연구논문
Food Preserv Process Ind 2025;24(2):119-130
https://doi.org/10.11002/fppi.2025.24.2.119

식품저장과 가공산업
Food Preservation and Processing Industry
pISSN: 1598-7418, eISSN: 3092-0116

국내 유래 낙산균 *Clostridium butyricum* S-45-5의 대량생산 공정 수립 및 안전성 평가

김형우 · 손성오 · 김종근*
엔피케이(주)

Production process development and safety analysis of domestically isolated *Clostridium butyricum* S-45-5

Hyeong-Woo Kim, Sung-Oh Sohn, Jong-Keun Kim*
Institute of R&D Center, NPK Inc., Jeollanam-do, Korea

Abstract

The discovery and industrial application of functional microbial strains with probiotic potential have gained global attention. This study focused on *Clostridium butyricum* S-45-5, a butyrate-producing strain isolated from the feces of breastfed infants in Korea and transferred from the Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB, Jeongeup, Korea). Comparative analyses were conducted with representative commercial strains, including MIYAIRI 588 (Japan) and CGMCC0313 (China), to evaluate origin, cultivation characteristics, and industrial applicability. The S-45-5 strain exhibited superior productivity, stable fermentation profiles, and consistent viable cell counts under large-scale production conditions. Comprehensive safety assessments, including toxicity, antibiotic resistance, and pathogenicity tests, confirmed its compliance with international probiotic safety standards. These findings demonstrate that *C. butyricum* S-45-5 is a safe and robust probiotic candidate suitable for commercial use. Furthermore, ongoing registration for Generally Recognized As Safe (GRAS) status with the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and forthcoming human clinical trials are expected to support its global commercialization. The establishment of a stable mass-production process highlights the potential of S-45-5 as a Korea-origin butyrate-producing probiotic with broad industrial and functional applications.

Key words: *Clostridium butyricum*, Probiotics, Mass production, Safety evaluation, Industrial application

Date Received: Oct. 1, 2025, **Date Revised:** Oct. 14, 2025, **Date Accepted:** Oct. 28, 2025
***Corresponding author:** Jong-Keun Kim, Tel: +82-70-4447-9427, E-mail: kimjk8266@gmail.com

Copyright © 2025 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ⅰ. 서론

미생물 기반 바이오소재 및 프로바이오틱스 개발에 대한 관심이 전 세계적으로 증가함에 따라, 다양한 유익균의 탐색과 기능성 평가가 활발히 이루어지고 있다(Hill 등, 2014; Marco 등, 2017; Markowiak와 Slizewska, 2017). 그중에서도 *Clostridium* 속의 대표적 유익균인 *C. butyricum*은 아포(spore) 형성 능력을 갖춘 혐기성 그람양성균으로, 산업적으로 유리한 생리학적 특성과 생존력으로 주목받고 있다(Guo 등, 2020; Stoeva 등, 2021; Tran 등, 2020).

*C. butyricum*은 토양, 수계, 동물의 장관 등 다양한 환경에 분포하며, 장내 환경에서 낙산(butyric acid)을 포함한 단쇄지방산(short-chain fatty acids, SCFAs)을 생성한다. 특히 열・산・건조 등 극한 환경에서도 생존이 가능한 높은 아포 형성 능력으로 제형화 및 장기 저장에 유리하고, 위산과 담즙 등 소화관 내에서도 생존하여 장내 유익한 생리활성을 발휘할 수 있다(Xiong 등, 2011; Yang 등, 2012). 이 균주는 장 점막 보호, 면역 조절, 염증 억제 등의 기능을 통해 장 건강 유지에 기여하며, 최근에는 장 질환 및 대사질환 개선에도 유효한 균주로 평가받고 있다(Li 등, 2021; Sun 등, 2018; Zhao 등, 2019).

이러한 생물학적 우수성에 기반하여 *C. butyricum*은 프로바이오틱스 소재로서 일반식품, 건강기능식품, 의약품, 사료첨가제 등 다양한 산업 분야에서 활용되고 있다(Durre, 2014; Yamamoto 등, 2022). 특히 일본, 중국, 한국 등에서 상용화가 이루어지고 있으며, 대표적인 상용 균주로는 일본의 MIYAIRI 588, 중국의 CGMCC0313, 한국의 S-45-5 등이 있다. 이들 국가별 균주는 유래, 유전적 특성, 생산성과 안정성 등에서 상이한 특징을 보인다. 일본의 MIYAIRI 588 균주는 오랜 임상 경험과 안정성을 기반으로 의약품 및 건강기능식품에 폭넓게 활용되고 있으며, 중국은 CGMCC0313 균을 중심으로 원료 생산 및 사료용 활용이 활발하나, 소비자용 완제품 시장은 제한적이다. 한국은 비교적 최근 자체 균주 개발에 착수하였으며, 수입 균주 의존도를 줄이고, 국내 환경에 적합한 프로바이오틱스 균주를 확보하려는 노력이 증가하고 있다. 그러나 여전히 국내 유래 균주의 대량생산 공정 확립과 안전성 검증에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 국내 모유 수유 아기 분변에서 분리되어 한국생명공학연구원으로부터 기술이전 받은 국내 유래 균주 *C. butyricum* S-45-5를 대상으로, 상업적 활용을 위한 대량생산 공정을 확립하고, 일본・중국의 대표 상용 균주들과의 비교를 통해 산업화 가능성과 경쟁력을 고찰하고자 한다. 아울러, S-45-5 균주에 대한 프로바이오틱스 안전성 평가 결과와 향후 독성시험 및 GRAS 획득을 포함한 건강기능식품 원료화를 위한 기반 자료도 제시하고자 한다.

1.1. 각국(한국, 일본, 중국)의 낙산균 개발 및 상용화 현황

전 세계적으로 *C. butyricum*은 아포 형성 능력, 극한 환경 내성, 장내 정착성 등의 특성으로 인해 프로바이오틱스 및 미생물 기반 바이오소재로서의 활용 가능성이 주목받고 있다. 특히 한국, 일본, 중국에서는 각국의 식품・의약 기준에 부합하는 다양한 균주들이 상업적으로 활용되고 있으며, 균주의 유래, 적용 제품군, 배양 및 생산성 측면에서 차별성이 존재한다. 한국, 일본, 중국에서 상업적으로 사용되는 *C. butyricum* 균주의 비교는 Table 1과 같다.

1.1.1. 일본: MIYAIRI 588 균주의 의약 및 건강기능식품 적용

일본은 낙산균 상용화의 선도국으로, 1933년 인간 장내에서 분리한 *C. butyricum* MIYAIRI 588 균주를 기반으로 한 프로바이오틱스 개발이 가장 활발히 이루어졌다(Hayashi 등, 2013). 해당 균주는 일본 PMDA의 승인하에 경구용 장내 제제인 ‘MIYA-BM®’ 등의 의약품 형태로 상용화되었으며, 현재는 일반 소비

Table 1. Comparison of commercial *C. butyricum* strains in Korea, Japan, and China

Category	Korea	Japan	China
Strain	S-45-5	MIYAIRI 588	CGMCC0313
Origin	Feces of Korean infant	Soil	Human feces
Commercial form	Food (for health functional food application)	Pharmaceuticals, health functional food	Mainly raw material/feed additive, research use
Market share	Domestic food market	Leading pharmaceutical market in Japan and Asia	Raw material supply and research
Notable features	Domestic strain	Over 80 years of accumulated clinical data	Limited commercialization

자용 건강기능식품 원료로도 다양하게 사용되고 있다. MIYAIRI 588은 고도의 아포 형성 능력과 장내 생존율을 바탕으로 항생제 병용 안전성이 높고, 의약 관련하여 많이 연구되고 있으며(Bertuccioli 등, 2023; Seki 등, 2003), 특히 항생제 유발 장염 및 *Clostridioides difficile* 감염 예방에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Hagihara 등, 2021; Sato 등, 2022; Takahashi 등, 2004). 일본 내에서는 배양 조건의 일관성 확보, 고농도 생균수 유지 기술, 장기 안정성 확보 등 전 주기적 기술이 축적되어 있으며, 수출 제품에서도 강점을 가진다.

1.1.2. 중국: CGMCC0313 균주 중심의 사료 및 연구용 소재 활용

중국에서 산업적으로 활용되는 *C. butyricum* 균주는 주로 분변 및 발효 제품에서 분리된 경우가 많다(Yang 등, 2024). 특히 중국 정부는 사료첨가제 품종 카탈로그에 *C. butyricum* 균주를 등재하여(Zhao 등, 2018), 주로 가축용 사료첨가제로 사용되고 있다(Li 등, 2021; Liang 등, 2021). 이 가운데 CGMCC0313 균주는 널리 상용화된 대표 균주로, 연구용 소재뿐 아니라 기능성 발효소재로 개발되어 왔다(Jia 등, 2017). 생균수는 일반적으로 10^8-10^9 CFU/g 수준이며, 배양 안정성은 균주마다 편차가 있으나, 산업적 용도로 적합한 수준으로 보고된다. 다만, 인체 적용에 필요한 GRAS 수준의 독성평가 및 장기 안전성 자료는 상대적으로 부족하여, 주로 일반 식품이나 사료 등의 비의약용・비건강기능식품 중심의 활용이 이루어지고 있다.

1.1.3. 한국: S-45-5 균주 개발을 통한 자립 기반 구축 노력

국내에서는 한동안 일본산 낙산균 또는 중국산 균주를 원료로 한 수입제품 위주 시장이 형성되어 왔다. 그러나 최근 미생물 자원 주권과 원료 자립화 필요성이 대두됨에 따라, 한국 환경에 특화된 국내 유래 미생물 발굴과 균주 산업화 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적으로 한국생명공학연구원에서 모유수유 유아의 분변에서 분리된 *C. butyricum* S-45-5 균주는 2020년대 초 기술이전 과정을 거쳐 산업계에 도입되었으며, 현재 국내 대량생산 공정을 통해 상업적 활용이 가능해진 상태이다.

S-45-5는 고농도 생균수 확보(≥10^9 CFU/g), 균일한 아포 형성, 배양 안정성, 그리고 높은 보관 내구성 등에서 경쟁력을 갖추고 있으며, 프로바이오틱스 원료로서의 안전성 확보를 위한 *in vitro* 및 *in vivo* 전임상 시험도 완료된 바 있다(Chathuranga 등, 2023). 현재 GRAS 등재 및 건강기능식품 기능성 원료 등록을 위한 독성시험이 진행 중이며, 국내 프로바이오틱스 시장 내 수입균주 대체를 위한 실질적 자원으로 주목받고 있다. 이에 따라 본 연구에서는 *C. butyricum* S-45-5 균주의 확보에서부터 대량생산, 안전성 검증에 이르는 산업

화 과정을 논의하고자 한다.

Ⅱ. 본론

2.1. 재료 및 방법

2.1.1. 균주의 확보 및 동정

C. butyricum S-45-5 균주는 한국생명공학연구원에서 모유수유 중인 건강한 유아의 분변에서 분리된 국내 유래 균주로, 아포 형성 능력, 극한 환경 내성, 균질한 생육 특성 등을 기반으로 선별되었다. 초도 분리 이후 형태학적 관찰, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석, 기능적 스크리닝 등을 통해 *C. butyricum*으로 동정되었으며, 이후 산업화 가능성 평가를 거쳐 특정 균주(S-45-5)에 대한 기술이전이 이루어졌다.

2.1.2. 배양 및 대량생산 공정 개발

2.1.2.1. 배지 조건

C. butyriucm S-45-5 균주는 RCA (KisanBio Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 계대하였다. 고체배지는 AnaeroGen gaspack (OXOID Ltd, Basingstoke, UK)을 사용하여 혐기성 조건을 조성하였으며, 액체배지는 질소(N_2) 가스로 산소를 치환하여 혐기 환경을 확보하였다. 접종 및 배양 과정에서는 엄격한 혐기 상태 유지를 위해 배양 전 과정에서 지속적으로 N_2 가스를 주입하였다.

2.1.2.2. 대량생산 공정 개발

C. butyricum S-45-5 균주는 혐기성 조건에서 5 L 규모의 Fermenter (MARAOD-05D-PS, BIOCNS Co., Ltd., Daejeon, Korea)부터 5,000 L 규모의 Fermenter (5KL Fermenter, BIOCNS Co., Ltd.)를 이용하여 배양하였다. 배양 성능 평가는 생균수(CFU/mL), 아포 형성률 등을 기준으로 수행하였다. 생균수는 표준 도말법을 통해, 아포 형성은 열처리 후 검정하였다. 모든 공정 과정에 있어 대장균(*Escherichia coli*) 및 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)의 오염 여부를 확인하였다. 대장균 검출은 3M 페트리필름 대장균(Neogen Co., Lansing, MI, USA)을 사용하였고, 바실러스 세레우스 검출은 MYP Agar (OXOID Ltd, Basingstoke, UK)를 사용하여 수행하였다. 또한, 건조 후 12개월 동안 생존율을 평가하였다. 반복 생산 과정에서 균주 특성, 생균수, 대사산물 일관성을 확인하여 산업적 생산 가능성을 검증하였다.

2.1.3. 프로바이오틱스 안전성 평가

모든 프로바이오틱스 안정성 평가 시험은 한국미생물보존센터(KCCM, Sooul, Korea)에 의뢰하였으며, 건강기능식품 기능성 원료 프로바이오틱스 안전성 평가 가이드 안내서-1124-02(2022.09.29. 개정)에 따라 수행하였다(MFDS, 2022).

2.1.3.1. 독성 생성

배지는 RCA (Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였다. Caco-2 세포주를 대상으로 수행하였고, Cytotoxicity Detection KitPLUS (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하였다. 또한 *E. coli* O157:H7을 양성 대조군으로 사용하여 비교하였다. S-45-5 균주와 양성 대조군 균주는 Caco-2 cell에 각각 10^7, 10^8, 10^9 CFU/well의 농도로 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 24시간 배양된 96-well plate (SPL Life science, Pocheon, Korea)에 Kit를 처리하여 반응시킨 뒤, microplate reader (Infinite F50, Tecan Group Ltd., Mannedorf, Swiss)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Cytotoxicity (%)은 다음 식과 같이 계산하였다.

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

2.1.3.2. 용혈 활성

시너지이노베이션사(Synergy Innovation Co.,

Ltd., Seongnam, Korea)의 혈액 한천 배지를 사용하였으며, 혈액 한천 배지에서의 용혈반응 판정을 위해 다음 균주를 대조군으로 사용하였다.

α-Hemolysis: *Streptococcus pneumoniae* (KCCM 41570)

β-Hemolysis: *Streptococcus pyogenes* (KCCM 40411)

γ-Hemolysis: *Streptococcus agalactiae* (KCCM 40417)

S-45-5 균주와 대조 균주를 활성 상태로 배양 후, 혈액 한천 배지에 획선으로 접종하여 용혈반응을 확인하였다.

2.1.3.3. 대사적 특성

D-Lactic acid production을 확인하기 위한 배지는 RCA (Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였다. S-45-5 균주의 D-lactate 농도는 Enzytec Liquid D-Lactic Acid Kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany)를 이용하여 측정하였다.

Bile salt deconjugation (BSH)을 확인하기 위한 배지는 상기의 RCA 배지와 Merck사(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구매한 taurodeoxycholic acid (TDCA) 5.0 g을 첨가하여 최종 농도 0.5%(w/v)가 되도록 제조한 RCA with TDCA 배지를 사용하였다. 또한 *Lactiplantibacillus plantarum* 균주를 대조군으로 사용하여 비교하였다. S-45-5 균주와 대조 균주를 RCA, RCA with 0.5%(w/v) TDCA, MRS Agar (Difco, Detroit, MI, USA) 및 MRS Agar with 0.5%(w/v) TDCA 배지에 각각 획선으로 접종하였으며, 배양 후 BSH 활성을 확인하였다.

2.1.3.4. 항생제 내성

배지는 RCA (Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며, 항생제 내성 평가를 위해 다음 9종의 항생제 strip을 사용하였다.

Erythromycin: EM 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Gentamicin: GM 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Vancomycin: VA 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Tetracycline: TC 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Clindamycin: CM 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Chloramphenicol: CL 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Streptomycin: SM 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Kanamycin: KM 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

Ampicillin: AM 0.016-256 μg/mL (BioMerieux, Lyon, France)

S-45-5 균주를 활성화 후 희석하여 멸균 면봉으로 배지에 lawn 형태로 접종하였으며, 항생제 strip을 배지 위에 적절한 거리를 유지하여 배치한 뒤 배양하였다. 배양 후 minimum inhibitory concentration (MIC)을 확인하였다.

2.2. 결과

2.2.1. *C. butyricum* S-45-5 균주의 산업화 과정

2.2.1.1. 대량생산 공정 개발

S-45-5의 대량 생산을 위해 혐기성 조건에서의 생장 곡선 분석, pH 및 온도 민감도, 탄소원 및 질소원 스크리닝 등 일련의 반응표면분석(Response Surface Methodology, RSM) 기반 최적화 실험이 수행되었다. 이를 통해 1.0×10^9 CFU/g 이상의 고농도 생균수 확보가 가능한 배양 조성 및 조건을 확립하였다. 이후 5-5000 L 규모의 다양한 배양기에서 배양 시험을 통해 균주 생장 일관성과 발효 탱크 간 스케일업 가능성을 검증하였으며, 최종적으로는 상업적 생산을 위한 공

정 설계를 완료하였다.

2.2.1.2. 생균수 확보, 균일성, 배양 안정성 등 주요 특징

개발된 공정에서 생산된 S-45-5는 평균 1.0×10^{10} CFU/g 이상의 생균수를 안정적으로 유지하며, 건조 후에도 12개월 이상 80% 이상의 생존율을 보였다. 또한 아포 형성률이 전체 생균의 80% 이상으로 확인되어 고온·건조·산성 등 다양한 외부 스트레스에 대한 내성이 확보된 제형화에 적합함과 저장 안정성 측면에서도 높은 수준의 내구성을 확보하였다. 반복 생산 공정 내에서 생균수, 아포 형성률, 주요 품질 지표들은 유의한 변동 없이 유지되었기 때문에, 이는 산업적 생산 조건 하에서도 균주의 안정성이 확보됨을 시사하였다. 이러한 결과는 장기적인 품질 관리 및 제품 균일성 확보 측면에서 S-45-5가 우수한 제조 적합성을 지님을 의미한다. 이는 대량생산 환경에서도 균주의 표현형 및 기능적 특성이 안정적으로 유지됨을 의미하며, 품질 관리 측면에서도 유리한 장점을 지닌다.

2.2.2. 프로바이오틱스 안전성 평가

프로바이오틱스 균주는 산업적 활용에 앞서 안전성이 과학적으로 검증되어야 한다. 특히 EFSA 및 FAO/WHO 가이드라인에 따르면, 신규 균주의 상업적 이용을 위해서는 용혈 활성, 독소 생성 가능성, 항생제 내성 전달 여부 등에 대한 평가가 필수적이다. 따라서 본 절에서는 *C. butyricum* S-45-5 균주에 대한 독성, 용혈 활성, 항생제 내성 등 안전성 검증 결과를 제시한다.

2.2.2.1. 독성 생성

C. butyricum S-45-5 균주의 세포독성 평가를 위해 Lactate Dehydrogenase (LDH) assay를 수행하였으며, 평가 결과 S-45-5 균주는 positive control 대비 유의하게 낮은 세포독성을 나타내어(Fig. 1), *in vitro* 조건에서 독성 생성 가능성이 낮음을 확인하였다. 추가적으로 균주의 독성 유전자 존재 여부를 확인하기 위해 마크로젠(Macrogen Inc., Daejeon, Korea)에서 수행한 전장 유전체 분석 결과, S-45-5 균주에서는 독성 관련 유전자가 검출되지 않았다.

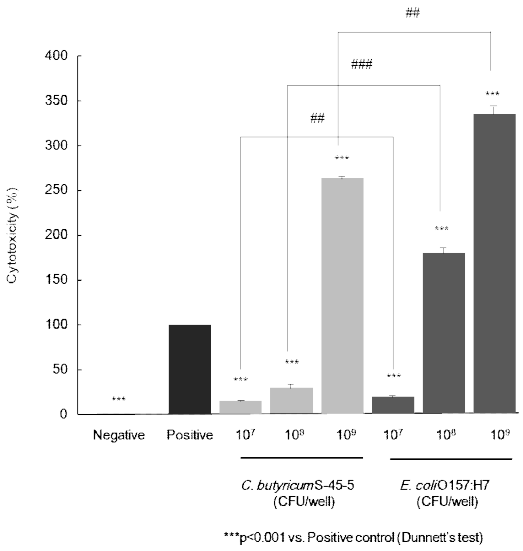


Fig. 1. Cytotoxicity of *C. butyricum* S-45-5 and *E. coli* O157:H7 measured by LDH assay. Cytotoxicity of Caco-2 cells was assessed according to the concentrations of the two strains. *C. butyricum* S-45-5 exhibited significantly lower cytotoxicity compared with the positive control strain ($^{\#\#}$ p<0.01, $^{\#\#\#}$ p<0.001).

2.2.2.2. 용혈 활성

혈액 한천 배지를 이용한 시험을 수행한 결과, Fig. 2에서 볼 수 있듯이 S-45-5 균주에서는 배양 후 혈액 한천 상에 용혈로 인한 반응이 관찰되지 않아 γ-hemolysis (음성)으로 판정되었다. 이는 균주가 용혈성을 나타내지 않음을 의미하며, 프로바이오틱스 원료로서 안전한 특성을 확인하였다.

2.2.2.3. 대사적 특성

C. butyricum S-45-5 균주의 대사적 안전성을 평가하기 위해 D-lactate 생산 여부와 BSH 활성 시험을 수행한 결과, S-45-5 균주는 D-lactate의 광학이성질

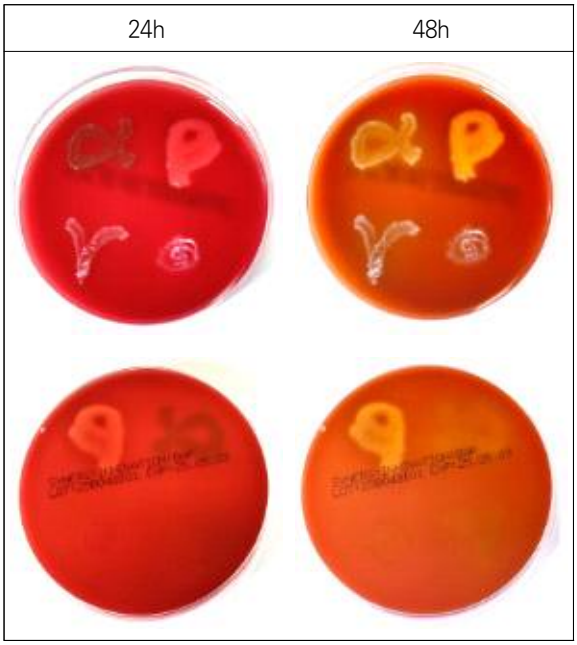


Fig. 2. Hemolytic activity of *C. butyricum* S-45-5 and the control strain after 24 and 48h of incubation. The test strain was *C. butyricum* S-45-5, while the control strain exhibited α-, β-, and γ-hemolysis. *C. butyricum* S-45-5 showed no hemolytic activity (γ-hemolysis) after 24 and 48h of incubation on blood agar plates.

체를 생성하지 않는 것으로 확인되었다. 또한, BSH 활성은 음성으로 확인되어(Fig. 3) 담즙산 대사와 관련된 잠재적 위험이 없는 것으로 판단되었다.

2.2.2.4. 항생제 내성

항생제 감수성 평가는 E-test를 이용하여 최소 억제농도(MIC)를 측정하였다. 측정 결과, 총 9종의 항생제 Ampicillin, Vancomycin, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Erythromycin, Clindamycin, Tetracycline, Chloramphenicol 중 Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin에서 European Food Safety Authority (EFSA)에서 제시하는 그람양성균 기준 MIC cut-off를 초과하는 수치가 확인되었다. 측정 결과는 Table 2 및 Fig. 4와 같다. 이는 *C. butyricum* S-45-5 균주가 표현형적 수준에서 특정 항생제에 대한 내성을 보유함을 확인하였으나, 표현형적 내성뿐만 아니라, 내성 유전자의 존재 여부 및 전이 가능성까지 고려해야 하므로 본 균주에 대한 항생제 내성 관련 유전자 분석을 추가로 수행하였다.

2.2.2.5. 항생제 내성 유전자 분석

유전체 기반 항생제 내성 유전자 탐색은 ABRicate (MEGARes DB)를 활용하여 수행되었다. 탐색 결과, 항생제 내성 유전자는 검출되지 않았으며, 수평적 유전자 이동(Horizontal Gene Transfer, HGT) 가능성을 평가하기 위해 HGTector2를 사용한 분석에서도 외부

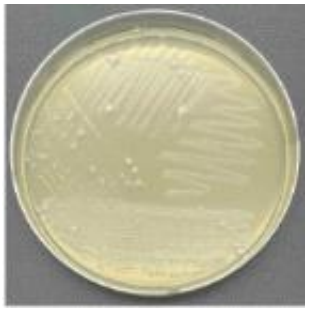
	Strain name	RCA	RCA with 0.5% (w/v) TDCA
Test strain	*C. butyricum* S-45-5		

Fig. 3. Representative culture images of strain *C. butyricum* S-45-5 and the control strain after incubation. Comparison with the control strain showing that *C. butyricum* S-45-5 was negative for bile salt hydrolase activity.

		MRS Agar	MRS Agar with 0.5% (w/v) TDCA
Positive control	*L. plantarum* KCCP 15022		

Fig. 3. Continued

Table 2. E-test MIC cut-off values for nine antibiotics against *C. butyricum* S-45-5

Antibiotics	Cut-off value (μg/mL)	MIC (μg/mL)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	1	0.125	S[1)]	Acceptable
Vancomycin	2	0.75	S	Acceptable
Gentamicin	4	6	R[2)]	Not acceptable
Kanamycin	16	24	R	Not acceptable
Streptomycin	8	64	R	Not acceptable
Erythromycin	0.5	0.5	S	Acceptable
Clindamycin	0.25	0.094	S	Acceptable
Tetracycline	2	0.064	S	Acceptable
Chloramphenicol	2	0.38	S	Acceptable

[1)] Susceptible.
[2)] Resistant.

로부터 획득된 내성 유전자는 확인되지 않았다. 이러한 결과는 S-45-5 균주가 표현형적으로 일부 항생제에 내성을 보일 수 있으나, 그 내성이 유전자적으로 획득된 것이 아니며, 다른 미생물로 전이될 가능성 또한 매우 낮음을 의미한다. 따라서 본 균주는 EFSA가 제시하는 프로바이오틱스 안전성 평가 기준을 충족하는 것으로 판단된다.

2.2.3. 프로바이오틱스 안전성 평가 결론

C. butyricum S-45-5 균주는 항생제 내성, 독성, 용혈활성 등 다양한 안전성 평가 항목에서 EFSA 등 주요 국제 기준을 충족하며, 인체 섭취에 있어 위해 우려가 없는 것으로 판단된다. 본 시험은 한국미생물보존센터에 의뢰하여 수행되었으며, 결과를 확인하였다. 현재 본 균주는 국내 개별인정형 원료 등록과 미국 FDA GRAS 절차가 진행 중이며, 본 자료는 관련 등록 과정의 근거 자료로 활용될 예정이다.

2.2.4. 종합 고찰 및 산업적 의의

2.2.4.1. 국내 유래 낙산균 상용화의 필요성

국내 프로바이오틱스 산업은 지속적인 성장세를 보이고 있으나, 상당수 제품이 해외 균주에 의존하고 있으며, 국내에서 분리·개발된 균주의 상용화 사례는



Fig. 4. E-test for the determination of antibiotic resistance of selected strain. Results of E-test MIC for nine antibiotics in *C. butyricum* S-45-5. *C. butyricum* S-45-5 exhibited MIC values exceeding the EFSA cut-off criteria for Gram-positive bacteria in gentamicin, kanamycin, and streptomycin. Therefore, additional analysis of antibiotic resistance-related genes was performed.

여전히 제한적이다. 특히 *C. butyricum* 계열의 경우, 대부분 일본에서 상용화된 균주가 시장을 선도하고 있으며, 국내 제품 역시 해당 수입 균주를 기반으로 하는 경우가 많다. 이에 따라 국내 환경과 장내 미생물 생태계에 보다 적합한 국내 유래 균주의 발굴 및 산업화는 수입 의존도를 낮추고, 장기적으로는 균주 주권 확보 및 지속 가능한 산업 생태계 구축에 기여할 수 있다. 또한, 한국 소비자의 특성과 건강 이슈에 적합한 맞춤형 프로바이오틱스 개발을 위한 기반이 마련된다는 점에서 전략적 가치가 크다.

2.2.4.2. *C. butyricum* S-45-5 균주의 경쟁력 및 차별성

본 연구에서 소개한 *C. butyricum* S-45-5는 국내 유아 유래 분변에서 분리된 균주로, 높은 생균수 확보 능력, 아포 형성률, 장기 저장 안정성 등 산업화에 유리한 특성을 보였다. 특히, 파일럿 및 플랜트 대량 배양 과정에서도 균주의 생리적 특성과 품질이 일관되게 유지되었으며, 건조 후 생존율 역시 상업적 기준을 상회하는 수준으로 확인되었다. 이는 일본의 MIYAIRI 588이나 중국의 CGMCC0313과 같은 기존 상용 균주와 비교하였을 때, 경쟁력 있는 품질 특성과 공정 적합성을 갖춘 것으로 평가된다. 또한, 독성 시험과 항생제 내성 평가를 포함한 안전성 평가에서도 국제 기준과의 부합성이 확인되어 향후 글로벌 시장 진출을 위한 기반을 확보한 셈이다.

2.2.4.3. 국가 경쟁력 확보 및 산업 발전 시사점

S-45-5와 같은 국내 균주의 상용화는 단순히 균주 자립화를 넘어, 국가 식의약 산업 전반의 경쟁력 강화를 의미한다. 특히 건강기능식품, 일반식품, 반려동물 사료, 사료첨가제 등 다양한 응용 분야에서 활용 가능성이 높으며, 국산 균주를 활용한 제품 포트폴리오의 다양화는 산업의 지속가능성을 높이는 요인이 될 수 있다. 더불어, GRAS 획득, EFSA 기준 부합성 확보 등 국제 규격에 기반한 원료 등록이 가능할 경우, 향후 수출 시장 확대 및 글로벌 브랜드 형성에도 기여할 수 있다. 국내 생물자원 기반의 고부가가치화 전략 측면에서도 의미 있는 사례로 활용될 수 있을 것이다.

2.2.4.4. 후속 임상시험 및 연구 계획

현재 S-45-5에 대한 건강기능식품 원료화를 위한 인체적용시험이 설계 중이며, 면역 기능성 중심의 개별인정형 등록을 목표로 8-12주 투여 기반의 임상시험이 진행될 예정이다. 주요 평가 항목으로는 Natural Killer (NK) 세포 활성도, 면역글로불린 분비량 등 면역 지표가 설정되었으며, 시험 설계 및 사전 자료 검토가 완료된 상태이다. 향후에는 면역 기능 외에도 비만, 피부, 대사 기능 등 다양한 타깃에 대한 기전 연구 및 기능성 평가를 확장할 계획이며, 이를 통해 S-45-5 기반 제품의 다각화 및 장기적 시장 경쟁력을 확보하고자 한다.

Ⅲ. 결론

본 연구에서는 국내 유래 낙산균 *C. butyricum* S-45-5 균주에 대한 대량생산 공정 확립과 안전성 평가를 통해 산업화 가능성을 검토하였다. 일본의 MIYAIRI 588, 중국의 CGMCC0313 등 해외 상용 균주와 비교하였을 때, S-45-5는 국내 유래 균주로서 높은 생존율과 배양 안정성, 균일한 품질 특성을 바탕으로 산업적 활용에 적합한 조건을 갖춘 것으로 확인되었다. S-45-5는 모유 수유기 한국 유아의 분변에서 분리된 균주로, 국내 식품환경 및 소비자 특성과의 적합성을 고려할 때 기능성 프로바이오틱스 개발의 유망한 소재로 평가된다. 또한 대량생산 공정의 안정성 확보와 함께, GRAS 취득을 위한 독성시험 및 국제 기준 기반의 안전성 평가가 병행되고 있어 향후 건강기능식품, 기능성 일반식품, 사료첨가제 등 다양한 산업 분야로의 확장이 가능할 것으로 기대된다. 결론적으로, 본 연구는 국산 낙산균 균주의 산업화를 위한 실질적 자료를 제시함으로써 수입균주 대체 및 국가 경쟁력 확보의 기반을 마련하였으며, 향후 S-45-5의 기능성 검증과 글로벌 규격 등록을 위한 후속 연구를 통해 국내 프로바이오틱스 산업의 고도화에 기여할 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발한 *C. butyricum* S-45-5 균주에 대해서는 현재 건강기능식품 원료화 및 GRAS 인증 획득을 목표로 독성 평가가 진행 중이며, 향후 안전성 자료를 바탕으로 국내외 시장 진출을 위한 기반을 마련할 예정이다.

Conflict of Interests

No potential conflict of interest relevant to

this article was reported.

ORCID

Hyeong-Woo Kim
https://orcid.org/0000-0002-5606-1318
Sung-Oh Sohn
https://orcid.org/0000-0002-0605-6270
Jong-Keun Kim
https://orcid.org/0009-0001-3574-4048

참고문헌

Bertuccioli A, Cardinali M, Zonzini G, Neri M, Palazzi CM, Gregoretti A, Cazzaniga M, Di Pierro F. *Clostridium butyricum* strain MIYAIRI 588 (CBM588) as a precision probiotic therapy in the ketogenic diet: A possible application? Microbiol Res, 14, 492-506 (2023)

Chathuranga K, Shin Y, Uddin MB, Paek J, Chathuranga WAG, Seong Y, Bai L, Kim H, Shin JH, Chang YH, Lee JS. The novel immunobiotic *Clostridium butyricum* S-45-5 displays broad-spectrum antiviral activity *in vitro* and *in vivo* by inducing immune modulation. Front Immunol, 14, 1242183 (2023)

Durre P. Physiology and sporulation in *Clostridium*. Microbiol Spectr, 2, 0010-1128 (2014)

Guo P, Zhang K, Ma X, He P. *Clostridium* species as probiotics: Potentials and challenges. J Anim Sci Biotechnol, 11, 24 (2020)

Hagihara M, Ariyoshi T, Kuroki Y, Eguchi S, Higashi S, Mori T, Nonogaki T, Iwasaki K, Yamashita M, Asai N, Koizumi Y, Oka K, Takahashi M, Yamagishi Y, Mikamo H. *Clostridium butyricum* enhances colonization resistance against *Clostridioides difficile* by metabolic and immune modulation. Sci Rep, 11, 15007 (2021)

Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. Cell Host Microbe, 13, 711-722 (2013)

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. The ISAPP consensus statement on the appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 11, 506-514 (2014)

Jia L, Shan K, Pan LL, Feng N, Lv Z, Sun Y, Li J, Wu C, Zhang H, Chen W, Diana J, Sun J, Chen YQ. *Clostridium butyricum* CGMCC0313.1 protects against autoimmune diabetes by modulating intestinal immune homeostasis and inducing pancreatic regulatory T cells. Front Immunol, 8, 1345 (2017)

Li H, Liu X, Shang Z, Qiao J. *Clostridium butyricum* helps alleviate inflammation in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. Front Vet Sci, 8, 683863 (2021)

Li W, Xu B, Wang L, Sun Q, Deng W, Wei F, Ma H, Fu C, Wang G, Li S. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, gut microbiota and intestinal barrier function of broilers. Front Microbiol, 12, 777456 (2021)

Liang J, Kou S, Chen C, Raza SHA, Wang S, Ma X, Zhang W, Nie C. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, metabonomics and intestinal microbial differences in weaned piglets. BMC Microbiol, 21, 85 (2021)

Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligne B, Ganzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, Smid EJ, Hutkins R. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. Curr Opin Biotechnol, 70, 165-171 (2017)

Markowiak P, Slizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients, 9, 1021 (2017)

MFDS. Guidelines for the safety evaluation of probiotic raw materials for health functional foods. Final Report of MFDS, Guideline-1124-02 (2022)

Sato T, Kudo D, Kushimoto S. Association between

nutrition protocol with *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 and reduced incidence of *Clostridioides difficile* infection in critically ill patients: A single--center, before-and-after study. Surg Infect, 23, 483-488 (2022)

Seki H, Shiohara M, Matsumura T, Miyagawa N, Tanaka M, Komiyama A, Kurata S. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. Pediatr Int, 45, 86-90 (2003)

Stoeva MK, Garcia-So J, Justice N, Myers J, Tyagi S, Nemchek M, McMurdie PJ, Kolterman O, Eid J. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. Gut Microbes, 13, 1907272 (2021)

Sun YY, Li M, Li YY, Li LX, Zhai WZ, Wang P, Yang XX, Gu X, Song LJ, Li Z, Zuo XL, Li YQ. The effect of *Clostridium butyricum* on symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Sci Rep, 8, 2964 (2018)

Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Kamiya S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol, 41, 219-226 (2004)

Tran NT, Li Z, Ma H, Zhang Y, Zheng H, Gong Y, Li S. *Clostridium butyricum*: A promising probiotic confers positive health benefits in aquatic animals. Rev Aquac, 12, 2573-2589 (2020)

Xiong XM, Yuan YJ. Progress on the studies and application of *Clostridium butyricum*. Chin J Microecol, 23, 1143-1145 (2011)

Yamamoto M, Ohmori H, Takei D, Matsumoto T, Takemoto M, Ikeda M, Sumimoto R, Kobayashi T, Ohdan H. *Clostridium butyricum* affects nutrition and immunology by modulating gut microbiota. Biosci Microbiota Food Health, 41, 30-36 (2022)

Yang CM, Cao GT, Ferket PR, Liu TT, Zhou L, Zhang L, Xiao YP, Chen AG. Effects of probiotic *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. Poult Sci, 91, 2121-2129 (2012)

Yang Y, Shao Y, Pei C, Liu Y, Zhang M, Zhu X, Li J, Feng L, Li G, Li K, Liang Y, Li Y. Pangenome analyses of *Clostridium butyricum* provide insights into its genetic characteristics and industrial application. Genomics, 116, 110855 (2024)

Zhao MM, Shan HS, Shen YH, Zhang C, Liu L, Gong DQ. Research progress on the application of *Clostridium butyricum* in livestock and poultry production. Chinese J Anim Nutr, 30, 2467-2472 (2018)

Zhao Q, Yang WR, Wang XH, Li GQ, Xu LQ, Cui X, Liu Y, Zuo XL. *Clostridium butyricum* alleviates intestinal low-grade inflammation in TNBS-induced irritable bowel syndrome in mice by regulating functional status of lamina propria dendritic cells. World J Gastroenterol, 25, 5469-5482 (2019)