수치가 미달이면 사용 가능**

② **기준보다 수치 초과 시 획득/내재 내성 판단**

② Broth microdilution assay

1) 항생제 용액 제조

① EFSA에서 규정된 항생제에 맞는 용매 선정 **<표 9. 참조>**

② 항생제별 stock solution 제조

③ Syringe filtration(0.2 μm 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 50μL씩 분주

③ 항생제 용액 50μL을 무첨가(대조군)로부터 농도를 두 배씩 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 ($5x10^6$ CFU/ml) 10μL를 각 well에 접종함

- 최종 균 수 ($5x10^4$ CFU/well) 및 well 당 최종 접종 균 수 ($5x10^5$ CFU/ml)

4) 배양

① 접종 후 15분 이내에 배양 시작

② 균주의 배양 조건에 따라 35±2°C의 호기 또는 혐기 조건에서 16~20시간 배양함 (반코마이신의 경우 24시간 배양)

③ 균주가 충분히 배양되지 않은 경우 최대 48시간까지 추가 배양함

5) MIC 확정

① MIC는 항생제를 넣지 않은 대조군과 육안으로 비교하거나 viewing device를 사용하여 확인함

② 그림과 같이 대조군과 비교했을 때 명확하게 다른 탁도를 보이는 농도를 MIC로 확정 **<그림 10>**

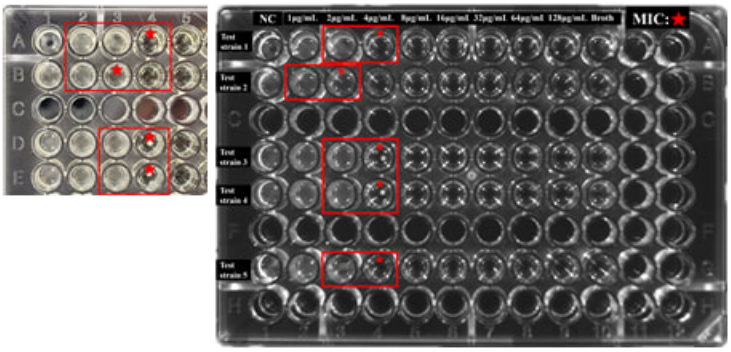


그림 10. Broth micordilution assay 예시

6) 판정 기준

① 9개의 항생제(*Enterococcus faecium*의 경우 tylosine을 포함한 10개)에 대해서 EFSA 기준 cut-off 기준 **<표 8>**과 비교하여 **수치가 미달이면 사용 가능**

② **기준보다 수치 초과 시 획득/내재 내성 판단**

③ E-TEST®

1) 균주 준비

① 0.5~1.0 McFarland (1.5~3x10^8 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 streaking 함
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 다수의 strip을 사용할 경우 strip 간의 간격이 너무 좁으면 MIC 측정에 문제가 생길 수 있으므로 적절한 거리를 유지하여 배치함

4) 배양

① 균주의 배양 조건에 따라 35±2°C의 호기 또는 혐기 조건에서 24시간 배양함
② 균주가 충분히 배양되지 않은 경우 최대 48시간까지 추가 배양함

5) MIC 확정

① **<그림 11>**와 같이 균이 자라지 않은 strip 부위의 가장 밑 부분을 MIC로 확정



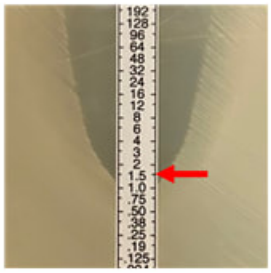
그림 11. E-TEST MIC 판정 예시

6) 판정 기준

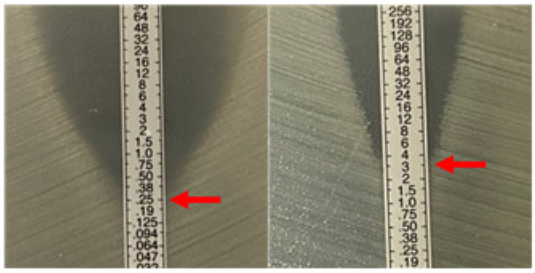
① 9개의 항생제에 대해서 EFSA 기준 cut-off 기준 **<표 8>**과 비교하여 **수치가 미달이면 사용 가능**
② 기준보다 **수치 초과 시 획득/내재내성 판단**

7) MIC 판독 시 주의 사항[10)]

① 2개의 농도 사이에 억제대가 있으면 높은 농도로 판독



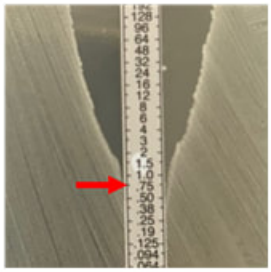
② Bacteriostatic antibiotic은 증식 억제가 처음 관찰되는 80% 또는 90% 억제대를 판독



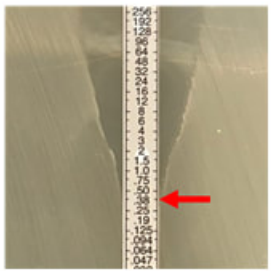
③ 억제대 안에 집락이 있으면 집락이 있는 지점까지 농도를 올려서 판독



④ 좌우의 농도가 다른 경우는 높은 농도로 판독하고 2단계 이상 차이 나는 경우는 재시험함



⑤ Vancomycin의 경우에 타원형의 골짜기 억제대가 생기는 경우는 가장 낮은 억제대 농도를 판독



10) 질병관리청, One Health, op.cit.

나. 획득/내재 내성 판단 방법[11)]

○ 획득/내재 내성을 판단하기 위해서 생물정보학 기반 4가지 방법을 제안함

1) HGTree 기반 판단 방법[12)]

○ Horizontal gene transfer database (HGTree DB)를 기반으로 생물정보학적 분석을 활용한다면 획득 또는 내재 내성 구분이 가능함

○ 또한 HGT event의 분석 결과를 바탕으로 항생제 내성 유전자의 전파경로를 파악할 수 있음

○ 획득 내성의 경우 크게 conjugation, transduction, mobile element에 의해서 내성 유전자를 얻게 되므로 전장유전체를 활용하여 이와 같은 전파경로를 파악한다면 획득 내성 여부를 확인할 수 있음

○ 획득 내성과 내재 내성을 구분하기 위하여 전장유전체를 활용하여 HGTree DB를 기반으로 구분하는 방법을 제시하고자 함 **<그림 12>**

① HGTree DB (http://hgtree2.snu.ac.kr/) 내 항생제 내성 유전자 검색 기능

② 해당 균주의 전장유전체 정보입력으로 HGTree 분석을 시작

③ HGT event가 발생한 유전자에 관한 결과 확인

④ phylogenetic tree 기반 항생제 내성 유전자의 상호관계 및 전파경로 파악으로 획득/내재 내성 구분

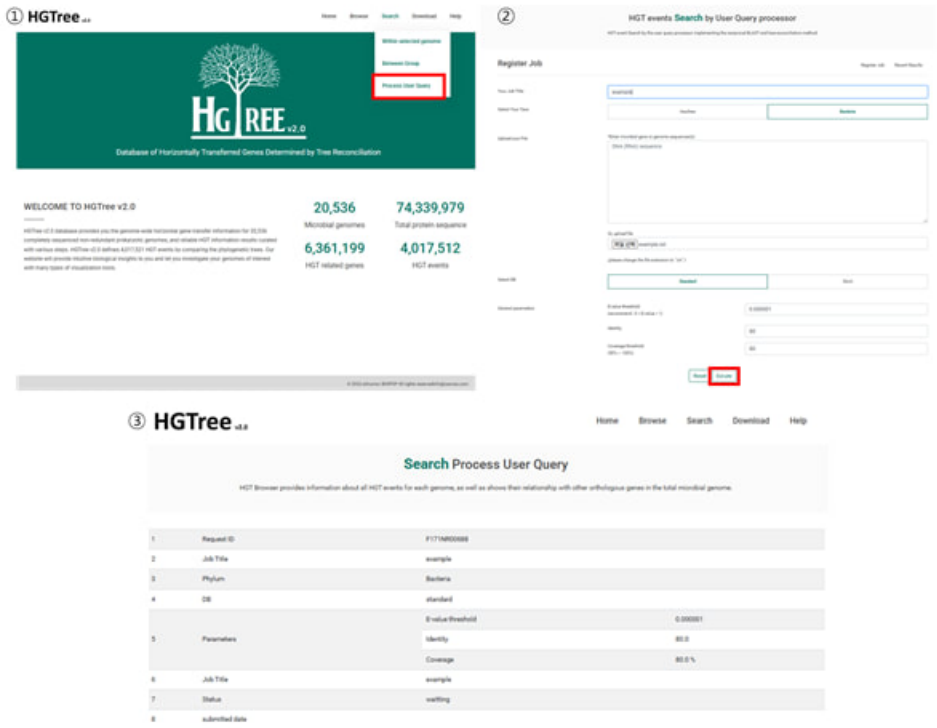


그림 12. HGTree 사용 방법

11) 건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드, 2021, 식품의약품안전평가원

12) HGTREE2 Seoul National University, http://hgtree2.snu.ac.kr/

2) Conjugation에 의한 획득/내재 내성 판단[13)]

① PlasmidFinder 2.1 프로그램 기반 (cge.cbs.dtu.dk/servicesPlasmidFinder) 사이트에 접속

② 균주의 FASTA file 업로드 후 분석 진행

③ 해당 균주에 plasmid가 존재하는지 확인

④ Plasmid가 존재 시 plasmid 내에 항생제 내성 유전자와 *tra* 유전자가 있는지 확인

⑤ Plasmid 내에 *tra* 유전자 존재 및 항생제 내성 유전자 존재 시 획득 내성 판단

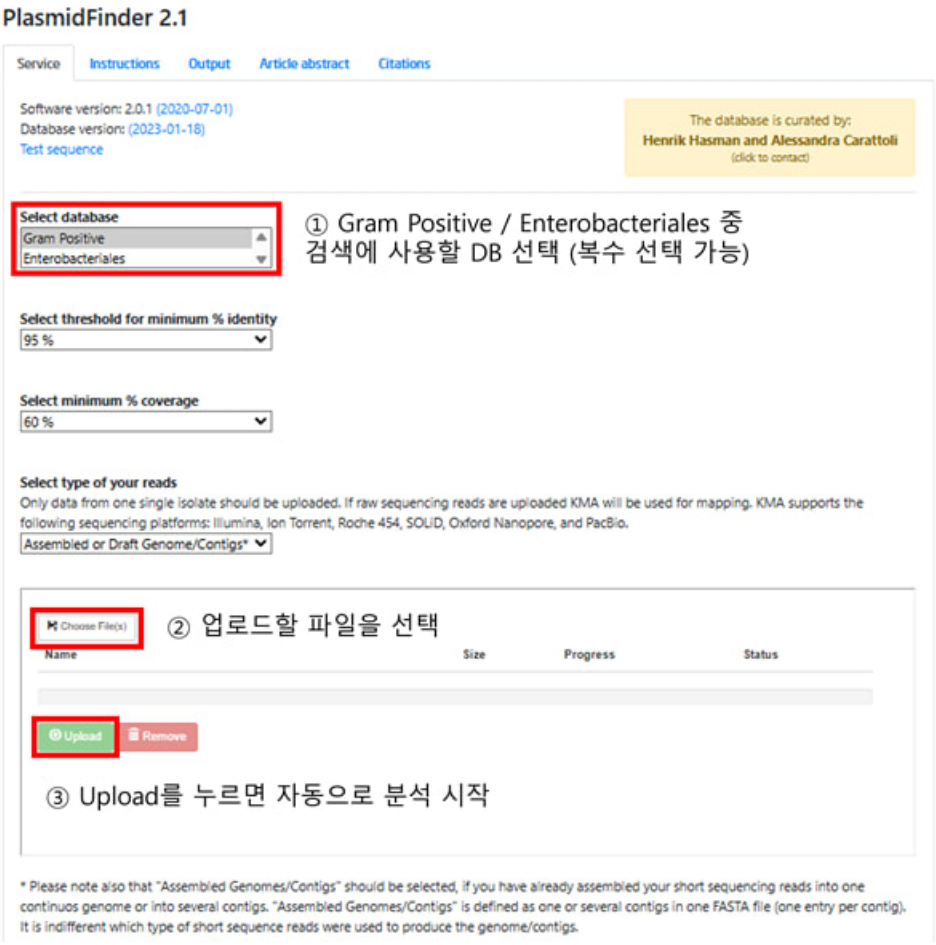


그림 13. PlasmidFinder 사용 방법

13) Center for Genomic Epidemiology. PlasmidFinder. Technical University of Denmark. https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/

3) Transduction에 의한 획득/내재 내성 판단[14)15)]

① PHASTER (https://phaster.ca/) 사이트에 접속

② 균주의 FASTA file 업로드 후 분석 진행

③ 예측된 prophage 염기서열 안에 항생제 내성 유전자가 있는지 확인

④ Prophage 내에 항생제 내성 유전자 존재 시 획득 내성 판단



그림 14. PHASTER 사용 방법

14) Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: A fast phage search tool. Nucleic Acids Research, 39(Web Server issue, W347–W352. https://doi.org/10.1093/nar/gkr485

15) PHASTER. PHAge Search Tool Enhanced Release. https://phaster.ca/

4) Mobile element에 의한 획득/내재 내성 판단[16)]

① Mobile Element FInder (cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder) 사이트에 접속

② 균주의 FASTA file 업로드 후 분석 진행

③ 예측된 mobile element 염기서열 안에 항생제 내성 유전자가 있는지 확인

④ Mobile element 내에 항생제 내성 유전자 존재 시 획득 내성 판단

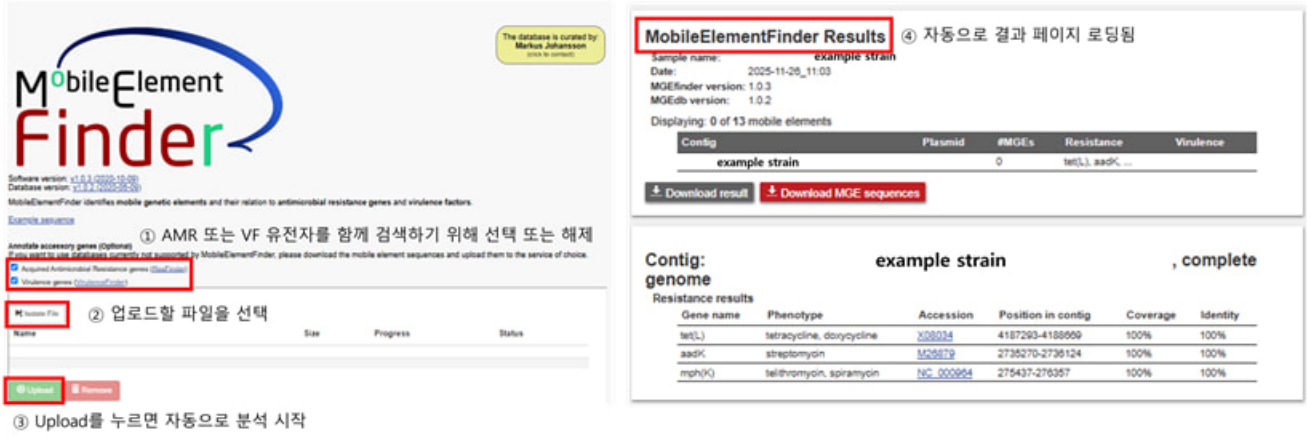


그림 15. MobileElementFinder 사용 방법

5) 판정 기준

① 획득 내성으로 판단 시 사용 불가

② 내재 내성 판단 시 사용 가능하나, 종 수준 문헌 근거 명시해야 함

16) Center for Genomic Epidemiology. MobileElementFinder. Technical University of Denmark. https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/

3-2. 용혈 활성 평가

○ 미국의 American Society for Microbiology 가이드라인 참고[17]

○ 균주의 용혈 활성은 숙주의 적혈구를 파괴시켜 용혈성 빈혈 등 건강상의 위험을 초래할 수 있기에 용혈 활성이 있는 균주를 사용해서는 안됨

가. 혈액 한천 배지 기반 평가

1) 혈액 한천 배지 제조

① 다음과 같은 조성으로 배지를 만든 후 autoclave 후 온열수조내에서 40~50°C로 조정

Contents(G/L)

- 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

② 5%의 멸균된 sheep blood를 미리 실온 상태로 준비한 후 첨가함

③ 혈액이 첨가된 배지를 20 ml씩 분주 후 실온에서 고형화함

※ 참고사항

- 배지의 온도가 40-50°C보다 높을 경우, 혈액 첨가 시 혈액 내 적혈구가 손상될 수 있으며, 혈액 첨가 시 혈액의 온도가 차가울 경우, 배지를 분주하기 전에 응고가 발생할 수 있음

2) 균주 접종

① 해당 균주를 혈액한전배지에 streaking함

3) Hemolysis 결과 분석

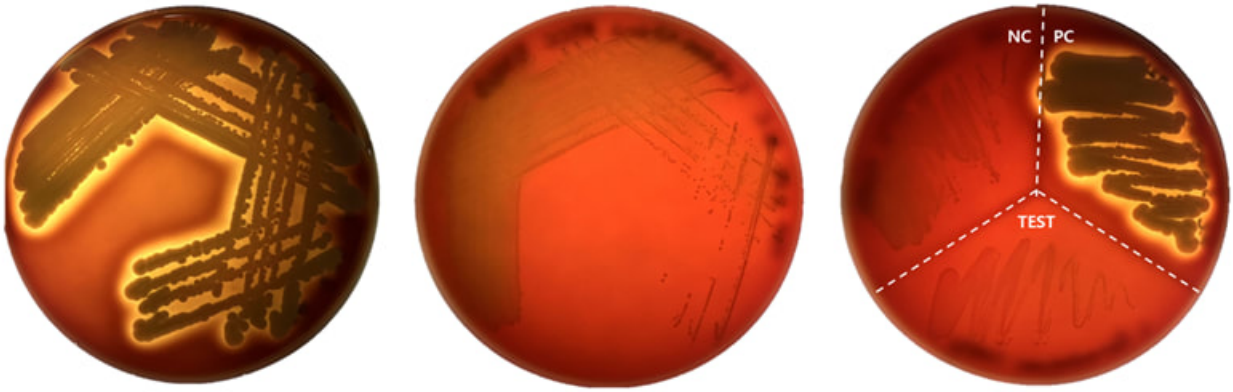
① 용혈반응을 확인하기 위해서는 반드시 투과광으로 관찰해야 함 **<그림 16>**

② α-hemolysis : 적혈구의 헤모글로빈이 Methemoglobin으로 변환되어 녹색 혹은 갈색변색을 형성함

β-hemolysis : 적혈구를 완전히 파괴하여 투명한 용혈 구역를 형성함

γ-hemolysis : 용혈 활성이 확인되지 않으며, 콜로니 주변에 아무런 변화가 없음

17) Blood agar plates and hemolysis protocols, 2005, ASM protocol



용혈 활성을 가지는 병원균
예시) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

용혈 활성을 가지지 않는 미생물
예시) *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103

용혈 활성 판정 TEST 예시

그림 16. 용혈 활성 결과 예시

※ 참고사항

- Positive control(예시):β-hemolysis를 나타내는 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 등
- Negative control(예시):γ-hemolysis를 나타내는 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 등
- β-hemolysis은 콜로니 주변 배지에서 녹색 또는 갈색 변색을 절대 포함하지 않으며, 장시간 배양 시 clear zone이 생겼다고 하더라도 녹색 또는 갈색 변색이 남아 있다면 α-hemolysis로 간주함

4) 용혈 활성 판정 기준 <그림 17>

① 용혈반응을 확인하기 위해서는 반드시 투과광으로 관찰

② 반드시 용혈활성을 가지는 양성 대조군과 용혈활성을 가지지 않는 음성 대조군과 함께 비교하여 시험 균주의 용혈성을 판단

③ α-hemolysis 의 경우 유전자 보유 확인을 통한 추가적인 안전성 평가 진행

(2) 병원성 요소가 있는 경우 사용 불가

β-hemolysis : 사용 불가

γ-hemolysis : 사용 가능

판단 기준

용혈 활성 판정 기준

① 용혈반응을 확인하기 위해서는 반드시 투과광으로 관찰

② 반드시 용혈활성을 가지는 양성 대조군과 용혈활성을 가지지 않는 음성 대조군과 함께 비교하여 시험 균주의 용혈성을 판단

③ α-hemolysis 의 경우 유전자 보유 확인을 통한 추가적인 안전성 평가 진행

평가 결과 사진 예시	판단 기준	
	추가적인 안전성 근거 제시	
	• 병원성 요소 보유 - *hblC, hblD, hblA* - *HlyA* - *hla, hlb* - *cylE* - *ply* **사용 불가**	• 병원성 요소 보유 X • 과산화수소 관련 gene - *spxB* - *Pox* - Etc. **사용 가능함**
	**사용 불가**	
	**사용 가능함**	

그림 17. 용혈 활성 평가의 판단 기준

나. α-hemolysis 균주의 추가적 병원성 요소 유전자 기반 평가

○ 혈액 한천 배지법은 용혈 활성을 확인하는 기본적 지표이나, 특정 균주는 H_2O_2 생성 등 대사적 요인으로 인해 α-hemolysis과 유사한 패턴을 나타날 수 있어, 배지법으로 병원성 여부를 판단하기 어려운 경우 병원성 관련 유전자 보유 여부와 함께 종합적으로 해석할 수 있음

○ 전장유전체 분석 시, 확인해야 할 대표적 병원성 요소 유전자는 다음과 같음 (예시): 유전자 존재시 사용 불가

- Hemolysin BL gene (*hblC, hblD, hblA*)
- Hemolysin A (*hlyA*)
- Alpha/beta hemolysin (*hla, hlb*)
- Beta hemolysin/cytolysin (*cylE*)
- Pneumolysin (*ply*)

○ H_2O_2 생성과 관련된 유전자(*spxB, pox* 등)를 보유한 균주는 배지 상에서 α-hemolysis와 유사한 녹색 변색을 유발할 수 있으므로, 이러한 균주에 대해서는 H_2O_2 생성 여부를 별도로 확인하고 용혈 활성 판독에 반영하여야 함: 사용 가능

3-3 독소 생성 여부 평가 : LDH assay 시험

○ 신규 식품 원료가 독소를 생성할 경우 인체에 매우 유해한 결과를 가져오기 때문에 이를 세포를 기반으로 *in vitro* test를 통해 확인함[18)]

○ 특정 박테리아가 생성하는 독소는 장내 점막 손상, 염증반응, 설사, 식중독, 패혈증을 초래할 수 있음 (예: *Clostridium botulinum*의 botulinum toxin)[19)]

○ 젖산 탈수소효소(Lactate dehydrogenase) 세포막 무결성 손실로 인한 세포 내 LDH 효소의 세포 외부로 방출되는 것을 기반으로, 세포 손상 수준을 정량적으로 평가하는 데 사용됨[20)]

○ 독소 혹은 외부 자극에 의해 유도된 세포막 투과성 변화에 민감하게 반응하므로, 세포 사멸 및 괴사 지표로 활용됨 **<그림 18>**

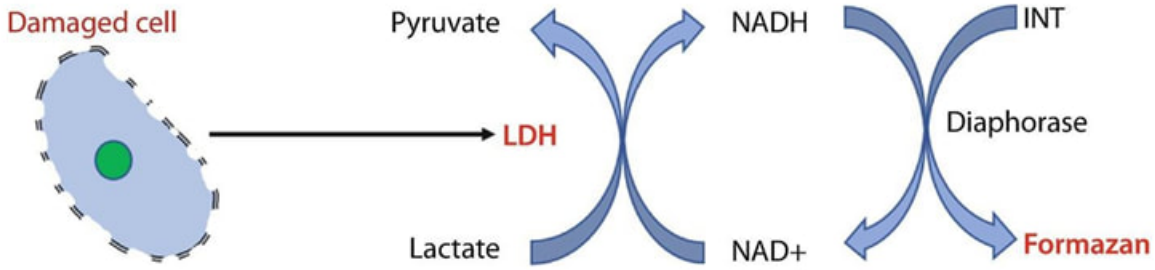


그림 18. LDH 시험 원리[21)]

가. LDH assay kit를 활용한 평가법

1) 세포배양 및 준비

① 멸균된 DMEM 배지에 오염을 방지하기 위해 Penicillin-Streptomycin solution (100 U/mL) 및 불필요한 면역반응과 단백질 분화를 방지하기 위해 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)을 첨가

- FBS의 heat-inactivation을 통해 보체단백질과 효소를 비활성화시켜 세포 배양에서 불필요한 면역반응과 단백질 분화를 방지함

② 제조한 ①배지에서 활성화된 Caco-2 또는 HT-29 cell line을 penicillin-streptomycin free 및 phenol red free DMEM 세포배지를 각 well에 접종함(1~5 x 10^4 cell/mL)

- Penicillin-streptomycin free : 각 well에는 균주를 처리할 예정으로 항생제와 LDH에 영향을 주는 FBS 성분이 없는 배지를 사용해야함

18) World Health Organization (WHO), WHO Global Strategy for Food Safety 2022–2030: Towards Stronger Food Safety Systems and Global Cooperation, WHO, Geneva, 2022.
19) Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA), Botulinum Toxin: Characteristics and Public Health Risk, KDCA, Cheongju, 2020.
20) Van den Bossche S, Vandeplassche E, Ostyn L, Coenye T, Crabbé A, Bacterial Interference With Lactate Dehydrogenase Assay Leads to an Underestimation of Cytotoxicity, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020.
21) Narine Sarvazyan et al., Tissue Engineering – Functional Assays and Toxicity Screening, Springer, 2020.

- Phenol red free DMEM : 생균 처리 시, phenol red의 pH 지시 특성으로 인해 배지 색 변화가 균주 대사활성에 따라 다르게 나타나며, 이는 흡광도 측정값에 영향을 줄 수 있음

③ 96 well plate의 각 well에 접종된 세포 배지를 옮긴 후 5% CO_2, 37°C에서 24시간 배양[22)]

④ 배양 후 배지 제거 후 1% BSA가 포함된 PBS로 2회 washing 후 새로운 세포 배지 100 μL 첨가함

2) 시험 균주 접종

① 각 well에 시험균주(10^6~10^8 CFU/mL)를 접종하고 5% CO_2, 37℃에서 18~24시간 배양함

② 비교군으로서 Positive control (Lysate 용액 첨가) 및 Negative control (No lysate solution, No bacterial cell addition) 준비

3) LDH assay (kit 사용)

① 5분간 원심분리 후 (600 x g), 상층액 50 μL를 새로운 96well plate에 옮김

② 50 μL LDH reaction mix를 넣고 상온에서 빛을 차단하여 30분 이내 배양함

③ 생성된 NADH가 INT-Formazan(colorless)을 Formazan(purple)로 변환함

④ 변화된 색을 490nm에서 흡광도 측정 후, 공식에 따라 cytotoxicity (%) 계산함

$$Cytotoxicity\,(\%) = \frac{Test\ sample - Negative\ control}{Positive control - Negative\ control} \times 100$$

4) 독소 생성 판정 기준

① 시약에 의한 양성 대조군과 함께 실제 병원성 균주를 포함하여 평가하며, 비교군보다 정량값이 비슷하거나 유의적으로 높게 나오는 경우 사용 불가 **<그림 19>**

22) Chen ZY, Hsieh YM, Huang CC, Tsai CC, Inhibitory Effects of Probiotic Lactobacillus on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29, Providence University, Taichung, 2017.

판단 기준

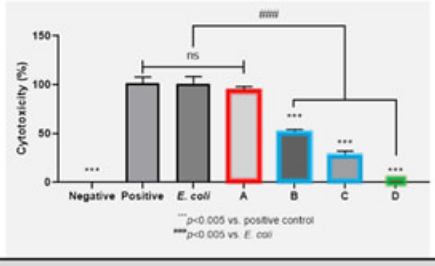
독소 생성 판정 기준

① 세포독성 판정을 위해 반드시 시약기반의 음성/양성 대조군과 균주 기반의 음성/양성 비교군을 포함하여 LDH 방출량을 평가

② 시험 균주의 LDH 방출량이 양성 비교군인 병원성 균주와 비슷하거나 유의적으로 높게 나올 시 경우 사용 불가, 더 낮은 값이 나올 경우 사용 가능

③ 중간 수준 또는 의심되는 LDH 결과가 확인될 경우, 전장유전체 분석을 통해 독소 및 병원성 유전자 보유 여부 확인 및 추가적인 안전성 평가 진행

평가 결과 사진 예시



판단 기준	
A 사용 불가	• 독소를 생성하는 양성 비교군 균주와 정량 값이 비슷하거나 유의적으로 높게 나올 경우
B, C 추가적인 안전성 근거 제시	• LDH를 방출하나 양성 비교군보다 더 낮은 값을 나타낼 경우 독성유전자 존재 평가 진행 • 독성유전자 존재 X(존재하나 발현 X), 사용가능
D 사용 가능함	• 음성 비교군 수준으로 20% 이하의 독성 생성을 나타내는 경우

그림 19. LDH assay의 판단 기준

※ 참고사항
- 시약에 의한 양성 대조군과 함께 실제 병원성 균주를 비교군으로 포함하여 평가
- 대조군 설정은 다음과 같은 예시를 적용할 수 있음
- *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 14579 등의 병원성 균주 사용을 권장함

나. 독성 유전자 기반 평가

○ 전장유전체 데이터를 활용하여 VirulenceFinder 2.0, ToxFinder 1.0, PathogenFinder 1.1, DBETH(Database of Bacterial Exotoxins for Human) 등과 같은 분석 도구를 활용하여 잠재적 병원성 및 독소 관련 유전자 보유 여부를 평가할 수 있음

3-4 대사적 특성평가 시험 (D-lactate, BSH activity, Biogenic Amine)

가. D-lactate 시험

○ 인체의 경우 L-lactic acid만 대사가 가능하고 이성질체인 D-lactic acid는 대사가 불가능함

○ 일부 미생물의 경우 L-lactate를 D-lactate로 변환하는 효소인 DL-lactate racemase를 가지고 있음

○ DL-lactate racemase 효소의 활성이 강할 경우 신생아나 어린아이 그리고 short bowel syndrome 환자에게 D-lactate가 축적되어 산독증(acidosis)를 유발할 수 있음

1) 샘플준비

① 시험균주를 각 배양 조건에 맞게 24시간 배양함
② 균 배양액을 11,000 g ~ 13,000 g에서 5~10분간 원심분리 후, 상층액을 0.2 μm filter를 사용하여 filtering 진행함
③ 배양액에 PCA를 첨가하여 deprotenization 진행함
④ KOH를 첨가하여 pH를 6.5~8 범위 내로 조정함

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

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

$$\text{샘플의 } D-lactate \text{ 양, } La\ (nmol) = \frac{\text{측정 흡광도 값} - y \text{ 절편값}}{\text{표준 곡선의 기울기}}$$

$$\text{샘플의 } D-lactate \text{ 농도 } (nmol/\mu L) = La / 100\,\mu L$$

3) D-lactate 판정 기준 <그림 20>

① 양성
- 식경험이 있는 균주 → 식경험 자료 제시 후 사용 가능
- 식경험이 없는 균주 → 안전성 입증하기 위한 추가적인 자료 제시 (예시: L/D-lactate 생성 비율 및 생성량, *ldhD*/*larA* 유전자 보유 여부 등)

② 음성
- D-lactate 생성이 확인되지 않은 경우, 안전성이 확보된 것으로 판단되어 사용 가능

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

판단 기준

D-lactate 판정 기준

① 키트 기반 정량 결과를 통해 D-lactate 검출 시 양성으로 판정하며 미검출 시 음성으로 판정

② 양성 시, 해당 균주의 식경험 유무에 따라 '사용 가능' 또는 '추가 안전정 자료 제시 ' 로 세분화

③ D-lactate 생성능을 가지는 양성 대조군과 가지지 않는 음성 대조군과 함께 비교하여 시험 균주의 생성능을 평가

평가 결과		판단 기준
양성	식경험이 있는 균주	과다섭취 않도록 주의 권고 사용 가능함
	식경험이 없는 균주	추가적인 안전성 근거 제시 후 과다섭취 않도록 주의 권고 사용 가능함
음성		사용 가능함

그림 20. D-lactate 생성 평가의 판단 기준

나. Bile salt deconjugation 시험

○ Bile salt의 경우 지방을 유화시켜 lipase의 작용을 촉진하여 지방산 분해를 도움

○ 일부 미생물에 존재하는 bile salt hydrolase는 bile salt로부터 미생물을 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 가짐

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

① 시험균주 특성에 따라 TDCA 0.15% ~ 0.5% 첨가한 최적화된 MRS 한천배지 준비함

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

① TDCA 첨가 배지에 streaking 후 혐기 조건에서 37°C에서 3일간 배양

② BSH activity가 있는 균주의 경우 콜로니 주변에 불투명한 하얀색 콜로니가 형성되거나 침전물에 의한 후광이 생성됨 **<그림 21>**

※ 참고사항
- 대조군 설정은 다음과 같은 예시를 적용할 수 있음
- 양성대조군: BSH 활성을 나타내는 *Enterococcus faecium* ATCC 19434 등
- 음성대조군: BSH 활성을 나타내지 않는 *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 등

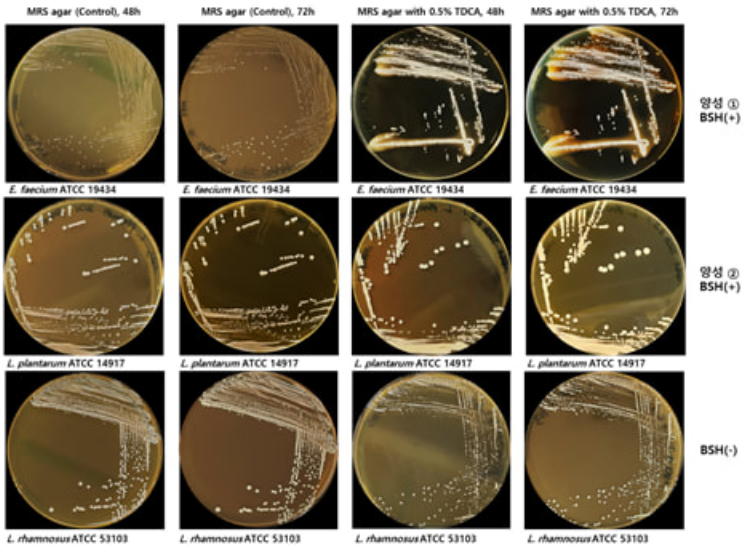


그림 21. Bile salt deconjugation test 결과 예시

3) BSH (Bile salt hydrolase) 판정 기준 <그림 22>

① Bile salt deconjugation의 생성 유무에 따라 Bile salt hydrolase 효소 양성/음성 판정

양성 1. 다량의 deoxycholic acid가 침전되어 colony 주위에 침전물에 의한 후광이 생성된 경우

양성 2. TDCA가 있는 상태에서 성장할 때 침전물 후광이 없는 불투명한 흰색colony를 형성한

경우

② 양성의 경우 deconjugation된 bile salt의 2차 대사산물이 독성을 가질 수도 있으므로 과다 섭취 않도록 주의 권고, 음성의 경우 사용 가능

③ 최종 산물이나 원료 균주의 D-lactate 생산 능력과 관련한 정량적인 국제 표준은 현재 존재하지 않기에 국내외 허용 균주 사례 기반 후속 연구를 통한 기준 필요함

판단 기준

1 Bile salt deconjugation 활성 기준 판정

① 반드시 Bile salt deconjugation을 가지는 양성 대조군과 Bile salt deconjugation 을 가지지 않는 음성 대조군과 함께 비교하여 시험 균주의 활성을 판단

② colony 주위에 침전물로 형성된 후광이 나타나거나, 후광 없이 불투명한 흰색 colony가 생성된 경우 양성판단

③ *bsh* 유전자 Bile salt hydeolase gene (choloylglycine hydrolase, EC 3.5.1.24)의 보유 여부를 확인하여 잠재적 bile salt deconjugation 활성을 평가하는 추가적인 안전성 평가 진행

평가 결과 사진 예시	*bsh* 유전자 존재 유무	판단 기준
	***bsh* 유전자 유/무**	식경험 등 추가적인 안전성 입증 후 **사용 가능함** 과다섭취 않도록 주의 권고
	***bsh* 유전자 유/무**	식경험 등 추가적인 안전성 입증 후 **사용 가능함** 과다섭취 않도록 주의 권고
	***bsh* 유전자 존재**	식경험 등 추가적인 안전성 입증 후 **사용 가능함** 과다섭취 않도록 주의 권고
	존재하지 않음	**사용 가능함**

그림 22. Bile salt deconjugation 활성 판단 기준

다. Biogenic amine production 시험

○ 일부 생균 기반 식품원료는 식품 내 아미노산을 decarboxylation하여 biogenic amine(BA)을 생성할 수 있으며, BA의 과도한 섭취는 인체에 위해를 초래할 수 있음

○ EFSA(EFSA, 2011)는 식품 안전과 관련하여 관리가 필요한 주요 BA로 histamine, tyramine, cadaverine, putrescine 등을 제시하고 있으며, phenylethylamine 및 tryptamine에 대한 자료는 상대적으로 제한적인 것으로 보고함.[23)]

○ GRAS 사례에서도 4가지 BA(histamine, tyramine, putrescine, cadaverine)에 대한 HPLC 분석을 수행한 사례가 다수 존재함[24)]

○ BA 분석은 국제 표준화된 단일 시험법은 없으나, 다양한 학술 문헌 기반 분석법이 보고되어 있음[25)]

○ 본 항목에서 제시하는 분석법은 예시이며, 다른 농도 및 방법을 사용하는 경우에는 분석 절차와 판정 기준을 상세히 기술하고 관련 reference를 함께 제출해야 함

① 배지 기반 생체 아민 생성 평가 (Plate 평가법)

1) 생체 아민 전구체 포함 배지 제작

① 다음 조성으로 기본 배지를 준비한 후, 121℃에서 15분간 autoclave하여 멸균함. 멸균 후 배지는 온열 수조 내에서 40~50°C로 조정

Contents (예시, Bover-Cid and Holzapfel 배지)

- 0.5% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% meat extract, 0.25% sodium chloride, 0.05% glucose, 0.1% tween 80, 0.02% MgSO4, 0.005% MnSO4, 0.004% FeSO4, 0.2% ammonium citrate, 0.001% thiamine, 0.2% K2PO4, 0.01% CaCO3, 0.005% pyridoxal-5-phosphate, 1.0% amino acid, 0.006% bromocresol purple, 2% agar, pH 5.3

② 배지를 20 ml씩 분주 후 실온에서 고형화함

- 각 시험균주의 고유 특성을 반영하여 해당 균주에 최적화된 분석법 적용이 필요하므로, 균주별 특성에 맞게 개발된 학계 보고 배지 활용을 권장함
- 예시) Bover-Cid and Holzapfel[26)], Choudhury et al.[27)], Joosten and Northold[28)],

23) Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, 2011, EFSA Panel on Biological Hazards
24) GRAS notice 937/946/952/953, 2021/2021/2021/2021, FDA
25) Amino acid decarboxylation by Lactoacillus curvatus CTC273 affected by the pH and glucose availability, 2008, Food microbiol.
26) Bover-Cid, Sara, and Wilhelm Heinrich Holzapfel. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. International journal of food microbiology 53.1. 1999.
27) Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W. P., & Holzapfel, W. H. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. Letters in Applied Microbiology, 11(6), 278-281. 1990.

Maijala[29], Moller[30], Niven et al.[31], Chang, M. and Chang, H. C.[32]

2) 시험 균주 준비

① 균주 별 배양 조건에 따라, 생체 아민 전구체가 포함된 액체 배지에서 3~5일간 전배양함

3) 균주 접종

① 전구체 포함된 배지에 균주를 spot-inoculation하거나 streaking 방식으로 접종함

② 접종 후, 37°C에서 혐기 또는 호기 조건에서 24~48시간 배양 후 확인함

4) 생체아민 생성 배지법 판단 기준

① **<그림 23>**와 같이 집락 주위로 보라색이 나타나면 Biogenic amine 생성 가능성 균주로 판정

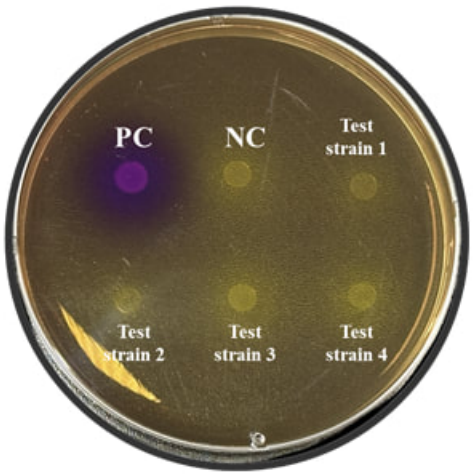


그림 23. Biogenic amine 평가 결과 예시

28) Joosten HMLJ, Northolt MD. Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. Appl Environ Microbiol 55. 1989

29) Maijala, R. L. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. Letters in Applied Microbiology, 17(1), 40-43. 1993.

30) Møller, V. Distribution of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae 1. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 35(3), 259-277. 1954.

31) Niven Jr, C. F., Jeffrey, M. B., & Corlett Jr, D. A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 41(1), 321-322. 1981.

32) Chang, M., & Chang, H. C. Development of a screening method for biogenic amine producing Bacillus spp. International Journal of Food Microbiology, 153(3), 269-274. 2012.

※ 참고사항
- 대조군 설정은 다음과 같은 예시를 적용할 수 있음
- 양성대조군: Biogenic amine을 생성할 수 있는 *Escherichia coli* ATCC 25922 등
- 음성대조군: Biogenic amine을 생성하지 않는 *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 등

※ 배지법은 위음성 결과의 가능성을 고려해야하며, 다른 방법과 병행하여 사용하는 것을 권장

② 생체 아민 생성 유전자 기반 평가

○ 배지 기반 생체 아민 생성 평가 (Plate 평가법) 결과 판정 시 위음성 감별 목적으로 생체 아민 생성과 연관된 decarboxylase 유전자의 존재 여부 확인을 목적으로 함

○ 유전자 기반 평가 시, 확인해야할 주요 표적 유전자는 다음과 같음 (예시):

- *hdcA* (histidine decarboxylase): histamine 생성 관련 유전자
- *tyrDC* 또는 *tdc* (tyrosine decarboxylase): tyramine 생성 관련 유전자
- *odc* (ornithine decarboxylase): putrescine 생성 관련 유전자
- *ldc* (lysine decarboxylase): cadaverine 생성 관련 유전자

③ HPLC 분석

1) 시험 균주 준비

① 균주 별 배양 조건에 따라, 생체 아민 전구체가 포함된 액체 배지에서 3~5일간 전배양함

② 생체아민의 전구체 아미노산인 L-histidine, L-tyrosine, L-lysine, L-ornithine의 최종 농도 1% (w/v)를 보충한 배지에서 균을 3~5일간 전배양함

- 아미노산의 농도는 적용될 최종 제품에 따라 달라질 수 있음

2) 시료 전처리

① 시료 5 g을 취한 후 0.1 N HCl을 25 ml 가하여 균질화함

② 균질화된 시료를 4,000 x g, 4℃, 15 min 조건에서 원심분리한 후 상등액을 회수함

3) 유도체화(derivatization)

① 상등액 1 ml, Na_2CO_3 0.5 ml, 1% dansyl chloride 용액 0.8 ml를 혼합함

② 용기를 밀봉하고 45℃에서 1시간 반응시켜 유도체화를 진행함

4) 추출 및 정제

① 10% proline 용액 0.5 mL와 diethyle ether 5 mL를 첨가한 후 10분간 진탕함

② 상층 유기용매(에테르층)를 취한 후 질소 농축함

③ 잔류물에 acetonitrile 1 mL를 가하여 재용해한 후 0.25 um 필터로 여과함

5) HPLC 분석

① 여과된 시료를 HPLC에 주입하여 정량함

※ 칼럼 조건, 이동상 조성 및 검출 파장은 사용하는 장비와 분석 조건에 따라 기술해야 함

6) Biogenic amine 생성 판정 기준 <그림 24>

① 식경험이 있는 균주

- Plate 양성/유전자 양성 → HPLC 분석을 통한 정량화, 과다 섭취 않도록 주의 권고
- Plate 양성/유전자 음성 → HPLC 분석을 통한 정량화, 과다 섭취 않도록 주의 권고
- Plate 음성/유전자 양성 → HPLC 분석을 통한 정량화, 과다 섭취 않도록 주의 권고
  (두 평가법 중 하나라도 양성일 경우, HPLC 분석·과다섭취 주의 권고·사용 가능)
- Plate 음성/유전자 음성 → 사용 가능

② 식경험이 없는 균주 : HPLC 분석 의무

- 양성 → 최종 식품 제품 속 biogenic amine이 독성을 가질 수 있으므로 과다 섭취 않도록 주의 권고 필요, 독성을 나타내지 않는 근거를 제시할 경우 사용 가능
- 음성 → 사용 가능



그림 24. Biogenic amine 생성 평가 판단 기준

3-5. 항균 활성 평가

○ EFSA, FAO/WHO(JECFA)는 항균활성을 식별하기 위한 가이드라인을 제시하였음[33)34)]

○ 항균물질 생성 평가는 원료 균주 배양 상층액이 참조 균주의 생장을 억제하는지 여부로 평가함

○ 참조 균주란 넓은 범위의 항균 물질에 의해 생장이 억제되는 것으로 알려진 균주로, EFSA는 아래와 같은 참조균주를 제시함

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

○ 참조 균주의 생장 억제가 관찰될 시 생장 억제 물질을 식별해야 함

○ 항균물질 생성이 확인된 경우 최종 제품에 포함되지 않음을 증명해야 함

1) 배지 준비

① 다음과 같은 조성으로 배지를 만든 후 autoclave 후 온열수조내에서 40~50°C로 조정
- EFSA는 Mueller-Hinton Agar 제시, FAO/WHO(JECFA)는 Tryptic Soy Agar 제시

○ Mueller-Hinton Agar (MHA) 배지 조성 (1,000 ml 기준):

- Beef, dehydrated infusion from 3.0 g
  Casein hydrolysate 17.5 g
  Soluble starch 1.5 g
  Agar 15 g
  Distilled water 1,000 ml

○ Tryptic Soy Agar(TSA) 배지 조성 (1,000 ml 기준):

- Pancreatic digest of casein 15.0 g
  Peptic digest of soybean 5.0 g
  Sodium Chloride 5.0 g
  Agar 15 g
  Distilled water 1,000 ml

② Petri dish에 준비한 배지 15ml를 분주 후 실온에서 고형화함

③ Base agar에 사용한 동일한 배지로 Overlay 0.75%(w/v) Soft agar를 준비함

④ Soft agar에 참조 균주 1%(v/v)를 접종하여 최종 농도를 1 x 10^7로 맞추어 base agar 위에 10ml 분주함

---

33) Combined compendium of food additive specifications Vol. 4. Analytical methods, test procedures and laboratory solution used by and referenced in the food additive specifications. 2006, JECFA

34) Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms, 2018, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed

⑤ 멸균된 도구나 팁을 이용하여 6mm 원형의 구멍을 뚫음

2) 참조 균주 준비

① 참조 균주들을 Mueller-Hinton Agar (MHA) 또는 Tryptic Soy Agar(TSA) 배지에 24~48시간 배양 후 0.5 McFarland(=1-2x10^8CFU/ml) 농도로 조정[35]

3) 시험 균주 준비

① 시험 균주는 균주 별 적절한 배지와 환경에서 24-48시간 배양함

② 배양후 Test 균주 배양액을 10,000 x g(RCF)에서 10분간 원심분리 하여 상층액 분리[36]

③ 원심분리한 Test 균주 상층액을 필터(0.2ul)로 여과하여 cell free supernatant(CFS) 확보함

④ 확보한 CFS의 유기산 검정을 위해 1N NaOH로 pH6.5로 조정[37]

4) CFS 접종

① Well에 확보한 시험 균주 상층액(CFS)를 0.1ml 분주함

② 37℃에서 24시간 호기배양함

5) 항균 활성 판정 기준 <그림 25>

① 항균 활성이 확인되지 않으면 사용 가능

① 하나 이상의 참조 균주에서 생장 억제가 관찰되면 양성으로 판정하고 억제 물질을 식별해야 함

○ 억제 물질 식별 방법

- 배양 상층액에 단백분해 효소 처리 후 확인을 통해 단백질성 항균물질 확인
- pH 조정(pH 6.5~7.0) 후 확인을 통해 유기산 확인
- LC-MS, HPLC, MALDI-TOF 등의 분석을 통한 물질 동정

② 식별된 억제 물질에 따른 판정

○ WHO CIA/HIA 목록에 포함된 의약용 항생제 또는 약리적 항생제 수준의 작용을 유도하거나 유발 가능성을 확인된 경우

- 최종 제품에 해당 물질이 포함되어 있지 않음을 증명, 포함된 경우 사용 불가

③ 유기산, 박테리오신 등 박테리아 생성 천연 항균물질로 식별된 경우 사용 가능

35) EUCAST, "Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method", Version 13.0, 2025,

36) Davoodabadi, A., Dallal, M. M. S., Foroushani, A. R., Douraghi, M., & Harati, F. A. (2015). Antibacterial activity of Lactobacillus spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. Anaerobe, 34, 53-58.

37) Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. BioMed research international, 2014(1), 927268.

판단 기준

1 항균 활성 기준 판정

① Disk/well 주위로 균의 생장이 억제된 양상이 하나 이상의 종에서 관찰되면 양성으로 판정하고 억제 물질을 식별해야 함

② 항균물질이 약리적 수준의 작용을 유도하거나 내성 유발 가능성이 있다고 판단되면 최종 제품에 해당 물질이 포함되지 않음을 확인해야됨

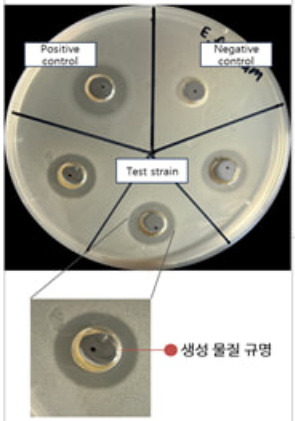
평가 결과 사진 예시	판단 기준
	**사용 가능** ❖ 음성의 경우, 사용 가능 ❖ 최종 제품에 해당 물질이 포함되어 있지 않은 경우 ❖ 비특이적 요인으로 판단되는 경우, 안전성 입증을 위한 추가자료 제시 후 사용 가능 (pH, H_2O_2 등의 요인)
	사용 불가 ❖ 생성 물질이 약리적 수준의 작용을 유도하거나 내성 유발 가능성이 있을 경우 ❖ 최종 제품에 해당 물질이 포함된 경우

그림 25. 항균 활성 평가 판단 기준

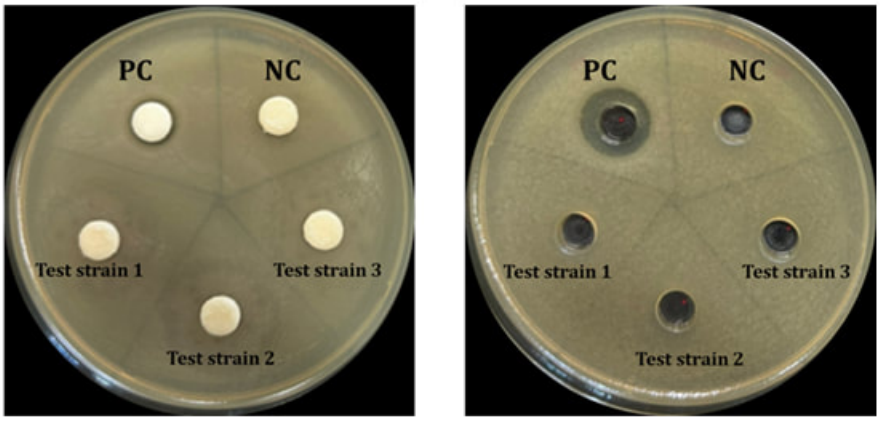


그림 26. Disk 및 Well 항균 활성 평가 결과 예시

Ⅳ 독성평가 항목

❍ 독성시험은 우수실험실운영규정(Good Laboratory Practice, GLP)에 따라 운영되는 기관에서 실시하여야 하고, OECD에서 정하고 있는 독성시험방법(OECD Test Guideline, OECD TG)에 준하여 시험한 보고서 형태여야 함
* 국내에는 독성시험을 진행해주는 대행업체가 다수 있음

❍ 독성시험자료는 단회투여 독성시험(설치류, 비설치류), 90일 반복투여 독성시험(설치류), 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 소핵시험)을 기본으로 제출해야 함
* 필요한 경우 기타 독성시험 자료에 대한 추가적인 요청이 있을 수 있음

❍ 독성평가 적용 대상은 다음과 같음

- 미생물의 종이 명확히 확인되지 않거나, 안전성이 과학적으로 입증되지 않은 경우
- 생산 과정 중 유전적 변형 또는 위해 가능성이 있는 부산물이 생성될 우려가 있는 경우
- 기존 섭취 이력이나 독성 관련 정보가 부족하여 안전성을 판단하기 어려운 경우

❍ 아래에 해당하는 경우에는 독성시험자료가 면제될 수 있으며 다만 안전성이 확보되지 않은 경우에는 추가로 독성시험 자료 등을 요청할 수 있음

- 미국 FDA GRAS(Generally Recognized As Safe)에 등재된 식품원료(식이 보충제, 특수의료용제품 및 식품첨가물은 제외)
  ※ 단, GRAS self-affirmation(전문가에게 안전성을 확인받는 경우) 제외
- 유럽연합, EFSA Novel food에 등재된 식품원료(식이보충제, 특수의료용제품 및 식품첨가물은 제외
- 호주/뉴질랜드, FSANZ의Novel food에 등재된 식품원료(식이보충제, 특수의료용제품 및 식품첨가물은 제외)
- 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC)에 등재된 식품원료

4-1. 단회투여 독성 시험

○ 단회투여 독성 시험은 반수치사량(LD_{50}) 값을 측정하기 위한 시험으로, 개략적인 치사량 또는 급성 독성 증상을 관찰하기 위한 시험임

○ OECD TG 425에 따른 단회투여 독성 시험 자료를 제출해야 함

가. 평가 방법

○ OECD TG 425에 따르면 독성이 없을 것으로 예상되는 물질의 경우 한계 시험(Limit test)를 권장하고 있음 **<그림 27>**

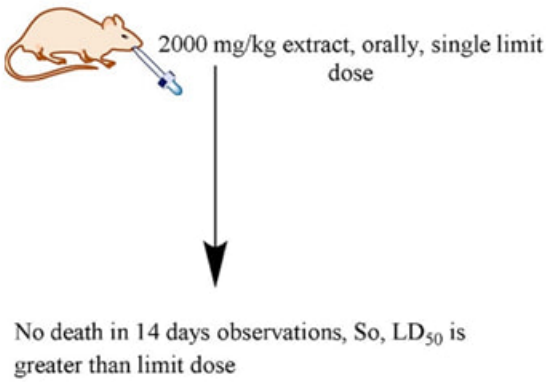


그림 27. 단회투여 독성 시험 – 한계 시험

○ 생균제 또는 사균체를 쓰는 경우 투여량의 단위를 mg 대신 CFU 단위를 사용하여 최대 용량을 적절히 설정한 뒤(예: $5*10^{10}$ CFU/kg bw/d 등) 한계 시험을 수행할 수 있음

○ 한계 시험은 5마리의 동물에 최대 용량(~2,000 mg/kg bw/d)을 투여하여 LD_{50}값이 최대 용량 이상인지 테스트하는 시험임

○ 한계 시험에서 통과하지 못할 경우 본 시험(Main test)를 통해 LD_{50} 값을 측정해야 함

○ 투여 방법은 식품 원료의 특성 상 위관 투여법을 권장함

나. 판정 방법

○ 섭취 후 2주의 기간동안 매일 관찰하고, 사망 여부를 통해 치사량을 확인함

○ 단회투여 독성 시험 후 보고 내용에는 자세한 실험 조건과 함께 다음과 같은 내용이 포함되어야 함 (자세한 항목은 OECD TG 425 참조)

- 체중 측정 기록
- 개략의 치사량

- 독성 징후 및 독성 징후가 나타나는 시간 경과
- 관칠기간 종료 후 육안적 해부소견
- (필요시) 육안적 이상소견이 관찰된 장기·조직에 대한 병리조직학적 검사

○ 단회투여 독성 시험을 통해 90일 반복투여 독성시험에 적합한 용량을 선정하는 근거 제공

4-2. 90일 반복투여 독성시험

○ 90일 반복투여 독성시험은 최대무독성량(NOAEL) 값을 측정하기 위한 시험으로, 각각의 그룹에 서로 다른 용량을 만성적으로 노출시켜 만성 노출에 대한 안전 기준을 설정하기 위한 시험임

○ 14일 아급성 독성시험(단회투여 독성시험)을 통해 90일 반복투여(아만성) 독성시험에서 사용할 적절한 용량을 선정함

○ OECD TG 408에 따른 90일 반복투여 독성시험 자료를 제출해야 함 **<그림 28>**

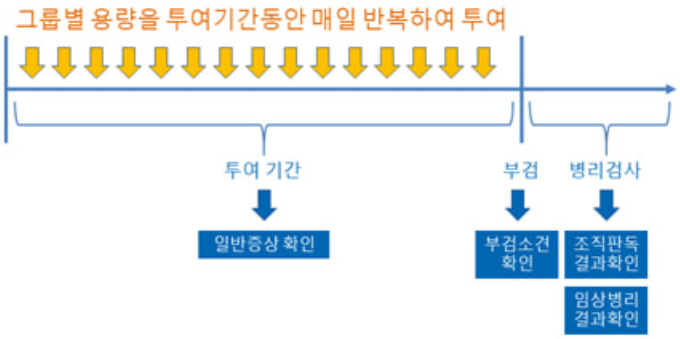


그림 28. 90일 반복투여 독성시험 과정

가. 평가 방법

○ 효율적인 평가를 위해 Tier 접근법으로 반복투여 독성평가를 진행함 **<그림 29>**

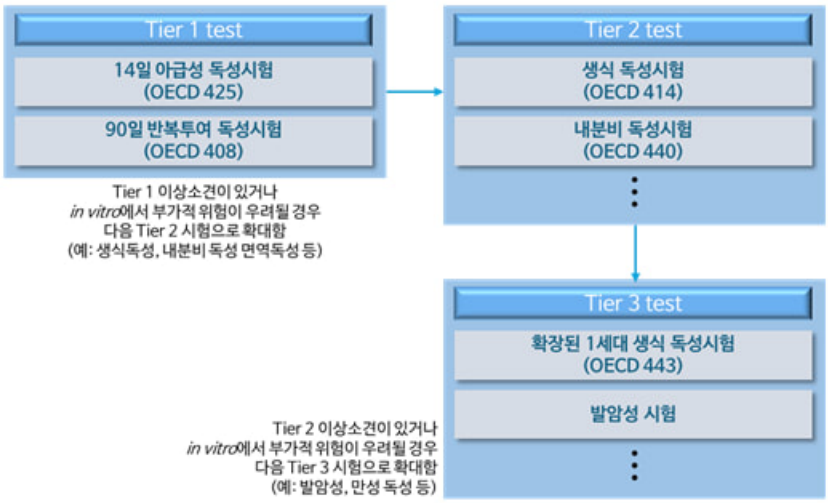


그림 29. Tier 접근법 기반 반복투여 독성시험 개요

○ 선호되는 종은 rat이나 mouse도 사용 가능함

❍ 일반적으로는 서로 다른 3가지 용량을 사용하나, 최소 1,000 mg/kg body weight/day에 해당하는 단일 용량 수준의 데이터에서 독성이 예상되지 않는 경우 최대 용량의 한계 시험(limit test)를 적용하는 것으로 간주하여 해당 데이터만 제출하여도 충분함

❍ 단회투여 독성시험에서 측정한 LD_{50}값을 활용하여 CFU 단위로 적절히 변환하여 NOAEL 값을 측정할 수 있음 (예 : $1*10^{10}$ CFU/kg bw/d, $3*10^{10}$ CFU/kg bw/d, $5*10^{10}$ CFU/kg bw/d 등)

❍ OECD 가이드라인에 따르면 용량별로 최소 20마리(암수 각 10마리)의 동물을 사용하여 독성을 나타내지 않는 최대무독성량(NOAEL) 값을 측정해야 함

나. 판정 방법

❍ 통계적 유의성과 용량 의존성, 생물학적 및 병리학적 의미를 종합적으로 고려하여 독성 여부를 판정함

❍ 변동이 있더라도 생리학적 범위 내이거나 무해하다고 판단되면 독성으로 간주하지 않음

※ 참고 사항

❍ Tier I 이상소견이 있거나 *in vitro*에서 부가적 위험이 우려될 경우 다음 Tier II 시험으로 확대됨(예: 생식독성, 내분비 독성 면역독성 등)

4-3. 유전 독성 시험[38]

○ 유전독성 시험은 인간에게 유전적 손상을 유발하여 발암 및 후속 세대로 이어지는 돌연변이 문제를 일으킬 수 있는 가능성을 평가하는 시험임

○ 장기적인 섭취를 고려하여 인체에 발암 및 후속 세대로 이어지는 돌연변이 등 유전적 손상을 유발할 수 있기 때문에 유전독성평가를 진행해야 함

○ EFSA에서는 보다 효율적인 식품첨가물의 독성 시험이 이루어질 수 있도록 독성 시험에 대한 Tier 접근법을 사용하고 있음[39]

○ Tier 접근법은 상대적으로 분석이 쉬운 Tier 1 test에서 안전성이 판정되지 않은 경우에 *in vivo* 기반의 Tier 2 test를 진행할 것을 권고하고 있음 **<그림 30>**

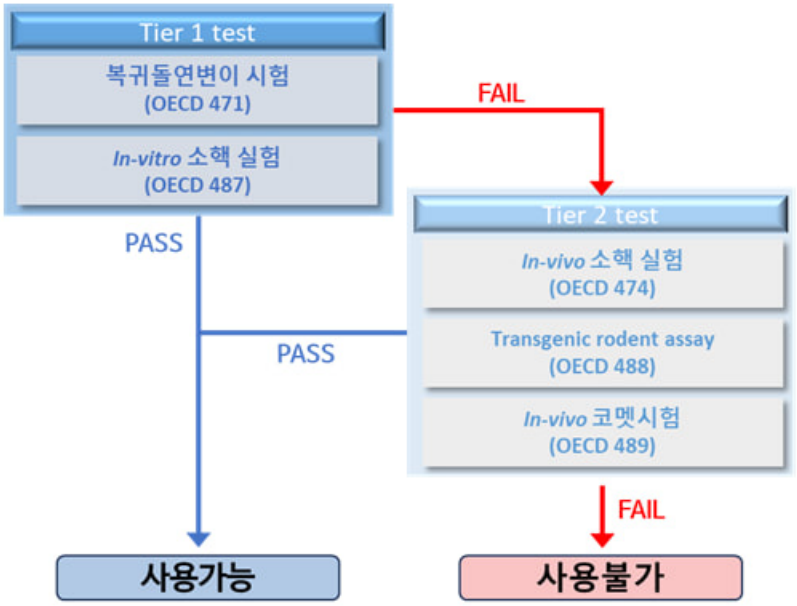


그림 30. 유전독성 시험 Tier test 접근법

○ **평가 방법**

- 효율적인 평가를 위해 Tier 접근법으로 반복투여 독성평가를 진행함
- **[Tier 1]** 복귀돌연변이시험 OECD TG 471, *in vitro* 소핵시험 OECD TG 487
- **[Tier 2]** *in vivo* 소핵시험 OECD TG 474, Transgenic rodent assay OECD TG 488, *in vivo* 코멧시험 OECD TG 489

38) Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment, 2011, EFSA Scientific committee

39) Guidance for submission for food additive evaluations, 2012, EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food

가. 복귀돌연변이 시험(Bacterial reverse mutation test)

○ OECD TG 471은 Ames test를 기반으로 한 복귀돌연변이 시험 방법으로 유전독성을 평가하기 위한 표준 방법이며, *Salmonella typhimurium*과 *Escherichia coli*를 포함한 균주를 사용하여 실시해야 함[40)41)]

○ 본 시험에서는 최소 5개의 균주를 사용하여 유전적 손상을 평가하며, 필요한 균주는 <표 10>와 같음

표 10. 복귀돌연변이 시험에 사용되는 균주 목록

최소 5개 균주에서 실시
1. *Salmonella typhimurium* TA1535
2. *Salmonella typhimurium* TA1537, or TA97, or TA97a
3. *Salmonella typhimurium* TA98
4. *Salmonella typhimurium* TA100
5. *Escherichia coli* WP2 uvrA, or *Escherichia coli* WP2 uvrA (pKM101), or *Salmonella typhimurium* TA102

○ 복귀돌연변이 시험 균주는 히스티딘 생합성 효소계를 조절하는 DNA상의 다른 위치에 Base-pair substitution type으로 변형된 균주와 frame-shift type으로 변형된 균주 (TA98, TA1537, TA1538, TA97a 등)를 사용함

○ 시험에 사용되는 균주는 반드시 genotypes (*Histidine requirement, rfa mutation, uvrB mutation, R-factor* 등)이 검증된 균주이어야 하며, 이를 통해 정확한 시험 결과를 얻을 수 있음

○ 유전독성 시험의 결과는 실험의 신뢰성을 보장하기 위해 반드시 positive 및 negative control을 사용하여 평가해야 하며, 각 균주에 대한 positive control 물질은 **<표 11>**와 같음

표 11. 균주별 대사활성계 적용/비적용에 따른 양성대조군의 예시

S9	Strain	Positive control	CAS No.
Not applied	TA1535, TA100	Sodium azide	CAS no. 26628-22-8
	TA98	2-Nitrofluorene	CAS no. 607-57-8
	TA1537, TA97, TA97a	9-Aminoacridine or ICR191	CAS no. 90-45-9 or CAS no. 17070-45-0
	TA102	Cumene hydroperoxide	CAS no. 80-15-9
	WP2 uvrA, TA102	Mitomycin C	CAS no. 50-07-7
	WP2, WP2 uvrA, WP2 uvrA (pKM101)	N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline 1-oxide	CAS no. 4245-77-6 or CAS no. 70-25-7 or CAS no. 56-57-5
	plasmid-containing strains	Furylfuramide (AF-2)	CAS no. 3688-53-7

40) OECD guideline for the testing of chemicals 471. Bacterial Reverse MutationTest. 2020.

41) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 1983 May;113(3-4):173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.

Applied	9,10-Dimethylanthracene	CAS no. 781-43-1
	7,12-Dimethylbenzanthracene	CAS no. 57-97-6
	Congo Red (for the reductive metabolic activation method)	CAS no. 573-58-0
	Benzo(a)pyrene	CAS no. 50-32-8
	Cyclophosphamide (monohydrate)	CAS no. 50-18-0 (CAS no. 6055-19-2)
	2-Aminoanthracene	CAS no. 613-13-8

1) 복귀돌연변이 균주 샘플 준비

① 다음과 같은 조성의 배지(Oxoid nutrient broth No. 2)에서 복귀돌연변이 균주를 37°C, shaking조건으로 배양

- `Lab-Lemco' powder 10.0 g
- Peptone 10.0 g
- NaCl 5.0 g
- Distilled water 1,000 ml

② 1~2x10^9 CFU/ml의 복귀돌연변이 균주를 사용 전까지 ice bath에 보관

※ 참고사항

- 복귀돌연변이 균주는 genotypes가 검증된 최소한 아래 열거한 5개의 균주를 사용해야함

(1) *S. typhimurium* TA98

(2) *S. typhimurium* TA100

(3) *S. typhimurium* TA1535

(4) *S. typhimurium* TA1537 또는 TA97, TA97a 중 1개

(5) *S. typhimurium* TA102 또는 *E. coli* WP2 uvrA, *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) 중 1개

- 복귀돌연변이 균주는 후기 지수기나 초기 정체기의 fresh한 1x10^9 CFU/ml 이어야 함

2) Test 균주 샘플 준비[42)43)]

① 시험 균주를 해당 균주의 적합한 액체배지에 배양하여 1x10^9 CFU/ml로 준비

② 3,075 g에서 10분간 원심분리 후, 상층액을 0.22 μm filter를 사용하여 여과한 뒤 상층액 샘플 확보

③ 상층액이 제거된 pellet은 phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)에 2번 세척 진행

④ 멸균 distilled water에 1x10^9 CFU/ml에 맞게 resuspending 후 lysate 진행하여 lysate 샘플 확보

⑤ 확보한 샘플들을 5단계의 half-log 배수로 PBS에 희석하여 제조

42) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 1983 May;113(3-4):173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.

43) Jeya, K.R., Khalifa, A., Veerapagu, M., Sankaranarayanan, A. (2022). Assessment of Mutagenicity. In: Dwivedi, M.K., Amaresan, N., Sankaranarayanan, A., Begum, R. (eds) Biosafety Assessment of Probiotic Potential. Methods and Protocols in Food Science . Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2509-5_21

※ 참고사항
- Test 균주는 후기 지수기나 초기 정체기의 fresh한 $1x10^9$ CFU/ml 이어야 함

(3) 시험 배지 및 시약 준비

① Petri dish에 Minimal glucose agar 배지를 25ml 분주하여 준비
Minimal glucose agar (base agar) 조성:

- Agar 15.0 g
- 50X Vogel-Bonner Medium E 20ml
- 40% glucose 50 ml
- Distilled water 930 ml

② 각 petri dish 당 2ml의 top agar 준비 후 온열 수조 내에서 45°C로 조정하여 준비
Top agar 조성:

- Agar 6.0 g
- NaCl 5.0 g
- Distilled water 1000 ml
- 0.5 mM histidine/biotin solution 100 ml

③ 대사활성계 시험 수행을 위한 S9 mix 제작
S9 Mix 조성:

- S9 SD Phenobarbital/Benzoflavone (PB/BNF) KCl 5 ml
- MgC12-KC1 salts 1.0 ml
- 1 M glucose-6-phosphate 0.25 ml
- 0.1 M NADP 2.0 ml
- 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 25.0 ml
- Distilled water 16.75 ml

※ 참고사항
- S9 mix의 경우 시험 당일 제작하며, 사용 전까지 ice bath에서 보관해야 하며, top agar를 minimal glucose agar에 도포하기 직전, S9 mix를 top agar에 첨가하여 시험 수행

4) 시험 수행

① 각 농도 당 3개의 플레이트를 사용
② Top agar 2ml에 준비된 0.1 ml의 복귀돌연변이 균주 배양액 0.1 ml의 시험물질 용액(시험균주 용액(supernatant, or cell lysate), or positive control, or negative control(distilled water, or DMSO)를 첨가)
③ 대사활성계 포함의 경우 S9 mix 0.5ml, 대사활성계 비포함의 경우 phosphate buffer

(0.2M, pH 7.4) 0.5ml 첨가

④ 낮은 속도로 3초간 voltexing 후 minimal glucose agar에 도포

⑤ 15-20분 간 굳힌 후 plate를 뒤집은 채 37℃ 48시간 배양

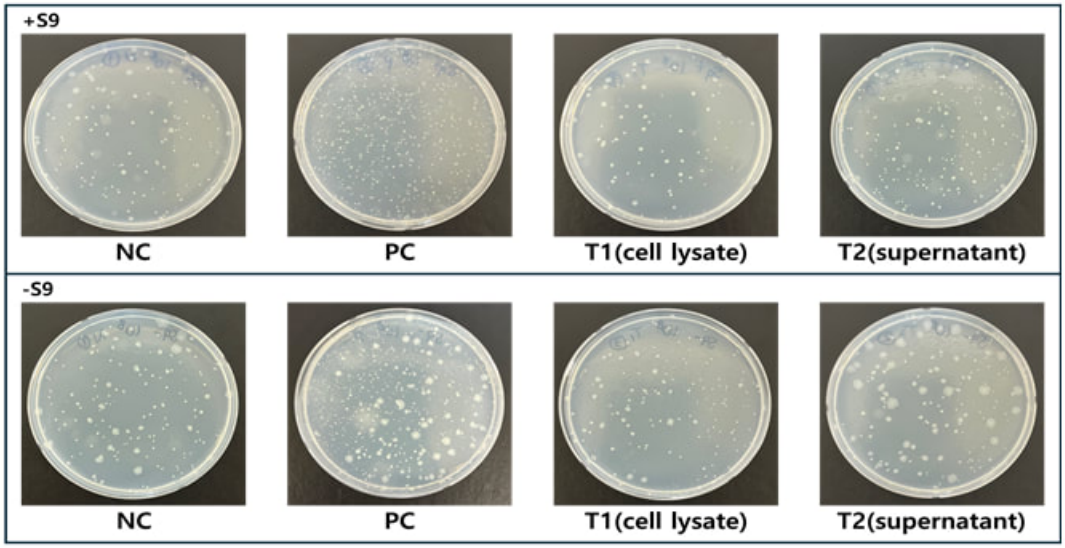


그림 31. 복귀돌연변이 시험 예시

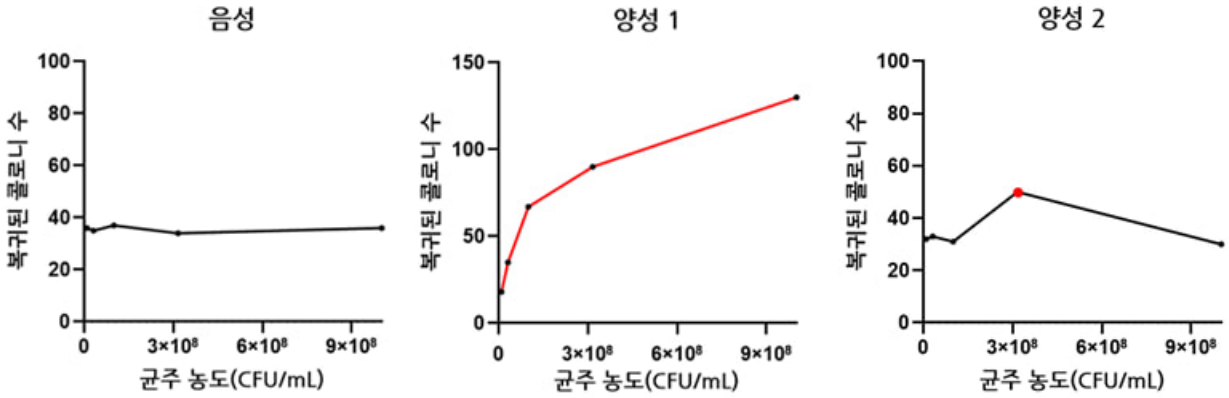


그림 32. 복귀돌연변이 판정 기준 예시

5) 박테리아 돌연변이 유전독성 판정 기준

① 양성 판정 시 결과가 **생물학적으로 타당한지 고려**하는 것이 가장 중요하며 통계학적 분석을 결과 판정의 보조 수단으로 활용 가능

양성 1. 대사 활성 시스템 유무와 관계없이 적어도 1개의 균주에서, 플레이트당 복귀된 콜로니 수가 **농도 의존적인 증가**를 보이는 경우

양성 2. 대사 활성 시스템 유무와 관계없이 적어도 1개의 균주에서, 적어도 1개의 농도에서 **재현성 있는 증가**를 보이는 경우

② **양성일 경우, Tier 2에 따른 추가적인 in-vivo(OECD 474, 488, 489) 시험이 필요함**

③ 시험 결과에는 플레이트당 복귀된 콜로니 수의 평균과 표준편차를 제시해야 함

나. 소핵 시험(*In vitro* mammalian cell micronucleus test; MNvit test)

○ OECD 487(*In vitro* Mammalian cell micronucleus Test)을 기반으로 한 소핵시험 방법으로 유전독성을 평가하기 위한 표준 방법이며, 인체나 설치류 유래 세포주 또는 일차세포를 사용하여 실시해야 함.[44)]

○ 소핵이란 세포가 분열할 때, DNA 손상 혹은 염색체 분리 이상으로 기존 핵으로부터 분리된 작은 구조물로, 소핵 시험은 세포질에서 소핵을 검출하기위한 시험임

○ 본 시험에서는 포유류 배양세포를 이용하여 체외 소핵시험을 평가하며, 제시하는 배양세포는 <표 12>과 같음

표 12. 유전독성 시험(MNvit) 권장 세포유형

Cell lines	CHO, V79, CHL/IU : 설치류 세포주(Rodent cell lines) TK6: 인간 세포주(Human cell line)
Primary cell	사람 또는 기타 포유류의 말초혈 림프구

*HT29, Caco-2, HepaRG, HepG2, A549 및 Syrian hamster 배아 1차 세포는 MNvit 시험에 사용된 바 있으나, 검증이 충분하지 않음. 사용 시 수용기준에 따른 성능 자료로 타당성을 입증해야 함

○ 시험에 사용되는 배양세포는 시험물질에 노출 중이거나 노출 후 세포증식 기간에 유사분열을 완료한 세포에 대해서만 소핵 계수가 필요함. 따라서 분열이 확실한 이핵세포에서 소핵을 분석하여 정확한 시험결과를 얻을 수 있음

○ 본 시험법은 액틴의 중합을 억제하는 Cytochalasin B(CytoB)를 사용하는 조건과 사용하지 않는 조건의 시험이 모두 가능하며, 유사분열 전에 CytoB를 첨가하면 두 개의 핵을 가지는 이핵세포가 생기기 때문에 분열을 한번 완료한 세포만을 대상으로 소핵을 확인 및 분석할 수 있음

○ 일반적인 소핵시험은 <표 13>의 3가지 노출 조건을 모두 사용하여 실험을 수행하고, 처리 일정은 시험 물질의 안정성, 반응성, 세포 성장 특성에 따라 수정될 수 있으며, 그 경우 적당한 근거가 제시되어야 함

44)OECD. (2023). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test.* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

표 13. MNvit 시험의 세포 처리 및 수확 시간

CytoB 처리한 림프구, 1차 세포 및 세포주	1. S9(+) 단기 처리
	1) S9 존재 하에 3–6시간 처리 2) S9 및 처리 배지를 제거 3) 신선한 배지와 CytoB를 첨가 4) 처리 시작 시점으로부터 정상 세포주기 길이의 1.5–2.0배 경과 후 수확
	2. S9(-) 단기 처리
	1) 3–6시간 처리 2) 처리 배지를 제거 3) 신선한 배지와 CytoB를 첨가 4) 처리 시작 시점으로부터 정상 세포주기 길이의 1.5–2.0배 경과 후 수확
	3. S9(-) 장기 처리
	1) CytoB 존재 하에 정상 세포주기 길이의 1.5–2.0배 동안 처리 2) 처리 종료 시점에 수확
CytoB 미처리 세포주 CytoB를 첨가하지 않는다는 점을 제외하고, 상기 처리 일정과 동일하게 적용	

1) 배양세포 준비

① <표 12>을 참고한 세포를 각 유형의 최적 성장, 소핵의 빈도 등 소핵시험의 고려사항을 참고하여 확인한 배양세포를 적정량 seeding 진행 후 24시간[45] 37°C, 5% CO2 incubator에서 배양함

※ 참고사항
- 처리개시부터 세포수확까지 세포주기의 1.5–2.0배를 고려하여 배양 세포는 수확 시점 시 70-80% confluence를 권장함[46]
특히 일차 배양세포의 경우, 세포분열을 촉진시켜 세포주기를 시작하기 때문에 세포분열촉진제를 처리한 후 44-48시간 후에 시험 물질을 처리하는 것이 효율적임

45) Della Torre, A., Albuquerque, L. B. L., Farrapo, N. M., Oshima-Franco, Y., dos Santos, M. G., Tavares, R. V. S., Rodas, A. C. D., Dal Belo, C. A., Cardoso, C. R. P., Varanda, E. A., Groppo, F. C., & Lopes, P. S. (2011). *Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant Plathymenia reticulata Benth.Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 17*(2), 190–198.

46) Shi, J., Bezabhie, R., & Szkudlinska, A. (2010). Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. Mutagenesis, 25(1), 33-40.

2) Test 균주 샘플 준비[47]

① 시험 균주를 해당 균주의 적합한 액체배지에 배양하여 $1x10^9$ CFU/mL로 준비함

② 5,000rpm에서 15분간 원심분리 후, 상층액을 0.22 μm filter를 사용하여 filtering 진행하고 상층액 샘플을 확보하여 바로 사용 또는 동결 건조하여[48] 사용함

③ 상층액이 제거된 pellet은 phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)에 2번 세척 진행함

④ 멸균 distilled water에 $1x10^9$ CFU/mL에 맞게 resuspending 후 lysate 진행하여 lysate 샘플을 확보함

⑤ 확보한 샘플들을 3가지의 농도로 PBS에 희석하여 제조함

※ 참고사항

○ Test 균주의 최대 농도는 음성대조군과 비교하여 세포독성 55±5%의 농도를 권장함
- CytoB를 사용할 경우, 세포분열 억제증식 지수(CBPI) 또는 복제지수(RI)를 산출하여 55±5%의 세포독성을 나타내는 농도를 최대 농도로 선정함
- CytoB를 사용하지 않을 경우, 상대 세포수 증가율(RICC) 또는 상대 세포집단 배가율(RPD)를 산출하여 55±5%의 세포독성을 나타내는 농도를 최대 농도로 선정함

○ Test 균주의 세포독성이 나타나지 않는 경우, 탁도 및 침전물의 유무에 따라 최대농도를 선정함
- 탁도 및 침전물을 관찰될 경우[49], 그 중 가장 낮은 농도를 최대농도로 선정
- 탁도 및 침전물이 관찰되지 않은 경우[50][51], 2mg/mL 또는 2μL/mL 중 가장 낮은 농도를 최대농도를 선정

3) 대조군 시약 준비

① 소핵 시험의 결과는 실험의 신뢰성을 보장하기 위해 반드시 positive 및 negative control을 사용하여 평가해야 하며, positive control에 대한 물질은 **<표 14>**와 같음

47) EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D, Bohn T, Castenmiller J, de Henauw S, Hirsch-Ernst KI, et al. Guidance on the scientific requirements for an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Journal. 2024;22(9):e8961.

48) Kang Min Kim, Tae Sung Jung, Seon Ok, Chan Young Ko and Jae Seon Kang. (2012). Evaluation of genotoxicity of Bacillus mojavensis KJS-3 on culture supernatant for use as a probiotic. Molecular & Cellular Toxicology, 8(1), 77-81.

49) Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Brient, A., Phipps, K. R., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2021). *Toxicological safety evaluation of pasteurizedAkkermansia muciniphila. Journal of Applied Toxicology, 41*(2), 276–290.

50) Seegers, J. F. M. L., Gül, I. S., Hofkens, S., Brosel, S., Schreib, G., Brenke, J., Donath, C., & de Vos, W. M. (2022). *Toxicological safety evaluation of liveAnaerobutyricum soehngeniistrain CH106. Journal of Applied Toxicology, 42*(2), 244–257.

51) Fujiishi, Y., Ohyama, W., & Okada, E. (2024). *A study for the genotoxicity assessment of substances containing probiotic candidates in the in vitro TK6 cell micronucleus test: Influence of low pH conditions and antibiotic supplementation on the test results. Genes and Environment, 46*, Article 26.

표 14. MNvit 시험용 실험실 숙련도 및 양성대조 선정을 위한 기준물질 예시

카테고리	기준물질	CAS 등록번호
1. 대사활성화 비필요 염색체 절단유발물질(Clastogens)		
	Methyl metanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Notroquinoline-N-Oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. 대사활성화 필요 염색체 절단유발물질(Clastogens)		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
3. 염색체 비분리유발물질(Aneugens)		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

② 대사활성계 시험 수행을 위한 S9 mix 제작

S9 Mix 조성:

- S9 SD Phenobarbital/Benzoflavone (PB/BNF) KCl 5 ml
- MgC12-KC1 salts 1.0 ml
- 1 M glucose-6-phosphate 0.25 ml
- 0.1 M NADP 2.0 ml
- 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4 25.0 ml
- Distilled water 16.75 ml

※ 참고사항
- S9 mix의 농도는 일반적으로 최종처리 배양액에 1~2%(v/v)을 사용하지만, 경우에 따라 10%(v/v)까지 높일 수 있음.

③ 양성 대조군 시약 준비
- **<표 14>**의 각 조건에 맞는 양성 대조군 시약을 선정하여 세포 독성 한계
- (55±5%)를 초과하지 않도록 적절한 농도를 결정함

④ 음성 대조군의 경우, 세포배양배지 및 양성대조군 및 CytoB의 용매만을 사용하여 동일한 방법으로 진행함.

※ 참고사항
- 대사활성화의 유무 조건에 관계없이 단기처리법은 표준화 되어있으며, 대사활성계를 필요로하는 수적이상 유발물질은 현시점까지 알려진 바가 없음. 따라서 대사활성계를 필요로 하는 구조이상 유발물질의 단기처리법은 필수적임
- 장기 처리법은 대사활성계의 적용 조건과 처리시간이 다르기 때문에, 그 자체의 양성대조군을 필요로 함. 대사활성계 비적용 조건을 실시하는 수적이상 유발물질의 장기처리법은 필수적임
- 대사 능력이 있는 세포를 사용할 경우, 구조이상과 수적이상을 유발하는 양성대조군을 모두 사용해야 함

4) 시험 수행

① 단기 처리

- seeding 후 24시간 배양한 세포에 **<표 14>**을 참고하여 대사활성계 유무에 따른 양성대조군을 처리하고 음성대조군은 동일 용매만 사용하여 처리함
- 시험물질과 대사활성계 S9 mix 유무 조건에 맞는 처리를 진행함
- 37°C, 5% CO_2 incubater 조건에서 3-6시간 배양함
- S9 및 처리 배지를 제거하고 새로운 배양배지와 CytoB를 처리함
  *CytoB를 처리하지 않을 경우 새로운 배양배지만 처리함
- 37°C, 5% CO_2 incubater 조건에서 처리 시작 시점으로부터 정상세포 주기의 1.5-2.0배 경과 시점까지 노출함

② 장기 처리

- 장기처리의 경우 대사활성계를 사용하지 않으므로, seeding 후 24시간 배양한 세포에 <표 2>을 참고하여 양성대조군을 처리하고 음성대조군은 동일 용매만 사용하여 처리함.
- 시험물질과 CytoB를 동시 처리 진행함
  *CytoB를 처리하지 않을 경우 시험물질만 처리함
- 37°C, 5% CO_2 incubater 조건에서 처리 시작 시점으로부터 정상세포 주기의 1.5-2.0배 경과 시점까지 노출함

5) 세포 수확 및 슬라이드 검체 제작

① 소핵 검출 및 이핵세포의 신뢰할 수 있는 식별을 위해 슬라이드 검체를 제작하여 Gimsa 염색과 DNA 특이적 형광 염색 등 다양한 방법으로 염색을 진행 함

※ 참고사항
- 추가적으로 염색체 구조이상 및 수적이상 유발물질을 구별하기 위해선 화상분석, 레이저주사 세포 분석법, 유세포 분석법 등의 기술을 이용하여 평가할 수 있음

6) 분석

① 소핵 빈도를 현미경으로 분석하기 전 모든 슬라이드 검체는 개별적으로 코드화하여 계수를 진행함

② 소핵 계수와는 별도로 최소 500개의 세포를 계수하여 CBPI, RI, RPD, RICC 계산을 진행하고 세포증식 확인을 통해 세포 독성을 측정함

③ 유전독성 평가는 각 시험농도와 대조에 대해 적어도 2,000개의 이핵세포에서 소핵의 빈도를 계수하여 소핵의 빈도를 측정함

*CytoB 처리하지 않은 세포주에서는 2,000개의 세포에서 소핵을 계수함

※ 참고사항

- 각 농도별 이핵세포(또는 세포)의 수가 2,000개가 되지 않는 경우, 그리고 소핵에서 유의미한 증가가 검출되지 않는 경우에는 세포수를 늘리거나 세포독성이 낮은 농도를 설정하여 반복실험을 진행해야 함

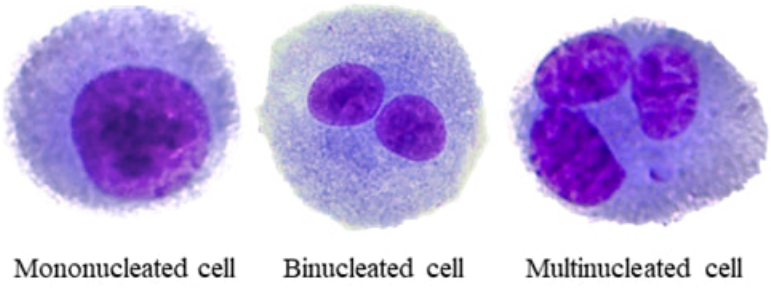


그림 33. Gimsa 염색으로 관찰한 단핵/이핵/다핵세포의 대표 이미지

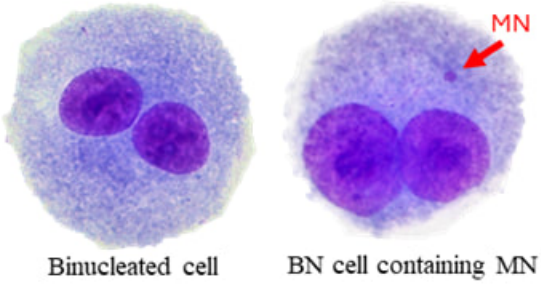


그림 34. Gimsa 염색 이핵세포의 소핵유무에 따른 대표 이미지

7) 세포 독성 평가 지표 및 계산 공식

① CytoB를 사용하는 경우

- 세포질분열억제 증식지수(CBPI) 또는 복제지수(RI)에 근거하여 세포독성을 평가하는 것을 권장함

*CBPI는 배양된 세포 중 단핵, 이핵, 다핵 세포의 비율을 고려하여 세포 집단이 평균적으로 몇 번의 핵 분열을 거쳤는지를 나타내는 지수

$$CBPI = \frac{(\text{단핵 세포 수}) + (2 \times \text{이핵 세포 수}) + (3 \times \text{다핵 세포 수})}{\text{총 세포수}} \times 100$$

*RI는 CytoB 처리된 배양에서 대조군 배양과 비교하여 세포 주기가 얼마나 진행되었는지를 상대적으로 나타냄. T: 처리한 배양, C: 대조 배양

$$RI = \frac{\left(\frac{(\text{이핵 세포 수}_T) + (2 \times \text{다핵 세포 수}_T)}{\text{총 계수 세포 수}_T}\right)}{\left(\frac{(\text{이핵 세포 수}_C) + (2 \times \text{다핵 세포 수}_C)}{\text{총 계수 세포 수}_C}\right)} \times 100$$

예시) 53%의 RI의 값은 대조 배양세포에서 분열하여 이핵세포와 다핵세포를 형성한 세포수에 비하여, 처리한 배양세포에서는 53%가 분열한 것, 즉 세포증식 억제율이 47%임을 의미함

② CytoB를 사용하지 않는 경우

상대 세포수 증가율(RICC) 또는 상대 세포집단 배가율(RPD)에 근거하여 세포독성을 평가하는 것을 권장함

*RICC는 처리군에서 세포 수가 얼마나 증가했는지를 대조군의 세포 수 증가와 비교하는 지수

$$RICC = \frac{\text{처리군 세포 수 증가(최종 - 시작)}}{\text{대조군 세포 수 증가(최종 - 시작)}} \times 100$$

*RPD는 처리군에서 세포 집단이 몇 배나 증가했는지를 대조군의 배가 횟수와 비교하는 지수

$$RPD = \frac{\text{(처리군에서의 개체군 배가 횟수)}}{\text{(대조군에서의 개체군 배가 횟수)}} \times 100$$

$$\text{개체군 배가 횟수} = \frac{\log(\text{최종 세포 수} \div \text{초기 세포 수})}{\log 2}$$

예시) 53%의 RICC 또는 RDP의 값은 세포 독성 및 세포성장 억제가 47% 되었음을 의미함.

③ 기타 세포 독성 평가 지표

- 증식지수(Proliferation Index, PI)를 사용하는 경우는, 1세포(cl1), 2세포(cl2), 3-4세포(cl4), 5-8(cl8)세포로 이루어진 클론의 수를 세는 것으로, 세포독성을 평가할 수 있음
- PI는 CytoB 미적용 조건에서 배양한 세포주에 대하여 중요하고 신뢰할 수 있는 세포독성 평가항목으로 사용되어, 유용한 추가 보조지표로 간주할 수 있음

$$\Pi = \frac{(1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl3-4) + (4 \times cl5-8)}{cl1 + cl2 + cl3-4 + cl5-8}$$

8) 결과 판정 및 해석

① 시험 적합성 기준을 모두 충족하고 수행한 시험 조건 중 어느 하나의 조건에서 다음과 같은 결과가 얻어진 경우 양성으로 판정되며, 모든 조건에서 해당하지 않을 경우 음성으로 판정. 모든 조건에서 일치하지 않은 불분명한 판정결과일 경우 추가검토 및 재평가를 실시함

양성 1. 통계적으로 유의한 증가: 적어도 하나의 시험 농도에서 음성 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 높은 값

양성 2. 농도의존적 증가: 시험 농도가 높아질수록 소핵빈도가 증가하는 경향이 통계적으로 유의한 값

양성 3. 과거 음성대조자료 범위 초과: 과거에 축적된 음성대조군 데이터의 통계적 범위를 넘어서는 값

② 양성일 경우, Tier 2에 따른 추가적인 *in-vivo*(OECD 474, 488, 489) 시험이 필요함

③ 시험 결과에는 사용한 세포독성 측정 결과(CBPI/RI/RICC/RPD또는 다른 관찰결과)를 제시해야 함

*시험 적합성 기준:

1) 시험결과의 음성대조군이 과거 음성대조자료 기준에 적합하는가

2) 시험결과의 양성대조군이 과거 양성대조자료와 일치하는가

3) 시약을 처리하지 않은 용매대조군의 세포증식이 1.5-2.0배 기준에 충종하는가

4) 최고농도의 선택 기준은 세포 독성 한계 (55±5%)를 넘지 않으며, 적절한 세포수와 농도단계에서 분석되었는가

V 요약

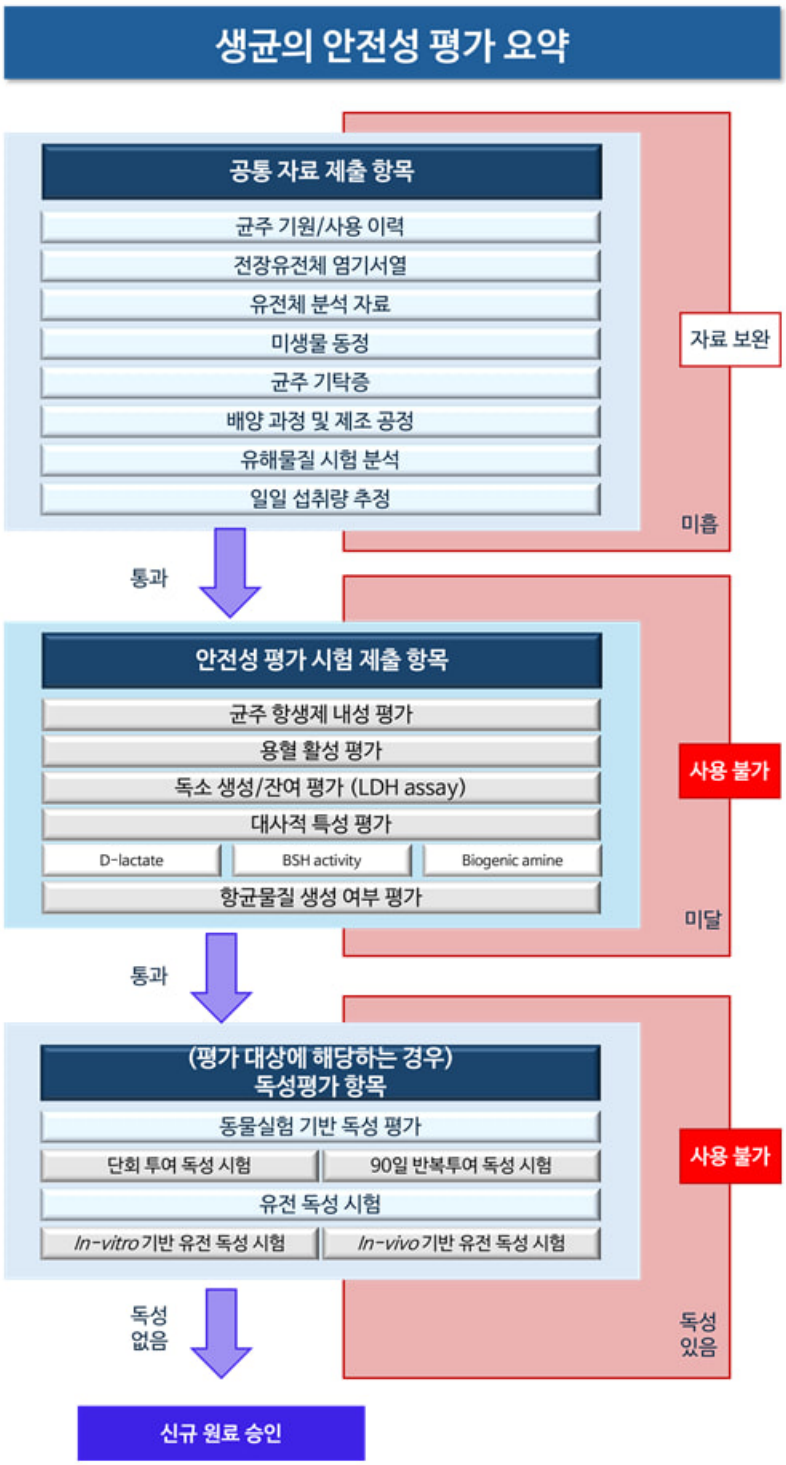


그림 35. 생균의 안전성 평가 요약

VI 참고 문헌

1) 「Next Generation Sequencing 기반 유전자 검사의 이해(심화용)」(식품의약품안전평가원, 2020)
2) Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. Journal of UOEH, 38(3), 223-232.
3) Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J. M., Kwon, SJ. & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie van Leeuwenhoek. 110:1281–1286
4) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07, 2024, Clinical & Laboratory Standards Institute(CLSI)
5) 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
6) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 2025, Clinical & Laboratory Standards Institute(CLSI)
7) CLSI, Performance Standars, op.cit.
8) One Health 항생제 내성균 다부처 공동대응사업, 2019~2023, 질병관리청
9) 질병관리청, One Health, op.cit.
10) 건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드, 2021, 식품의약품안전평가원
11) HGTREE2 Seoul National University, http://hgtree2.snu.ac.kr/
12) Center for Genomic Epidemiology. PlasmidFinder. Technical University of Denmark. https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/
13) Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: A fast phage search tool. Nucleic Acids Research, 39(Web Server issue, W347–W352. https://doi.org/10.1093/nar/gkr485
14) PHASTER. PHAge Search Tool Enhanced Release. https://phaster.ca/
15) Center for Genomic Epidemiology. MobileElementFinder. Technical University of Denmark. https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/
16) Blood agar plates and hemolysis protocols, 2005, ASM protocol
17) World Health Organization (WHO), WHO Global Strategy for Food Safety 2022–2030: Towards Stronger Food Safety Systems and Global Cooperation, WHO, Geneva, 2022.
18) Korea Disease Control and Prevention Agency (KDCA), Botulinum Toxin: Characteristics and Public Health Risk, KDCA, Cheongju, 2020.
19) Van den Bossche S, Vandeplassche E, Ostyn L, Coenye T, Crabbé A, (2020). Bacterial Interference With Lactate Dehydrogenase Assay Leads to an Underestimation of Cytotoxicity, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.
20) Narine Sarvazyan et al., Tissue Engineering – Functional Assays and Toxicity Screening, Springer, 2020.
21) Chen ZY, Hsieh YM, Huang CC, Tsai CC, (2017), Inhibitory Effects of Probiotic Lactobacillus on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29, Providence University, Taichung.
22) Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods(2011) EFSA Panel on Biological Hazards
23) GRAS notice 937/946/952/953, 2021/2021/2021/2021, FDA
24) Amino acid decarboxylation by Lactoacillus curvatus CTC273 affected by the pH and glucose

availability, 2008, Food microbiol.
25) Bover-Cid, Sara, and Wilhelm Heinrich Holzapfel.(1999) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. International journal of food microbiology 53.1.
26) Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W. P., & Holzapfel, W. H. (1990). Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase assay medium. Letters in Applied Microbiology, 11(6), 278-281.
27) Joosten HMLJ, Northolt MD. (1989) Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. Appl Environ Microbiol 55.
28) Maijala, R. L. (1993) Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. Letters in Applied Microbiology, 17(1), 40-43.
29) Møller, V. (1954) Distribution of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae 1. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 35(3), 259-277.
30) Niven Jr, C. F., Jeffrey, M. B., & Corlett Jr, D. A. (1981) Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 41(1), 321-322.
31) Chang, M., & Chang, H. C. (2012) Development of a screening method for biogenic amine producing Bacillus spp. International Journal of Food Microbiology, 153(3), 269-274.
32) Combined compendium of food additive specifications Vol. 4. Analytical methods, test procedures and laboratory solution used by and referenced in the food additive specifications. 2006, JECFA
33) Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms, (2018) EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed
34) EUCAST, "Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method", Version 13.0, (2025)
35) Davoodabadi, A., Dallal, M. M. S., Foroushani, A. R., Douraghi, M., & Harati, F. A. (2015). Antibacterial activity of Lactobacillus spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. Anaerobe, 34, 53-58.
36) Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. BioMed research international, 2014(1), 927268.
37) Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment, 2011, EFSA Scientific committee
38) Guidance for submission for food additive evaluations, (2012) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food
39) OECD guideline for the testing of chemicals 471. Bacterial Reverse MutationTest. (2020).
40) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 1983 May;113(3-4):173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
41) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res. 1983 May;113(3-4):173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
42) Jeya, K.R., Khalifa, A., Veerapagu, M., Sankaranarayanan, A. (2022). Assessment of Mutagenicity. In: Dwivedi, M.K., Amaresan, N., Sankaranarayanan, A., Begum, R. (eds) Biosafety Assessment of Probiotic Potential. Methods and Protocols in Food Science . Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2509-5_21
43)OECD. (2023). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test.* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

44) Della Torre, A., Albuquerque, L. B. L., Farrapo, N. M., Oshima-Franco, Y., dos Santos, M. G., Tavares, R. V. S., Rodas, A. C. D., Dal Belo, C. A., Cardoso, C. R. P., Varanda, E. A., Groppo, F. C., & Lopes, P. S. (2011). *Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant Plathymenia reticulata Benth.Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 17*(2), 190–198.

45) Shi, J., Bezabhie, R., & Szkudlinska, A. (2010). Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. Mutagenesis, 25(1), 33-40.

46) EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D, Bohn T, Castenmiller J, de Henauw S, Hirsch-Ernst KI, et al. Guidance on the scientific requirements for an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Journal. 2024;22(9):e8961.

47) Kang Min Kim, Tae Sung Jung, Seon Ok, Chan Young Ko and Jae Seon Kang. (2012). Evaluation of genotoxicity of Bacillus mojavensis KJS-3 on culture supernatant for use as a probiotic. Molecular & Cellular Toxicology, 8(1), 77-81.

48) Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Brient, A., Phipps, K. R., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2021). *Toxicological safety evaluation of pasteurizedAkkermansia muciniphila. Journal of Applied Toxicology, 41*(2), 276–290.

49) Seegers, J. F. M. L., Gül, I. S., Hofkens, S., Brosel, S., Schreib, G., Brenke, J., Donath, C., & de Vos, W. M. (2022). *Toxicological safety evaluation of liveAnaerobutyricum soehngeniistrain CH106. Journal of Applied Toxicology, 42*(2), 244–257.

50) Fujiishi, Y., Ohyama, W., & Okada, E. (2024). *A study for the genotoxicity assessment of substances containing probiotic candidates in the in vitro TK6 cell micronucleus test: Influence of low pH conditions and antibiotic supplementation on the test results. Genes and Environment, 46,* Article 26.