

프로바이오틱 제품 개발 동향과 과제

서재구* · 이과수 · 김진웅 · 정명준

(주)셀바이오텍 연구소

Development of Probiotic Products and Challenges

Jae-Gu Seo*, Gwa-Soo Lee, Jin-Eung Kim, and Myung-Jun Chung

Cell Biotech, Co., Ltd., Gimpo 415-871, Korea

Abstract Probiotics beneficially affect the health of the host via various mechanisms in the intestine. Recent developments in probiotic products have mainly been made to maximize probiotic effects in human. In this regard, probiotic products containing doubly coated or encapsulated cells, multi-species probiotics, or high viable cell number (10^{10} viable cells/gram or more) have been developed and are already available in the market. Until now, the majority of probiotics contain live cells but little attention has been paid to other alternative products such as heat-killed cell or bacteriocin-containing ones, which could have broad applications due to advantages over live cell-based probiotics, such as safety and stability. In addition, genetically engineered lactic acid bacteria could be of great importance in the field of alimentary health if they are carefully designed for biological safety. Although a number of probiotics are marketed by claiming health benefits, regulations for health claims will be more stringent. Therefore sufficient scientific and clinical evidences supporting the safety and efficacy of the potential probiotic strain will be required by the regulatory authority for a health claim, which thus may have a huge impact on the future probiotic market.

Keywords: Probiotics, Lactic acid bacteria, Probiotic effect, European Food Safety Authority, Health claim

서 론

사람의 위장관 (gastrointestinal tract)은 수백 종 이상의 다양한 미생물들이 서식하는 복잡한 생태계이며, 이 안에는 인체를 구성하는 모든 세포의 수보다 10배나 많은 수의 미생물로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 장내미생물의 대부분은 소장(ileum)과 대장(colon)에 서식하고 미생물-미생물 또는 미생물-숙주 사이의 상호작용을 통해 건강에 기여한다. 수 많은 연구결과들에 따르면 과민성장증후군(irritable bowel syndrome, IBS), 항생제 유발 설사(antibiotic-associated diarrhea, AAD), 또는 염증성장염(inflammatory bowel disease, IBD) 환자 등의 장내균총 조성은 정상인의 조성보다 다르다는 것이 밝혀졌으며 [1-3], 유산균으로 대변되는 프로바이오틱스(probiotics) 섭취를 통해 병증이 개선될 수 있음이 밝혀지고 있다. 또한 food

allergy 또는 아토피(atopy dermatitis) 등과 같은 면역질환에 대한 개선효능이 임상연구들을 통해 밝혀지고 있다. 따라서 프로바이오틱스는 전통적으로 많이 알려진 설사 혹은 변비 개선과 같은 정상작용으로부터 면역질환에 이르기까지 매우 폭넓은 효능을 가지고 있는 건강기능식품이다.

프로바이오틱스는 섭취 시 사람이나 동물에게 건강상의 이로우를 주는 살아있는 미생물로 정의된다. *Lactobacillus*나 *Bifidobacterium*으로 대변되는 유산균은 프로바이오틱스의 대부분을 차지하고 있으며 국내에서는 정상작용을 하는 대표적인 건강기능식품으로 인식되어 있다. 이와 관련하여 국내에서는 식품의약품안전청고시 제 2008-12호를 통해 유산균 제품을 2010년 이후 '유산균 이용제품'에서 '프로바이오틱스'로 표기를 변경하도록 하였다.

프로바이오틱로서 유산균의 기능성은 균주 특이적(strain-specific)인 것으로 받아들여지고 있다. 유산균의 본고장이라고 할 수 있는 유럽이나 일본의 대형 프로바이오틱 기업들은 일찍이 새로운 기능성을 가진 유산균을 발굴하여 세계적 명성을 가진 프로바이오틱 제품으로 개발하였으며 *Lactobacillus rhamnosus* GG (Valio, Finland), *Bifobacterium*

*Corresponding author

Tel: +82-31-987-6205, Fax: +82-31-987-8102

e-mail: jgseo@cellbiotech.com

animalis subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen, Denmark), *Lactobacillus johnsonii* La1 (Nestle, Switzerland), *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult, Japan) 등이 이에 해당된다. 세계적인 대형 프로바이오틱 기업들은 대표 유산균들의 질환 개선효능을 임상시험을 통해 증명하고, 이를 토대로 균주 또는 제품의 우수성을 알림으로써 마케팅에 활용하고 있다. 스위스에서 매년 개최되는 유럽 최대 건강기능식품 박람회인 'Vitafoods'는 세계적인 프로바이오틱 기업들이 자사 제품 판촉을 위해 각축을 벌이는 것으로 유명하다. 한편, 유럽의 프로바이오틱 시장은 약 7조원 규모로 전 세계적으로 가장 큰 시장을 이루고 있지만 최근에는 중국, 인도, 베트남, 인도네시아 등의 아시아 시장이 급성장을 하고 있는 추세이다. 프로바이오틱 시장은 건강한 삶을 추구하는 사회적 분위기에 힘입어 앞으로 지속적인 발전이 예상된다. 그러나 최근에는 유럽을 중심으로 세계 주요 시장에서 과학적으로 충분히 입증되지 않은 프로바이오틱 제품의 기능성 표기를 제한함으로써 소비자의 건강안전을 지키려는 움직임이 거세지고 있는 실정이다. 그러므로 건강기능성 제품임을 증명하기 위해서는 다양한 방법을 통해 과학적 근거를 제시해야 할 것으로 보인다. *In vitro* 및 *in vivo* 연구를 통한 효능검증만으로는 충분하지 않으며 이와 함께 사람을 대상으로 한 임상연구 수행이 기능성 표시를 할 수 있는 필요조건인 것으로 알려져 있다.

본문에서는 생균 제품 위주로 이루어져 있는 프로바이오틱 시장에서 제품의 기능을 개선하기 위한 개발동향과 넓은 의미에서 프로바이오틱 제품으로 구분될 수 있는 사균체를 포함하는 제품과 박테리옌 (bacteriocin) 함유 제품 등에 대해 기술하고자 한다. 또한 건강기능식품으로서뿐만 아니라 치료용 약물을 생산, 전달하는 의약품으로서 유산균을 개발하려는 노력을 설명하고, 최근 프로바이오틱 기업들의 당면 과제로 떠오르고 있는 프로바이오틱 제품의 안전성과 기능성 표시에 대한 강화된 규정에 대해 기술하고자 한다.

유산균 코팅 기술

프로바이오틱스는 생균을 섭취한 후 사멸하지 않고 장까지 살아서 도달한 후 정착, 생장을 통해 최대의 건강편익 (health benefit)을 제공할 수 있다. 이러한 점에서 섭취한 유산균이 위와 십이지장 (duodenum)을 거치면서 여러 가지 생물학적 소화반응을 견뎌 내고 회장 (ileum)과 같은 소장의 말단이나 대장 (colon)에 이르는 것이 매우 중요하다. 대부분의 유산균은 편성혐기성 세균으로서 산소에 노출될 경우 급격히 사멸한다. 한편, 유산균 제조 공정은 크게 유산균 발효, 균체 회수, 동결건조의 과정으로 이루어지는데, 발효 후 공정에서 산소노출을 최소화하는 것이 제품의 품질을 유지하는 최선의 방법이다. 이와 더불어 공기 중의 수분, 온도 조건 등은 제품의 저장과 유통안정성 및 2차 제품 제조 과정에서 가공안정성에 큰 영향을 미친다. 따라서 고품질의 유산균 제품이 되기 위해서는 유산균 섭취 시 내산성 및 내담즙성이 강화되어야 하며, 높은 가공안정성 및 유통안정

성을 위한 보호장치가 요구된다. 프로바이오틱스의 기능성에 대한 수 많은 과학적 근거에도 불구하고 시장에서 유통되는 제품들이 실제로 이러한 기능성을 가지고 있는지에 대한 의문은 여러 학자들에 의해 제기되어 왔다 [4-6]. 이러한 의문들은 결국 제품에 포함된 균주의 조성도와 생존률이 표기 사항과 차이가 있기 때문이다. 그러므로 섭취된 유산균의 높은 장도달률과 유통과정에서의 안정성 유지는 프로바이오틱 제품의 기능성과 품질을 보장하는 매우 중요한 요소이며 유산균의 안정성을 높이는 기술은 제품의 경쟁력과 직결된다.

유럽에서는 유산균의 장도달률을 유산균을 캡슐로 싸거나 코팅하는 기술을 사용하고 있다. 세계적인 유산균 제조 회사인 덴마크의 Chr. Hansen은 hydroxypropyl methylcellulose와 같은 cellulose polymer를 acacia gum이나 propylene glycol과 혼합하여 유산균을 film 코팅하는 기술을 사용하고 있으며, 스위스의 네슬레 (Nestle)는 유산균에 동물성 및 식물성 단백질과 lactic fat을 첨가하여 제조하고 있다. 캐나다의 로셀 (Institut Rosell-Lallemand)은 micro encapsulation 기술을 이용하여 유산균을 캡슐로 보호함으로써 고온 또는 산성 조건하에서도 유산균이 높은 생존율을 가지도록 하였다. 또한 STAR (Optimal STmach Acid Resistance)라는 enteric coating 기술을 사용해서 유산균을 코팅하여 위와 같은 낮은 산성 조건에서도 거의 100%의 유산균이 생존하도록 하는 기술을 개발하였다. 이외에도 식물성 지방원료를 이용하여 유산균을 코팅하는 방법과 lipid powder (natural powder, oils, wax, fatty acid 등)를 이용하여 유산균체 표면을 코팅함으로써 내산성이 향상되도록 방법 등이 각각 미국과 일본에서 개발된 바 있다.

국내에서도 여러 가지 다양한 재질을 이용한 유산균을 코팅하는 기술이 개발되어 특허출원되어 있다. CJ 제일제당 (특허 출원 번호: 2008-0100826)은 유산균을 오일로 1차 코팅시킨 후 연질캡슐로 2차 코팅하여 빛, 산소, 수분을 효과적으로 차단시킴으로써 장도달률 및 유통기간 내 사멸율을 최소화 할 수 있는 기술을 개발하였으며, 키토라이프 (출원 번호: 2008-0025391)는 알긴산과 저분자 수용성 키토산을 이용하여 코팅하는 방법을 개발하였다. 케비젠 (출원 번호: 2006-0036360)은 유산균 다중 마이크로 캡슐 기술을 출원하였는데 즉, 유청분말, 저지방 탈지분유, glucose를 glycerol과 혼합하여 유산균을 1차 코팅하고 정제 가공유와 폴리글리세린지방산 에스테르 및 글리세린호박산지방산 에스테르를 혼합 균질화시켜 2차코팅을 한 후 최종적으로 탄수화물, 단백질 성분 및 검류 증점제, 유화제를 혼합하여 균질화시켜 최종적으로 유산균 다중 마이크로캡슐을 제조하는 방법을 특허 출원하였다. 한편, 한국생명공학연구원 (출원 번호: 2002-0050578)에서는 유산균을 미생물 유래의 레반 (levan)을 이용하여 폴리머 형태로 코팅하고, 이를 금속 알기네이트 비드 (alginate bead)에 포집시키는 방법을 사용하여 유산균의 생존율 및 안정성을 향상시키는 기술을 개발한 바 있다. 유산균 코팅 기술의 선두 주자인 셀바이오텍의 경우 4세대 코팅기술을 적용하고 있는데, 유산균을 단백질로 1차 코팅한 후 여러 가지 다당류로 2차 코팅하는 기술이다. 이 기술의

핵심은 유산균을 둘러싼 코팅층이 주위 pH에 의해 벗겨 지도록 하는 것이다 (pH-dependent uncoating mechanism). 즉, 단백질 코팅층이 위산과 같은 낮은 pH 조건하에서는 코팅이 유지되는 반면 소장의 말단부위나 대장에서와 같이 pH가 중성인 곳에서 코팅이 벗겨지도록 함으로써 장까지 도달한 유산균의 생존율을 크게 향상시킴으로써 장에서 유산균 고유의 생리활성이 발휘될 수 있도록 하였다 (Fig. 1). 이 기술은 또한 다당류 코팅에 의해 소화효소 등에 노출되는 표면적을 최소화 시킨 장점을 가지고 있다.

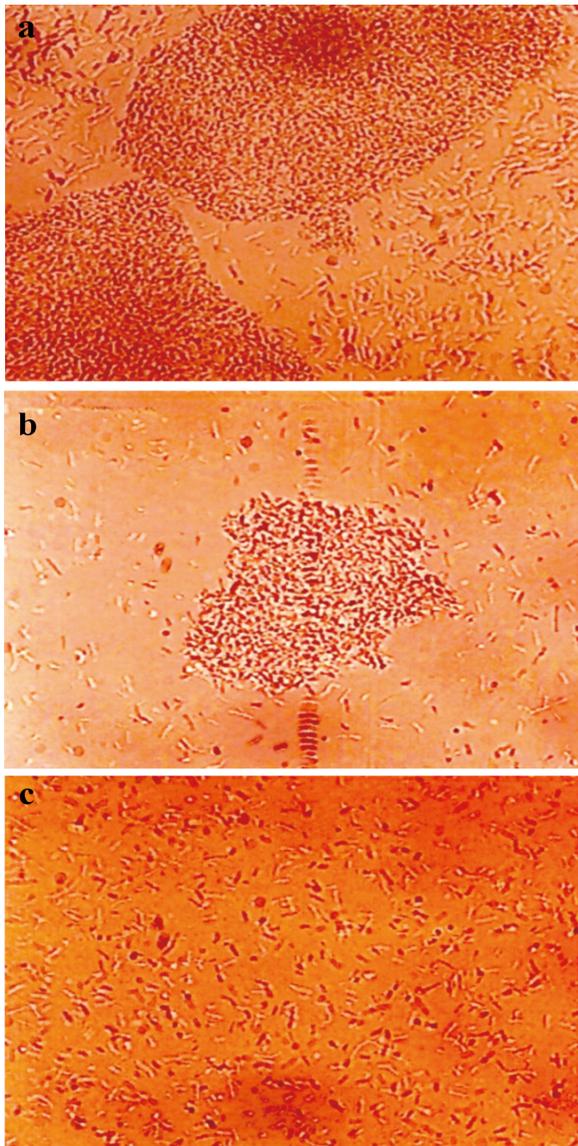


Fig. 1. pH-dependent release of doubly coated *L. acidophilus* cells. Doubly coated *L. acidophilus* cells remain mostly uncoated and conglomerated at pH 4, which is the pH of the stomach after meal (a), begin to be released from the coats as pH rises (b), and are fully released at pH 7, the pH in the intestine (c). The cells were photographed at magnification of 1,000.

유산균 제제 및 생균수

유산균에 의한 probiotic effect의 근거는 수 많은 연구 논문을 통해서 증명되어 왔으며 장내 미생물총의 조성에 영향을 미치거나 섭취한 유산균과 장관세포와의 상호작용에 의해 일어난다고 알려지고 있다. 그러나 기대하는 건강 편익을 얻기 위해 유산균제제 (단일유산균 혹은 복합유산균제제)의 형태 및 최적 생균수에 대한 근거는 매우 빈약하다. 유산균은 종에 따라서 최적서식지가 다르다. 예를 들어 *Lactobacillus*에 속하는 종들은 주로 소장에서 서식하고 *Bifidobacterium*은 주로 대장에서 서식하는 것으로 알려져 있다. 섭취된 유산균은 장정착을 통해 probiotic effect를 발휘할 수 있기 때문에 최적 서식지가 다른 복합유산균제제를 섭취하는 것이 최대의 건강편익을 얻는 올바른 유산균 섭취 방법이라고 할 수 있다. 이와 관련하여 Dunne 등 [7] 및 Rolfe [8]는 프로바이오틱스는 여러 종류의 strain으로 이루어져야 한다고 제안한 바 있다.

가장 큰 유산균 시장을 형성하고 있는 유럽에서는 약 10년 전 만하더라도 single-species probiotics가 주로 유통되었으며 이 후 3~5종류의 유산균이 포함된 제품이 출현하고 현재는 덴마크, 독일, 핀란드 등을 중심으로 4~12종의 유산균을 사용하여 만든 제품들이 선호되고 있다. 유럽의 유산균 원말 시장도 과거 단일 종 또는 2~3종 혼합제품이 판매되던 것이 현재는 5~8종의 유산균이 혼합된 제품이 선호되고 있다.

한편 유산균 발효기술이 발달하면서 지금은 세계적으로 10^{11} cfu/g 이상의 유산균 원말이 생산되고 있다. 일반적으로 *Bifidobacterium*은 *Lactobacillus*보다 산소노출에 훨씬 취약하므로 생산에 어려움이 있으며 높은 생균수를 확보하기란 쉽지 않다. 그러나 최근에는 발효기술의 발달과 함께 높은 생산력과 안정성을 확보할 수 있게 되었으며 이는 곧 프로바이오틱스 제품의 질적 향상으로 이어지게 되었다. 유럽 시장에서 일반적인 완제품의 생균수는 하루 복용량 기준으로 5×10^9 cfu/g 이상으로 정착되고 있으나 10^{10} cfu/g 이상의 프로바이오틱스 제품에 대한 선호가 생기기 시작하였다. 이는 곧 유산균 시장이 고가 제품 시장으로 이동 중임을 의미하는 것이다.

프로바이오틱스 제품은 미생물을 포함하는 기능성식품이기 때문에 생산 및 유통 과정에서 다른 종류의 미생물에 의한 오염에 각별한 주의 및 관리가 요구된다. 국내법에 의하면 완제품은 대장균 검출 결과가 음성이면 규격에 적합한 것으로 간주되나 외국의 경우 보다 엄격한 기준이 적용된다. 예를 들어 유럽약전 (European Pharmacopoeia, EP)은 구강용 비수 제품 (non-aqueous preparations for oral use)에 대해 TAMC (total aerobic microbial count)는 10^3 cfu/g 미만, TYMC (total yeasts/moulds count)는 10^2 cfu/g 미만으로 규정하고 있다. 또한 ISO (International Organization for Standardization) 기준에 의한 시험검사를 요구하기도 하는데 대표적으로 ISO 4832 (coliform, 10 cfu/g 미만), ISO 6579 (*Salmonella* sp., 25 g중 비검출), ISO 7251 (*E. coli*, 1 g 중 비검출), ISO

11290-1 (*Listeria monocytogenes*, 25 g중 비검출), ISO 6888-1 (*Staphylococcus aureus*, 10 cfu/g 미만), ISO 7954 (yeast와 mold, 100 cfu/g 미만), 그리고 ISO 4833 (non-lactic acid bacteria, 2,500 cfu/g 미만) 등이 적용된다. 따라서 해외 시장에서 통할 수 있는 경쟁력 있는 제품이 되기 위해서는 오염도 검사 강화가 필수적으로 뒷받침되어야 할 것이다.

유산균 사균체

1989년 Fuller는 Probiotics를 “장내 균종을 개선시켜 줌으로써 숙주에게 유익한 영향을 주는 생균제”라고 정의하였고 [9], 살아있는 미생물로서의 정립이 이루어졌으나, 1999년 Salminen 등이 “숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물 또는 미생물의 성분”으로 정의함으로 Probiotics의 범위를 사균으로까지 확대시켰다 [10,11]. 유산균 사균체는 생균의 반대되는 개념으로서 발효를 통해 얻어진 생균과 대사 산물들을 열처리 등에 의해 균의 성장이 일어나지 못하도록 한 형태로서 세포질 (cytoplasm), 세포벽 (cell wall), 박테리옌 (bacteriocin) 등의 항균활성 물질, 다당류 (polysaccharide), 유기산 등을 포함한다. 국내에서는 항균활성을 바탕으로 하여 설사치료를 위한 원료의약품으로 주로 많이 사용되고 있으며 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 면역조절기능 [12,13], 독소제거 [14] 등과 같은 다양한 효능을 가지고 있을 가능성이 제시되고 있다. 유산균 사균체 제품은 생균제품과 비교하여 높은 안전성과 안정성을 가지고 있다. 특히 높은 안정성으로 인하여 보관이 용이하고 유통기간을 늘일 수 있다는 장점을 가지고 있다. 따라서 사균체 제품은 건강기능식품, 식품첨가제, 의약품, 동물사료 등과 같은 기존의 유산균 생균이 적용되어 온 분야 외에도 화장품 원료로도 적용이 가능하다. 또한 항생제 사용에 대한 규제가 강화되고 있기 때문에 대체제로서의 활용성과 아직 사균체 제품 생산에 본격적으로 뛰어들지 못한 업체가 손에 꼽을 정도이기 때문에 시장성과 성장가능성은 크다고 할 수 있다.

유산균 사균체 제품 중 가장 대표적인 예로서 프랑스의 Lacteol사의 ‘Lacteol Forte’를 들 수 있다. 이 제품은 *L. acidophilus* 사균체를 포함하고 있으며 장점막세포에 병원성 세균의 부착을 방해하여 정상작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 일본 니치니치 제약의 ‘FK-23’은 유산균을 열처리한 사균체 제품으로서 면역활성 기능을 규명하여 c형 간염 치료제로 개발하였으며, 또 다른 일본 기업인 칼피스도 *L. acidophilus* L-92의 사균체가 면역조절 활성이 있다는 것을 밝힌 바 있다. 국내 기업인 쉐바이오텍이 생산하는 ‘Prolac-T’는 *L. acidophilus*의 사균체로서 설사의 원인균인 병원성 대장균, 장티프스, 이질균 등의 성장을 억제하고 장내 독소 생성균이 장점막세포에 부착되는 것을 막아 배설시킴으로써 세균성 대장염의 발생을 차단하는 효과를 가지고 있다. 또한 최근에는 사균수를 10^{11} cell/g 대로 높여 만든 고단위 사균 함유 제품을 생산함으로써 장내 세균총 (intestinal flora)의 균형이 빠른 시간 안에 회복될 수 있도록 하였으며

장관감염 예방능력을 향상시켰다. Prolac-T는 국내 제약회사들에 원료의약품으로 제공되고 있을 뿐 아니라 덴마크의 Actavis, 프랑스의 Da Pharma, 인도네시아의 Kalbe 사 등이 생산하는 제품에도 사용되고 있다.

박테리옌 (Bacteriocin) 함유 제품

박테리옌은 세균이 생산하는 항균활성 펩타이드 (antimicrobial peptide)로서 오래 전부터 기존 항생제를 대체할 수 있는 안전한 항균물질로서 많은 주목을 받아 오고 있다. 특히 유산균이 만들어 내는 박테리옌은 높은 상업적 활용가능성 때문에 특별한 관심의 대상이다. 각 종 유산균이 만들어 내는 박테리옌은 의약품, 식품보존제, 치즈나 맥주와 같은 식품제조 공정에 필요한 첨가제, 수산 또는 축산 사료 첨가제, 화장품 산업 등에 응용될 수 있다.

유산균이 만들어 내는 대표적인 박테리옌은 nicin이다. Nicin은 1933년에 발견된 이후로 수십 년간 가장 많이 연구되어 왔으며 1950년대에 영국에서 처음으로 유통되기 시작하여 음식물 첨가제로 허가 받은 유일한 박테리옌이다. 덴마크의 Danisco는 nicin을 상업화하여 ‘Nisaplin’과 ‘Novasin’이라는 제품을 판매하고 있다. 한편, 오스트레일리아의 Quest 사는 *Pediococcus acidilactici* PA1이 생산하는 pediocin을 함유하는 발효물을 판매하고 있는데 이 제품은 pediocin의 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성을 이용해 식품보존제로 사용되고 있다. 국내의 경우 유산균의 박테리옌을 활용한 제품개발은 미미한 편이며 쉐바이오텍은 *P. pentosaceus* 유래 pediocin이 함유된 ‘Freteria’와 *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, 및 *Lactococcus lactis*의 발효액의 혼합건조물인 ‘Lactocin-W’을 개발하여 시판하고 있다 [15]. 최근에는 *Enterococcus faecalis* SL-5가 생산하는 enterocin이 *Listeria* 또는 *Staphylococcus aureus* 등과 같은 병원성 세균 외에도 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes*에 높은 항균활성을 가지는 것을 발견하고 이 enterocin이 함유된 발효여액 건조농축물 ‘Lactopad’를 개발하였다 [16]. Lactopad는 여드름 환자를 대상으로 한 임상을 통해 안전성과 효능 검증을 마친 후 핀란드 및 폴란드 등에서 이미 제품으로 시판 중에 있다.

Genetically engineered LAB

프로바이오텍스는 자연에서 분리되어 고유의 특성을 기반으로 하여 오랜 동안 기능성 식품으로서 소비되어 오고 있다. 하지만 미래에는 이러한 가능성을 보다 적극적으로 활용하기 위해서 유전공학 기술이 적용된 유전자 변이 유산균이 개발되어 시판될 것으로 예상된다. 유전자 변이 유산균 개발은 기존의 probiotic effect를 강화하거나 새로운 probiotic effect를 부여하는 방법으로 이루어질 수 있다. 예를 들어 박테리옌의 안정성을 증가시키거나 항균 스펙트럼에 변화를 줌으로써 상업적 가치를 높이는 것은 전자에 해당되는 것

이며, 다른 종에서 유래한 항암단백질을 발현시키는 것은 후자에 해당한다. 유전자 변이 유산균 개발은 앞으로 여러 산업분야에 적용되어 파급 효과를 불러 올 수 있겠지만 특히 의료산업에 미치는 영향이 매우 클 것으로 예상된다.

한편 세균을 약물전달체 (drug delivery vehicle)로 이용하여 난치병을 치료하려는 기술인 bacterial therapy는 약물을 병원 위치에 특이적으로 전달이 가능하기 때문에 부작용을 최소화할 수 있으며 치료비로 인한 경제적 부담을 크게 줄일 수 있다. 이와 관련하여 *B. longum*, *B. adolescentis* 등의 유산균, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* 등의 병원성균, *Clostridium* 등과 같은 다양한 세균들이 약물전달체로 개발되어 왔으며, 이 중 유산균은 다른 세균들에 비해 오랜 동안 식품에 사용되어 왔을 만큼 안전성이 높다는 장점을 가지고 있다. 유산균을 이용한 유전자 변이주 개발은 국내에서 서울대학교 지근역 교수가 비피더스균에서 유전자발현 시스템을 구축하여 endostatin과 같은 항암활성 단백질 발현에 성공한 바 있으며 (주)바이오리더스는 유산균 세포표면에 병원성 바이러스의 항원단백질을 발현하게 함으로써 질병예방을 위한 vaccine 개발에 성공한 바 있다. 건강기능식품으로서 유산균 제품을 생산하고 있는 쉐바이오택도 최근 유산균을 이용한 치료의약품 개발에 뛰어들었으며 김치에서 분리한 *P. pentosaceus*에서 항암단백질 및 면역조절물질인 cytokine 발현을 위한 시스템 개발에 나서고 있다. 해외의 경우 여러 종류의 질환을 치료하기 위한 프로바이오틱스들이 개발되고 있다. 구강내 정상세균총의 일종으로 충치 (dental caries)의 원인균인 *Streptococcus mutans*의 lactate dehydrogenase 유전자를 비활성화시킨 후 wild-type strain과 치환하는 기술 (replacement therapy) [17], single chain antibody를 생산하는 *S. mutans*에 의해 병원균, 독소, cytokine 등을 비활성화시키는 기술 [18], 췌장기능부전 (pancreatic insufficiency) 치료를 위해 lipase 과발현 *Lactococcus lactis* 제조 기술 [19] 등이 대표적이다.

유전자변이 유산균을 이용하여 vaccine이나 치료제로 개발할 경우 안전성이 가장 우선적으로 고려되어야 할 것이다. 이를 위해서 단백질 발현시스템이 food grade가 되어야 할 것이며, plasmid 또는 chromosome 상에서 발현시킬 것인지를 결정해야 할 것이다. Plasmid를 이용할 경우 발현량에서 이점이 있겠지만 장내에서 horizontal gene transfer (HGT)의 문제가 발생할 수 있기 때문에 chromosome 상에서 발현하는 것이 가장 안전한 발현 방법일 것이다. 또한 유전자 변이주가 아무런 제어장치 없이 환경으로 유출될 경우 발생할 문제를 막기 위한 안전장치 마련이 매우 중요하다.

안전성 강화 및 기능성 표시 규제

대부분의 프로바이오틱스 제품에는 *Lactobacillus* 또는 *Bifidobacterium*에 속하는 유산균들이 주로 사용되고 있으며, 아토피, 과민성 장증후군, 항생제 유발 설사, 여행자 설사 (traveller's diarrhea), 여성 질증 (vaginosis) 등의 질환에

대한 효능을 표기하고 있다. 이와 같이 다양한 효능을 가진 제품들이 시장에서 유통되고 있지만 이들 제품에 사용된 균종 및 효능에 대한 객관적이고 과학적인 근거는 사실상 빈약한 편이다. 프로바이오틱스의 효능은 일반적으로 strain 특이적인 것으로 받아들여지고 있으며 특정 strain이 나타내는 효능이 같은 종의 다른 strain에 적용될 수 없다. 따라서 잠재적 프로바이오틱스를 분리하여 제품화하기까지는 매우 복잡한 검증 단계를 거쳐야 한다 (Fig. 2). 이 과정에서 가장 중요하면서 기본이 되는 것은 분리된 strain를 정확히 동정하고 병원성 (pathogenicity), 항생제 내성 (resistance) 및 감수성 (susceptibility) 등과 같은 특성을 파악하는 것이며, 이는 곧 프로바이오틱스 제품의 안전성과 직결된다. 이러한 점은 지금까지 프로바이오틱스로 알려진 많은 strain들의 들에 대한 동정결과가 상당부분 오류가 있다는 보고들에서 분명히 알 수 있다 [21,22]. 이와 같은 현실에 대해 FAO/WHO와 같은 권위 있는 기구들은 프로바이오틱스의 안전성 기준을 강화하기 위해 여러 가지 기준을 제시하고 있으며 특히, 유럽식품안전청 (EFSA, European Food Safety Authority)은 '영양과 건강기능성 청구에 관한 규정' (EC regulation on nutrition and health claims)을 통해 무분별한 건강 기능성 표시를 제한함으로써 식품의 안전성을 확보하고 이를 통해 소비자를 보호하려 하고 있다 [23]. 프로바이오틱스 제품의 건강기능성 청구는 위 규정 중 제 13 및 14조의 기준을 통과하는 것이 관건이다. 최근에 EFSA는 프로바이오틱스에 관한 지침을 공표하였는데 이 지침에 따르면 공인된 방법을 통해 species 수준 뿐 아니라 strain 수준까지 동정을 해야 하며 국제명명규약에 따라 명명을 해야 한다고 제시하고 있다. 또한 EFSA는 antibiotic resistance, toxin/virulence factor에 대한 genetic stability의 결과도 요구하고 있으며 특히, 'Probiotic'이라는 단어의 상업적 이용은 인체에 대한 연구내용이 뒷받침 되어야 한다고 발표하였다. 따라서 strain 동정 및 안전성이 EFSA 기준을 통과하지 못하거나 사람의 건강에 유익성을 제공한다는 근거가 부족한 strain을 포함한 제품인 경우 기능성 표시를 위한 health claim이 거절될 수 있다고 밝히고 있다. 예를 들어 크리스찬 한센의 대표 유산균주인 *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12과 *L. acidophilus* LA-5가 포함된 복합제제는 그 동안의 임상 결과를 토대로 유해균 억제 효과와 면역활성 강화라는 기능성을 청구하였으나 *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12와 달리 *L. acidophilus* LA-5의 동정 및 특성파악 자료가 불충분하다는 이유로 청구된 health claim이 거절되었다 [24]. 또한 네덜란드의 세계적 건강기능식품 회사인 DSM의 균주 *B. animalis* Lafti B94, *L. casei* Lafti L26 및 *L. acidophilus* Lafti L10 또한 각각 면역활성 강화 및 장내균총 정상화의 기능성을 청구하였으나 genetic typing 및 characterization에 대한 충분한 자료를 제시하지 못해 청구가 거절된 바 있다 [25]. 한편 스웨덴의 Probi 시는 대표 유산균인 *L. plantarum* 299v을 이용한 임상연구 결과를 통해 면역력 강화와 장내균총 정상화의 기능성을 청구하였으나 유산균 섭취가 증상개선에 기여했다는 근거가 부족하다는

이유로 거절되었다 [26,27].

그러므로 앞으로는 16s rDNA sequencing에 의한 species의 동정뿐만 아니라 DNA-DNA hybridization, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) 등과 같은 genetic typing을 통해 strain 수준의 동정이 필수적으로 이루어져야 할 것이다. 이를 통해 제품에 사용된 strain의 정확한 분류뿐만 아니라 지금까지 알려지지 않은 전혀 새로운 strain임을 증명해야 한다. 또한 임상상을 통해 효능 및 안전성이 최종적으로 검증되어야 한다. 특히, 임상상의 경우 최소한 서로 다른 두 인종을 대상으로 실시하여 일관된 효능 및 안전성을 증명하는 것이 중요할 것이다. 국내 기업의 경우 국내와 유럽에서의 임상상을 진행하는 것이 EFSA의 기준을 통과하는데 유리할 것으로 판단된다.

이와 같이 유산균 또는 유산균을 포함하는 제품에 대한 안전성 검증 및 기능성 표시에 관한 규정은 전세계적으로 점점 강화될 것으로 예상되며 따라서 유산균 제품을 생산하여 시장에 판매하기 위해서는 이러한 강화된 상황을 고려하여 준비하고 대비해야 시장 경쟁력을 가질 수 있을 것이다.

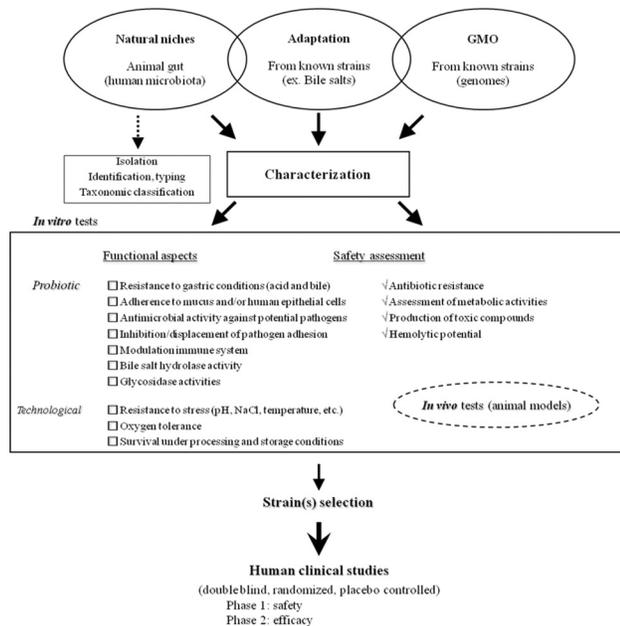


Fig. 2. Procedure for the isolation and characterization of novel strains with putative probiotic status [20].

향후 전망

프로바이오틱스 제품의 기능성과 안전성에 대한 검증 및 규정이 강화되고 있으며 이를 대비하는 것은 현재 프로바이오틱 기업들이 직면한 과제이다. 현재 유통되고 있는 대부분의 프로바이오틱 제품들이 특정 질환에 대한 개선 효능을 앞세우고 있기 때문에 이러한 대비는 매우 중요하다고 할 수 있다. 앞서 설명한 예들에서 볼 수 있듯이 오랜 동안 프로바이오틱스로서 인식되어 온 strain들도 임상상을 통해 섭취에

따른 ‘cause and effect’ 관계를 증명하는데 실패하거나 충분한 strain 동정 자료를 제시하지 못함으로써 EFSA의 기준을 통과하지 못하였을 뿐만 아니라 향후 이러한 기준을 충족시키지 못할 경우 프로바이오틱스에 의한 기능성 표시를 제한 받을 수 밖에 없기 때문이다.

한편 자유무역협정 (FTA) 체결은 무역환경의 새로운 변수로 떠오르고 있다. 특히, 작년에 최종적으로 타결된 한-EU 간 FTA가 의회비준을 통해 발효가 되면 제품판매를 위한 인증을 받기 위해 개별 국가에 신청하여 평균 6개월씩 소요되는 기간이 대폭 단축될 것으로 예상된다. 또한 한국에서 실시한 임상시험 결과나 국내 fGMP 인증 등도 상호인정을 받을 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 이와 같은 유리해진 환경을 적극적으로 활용하기 위해서 국내 업체들의 제조 능력 향상 및 품질관리가 뒤따라야 할 것이다. 세계 최대의 유산균 시장이며 까다로운 위생기준을 적용하고 있는 유럽의 기준을 통과하기 위해서는 프로바이오틱스 제품의 오염기준 수치를 더욱 강화해야 할 것으로 판단된다.

최근 일본을 비롯한 유럽 시장에서는 식물성 유산균을 포함하는 제품들이 큰 인기를 끌고 있다. 김치에서 분리되는 *L. plantarum* 등이 대표적인 식물성 유산균이라고 할 수 있는데 한국식품의 세계화를 위해서 기능성이 우수한 김치유산균을 발굴하고 임상연구를 통해 효능입증에 주력해야 할 것이다. 이와 관련하여 우리나라 고유의 프로바이오틱스 제품을 개발하고 경쟁력을 가지기 위해서는 프로바이오틱스 및 인체미생물 연구분야에 정부의 대폭적인 지원이 뒷받침되어야 할 것이다.

요 약

프로바이오틱스는 위장관에서 고유의 생리활성을 발휘하기 때문에 섭취 후 최대한 장까지 사멸하지 않고 도달하도록 하는 코팅이나 encapsulation 기술이 개발되어 왔다. 이와 함께 제품의 형태도 여러 종류의 유산균이 포함된 multi-species probiotics가 선호되는 추세이며 높은 생균수를 가지는 제품들이 개발되고 있다. 프로바이오틱 시장은 현재까지 생균 중심의 제품들이 대부분을 차지하고 있으나 사균제 제품 또는 박테리오킨과 같은 항균물질을 포함하는 제품 또한 다양한 분야에 적용될 수 있고 생균제와 비교하여 여러 가지 장점을 가지고 있어 관련 제품개발이 이루어져야 할 것으로 보인다. 프로바이오틱 제품들은 살아 있는 생균제로서 질환특이적 효능을 바탕으로 개발되고 있으나 질환개선 효능 표시에 대한 규제가 강화되고 있어 이에 대한 대비가 필요하다. 이를 위해 제품에 사용된 strain의 동정, 안전성 및 기능성에 대한 과학적 증거가 제시되어야 할 것이며 임상상을 통한 안전성과 효능에 대한 검증 자료가 필요할 것으로 보인다. 이와 같은 프로바이오틱스 제품의 헬스클레임에 대한 엄격해진 검증은 앞으로 프로바이오틱 시장에 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다.

접수 : 2010년 7월 25일, 게재승인 : 2010년 8월 24일

REFERENCES

- Kassinen, A., L. Krogius-Kurikka, H. Makivuokko, T. Rinttilä, L. Paulin, J. Corander, E. Malinen, J. Apajalahti, and A. Palva (2007) The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 133: 24-33.
- Young, V. B. and T. M. Schmidt (2004) Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J. Clin Microbiol.* 42: 1203-1206.
- Swidsinski, A., A. Ladhoff, Pernthaler, S. Swidsinski, V. Loening-Baucke, M. Ortner, J. Weber, U. Hoffmann, S. Schreiber, M. Dietel, and H. Lochs (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54.
- Fasoli, S., M. Marzotto, L. Rizzotti, F. Rossi, F. Dellaglio, and S. Torriani (2003) Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 59-70.
- Hamilton-Miller, J. M., S. Shah, and J. T. Winkler (1999) Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutr.* 2: 223-229.
- Temmerman, R., I. Scheirlinck, G. Huys, and J. Swings (2003) Culture independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 220-226.
- Dunne, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins (1999) Probiotics: from myth to reality. demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anton. Leeuw.* 76: 279-292.
- Rolfe, R. D. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130: 396S-402S.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Lee, Y. K., K. Nomoto, S. Salminen, and S. L. Gorbach. (1999) *Handbook of Probiotics*. John Wiley & Sons, New York.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno, and Y. K. Lee (1999) Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10: 107-110.
- Li, N., W. M. Russell, M. Douglas-escobar, N. Hauser, M. Lopez, and J. Neu (2009) Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. *Pediatr. Res.* 66: 203-207.
- Hirose, Y., S. Murosaki, Y. Yamamoto, K. Muroyama, Y. Miwa, A. Fujishima, and B. Lynch (2009) Safety studies of LP20 powder produced from heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54: 214-220.
- Kabak, B. and I. Var (2008) Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *J. Environ. Sci. Health B.* 43: 617-624.
- Kim, D. and M. J. Chung (2004) A probiotics condensate mixture: Novel antimicrobial application. *Nutrafoods* 3: 11-16.
- Kang, B. S., J. G. Seo, G. S. Lee, J. H. Kim, S. Y. Kim, Y. W. Han, H. Kang, H. O. Kim, J. H. Rhee, M. J. Chung, and Y. M. Park (2009) Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *J. Microbiol.* 47: 101-109.
- Hillman, J. D. (2002) Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Anton. Leeuw.* 82: 361-366.
- Kruger, C., Y. Hu, Q. Pan, H. Marcotte, A. Hultberg, D. Delwar, P. J. van Dalen, P. H. Pouwels, R. J. Leer, C. G. Kelly, C. van Dollenweerd, J. K. Ma, and L. Hammarström (2002) *In situ* delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat. Biotechnol.* 20: 702-706.
- Drouault, S., C. Juste, P. Marteau, P. Renault, and G. Corthier (2002) Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3166-3168.
- Lee, Y. K. (2009) Probiotic microorganisms. pp. 3-176. In: Y. K. Lee and S. Salminen (eds.). *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Son, Inc., New Jersey, USA.
- Huys, G., M. Vancanneyt, K. D'Haene, V. Vankerckhoven, H. Goossens, and J. Swings (2006) Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* 157: 803-810.
- Hamilton-Miller, J. M. and S. Shah (2002) Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 175-176.
- The European Union, Regulations (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R1924R\(01\):EN:NOT.\(2010\)](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R1924R(01):EN:NOT.(2010)).
- EFSA panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies

- (2009) Scientific opinion on the substantiation of health claims related to non-characterised microorganisms pursuant to Article 13(1) of regulation (EC) N0 1924/2006. *EFSA Journal* 7: 1247.
25. EFSA panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2010) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Bifidobacterium animalis* Lafti B94 (CBS118.529) and decreasing potentially pathogenic intestinal microorganisms (ID 867) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 7: 1232.
26. EFSA panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2009) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) and decreasing potentially pathogenic intestinal microorganisms (ID 1084) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 7: 1242.
27. EFSA panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2010) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) and “immune system” (ID 1081), pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8: 1488.