pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 5, pp. 306~309 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.5.306

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

프로바이오틱스 *Bifidobacterium breve* BB077 안전성 평가

우장빈[1†] · 한지윤[1†] · 서은솔[1,2] · 서민영[3] · 김병용[1*]
[1](주)씨에이치랩스, [2]서울대학교 농업생명과학대학 바이오모듈레이션학과, [3]㈜신우코퍼레이션

Safety Assessment of *Bifidobacterium breve* BB077 as Probiotics

Jang-Bin Woo[1†], Ji Yoon Han[1†], Eunsol Seo[1,2], MinYeong Seo[3], Byung-Yong Kim[1*]
[1]*CH Labs Corp., Chong Kun Dang Health care Labs, Seoul, Korea*
[2]*WCU Biomodulation Major, Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea*
[3]*ShinWoo Co., Ltd, Anyang-si, Korea*

(Received June 30, 2022/Revised October 04, 2022/Accepted October 13, 2022)

ABSTRACT - Probiotics are live microorganisms that confer health benefits onto the host when administered at adequate doses. Most widely used probiotics, such as *lactobacilli* and *bifidobacteria*, are known to be elements of healthy gut microflora and hence are not considered a threat to the host. However, probiotics may pose a risk in certain populations with compromised immune systems or defects in gut barrier functions. Herein, we evaluated the safety of *Bifidobacterium breve* BB077, according to the safety evaluation guidelines for probiotics produced by the National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS). The results show that *B. breve* BB077 is both non-hemolytic and non-cytolytic. In contrast, *B. breve* BB077 exhibited higher streptomycin and tetracycline resistance than the suggested NIFDS standard cut-off values. Hence, a genetic analysis of the streptomycin and tetracycline resistance genes was performed to determine the origin of antimicrobial resistance. Streptomycin and tetracycline resistance was shown have arisen from chromosomal mutations and considered intrinsic to the taxonomic group. In conclusion, the *B. breve* BB077 strain might be safe for human consumption.

Key words: Probiotics, *Bifidobacterium breve*, Safety, Antibiotics Resistance, EFSA

프로바이오틱스는 인간의 건강에 유익한 영향을 미치는 연관성을 가지는 박테리아를 명명하는 것으로 인체 내에서 유해한 미생물을 유용한 미생물로 대체하는 특성을 가진다[1]. 뿐만 아니라 장 질환을 겪고 있는 환자들이 프로바이오틱스를 복용한 후 건강한 미생물 균총을 회복하여 숙주에게 유익한 영향을 미치는 것을 확인하였다[2]. 그러나 프로바이오틱스의 안전성에 관한 문제는 꾸준히 제기되고 있으며, 국내에서도 지난 몇 년간 프로바이오틱스 섭취로 부작용이 발생했다는 사례가 보고되어 프로바이오틱스의 안전성을 확보할 필요가 있다[3]. European Food Safety Authority (EFSA)에 따르면 프로바이오틱스를 섭취할 때 숙주의 건강에 치명적인 위협이 되는 용혈 활성 평가 및 독소 생성 여부의 평가가 권장된다[4]. 또한, 국내에서는 식품의약품안전평가원이 EFSA의 규정에 따라 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드라인을 제시하였으며, 항생제내성 확인시험을 추가하는 등 안전성 평가기준을 강화하였다[5]. 프로바이오틱스가 가진 항생제 내성 유전자의 전이가 장 내에 분포하는 미생물에 일어날 경우, 장 내에 분포하는 미생물이 항생제 내성을 획득할 수 있다[3]. 이러한 전이가 병원성 미생물에 의해 이루어질 경우 항생제 치료를 필요로 하는 숙주에서 항생제의 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 이로 인해 숙주에게 치명적인 위협이 될 수 있다[7]. 따라서, 본 연구에서는 안전성 평가 기준 가운데 항생제 내성 평가에서 streptomycin 및 tetracycline에 대한 내성을 가지는 것으로 보여지는 *B. breve* BB077 균주를 국내 평가기준에 따라 용혈활성, 세포독소, 항생제 내성을 확인하여 프로바이오틱스로 섭취했을 때의 안전성을 평가하고자 한다.

†These authors contributed equally to this work.
*Correspondence to: Byung-Yong Kim, CH Labs, Chong Kun Dang Health care Labs, Seoul 07249, Korea
Tel: +82-10-2236-6044, Fax: +82-2-6676-6399
E-mail: greg6044@gmail.com

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Materials and Methods

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 SynBalance Srl (Origgio VA, Italy) 로부터 제공받은 *B. breve* BB077이며, 실험에 사용하기 위하여 BL 고체배지(selective medium used for the cultivation and maintenance of *Bifidobacterium* spp., KisanBio, Seoul, Korea)에 선상도말평판법으로 도말하여 37°C, 24시간, 혐기조건으로 배양되었다. 균주의 활성화를 위해 BL 액체배지(KisanBio, Seoul, Korea)에 2회 계대 접종하여 같은 조건으로 배양하였다.

용혈활성 확인

24시간 배양된 균주 *B. breve* BB077를 혈액고체배지(sheep blood agar, KisanBio, Seoul, Korea)에 선상도말평판법으로 도말하여 37°C, 48시간, 혐기조건으로 배양하여 용혈활성을 확인하였다.

세포독소 생성 확인

독소 생성 확인 실험은 식품의약품안전평가원이 제시한 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드의 lactate dehydrogenase (LDH) assay에 따라 수행되었고[5], 독소 생성 측정에는 Dyne LDH PLUS Cytotoxicity Assay Kit (Dynebio, Gyeonggi, Korea)가 사용되었다. 건강기능식품 가이드라인(장건강 기능성)에 제시된 실험방법에 따라 본 시험관 시험에서는 장 세포 유사(enterocyte-like) 세포인 Caco-2 세포(대장암 세포주)를 이용하여 독성 생성을 확인하고자 하였고, 10^4 cells를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Corning, Tucson, AZ, USA) 배지에 5% CO_2, 37°C 환경에서 24시간 배양하였다. 배양 후, *B. breve* BB077 10^8 CFU를 Caco-2 세포에 접종하고 5% CO_2, 37°C 환경에서 24시간 배양하였다. 양성 비교군으로써 pathogenic strain으로 알려진 *Escherichia coli* O127:B8[6]을 1×10^7 CFU/mL 또는 lysate 용액을 첨가하여 5% CO_2, 37°C 환경에서 24시간 배양하였으며, 음성 비교군으로써 균주가 들어있지 않은 배지만 첨가하여 동일하게 37°C 환경에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 세포독성을 측정하였고, 식품의약품안전평가원 발간 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드라인에 제시된 공식에 따라 cytotoxicity (%)를 계산하였다.

$$\text{Cyroroxicity (\%)} = \frac{\text{Test sample} - \text{Negative control}}{\text{Positive control} - \text{Active control}} \times 100$$

항생제 내성

항생제 내성 실험은 식품의약품안전평가원이 제시한 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드의 E-TEST에 따라 수행되었다[5]. 균주 *B. breve* BB077 1×10^8 CFU/mL를, Iso-sensitest 배지(KisanBio, Seoul, Korea)에 전체적으로 도말하였다. 9가지 항생제(ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol) 스트립 (E-test®, BioMerieux, La Balme Les Grottes, France)을 균주가 스며든 고체배지에 위치시키고 37°C에서 48시간동안 배양하였다.

항생제 내성 유전자 분석

항생제 내성의 특성을 확인하기 위해 항생제 내성 관련 추정 유전자를 분석하였다. Resistance Gene Identifier 버전 5.1.0 소프트웨어(RGI, Ontario, Canada)를 이용하여 Comprehensive Antibiotic Resistance Database 버전 3.0.4(CARD, Ontario, Canada)와 비교·분석하였다[8,9].

Results and Discussion

용혈활성 확인

혈액고체배지에 포함 되어있는 헤모글로빈이 미생물의 용혈활성으로 인해 분해될 경우 그 색상이 변화하게 되며, 이를 이용하여 용혈활성을 측정할 수 있다. 본 실험에 사용한 *B. breve* BB077 균주를 혈액고체배지에 배양한 결과 배지의 색상 변화가 관찰되지 않았으며, 이를 통해 본 실험에 사용한 *B. breve* BB077 균주가 용혈 활성을 나타내지 않음이 확인되었다.

세포독소 확인

LDH assay는 독소에 의해 세포가 파괴되면서 세포 내부로부터 세포 외부로 용출되는 LDH의 활성을 측정하는 시험법이다[10]. 식품의약품안전평가원이 제시한 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드에 따라 측정한 *B. breve* BB077의 세포 독소는 –56%로 나타났다. 이는 독소를 생성하는 비교균주인 *E. coli* O127:B8의 세포 독성 236%에 비해 현저히 낮은 수치로, 본 실험에 사용한 *B. breve* BB077 균주가 독소를 거의 생성하지 않음이 확인되었다.

항생제 내성

EFSA에서 제시한 *Bifidobacterium*의 cut-off value를 참고하여 *B. breve* BB077의 항생제 9종 (ampicillin, vancomycin, gentamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol)에 대한 각각의 최소 생육 저해농도 (MIC, minimum inhibitory concentration)를 확인하기 위해 항생제 내성 검사인 E-test를 수행하였다[11].

B. breve BB077은 항생제 7종(ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol) 가운데 최소 기준치가 존재하지 않는 kanamycin을 제외한 나머지 6종 항생제는 EFSA에서 제시한 cut-off value 보다 낮은 항생제 내성을 나타냈으며, streptomycin, tetracycline은 EFSA에서 제시한 cut-off value

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (μg/mL) of antibiotics to *B. breve* BB077

	Antibiotics								
	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TET	CHL
B. breve BB077	0.38	0.75	48	64	>128	0.125	<0.016	32	0.75
Suggested cut-off value according to European Food Safety Authority (2018)									
Bifidobacterium	2	2	64	n.r.*	128	1	1	8	4

AMP, VAN, GEN, KAN, STR, ERY, CLI, TET, CHL refer to ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol, respectively.
* n.r.: not required

Table 2. Antibiotic resistance determinants identified in *B.breve* BB077 using RGI software with Perfect and Strict algorithm

Locus-tag	Annotation	Algorithm	Best Hit CARD	ARO*	AMR gene family	Identity (%)	Bit Score
BB077_01853	Ribosomal protein S12	Strict	Mycobacterium tuberculosis rpsL mutations conferring resistance to Strptomycin	300395	Antibiotics resistant rpsL	82.93	200
BB077_01474	Tetracycline resistance protein TetW	Strict	Tet (W/N/W)	3004442	Tetracycline-resistant ribosomal protection protein	64.09	1,300

*ARO: Antibiotic Resistance Ontology

보다 높은 내성을 보이는 것으로 확인되었다(Table 1).

B. breve BB077 균주의 서열은 항생제에 대한 내성과 관련된 추정 유전자를 식별하기 위해 RGI software를 사용하여, CARD와 비교·분석하는데 사용되었다[8,9]. 분석 결과 streptomycin과 tetracycline에 대한 내성에 잠재적으로 관여하는 유전적 결정인자를 확인하였다(Table 2).

Streptomycin 내성 단백질 ribosomal protein S12를 코딩하는 BB077_01853은 *RpsL* 유전자의 돌연변이로 streptomycin에 내성을 나타내는 것으로 확인 되었으며, 이는 *B. breve* Yakult 균주가 streptomycin에 대해 높은 내성을 갖는 특성에서도 확인할 수 있다[12].

CARD에 따르면, *B. breve*가 가지는 이와 같은 특징은 ribosomal protein S12를 암호화하는 유전자 *RpsL*의 아미노산 치환이 일어나 streptomycin과 16S rRNA의 상호작용을 방해하여 streptomycin에 저항성을 갖게 되는 것으로 밝혀져 있다[13].

또한, tetracycline 내성 단백질 TetW를 코딩하는 유전자 자리 BB077_01474가 내성의 결정인자로 확인되었다. 이 유전자는 CARD 확인결과 *Tet (W/N/W)*로 tetracycline의 번역 억제로부터 리보솜을 보호하는 대체인자이다[14]. *B. breve* 종은 공통적으로 tetracycline에 대해 내성을 갖는 *Tet (W)* 유전자를 가지고 있으며[15], 본 연구에 사용된 *B. breve* BB077 또한 이러한 종의 특성에 따라 *Tet (W)* 유전자를 보유하고 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구를 통해 *B. breve* BB077이 가진 항생제 내성이 외재적 유전자로 인한 획득 내성이 아님을 확인하였고, EFSA에서는 MIC를 초과할 경우 해당 항생제 내성 유전자가 내재내성인지 획득내성인지를 판단하여 프로바이오틱스의 사용을 인정해주고 있는데, 본 실험의 결과와 같이 획득 내성이 아닌 경우의 자연돌연변이는 사용을 승인해주고 있다. 따라서 *B. breve* BB077이 가진 항생제 내성이 인체에 유해하지 않음을 확인할 수 있다.

국문요약

프로바이오틱스가 널리 사용됨에 따라 European Food Safety Authority (EFSA)와 식품의약품안전평가원이 제시하는 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드라인에 준수하여 *B. breve* BB077의 안전성을 평가하였다. 본 실험에 사용한 *B. breve* BB077 균주는 용혈성이 발생하지 않았으며, 독소를 거의 생성하지 않았음을 확인하였다. 항생제 내성 평가에서는 7종의 항생제에서는 EFSA 권고 cut-off value 보다 낮은 항생제 내성을 보였으며, 2종의 항생제인 streptomycin와 tetracycline에서는 cut-off value 보다 높은 항생제 내성을 보였다. streptomycin, tetracycline에 대한 내성 결정인자는 *B. breve* 종의 공통 유전적 특징으로 외부로부터 전달받은 내성이 아닌 자연돌연변이에 의한 획득내성이기에 사용에 안전한 균주임을 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Jang-Bin Woo	https://orcid.org/0000-0002-7129-4283
Ji Yoon Han	https://orcid.org/0000-0001-8607-2934
Eunsol Seo	https://orcid.org/0000-0002-1585-8048
MinYeong Seo	https://orcid.org/0000-0002-1164-1423
Byung-Yong Kim	https://orcid.org/0000-0002-4229-8859

References

1. Scott, K.P., Antoine, J-M., Midtvedt, T., Hemert, S.V., Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **26** (2015).
2. Kerry, G.R., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S, Das, G., Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.*, **26**, 927-939 (2018).
3. Chon, J.W., Seo, K.H., Bae, D.Y., Jeong, D.K., Song, K.Y., Status and Prospect of Lactic Acid Bacteria with Antibiotic Resistance. *J. Dairy Sci. Biotechnol.*, **38**, 70-88 (2020).
4. Yasmin, I., Saeed, M., Khan, W.A., Khaliq, A., Chughtai, M., Iqbal, R., Tehseen, S., Naz, S., Liaqat, A., Mehmood, T., Ahsan, S., Tanweer, S., *In vitro* probiotic potential and safety evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of Bifidobacterium strains isolated from raw camel milk., *Microorganism.* **8**, 354 (2020).
5. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, (2019). Guide to preparation of sub-mission data for recognition of functional ingredients for health supplements. Retrieved from https://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=12803&srchFr=&srchTo=&srchWord=%EA%B8%B0%EB%8A%A5%EC%84%B1%26nbsp%EC%9B%90%EB%A3%8C&srchTp=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1.
6. Cyril, S., Stulberg, Ph.D., Wolf, W., Zuelzer, M.D., Anthony, C., Nolke, M.D., *Escherichia Coli* O127:B8, a Pathogenic Strain Causing Infantile Diarrhea. *AMA Am. J. Dis. Child.*, **90**(2), 125-134 (1995).
7. Seo, Y.G., Yoon, Y.H., Kim, S.J., Functionality and Safety of Probiotics. *J. Dairy Sci. Biotechnol.*, **37**, 94-101 (2019).
8. Alcock, B.P., Raphenya, A.R., Lau, T., Tsang, K.K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.V., Cheng, A.A., Liu, S., Min, S.Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.K., Werfalli, R.E., Nasir, J.A., Oloni, M., Speicher, D.J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., Hernandez-Koutoucheva, A., Sharma, A.N., Bordeleau, E., Pawlowski, A.C., Zubyk, H.L., Dooley, D., Griffiths, E., Maguire, F., Winsor, G.L., Beiko, R.G., Brinkman, F.S.L., Hsiao, W.W.L., Domselaar, G.V., McArthur, A.G., CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.*, **48**, D517-D525 (2020).
9. Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A. N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S.L., Wright, G.D., McArthur, A. G., CARD 2017: expansion and model-centric curation of the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.*, **45**, D566-D573 (2017).
10. Fotakis, G., Timberll, J.A., *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*, **160**, 171-177 (2005).
11. European Food Safety Authority (EFSA)., Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal.*, **10**, 2740 (2012).
12. Kiwaki, M., Sato, T., Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium breve* strains and genetic analysis of streptomycin resistance of probiotic *B. breve* strain Yakult. *Int. J. Food Microbiol.*, **134**, 211-215 (2009).
13. Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD version 3.0.4). Mycobacterium tuberculosis rpsL mutations conferring resistance to streptomycin. Retrieved from http://card.mcmaster.ca/ontology/39979
14. Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD version 3.0.4). Tet (W/N/W). http://card.mcmaster.ca/ontology/41634
15. Duranti, S., Lugli, G.A., Mancabelli, L., Turroni, F., Milani, C., Mangifesta, M., Ferrario, C., Anzalone, R., Viappiani, A., van Sinderen, D., Ventura, M., Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, e02894-16 (2017).