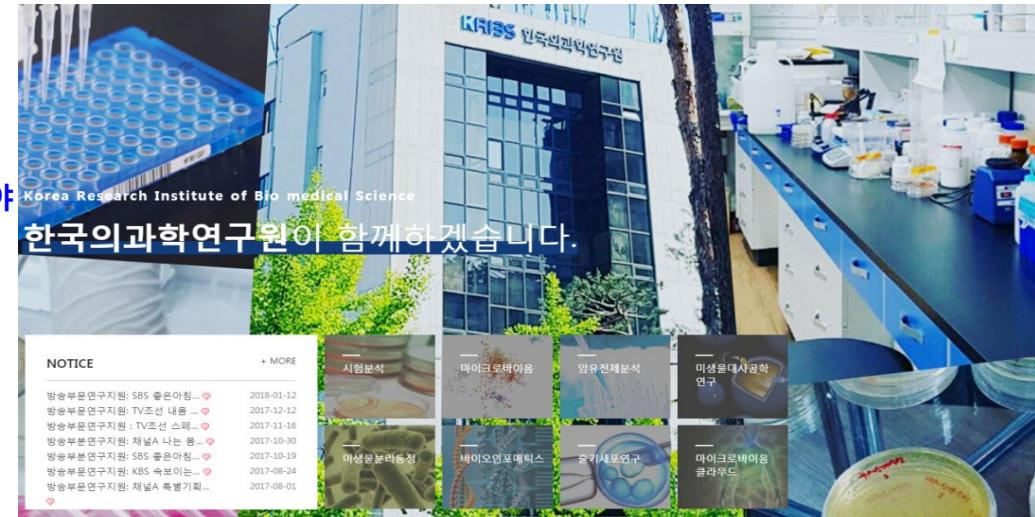


Korea Research Institute of Bio-medical Science

I -1. About KRIBS

A research institute established mainly by retired researchers in the life sciences field.



본원 : 대전 소재

2

연구개발의 목표 및 내용

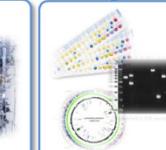
마이크로바이옴 타겟 프로바이오틱스 발굴 및 소자화 기술 개발
(마이크로바이옴 기반 DB제공, 제품화 8건 이상, 매출액 80억 이상)

목표

인체 마이크로바이옴 타겟 프로바이오틱스 규주 발굴, 종균화 및
대량생산 기술을 통한 산업화



질병 타겟 신규
프로바이오틱스 탐색



신규 프로바이오틱스의
안전성 평가



동물모델에서
마이크로바이옴
연구



전장유전체
염기서열 확보 및
건강 기능성
유전자 탐색 및
기능성 연구



질병 모델에서
마이크로바이옴과
기능성 평가



개발 소재 제작화

건국대
산학협력단

가천대
산학협력단

한국의과학
연구원

단국대
산학협력단

세계
김치연구소

(주)녹십자웰빙

I -1. About KRIBS

미생물을 활용한 산업분야 응용

Research experience closely related to daily life

**Optimal ripening conditions
related to microorganisms
in kimchi refrigerators**



**Improved vehicle air conditioner odor
using microorganisms**



**Functional food research using
microorganisms**



**Improvement of odor microorganisms
in dryer**



NGS
(Next Generation Sequencing)



High Performance Gas Chromatography Mass Spectroscopy

I -1. About KRIBS

Conducting joint research with industry, academia, and research institutes related to bio.

한국의과학연구원

장내세균분석 수행을 통해 Date를 측정하고 이를 공유하여 한국인의 장내 미생물군집 지도를 완성함. World wide Gut microbiome Project를 공동 수행.



한국의과학연구원

산업계

프로바이오틱스와 한국인의 장내 미생물군집 상관성을 확인하고 효과적인 제품 개발을 도모.



의료기관 병/의원

처방과 치료에 따른 장내 미생물군집의 변화를 Monitoring하고, 결과 지향의 장내환경 개선을 촉진.



학교/연구기관/언론기관

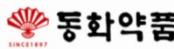
장내 미생물군집 분야에 활발한 연구활동을 통해 학술적인 체계를 확립하고 대국민 홍보.



Collaborate Partners



LG Chem



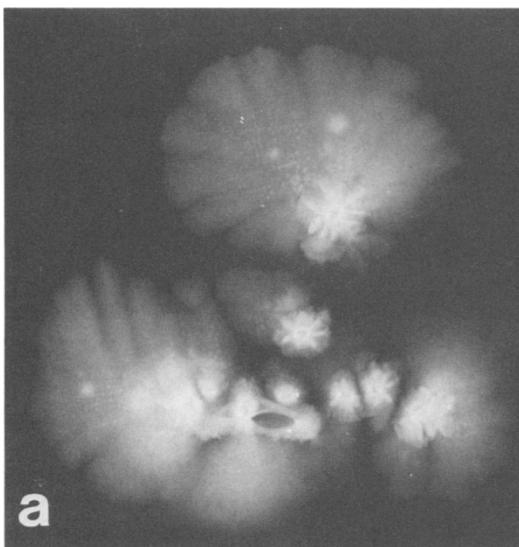
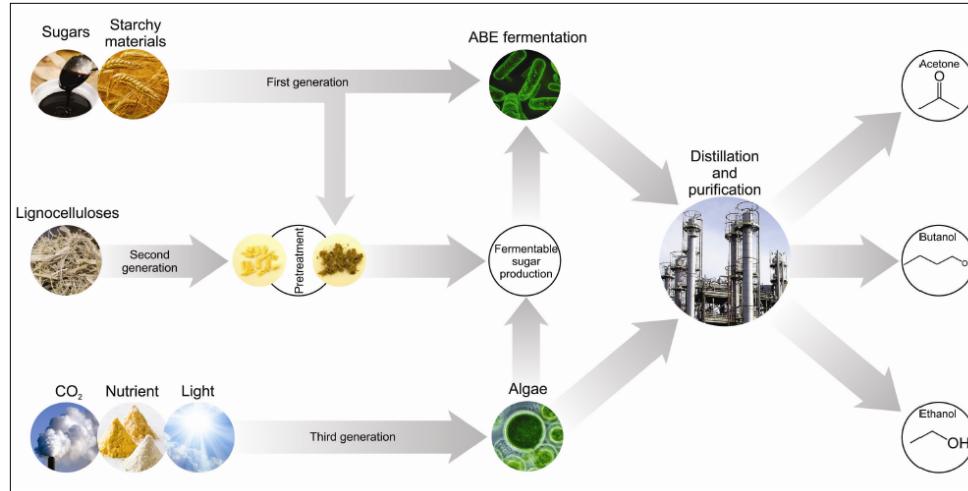
TS 대한제당



Exploration and R&D of resource microorganisms

II-1. Discovery of resource microorganism

Key microorganisms for bioethanol butanol production found in soil



APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 1989, p. 970-976
0099-2240/89/040970-07\$02.00/0
Copyright © 1989, American Society for Microbiology

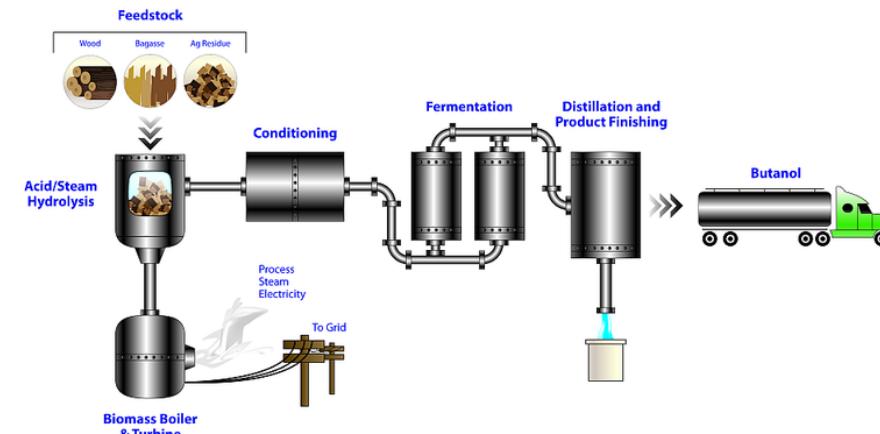
Isolation and Characterization of Mutants of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Deficient in Acetoacetyl-Coenzyme A:Acetate/Butyrate:Coenzyme A-Transferase (EC 2.8.3.9) and in Other Solvent Pathway Enzymes

SANDRA W. CLARK, GEORGE N. BENNETT, AND FREDERICK B. RUDOLPH*

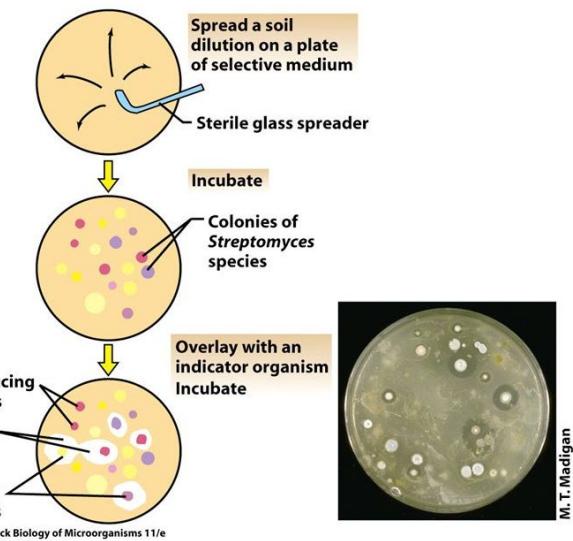
Department of Biochemistry, Rice University, P.O. Box 1892, Houston, Texas 77251

Received 14 November 1988/Accepted 19 January 1989

FIG. 1. Colony morphology on RCM. (a) *C. acetobutylicum* ATCC 824; (b) 2-BB mutant D; (c) M3; (d) M5; (e) 2-BB mutant R.



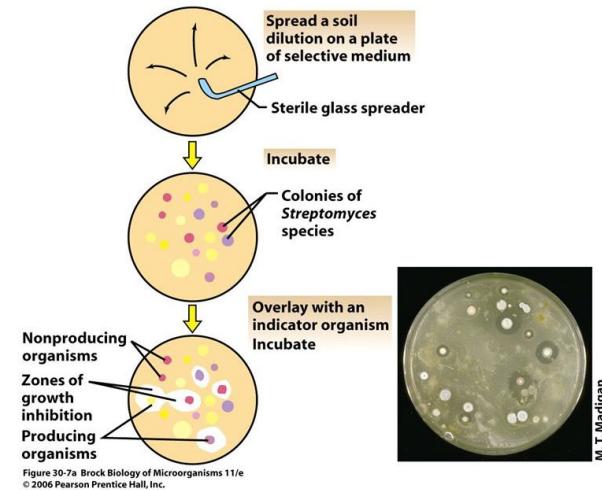
Vol. 55, No. 4



II - 1. Discovery of resource microorganism

Culture, pure separation, and identification analysis of soil samples from 9 regions

Biobutanol synthetic strain discovery project process



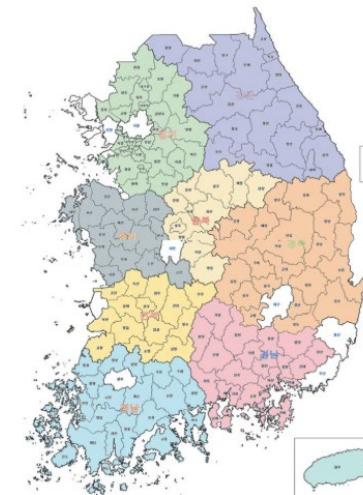
Nationwide soil sample collection
9개의 관할지역을 대상으로 토양 시료 수집

Genomic DNA prep.
토양시료에서 gDNA 추출

Culture
1차 선별된 시료에 대한 선택배양

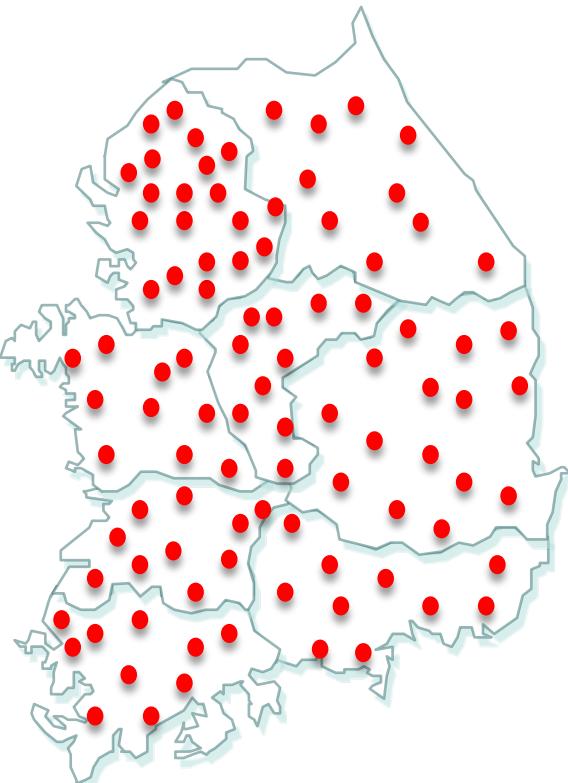
Pre screening
추출된 gDNA를 대상으로 Metagenome 및 Real-Time PCR 진행

Pure separation and identification
배양된 colony를 분리하여 재배양 후 gDNA prep 후 16s rRNA 동정



II-1. Discovery of resource microorganism

Soil collection to discover resource microorganisms



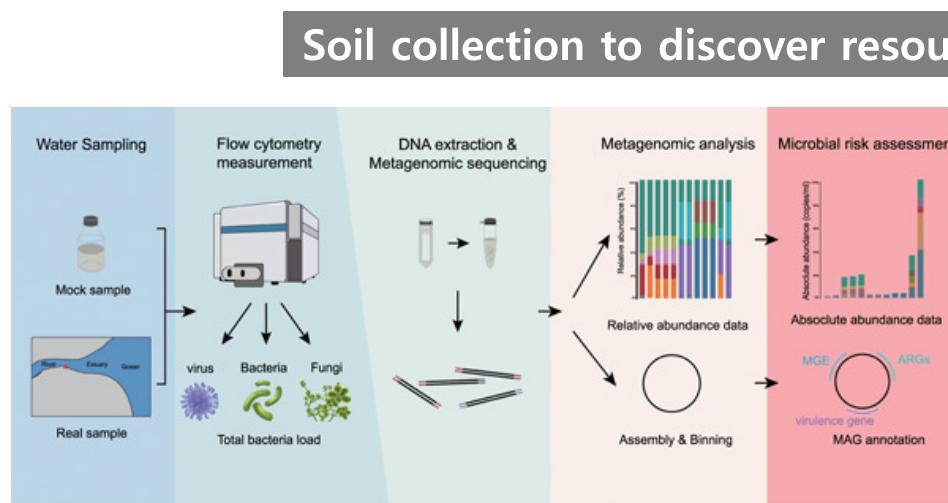
각 수집 장소 당
100개의 시료 수집

관할지역	수집장소
경기도	40
강원도	20
전라남도	20
전라북도	20
충청남도	20
충청북도	20
경상남도	20
경상북도	30
제주도	10
합계	200
총 대상시료	20,000



II-1. Discovery of resource microorganism

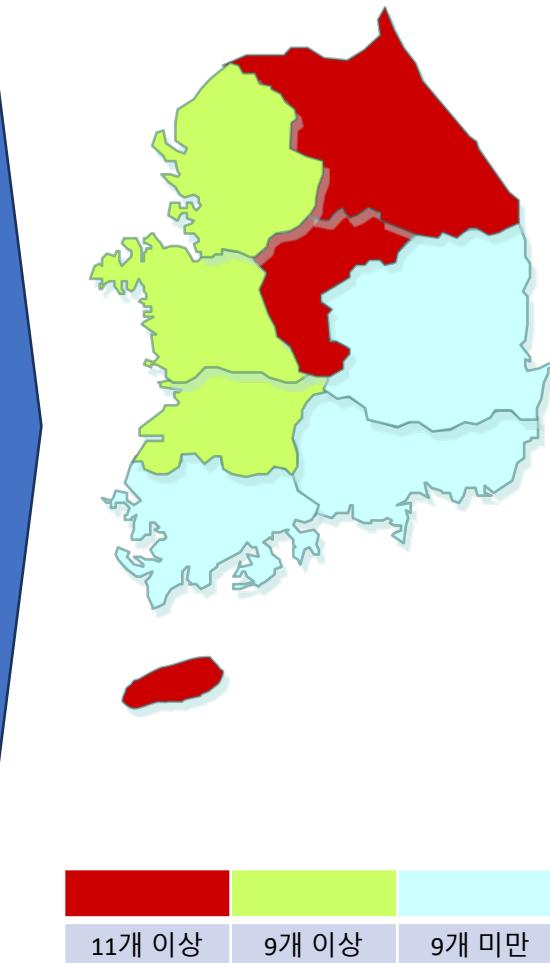
Metagenomic screening and RT-PCR primer setup and pre-screening



Sequence alignments showing conserved regions across various Clostridium species and strains. The alignments are divided into two sections:

- Section 13:** Positions 913 to 988. Labeled with 'Consensus' at position 913.
- Section 16:** Positions 1171 to 1248. Labeled with 'Consensus' at position 1171.

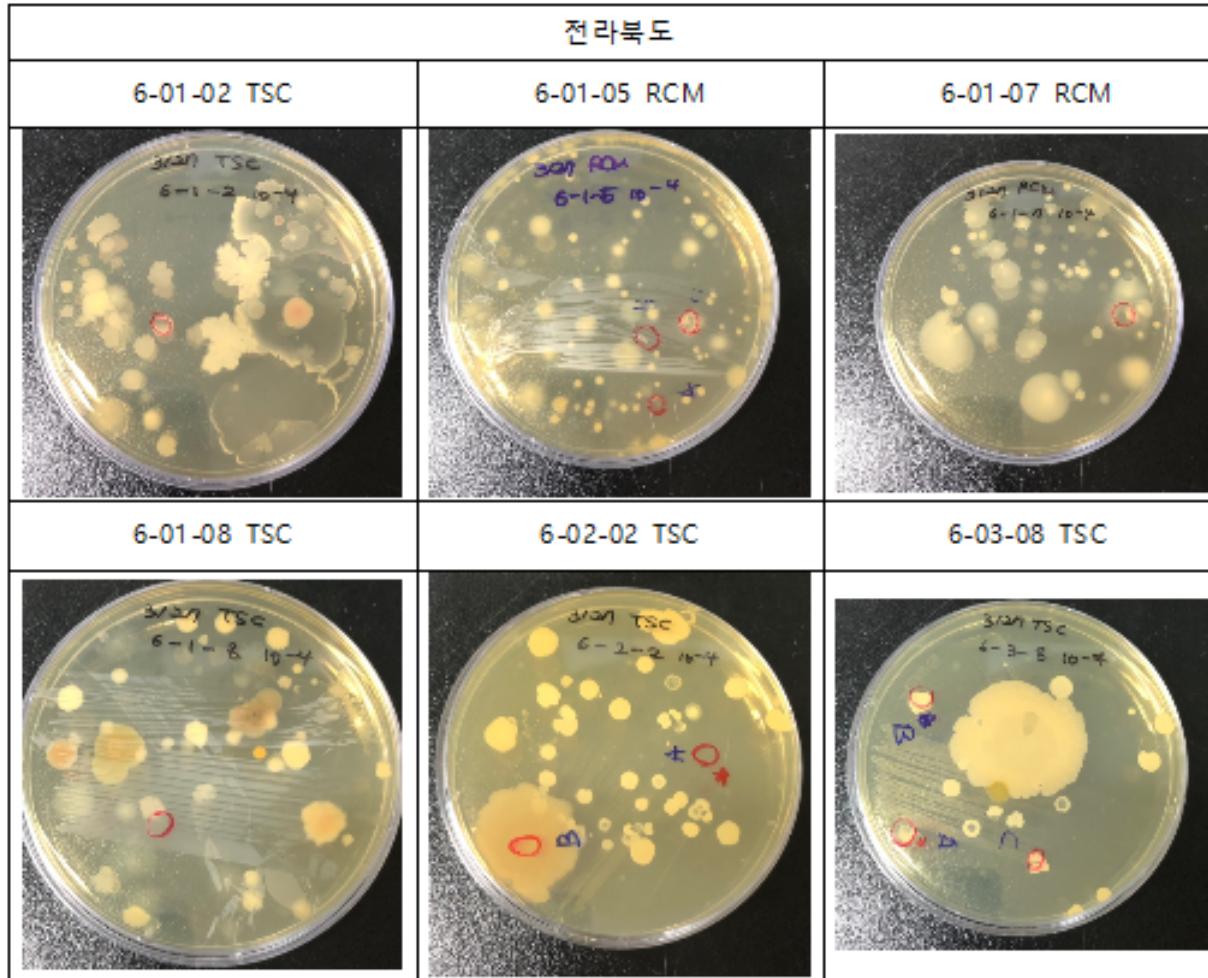
Red boxes highlight specific sequence segments in the alignments.



관할지역	검출결과
경기도	10
강원도	14
전라남도	8
전라북도	10
충청남도	10
충청북도	14
경상남도	8
경상북도	5
제주도	15
합계	94

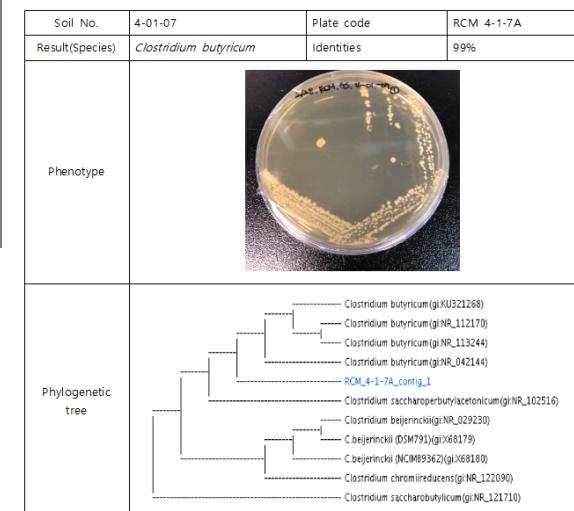
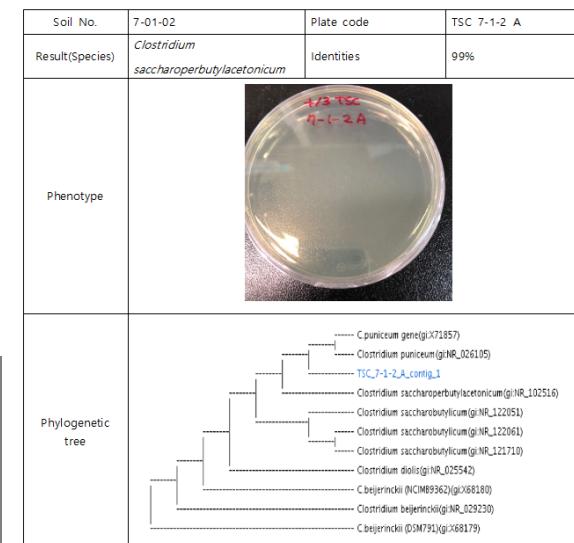
II-1. Discovery of resource microorganism

Resource microorganisms were secured from 94 soil samples selected through pre-screening.



A total of 115 strains were isolated, of which 47 were Clostridium sp.

Two unregistered Clostridium sp species that synthesize butanol were isolated.R



KCTC 생물자원센터 Korean Collection for Type Cultures

1. 접수
반드시 담당자와 먼저 상의하여 주시기 바랍니다.
제반 서류와 기탁자원을 접수합니다.(방문, 우편, 이메일)
* 원기탁신청서, 입금내역서와 균주를 같이 보내주셔야 접수가 됩니다.

STEP1. 접수

2. 심사
기탁서류와 미생물을 심사합니다. 거부될 경우 보완 후 재접수하시기 바랍니다.

STEP2. 생존시험
기탁하신 미생물이 자라지 않거나 오염된 상태인 경우 재기탁이 필요합니다.
* 심사종료 및 생존시험이 시작된 후에는 특허청 규정에 따라 환불되지 않습니다.

3. 번호부여
생존 시험에 통과하지 못한 경우, 수탁거부 통지서가 발행됩니다.

4. 보존
동결건조된 미생물은 저온실이나 액체질소 탱크에 30년간 보존합니다.

5. 기탁증명서 발행
특허 기탁 진행은 생존시험 및 보존 후 2~3주 정도 소요됩니다.
기탁 미생물의 기탁번호가 부여된 기탁증명서를 이메일로 발송해 드립니다.
최초 발행되는 기탁증명서로 기탁 당시 기탁 미생물의 생존 시험서를 같을 수 있습니다.

국립농업과학원 농업미생물은행 Korean Agricultural Culture Collection(KACC)

접수 → **심사** → **생존시험** → **Yes**: **보존 및 재생확인**, **동일확인요청** → **수탁증 발급**
No: **고지서 발급**, **수수료입금확인** → **수탁증 발급**, **수탁거부**

특허 기탁 신청서(국내)

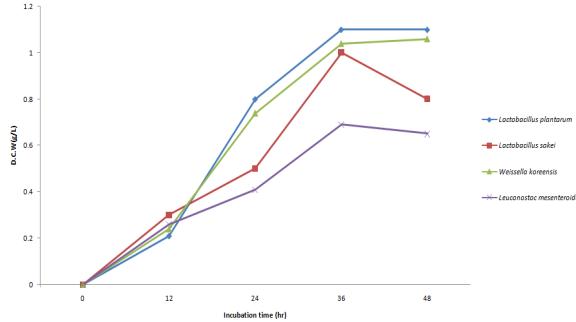
특허 기탁 신청서(국외)

특허 미생물 국내 기탁 신청서

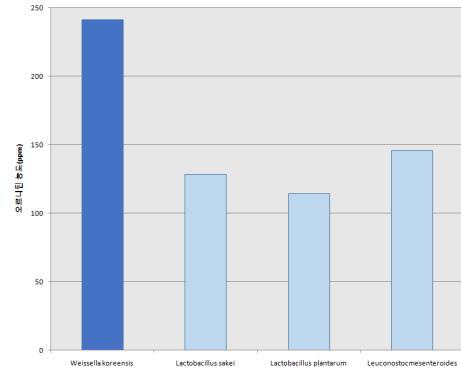
KACC 귀화

II-3. Resource microorganism patent registration

유산균 선정을 위한 생장을 분석



유산균 선정을 위한 오르니틴 분석



HUNGARIAN TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1

TO: KoreaNDLAB
KoreaNDLAB
303, Cheonjung-ro, Wanju-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Weissella koreensis</i> ND824	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: KCTC 13838BP
--	---

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

[] a scientific description

[] a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on April 17, 2019.

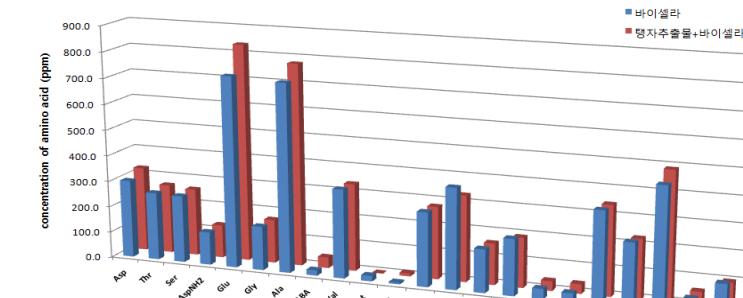
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

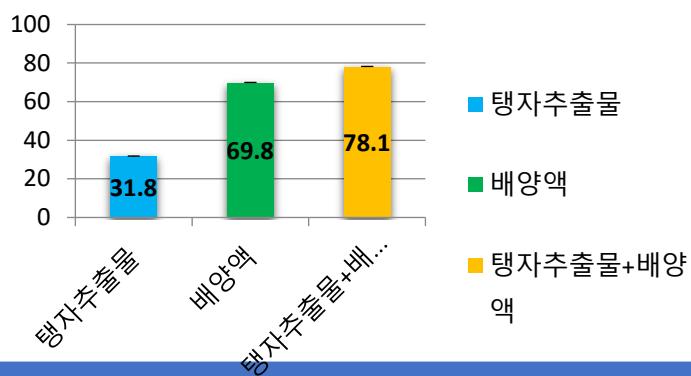
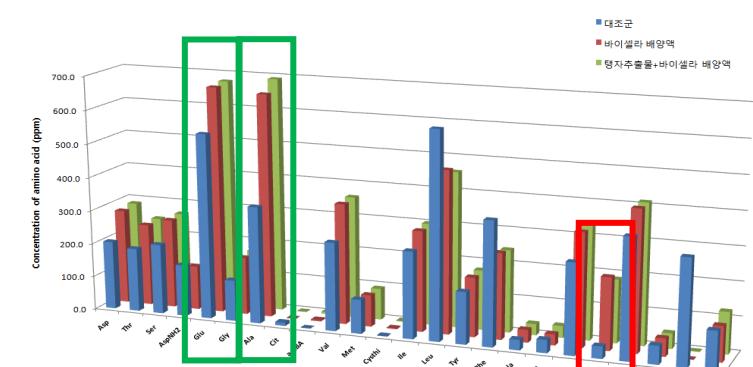
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipusi-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56112 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>Sang-Gun Kim</i> KIM, Sang-Gun, Director Date: April 17, 2019
--	--

Form BP4 (KCTC Form 17)

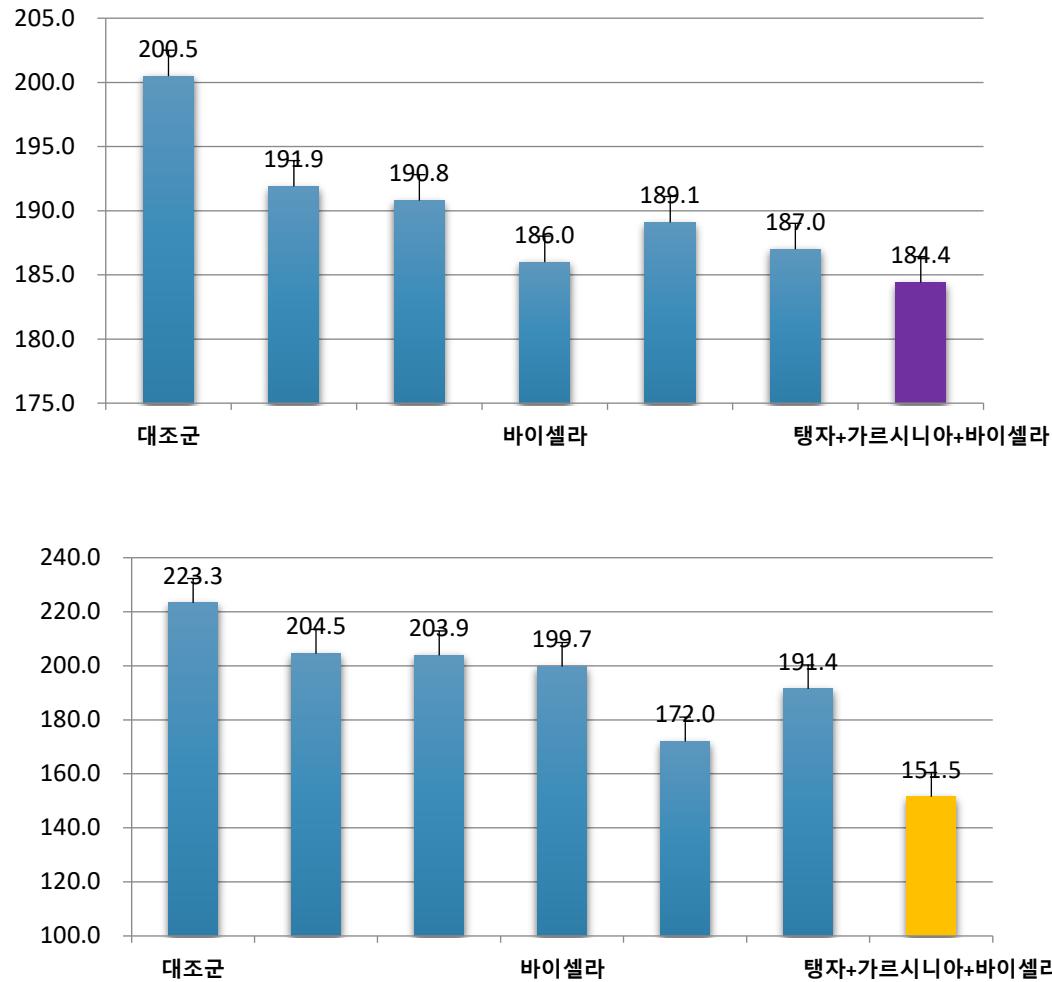
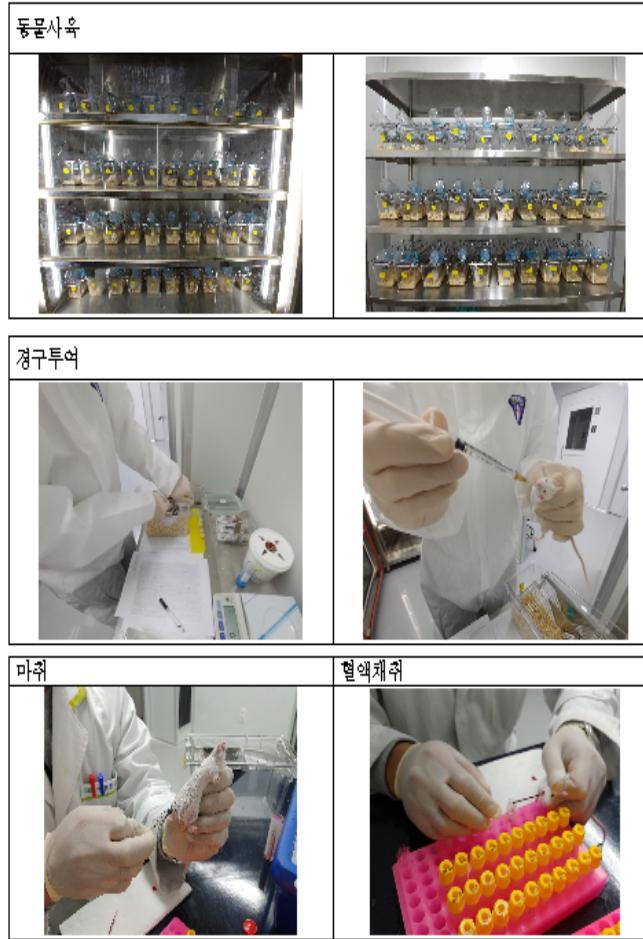


선정된 유산균 특허미생물 기록

1 ATTGCAATGA GTGGCGAACG GGTGAGTAAC ACGTGGAAAA CCTACCTCTT
ACCGAGGGAT AACATTGGA ACAAAATGCT AATACCGTAT AATAATTTAA
101 ACCGCATGGT TTAGTTTAAAT AGAAGTGGCT TGCTATCATC AAGAGATGGT
151 CCCGGGGTGT ATTAGTTAGT TTGTGAGGTA ATGGCTCACCC AAGAACATGA
201 TACATAGCCG AGTTGAGAGA CTGACCGGGCC ACAATGGAC TGAGCACCG
251 CCCATACTCC TACCGGGAGGC AGCAGTAGGG ATCTTCACAC AATGGACGAA
301 AGCTCTGATG AGCAACGCG CGTGTGTTGTA GAAGGGTTT GGCTCTGAA
351 AACTCTGTT AAGAGAAGAA TGACATTGAG AGTAAGTGT CAATGTGTA
401 CCGTATCTTA CCAGAAAGGA ACGGCTAAT ACCTGCAGC AGCCGGGTTA
451 ATACGTATGT TCCAAGGGT ATCCGGATTG ATGGCGTAA AAGCGAGCC
501 AGACGGTTAT TTAAGCTGA AGTAAAGAACCT CTGGCTCAA CGGAGGAATT
551 GCTTTGGAAA CTGGATAACT TGAGTGGAGT AGAGGAAGAAGT GGAACCTCCAT
601 GTGTTGGGT AGAATGGCTA GATATATGGA AGAACACCAAG TGCGGAAGGC
651 GGCCTTCTGCA ACTGTAACCT ACCTGGAGG TGCAAGAGTGGTGGTAGCAAA
701 CAGGAGGAGA TACCCCTGTA GTCCACACTG CAAAGATGAA GTGCTAGTTG
751 TTGAGGGTGT TCCGGCCCTTG AGTACGAGAAG CTAACGCTT AAGACACTCCG
801 CCTGGGGAGT AGCAGCCCAA GTTGTAAACCT CAAAGGAATT GACGGGGACCC
851 CGCACAAAGGG GTGGAGCATG TGTTTAAATT CGAAGCAAGC CGAACGACCT
901 TACCAAGCTCT TGACATCTTG TGACACTCC AGAGATGGTTG CTTCCTCTT
951 GGGGACAAAGG TGACAGCTGG TGCTATGGTG TGCTCAGCTC GTGTCGTGAG
1001 ATGTTGGGT AAATGCCGCA AGCAGCGAA CCTTATGTTG TAGTTGGCAG
1051 CATTAGTGTG GGCACCTAG CAAGACTGCC GTGACAACAC CGGAGGAAGG
1101 CGGGGATGAC GTCAAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG CTACACACG
1151 GCTCAATGG CAAGTACACAG GAGTCGCCCCA CGCGGGAGGG TGCGCAACATC
1201 TCTTAAAGCT TGTCAGTT CGGAAGTAG GCTGCAACTC GCCTCACACG



II-3. Resource microorganism patent registration



등록특허 10-2202092



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월12일
(11) 등록번호 10-2202092
(24) 등록일자 2021년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61P 3/04 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0129759

(22) 출원일자 2019년10월18일

심사청구일자 2019년10월18일

(56) 선행기술조사문현

KR1020090080797 A
(뒷면에 계속)

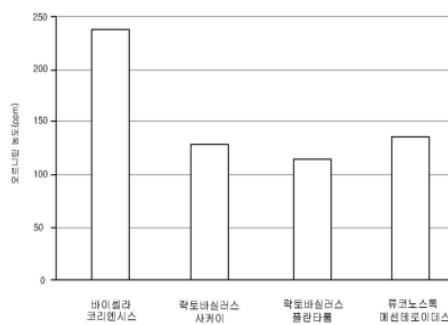
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 오르니틴 생성능력을 갖는 바이셀라 코리엔시스 ND824 균주 및 이를 함유하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 오르니틴 생성능력을 갖는 바이셀라 코리엔시스 ND824 균주를 제공하고, 바이셀라 코리엔시스 ND824와 맹자추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 식품 조성물 및 건강기능식품을 제공한다.

대 표 도 - 도2



Safety evaluation of resource microorganisms (probiotics)

마이크로바이옴 타겟 프로바이오틱스 발굴 및 소재화 기술 개발



- Notified of 19 types of probiotic strains in accordance with "Standards and Specifications for Health Functional Foods"

Probiotic strains listed in GRAS, QPS, and MFDS

식약처 고시 & QPS & GRAS 등재

Bifidobacterium animalis ssp. *lactis*
Bifidobacterium breve
Bifidobacterium longum
Lacticaseibacillus casei
Lacticaseibacillus rhamnosus
Lactiplantibacillus plantarum
Lactobacillus acidophilus
Limosilactobacillus fermentum
Limosilactobacillus reuteri
Streptococcus thermophilus

식약처 고시 & QPS 등재

Bifidobacterium bifidum
Lacticaseibacillus paracasei
Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*
Lactobacillus gasseri
Lactobacillus helveticus
Lactococcus lactis subsp. *lactis*
Ligilactobacillus salivarius

식약처 고시

Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium

III-1 Safety assessment procedures and decisions

건강기능식품 기능성 원료
프로바이오틱스 안전성 평가 가이드
[민원인 안내서]
- WHO/FAO 가이드라인을 중심으로 -

2021. 6.

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002



Food and Agriculture Organization
of the United Nations



World Health Organization

Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food

Report of a Joint FAO/WHO Working Group on
Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food

London Ontario, Canada

고시균주 (19종)

Enterococcus 속 균주는 항생제
내성 및 독성 유전자 유무 확인

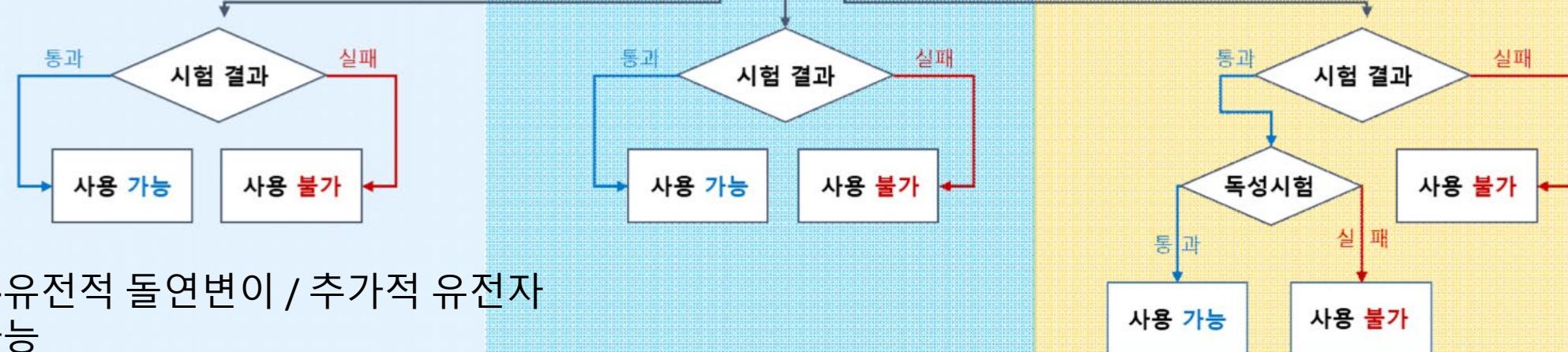
식경험 있는 고시되지 않은 균주

GRAS 등재, 전통발효균주 등
장기간 식경험 있는 균주

식경험 없는 고시되지 않은 균주

안전성 평가 시험

- | | | |
|---------------|--|--|
| 1. 항생제 내성 시험 | | 항생제 MIC 초과 시 획득 / 내재 내성 판단 |
| 2. 용혈활성 시험 | | 용혈활성 여부 판단 |
| 3. 독소생성 여부 시험 | | 독소생성 여부 판단 |
| 4. 대사적 특성 시험 | | D-lactate/Bile salt deconjugation 생성 여부 판단 |



WGS=> 획득성 : =>유전적 돌연변이 / 추가적 유전자
내재성 : 가능
국내 : CJ Bio co-work

• 항생제 내성 (WGS 분석)

ResFinder (biotools:resfinder)  ID Verified

<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

Available versions

2.1

Immunology

Emerging Other Free of charge (with restrictions)

Web application  

Identification of acquired antimicrobial resistance genes in total or partial sequenced isolates of bacteria.

Sequence >
(FASTA-like >, FASTA >)



CARD

Use or Download Copyright & Disclaimer
Help Us Curate #AMRCuration #WorkTogether

Browse Analyze Download About

Search

RGI Resistance Gene Identifier

RGI can be used to predict resistomes from protein or nucleotide data based on homology and SNP models. Analyses can be performed via this web portal (20 Mb limit), via the command line, or via use of a [Galaxy wrapper](#). The command line version can be obtained from the [Download section of the CARD website](#). You can additionally install RGI from Conda or run RGI from Docker.

This web portal supports analysis of genomes, genome assemblies, metagenomic contigs, or proteomes. The command line tool additionally supports analysis of metagenomic reads and k-mer prediction of pathogen-of-origin for AMR genes.

Web portal - RGI 5.2.1, CARD 3.2.1: Open Reading Frame (ORF) prediction using [Prodigal](#), homolog detection using [DIAMOND](#), and Strict significance based on CARD curated bitscore cut-offs. Options included for percent identity filtering, low quality/coverage assemblies, merged metagenomic reads, small plasmids or assembly contigs (<20,000 bp).

Online RGI results cached for 7 days. As the CARD curation evolves, the results of the RGI evolve. RGI targets, reference sequences, and significance cut-offs are under constant curation. Full documentation for the RGI can be found at [GitHub](#).

• 독성 유전자 (WGS 분석)

VirulenceFinder (biotools:virulencefinder)

<http://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>



Whole genome sequencing > Probes and primers > Sequence assembly > Genotype and phenotype > Mapping >

VirulenceFinder-2.0 Server - Results

Organism(s): *Enterococcus, Escherichia coli, S. aureus, Listeria*

Virulence genes for Enterococcus

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

Virulence genes for Listeria

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

Exoenzyme genes for S. aureus

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

Toxin genes for S. aureus

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

Hostimm genes for S. aureus

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

Shiga-toxin genes

Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

Virulence genes for Escherichia coli

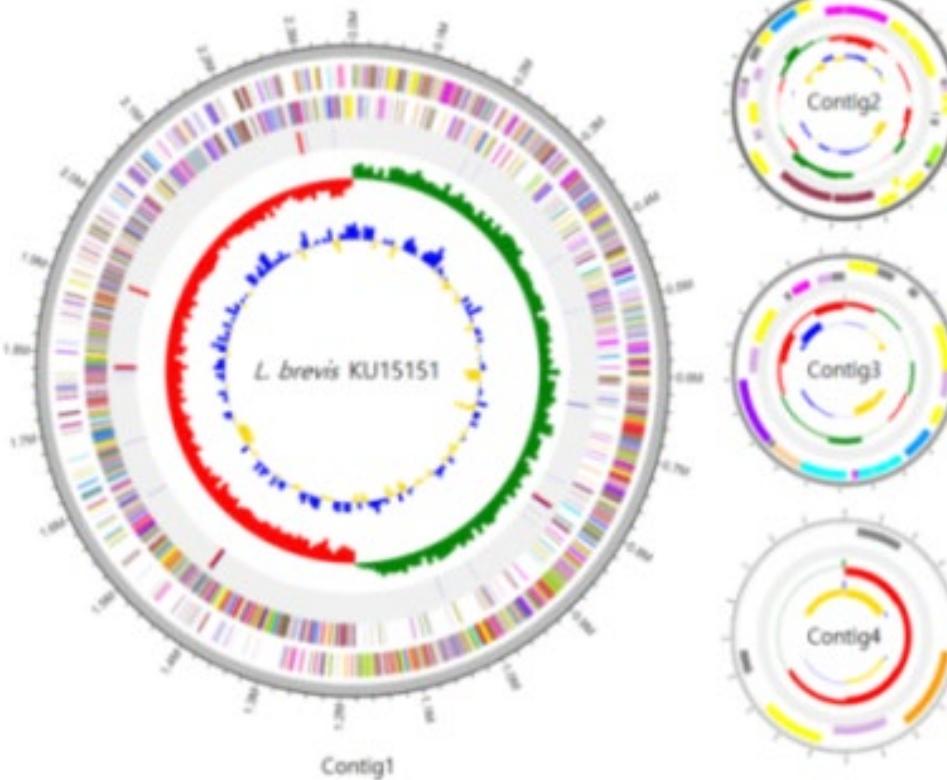
Virulence factor	Identity	Query / Template length	Contig	Position in contig	Protein function	Accession number
No hit found						

extended output

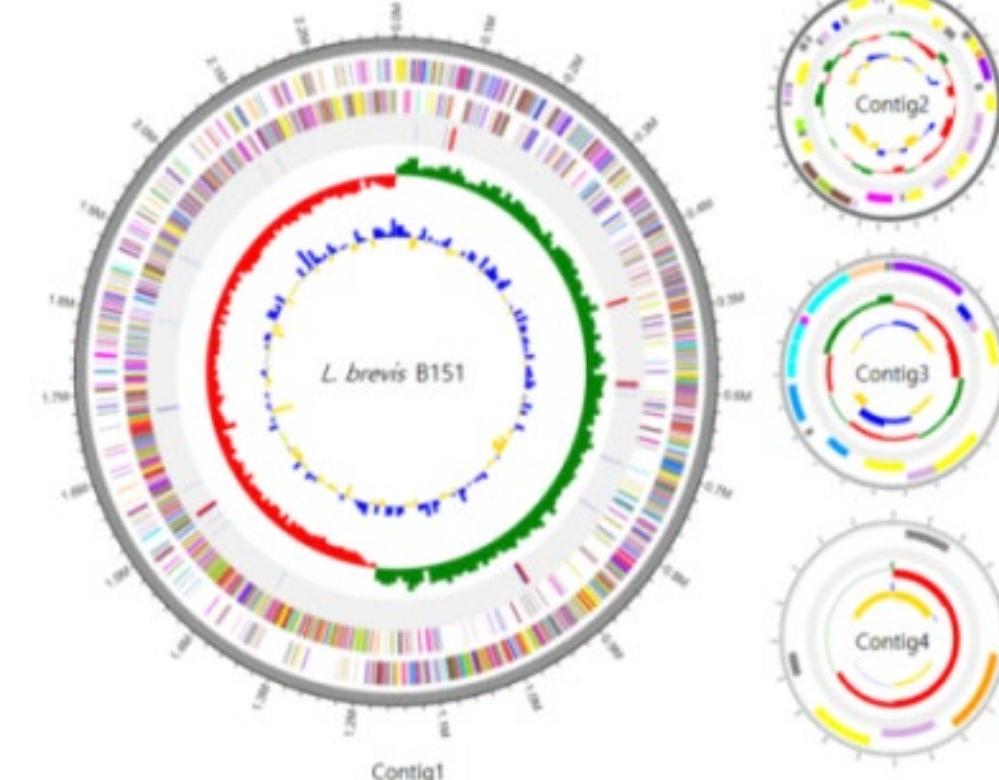
Results as text Results tsv Hits in genome seqs Virulence factor seqs

Input Files: *Lactobacillus_brevis_KU15151_contigs.fasta*

III-2. Whole Genome Sequencing

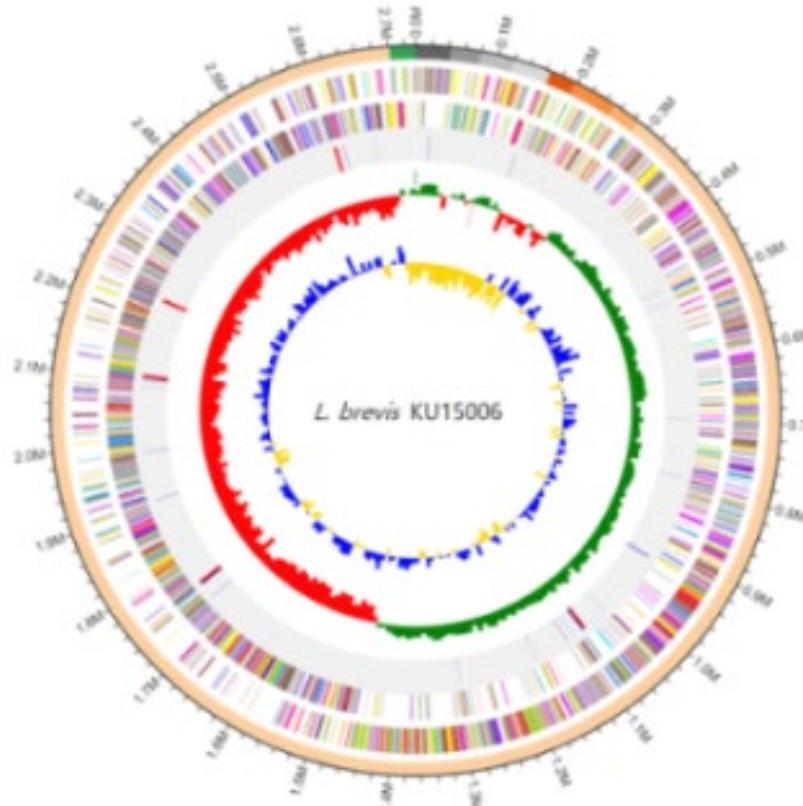


Circular map of *Levilactobacillus brevis* KU15151

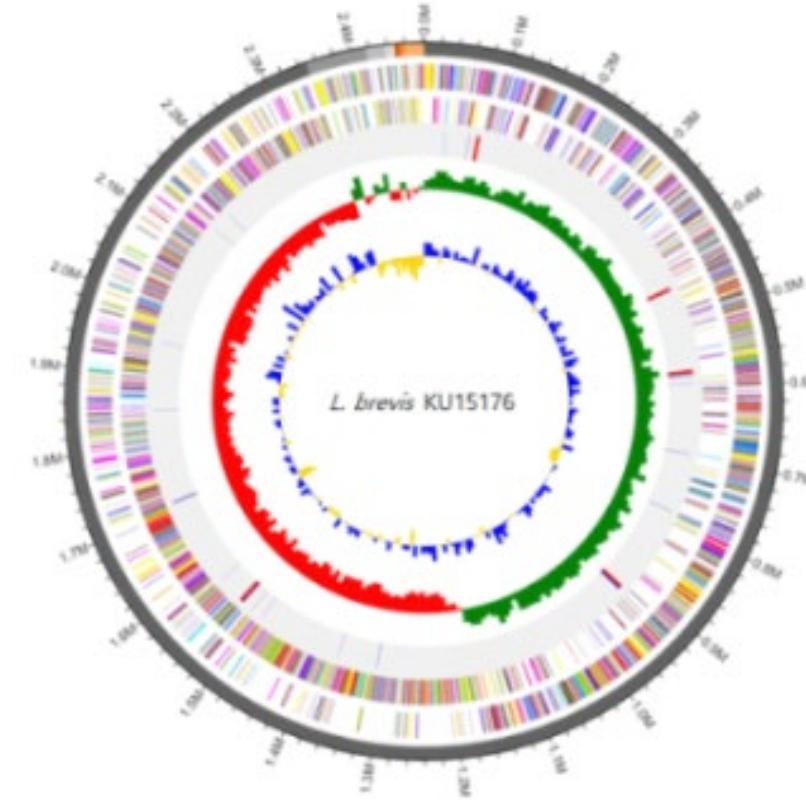


Circular map of *Levilactobacillus brevis* B151

III-2. Whole Genome Sequencing

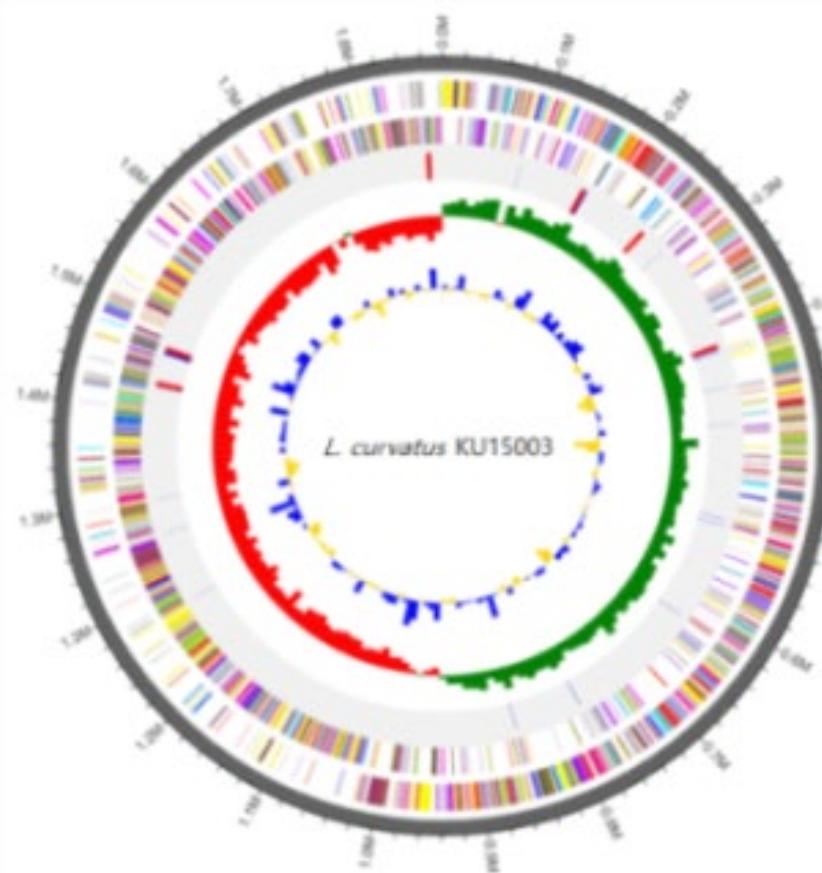


Circular map of *Levilactobacillus brevis* KU15006

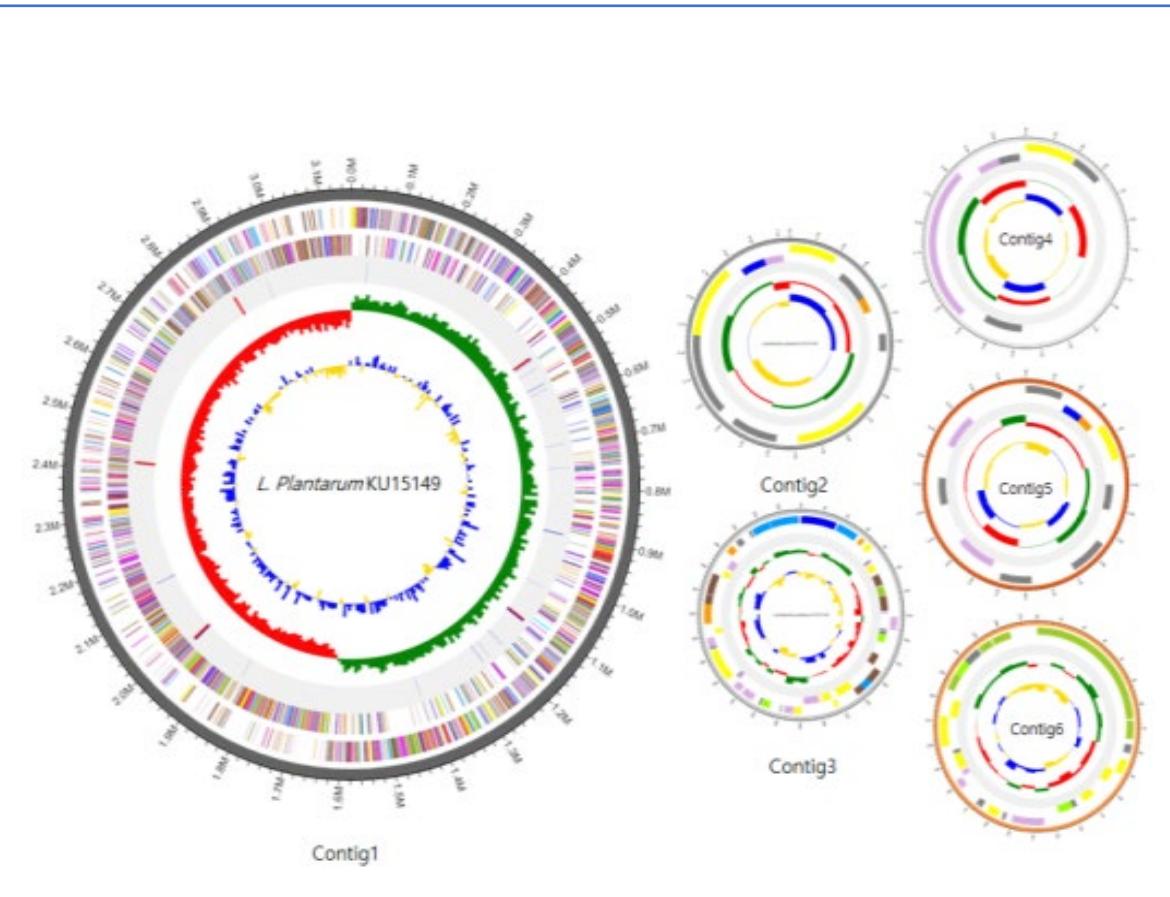


Circular map of *Levilactobacillus brevis* KU15176

III-2. Whole Genome Sequencing



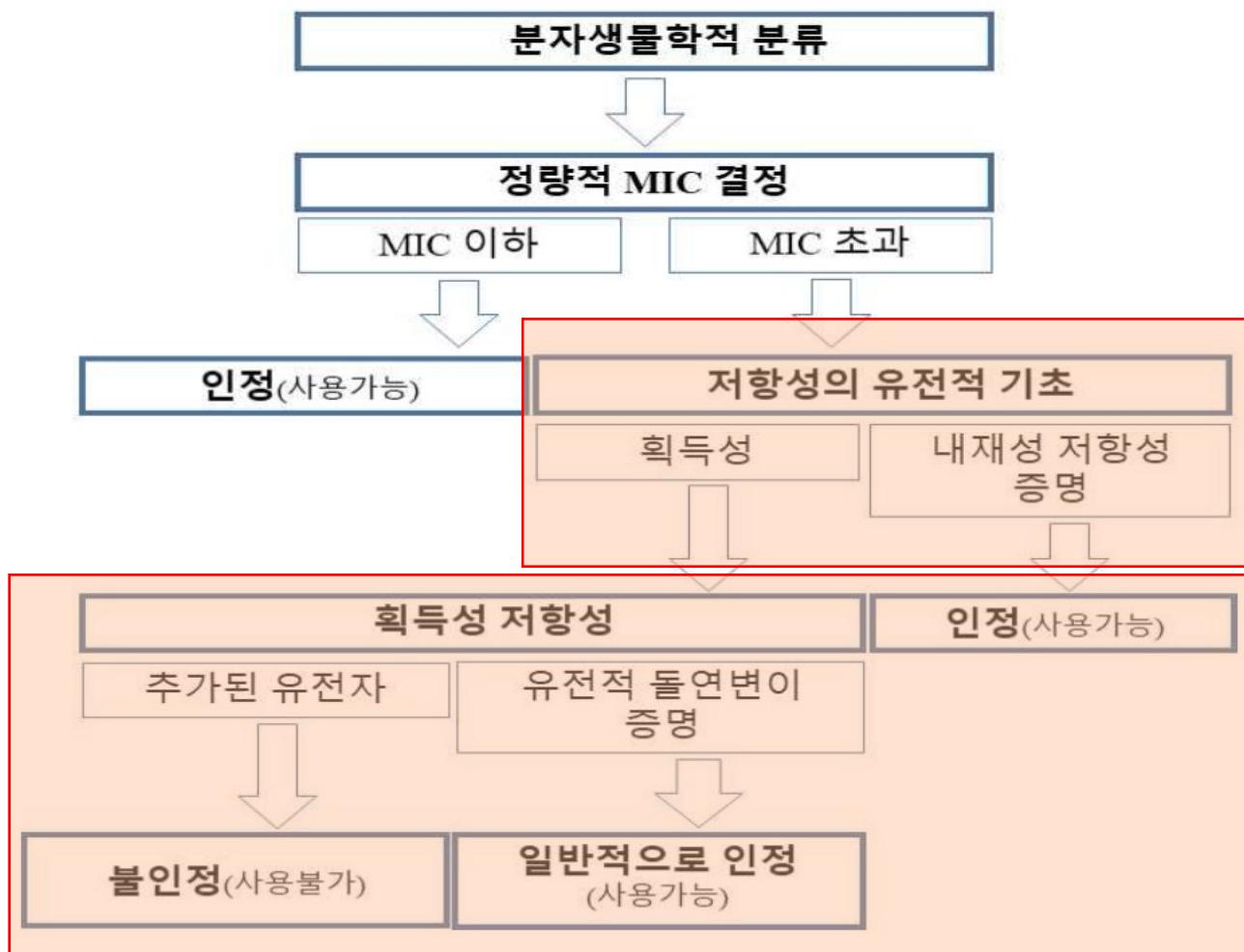
Circular map of *Lactilactobacillus curvatus* KU15003



Circular map of *Lactiplantibacillus plantarum* KU15149

III-2. Antibiotic resistance assessment

Decision tree for determining antibiotic resistance



EFSA의 MIC cut-off value (mg/L)

	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	dibramphenicol	tylosine
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^a	1	2 ^b	16	16	16	1	1	4	4	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4	-
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^c	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4	-
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	-
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4	-
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4	-
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	-
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	-
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	-
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4	-
<i>Bacillus</i> spp	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	-
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	-
Other Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2	-
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1024	128	4	4	16	4	-

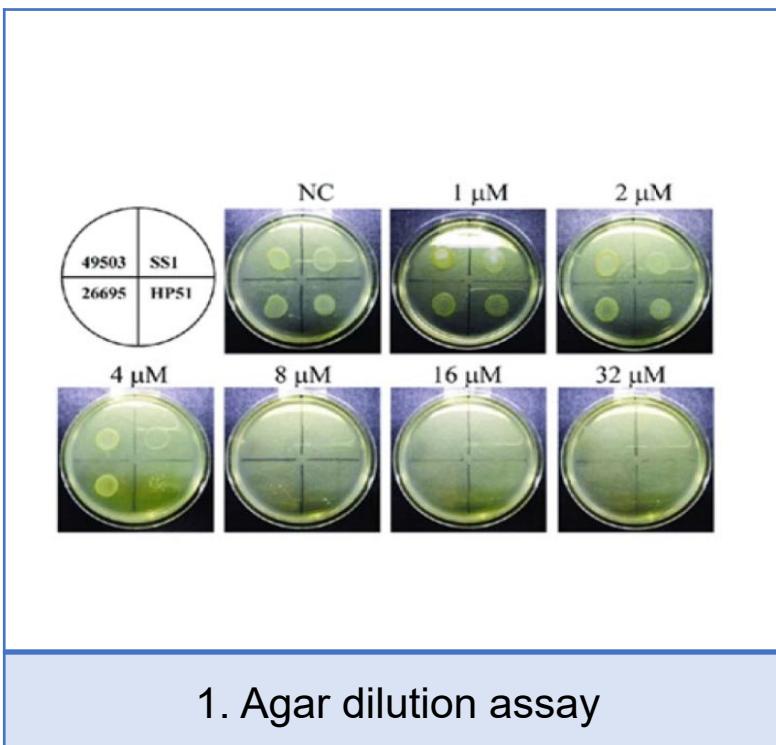
n.r. not required, ^a including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, ^b not required for *L. salivarius*

^c including *L. fermentum*

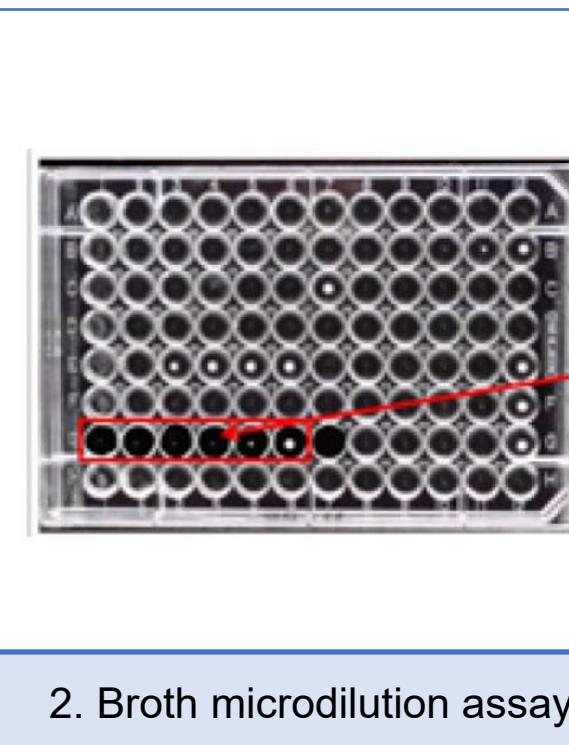
III-2. Antibiotic resistance assessment

- * Antibiotic resistance gene, it is dangerous because the antibiotic may not be effective in case of bacterial infection.
- * Transmission of antibiotic resistance genes can occur frequently in the intestines.

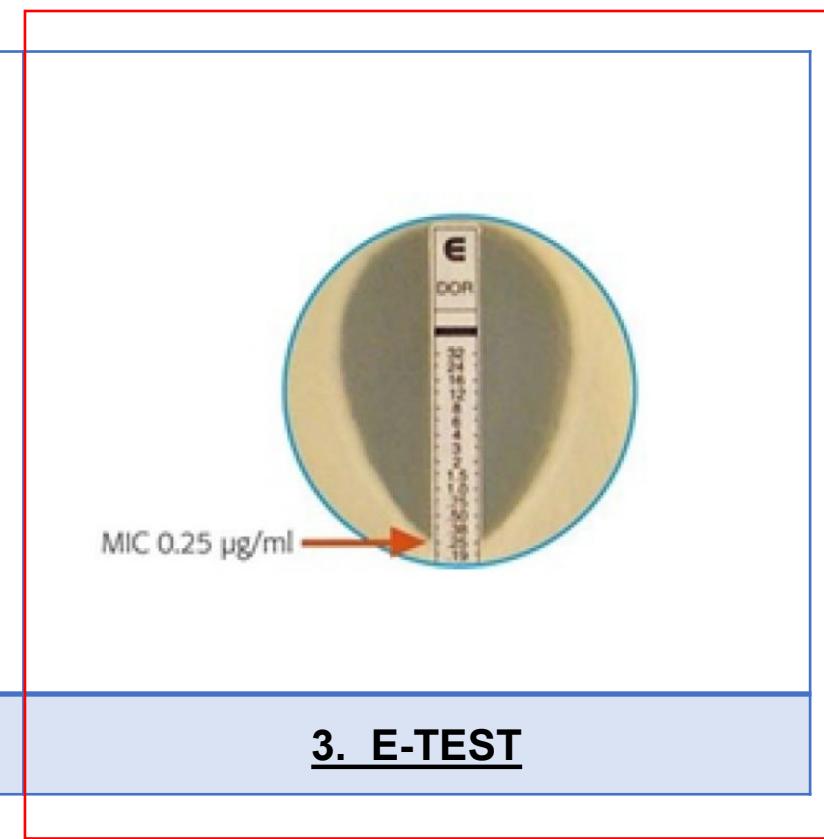
Antibiotic resistance test method



1. Agar dilution assay



2. Broth microdilution assay



3. E-TEST

미국 CDC추천

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus plantarum* KU15149



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	2	1	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	0.125	S	Acceptable
Kanamycin	64	12	S	Acceptable
Streptomycin	n.r.	-	-	Acceptable
Erythromycin	1	0.016	S	Acceptable
Clindamycin	2	0.016	S	Acceptable
Tetracycline	32	8	S	Acceptable
Chloramphenicol	8	3	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus brevis* B151



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	2	0.5	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	0.094	S	Acceptable
Kanamycin	32	3	S	Acceptable
Streptomycin	64	2	S	Acceptable
Erythromycin	1	0.032	S	Acceptable
Clindamycin	1	0.125	S	Acceptable
Tetracycline	8	4	S	Acceptable
Chloramphenicol	4	1	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus brevis* KU15006



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	2	0.5	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	0.19	S	Acceptable
Kanamycin	32	4	S	Acceptable
Streptomycin	64	4	S	Acceptable
Erythromycin	1	0.094	S	Acceptable
Clindamycin	1	0.016	S	Acceptable
Tetracycline	8	8	S	Acceptable
Chloramphenicol	4	2	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus brevis* KU15151



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	2	0.5	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	0.094	S	Acceptable
Kanamycin	32	2	S	Acceptable
Streptomycin	64	1.5	S	Acceptable
Erythromycin	1	0.064	S	Acceptable
Clindamycin	1	0.125	S	Acceptable
Tetracycline	8	8	S	Acceptable
Chloramphenicol	4	2	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus brevis* KU15176



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	2	1	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	0.25	S	Acceptable
Kanamycin	32	4	S	Acceptable
Streptomycin	64	6	S	Acceptable
Erythromycin	1	0.047	S	Acceptable
Clindamycin	1	1	S	Acceptable
Tetracycline	8	8	S	Acceptable
Chloramphenicol	4	2	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus brevis* KU15003



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	4	0.5	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	6	S	Acceptable
Kanamycin	64	12	S	Acceptable
Streptomycin	64	12	S	Acceptable
Erythromycin	1	0.23	S	Acceptable
Clindamycin	1	0.016	S	Acceptable
Tetracycline	8	0.38	S	Acceptable
Chloramphenicol	4	0.5	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-2. Antibiotic resistance assessment

Assessment of antibiotics resistance of *Lactobacillus plantarum* KU210152



Antibiotics	Cut-off value ($\mu\text{g/mL}$)*	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility	Assessment
Ampicillin	2	0.125	S***	Acceptable
Vancomycin	n.r.**	-	-	Acceptable
Gentamycin	16	1	S	Acceptable
Kanamycin	64	12	S	Acceptable
Streptomycin	n.r.	-	-	Acceptable
Erythromycin	1	0.047	S	Acceptable
Clindamycin	2	0.016	S	Acceptable
Tetracycline	32	4	S	Acceptable
Chloramphenicol	8	1	S	Acceptable

*Cut-off value is established in EFSA guidelines

n.r., not required. *S, Susceptible; R, Resistant

III-3. Homoytic activity evaluation

Probiotic microorganisms have high hemolytic activity, ingestion may be problematic.

Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols

Created: Friday, 30 September 2005

Author • Rebecca Buxton

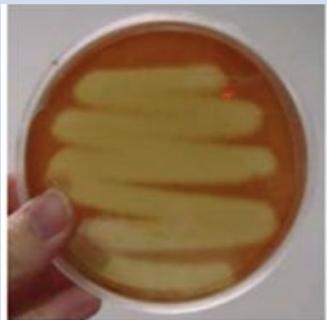
Information

History

The history of blood agar, as we know it today, is uncertain. The inclusion of blood as a nutritive supplement in culture media may predate the use of agar. In their 1903 *Manual of Bacteriology*, Muir and Ritchie list its inclusion before they discuss "agar-agar" as a replacement for gelatin as a solidifying agent.

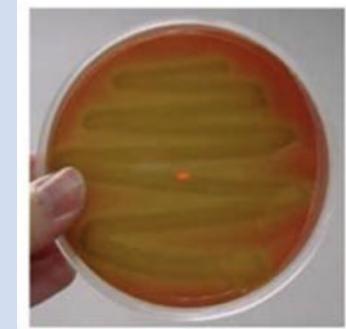


β -hemolysis



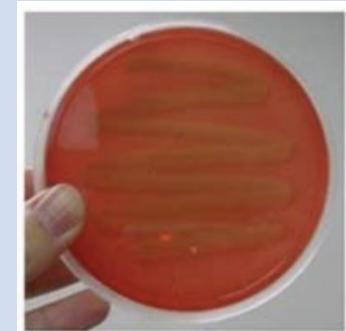
Hemolytically destroys red blood cells to form transparent colonies

α -hemolysis



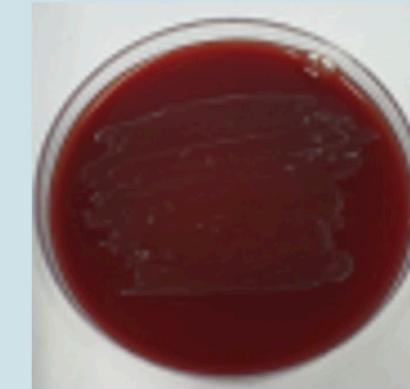
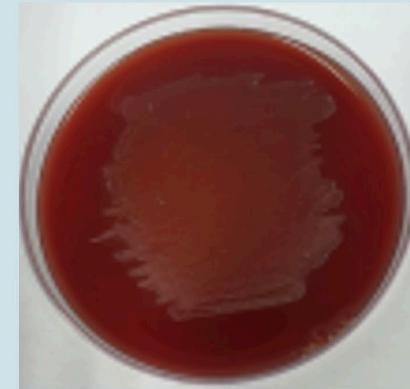
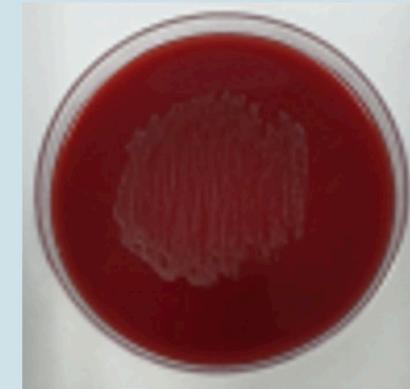
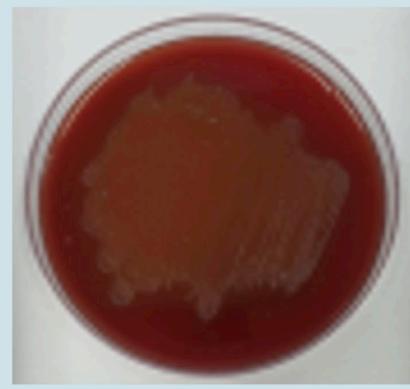
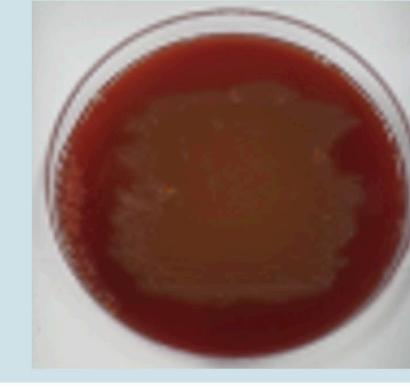
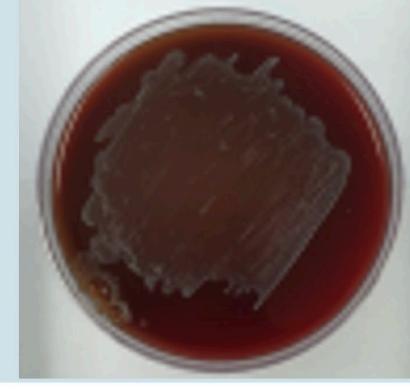
Reduces Methemoglobin in red blood cell hemoglobin, forming green colonies

γ -hemolysis



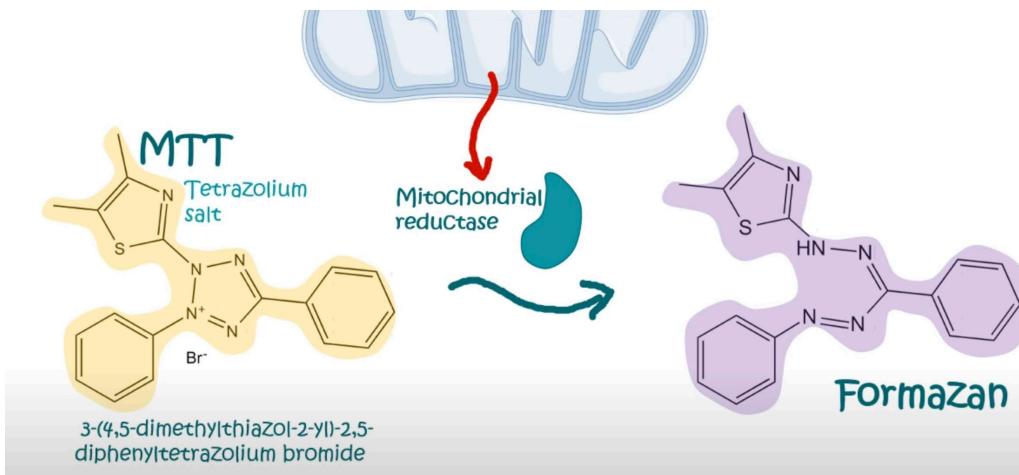
Hemolysis phenomenon not pound

III-3. Homoytic activity evaluation

<i>L. brevis</i> B151	<i>L. brevis</i> KU15006	<i>L. brevis</i> KU15151	<i>L. brevis</i> KU15176
			
<i>L. curvatus</i> KU15003	<i>L. plantarum</i> 200793	<i>L. plantarum</i> KU15149	<i>Streptococcus pyogenes</i> KCCM 11873
			

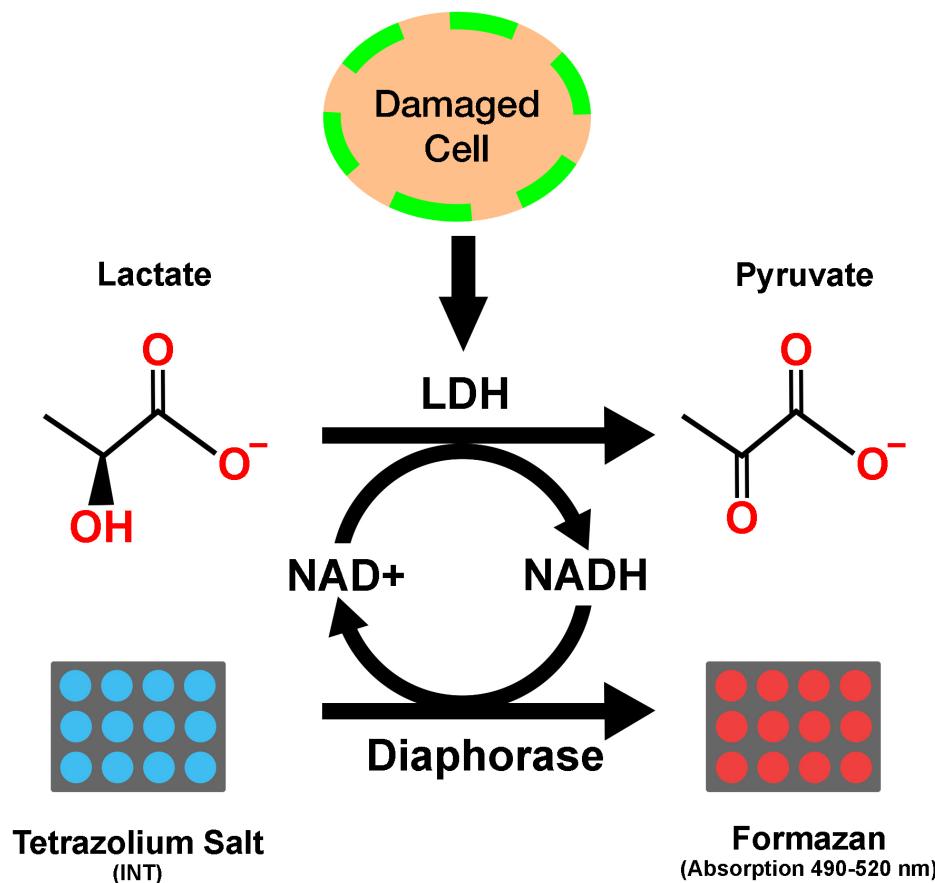
III-4. Toxicity production assessment

MTT assay



LDH assay measures the degree of cell death by measuring the amount of Lactate dehydrogenase released after cells are destroyed by toxicity.

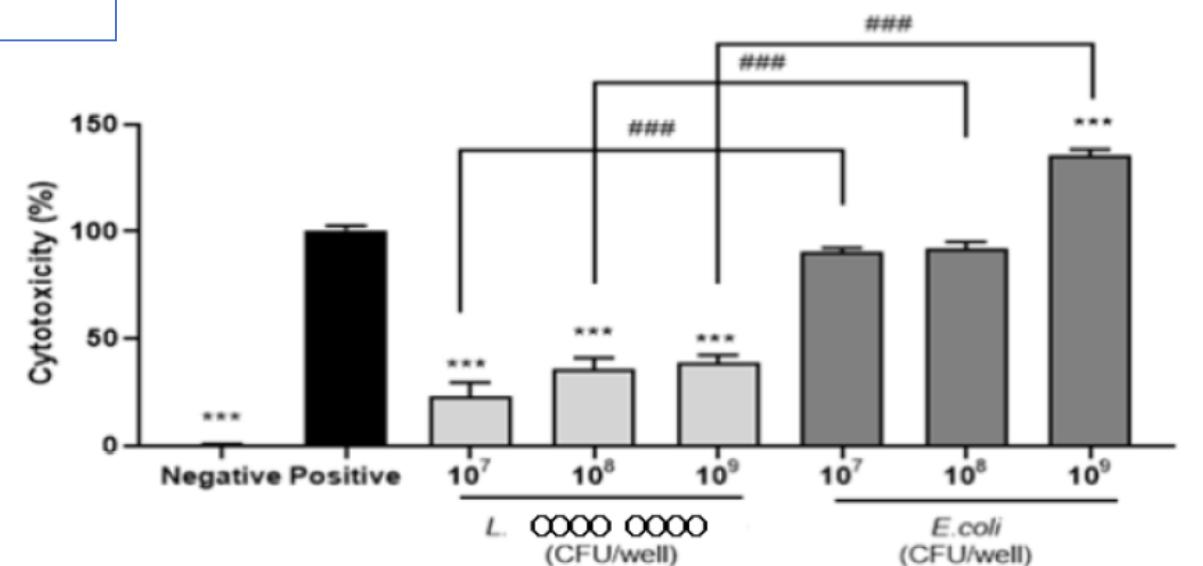
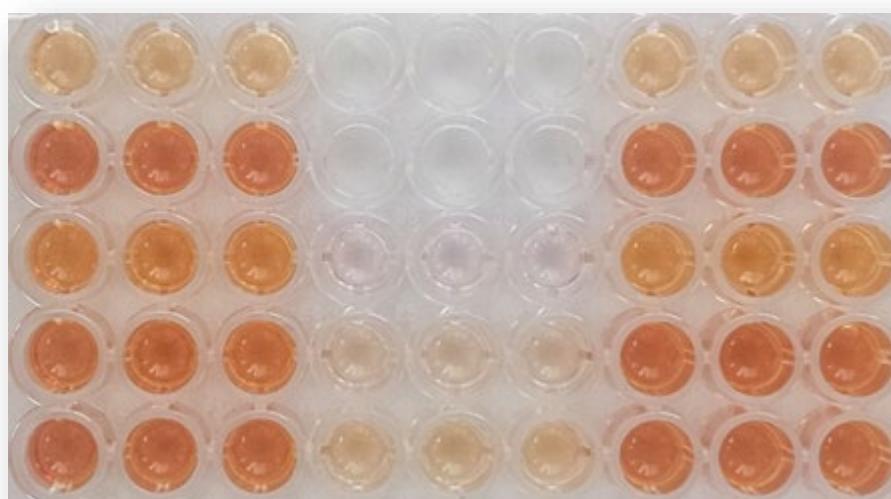
LDH assay



III-4. Toxicity production assessment

【독성 생성여부】

- 시험방법 : LDH assay를 통한 세포독성 평가
- 시험결과 : *L. OOOO OOOO* 균주는 Positive control과 비교 시 유의적으로 낮은 세포독성이 나타남

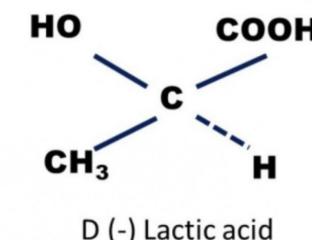
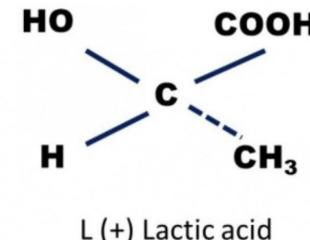


*** $p<0.005$ vs positive control

$p<0.005$ vs same concentration between *L. OOOO OOOO* and *E. coli*

D-lactate production

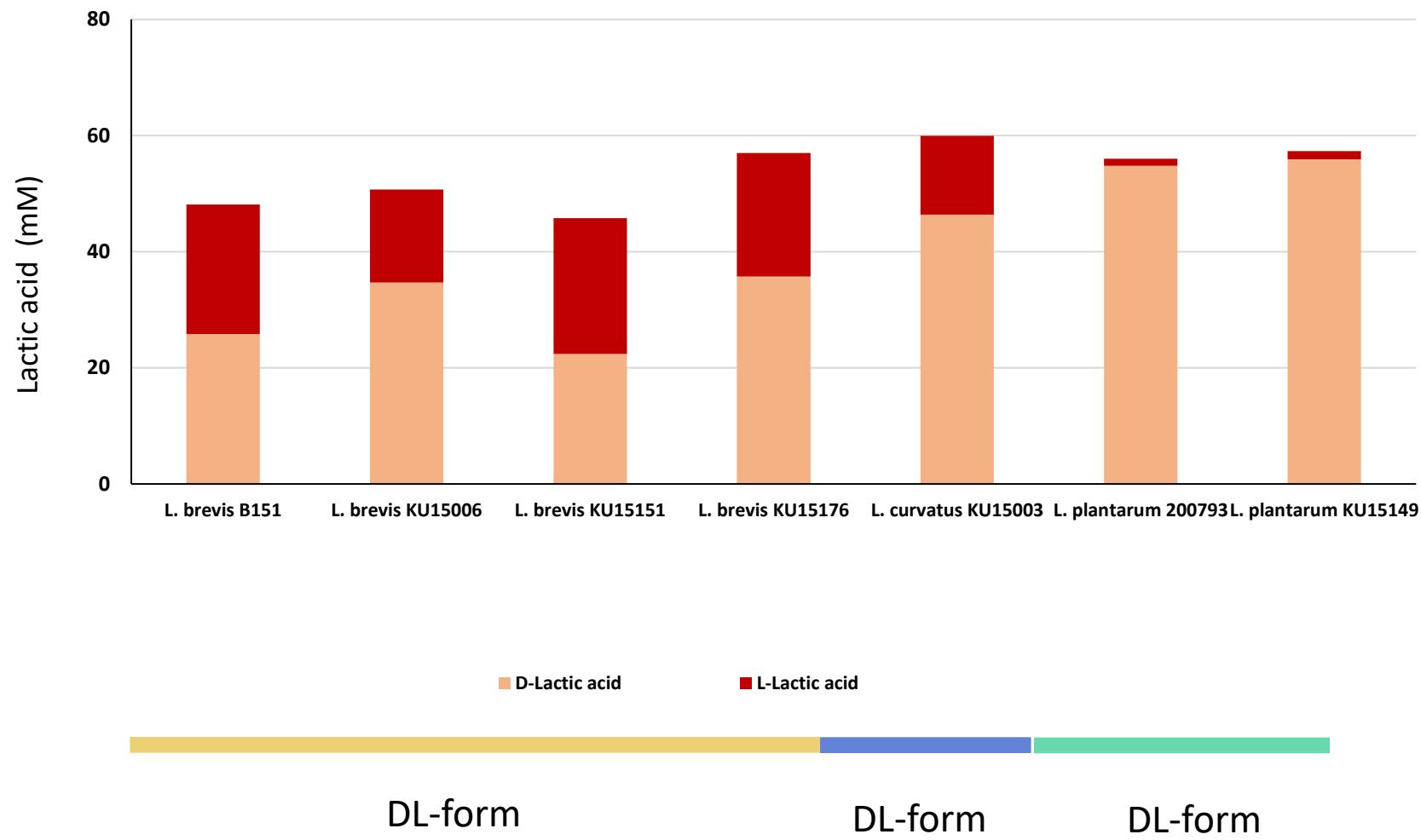
- L-lactate $\xrightarrow{\text{DL-lactate racemase}}$ D-lactate
- D-lactic acid cannot be metabolized in the human body
- D-lactate accumulates in newborns and children, causing acidosis.
- Daily intake of D-lactic acid: Below 100 mg/kg body mass (WHO)



Types of lactic acid bacteria according to the enantiomer of lactate

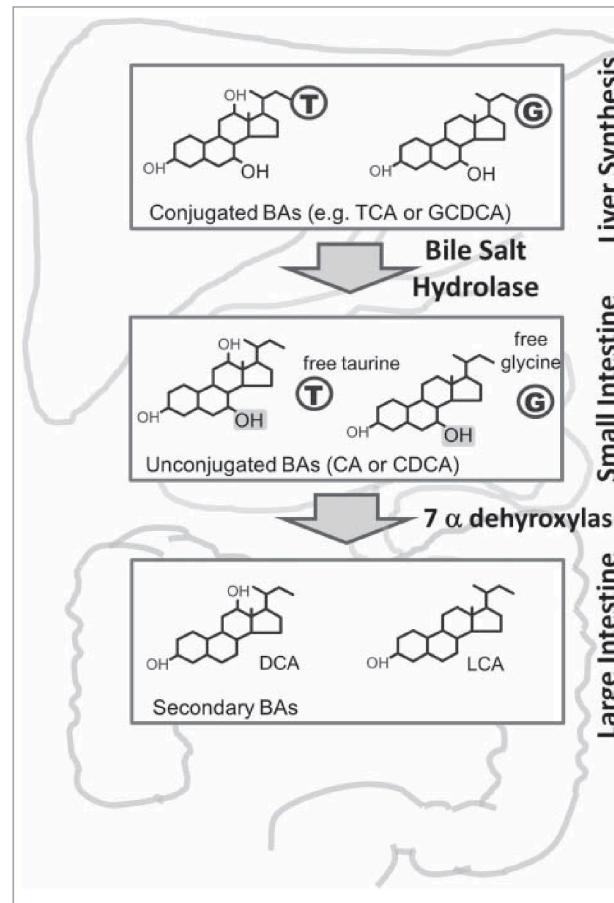
D-form	L-form	DL-form
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Amylolactobacillus amylophilus</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
	<i>Ligilactobacillus animalis</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus crispatus</i>
	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Aerococcus</i> sp.	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>Pediococcus</i> sp.
<i>Weissella</i> sp.		<i>Weissella</i> sp.

III-5. Metabolic profiles test

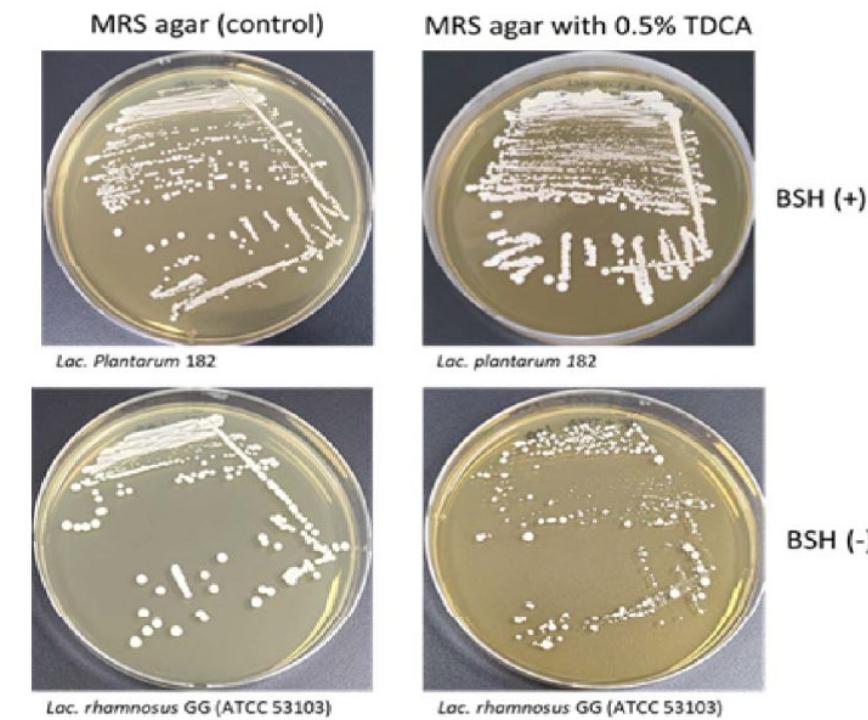


III-5. Metabolic profiles test

Bile salt deconjugation



- **Bile salt hydrolase (BSH):** Deconjugates bile salt to eliminate emulsifying function and makes fatty acid decomposition difficult.
- **secondary bile acids:** Increases risk of colorectal cancer



CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; TCA, taurocholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; LCA, lithocholic acid.
Joice et al. (Gut Microbes, 2015)

III-5. Metabolic profiles test

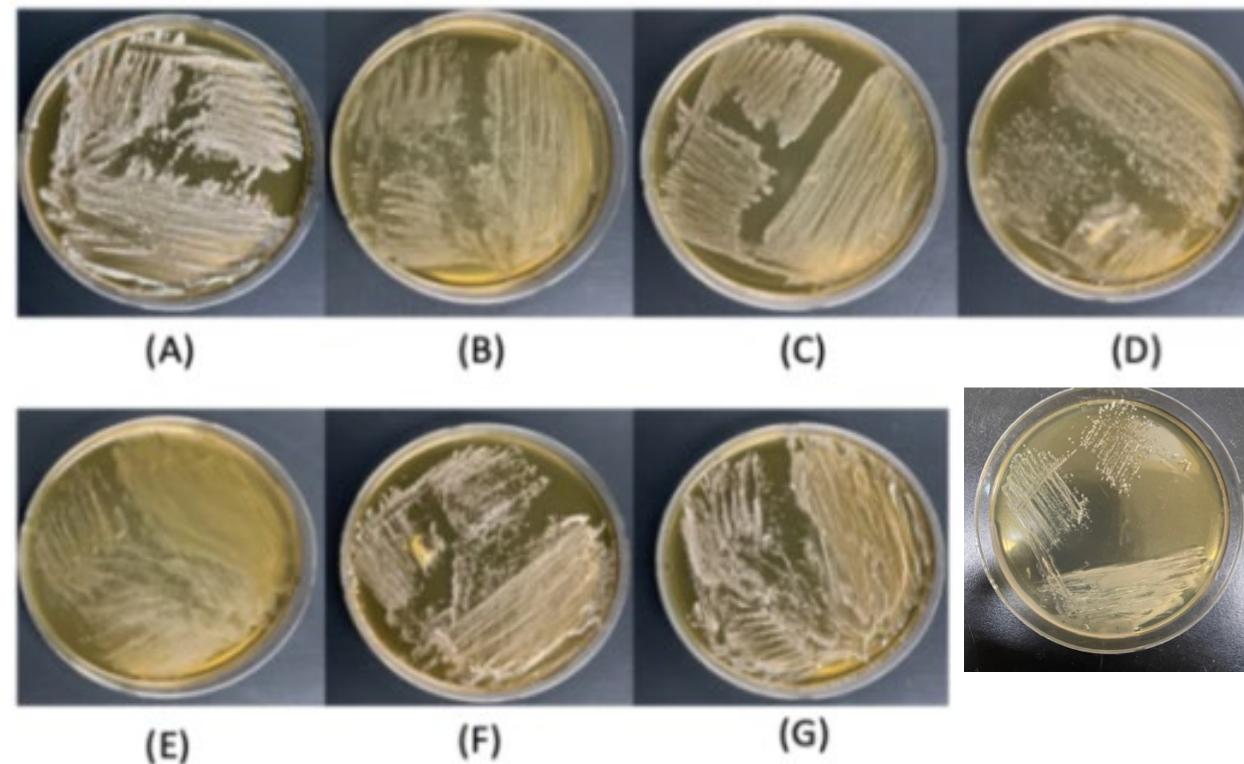


Fig. Bile salt hydrolase activity test of probiotic strains. (A) *L. brevis* B151, (B) *L. brevis* KU15006, (C) *L. brevis* KU15151, (D) *L. brevis* KU15176, (E) *L. curvatus* KU15003, (F) *L. plantarum* 200793, (G) *L. plantarum* KU15149. Positive control: *Eubacterium limosum* KCCM 12101

Consideration for toxicity test – Test animals and test condition

Standardization of test animal



- ▣ Use of normal animals without genetic mutations
- ▣ Standardized on rodents to take into account physiological relevance and the cost, duration, and practicality of testing
- ▣ In the case of weekly age, it is based on animals aged 5 to 6 weeks

Standardization of test condition

- ▣ 반드시 **강제경구투여 (oral gavage)**
- ▣ 투여 균주 수는 통일, 단위는 CFU/kg/day로 선정
- ▣ 생균수 **최소 10⁷~10⁹ CFU/kg/day** 이상으로 투여
- ▣ 균주 1개당 **10마리 이상**의 동물로 진행,
암수 비율은 1:1
- ▣ 투여 기간은 **최소 2주 이상, 매일 투여**

“프로바이오틱스” 독성시험방법

단회투여독성시험

- ▣ 프로바이오틱스(최소 10^{11} CFU/kg),
농도별로 시험 동물에 투여
- ▣ 섭취 후 2주 동안 관찰, 사망여부 통해
치사량 확인
- ▣ 시험기간 중 3회 이상 체중 측정
- ▣ 매일 관찰, 반드시 정해진 시간 내에
임상증상 확인

90일 반복투여독성시험

- ▣ 프로바이오틱스 (최소 10^9 CFU/kg),
시험 동물에 90일간 매일 투여
- ▣ 투여 후 체중, 사료 섭취량, 음수
섭취량 측정 후 기록
- ▣ 시험 종료 후 장기 무게, 혈액·뇨·
병리학적 검사, 기타 기능 검사를 통해
독성 평가

유전독성시험

- ▣ 프로바이오틱스(최소 10^{11} CFU/kg),
최소 3회 이상 투여
- ▣ 투여 후 골수나 말초혈액 세포에서
염색체의 손상 정도 파악
- ▣ 소핵 형성 여부로 cytogenetic
damage 측정

Effectiveness evaluation of resource microorganisms (probiotics)

Biomarkers to confirm intestinal health-related functionality

기전	바이오마커		측정 가능한 연구유형			
			in vitro	in vivo	human	
장관면 역조절	과도한 염증반응 억제	염증반응 관련 인자	Leukotriene B4	0	0	0
			Prostaglandin E2	0	0	0
			C-Reactive Protein	0	0	0
			Inducible nitric oxide synthase	0	0	0
			NF-kB 발현	0	0	0
			Myeloperoxidase 활성	0	0	0
			Calprotectin	0	0	0
		적혈구 침강 속도		0	0	0
	조직 변화	조직학적 손상 정도 및 병변			0	0
	지사효과	설사 빈도, 완화 소요시간 등			0	0
	임상적 증상	복부불편감, 소화불량, 가스배출 혹은 복부팽만감, 상복부 통증 및 속쓰림, 설사 수준 (Visual analogue scale, Likert scale)			0	0

출처 : 식품의약품안전평가원 건강기능식품 기능성 평가 가이드

Biomarkers to confirm intestinal health-related functionality

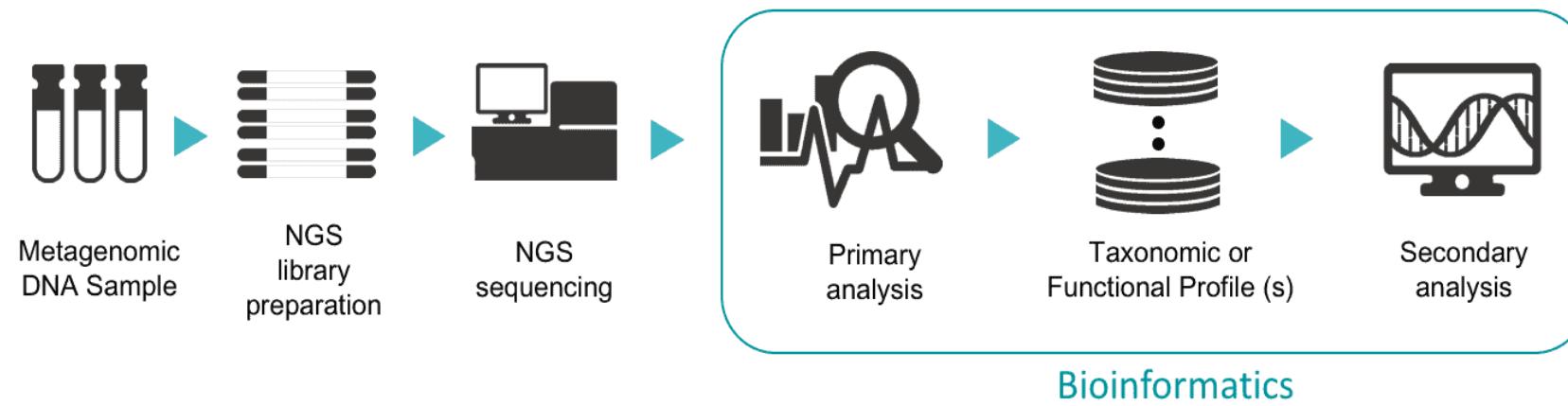
기전	바이오마커		측정 가능한 연구유형			
			in vitro	in vivo	human	
장내 미생물 개선	세균 동정 및 세균수	유익균	비피더스균, 락토바실러스균 등	o	o	o
		유해균	병원성 대장균, 황색포도상구균 등	o	o	o
	메타자이노믹스(Metagenomics)				o	
	장내 세균에 의한 부패산물			o	o	o
	장내 유해효소 활성(β -Glucuronidase)			o	o	o
	장내 pH			o	o	o
	단쇄지방산(Short chain fatty acids)			o	o	o
	탄소원이용능			o		
	항균기능(β -Defensin-2)			o		
	장 상피세포주에 대한 병원균 접착저해 활성			o		

출처 : 식품의약품안전평가원 건강기능식품 기능성 평가 가이드

1) Metagenomics 분석

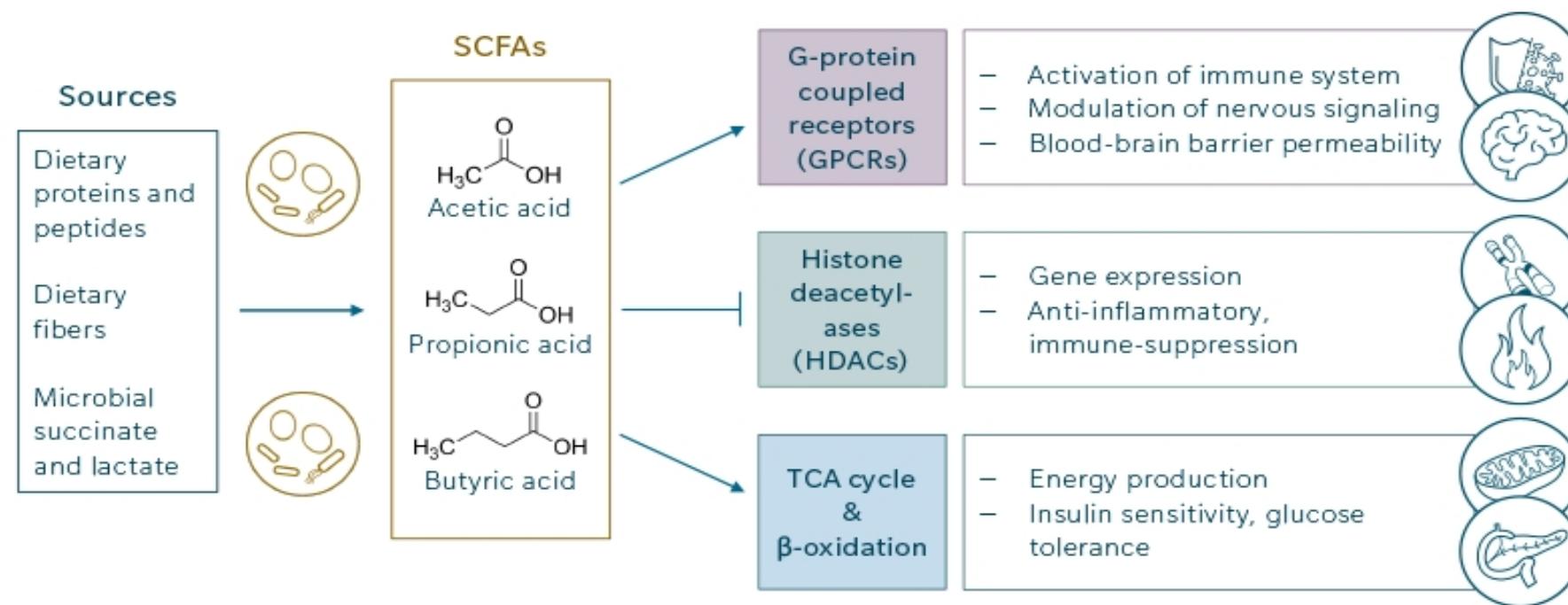
정성분석인 NGS분석과 정량분석인 q-PCR을 병행하여 진행된다. 장내 마이크로바이옴 유효성 평가를 통해 프로바이오틱스 건강기능식품의 유효성을 확인할 수 있으며, 확보된 분변(Fecal) 샘플에는 장내세균에 대한 정보 외에도 다양한 건강관련 정보 및 제품 섭취에 따른 유효성을 확인할 수 있다.

시험법	시험명	대상 및 방법	시료형태	시험결과
KRIBS 시험법 및 의뢰자 제시방법	마이크로바이옴 군집분석	Next generation sequencing(NGS)	고형시료, 액상시료	%
	마이크로바이옴 지표미생물분석	q-pcr	고형시료, 액상시료	CFU/g(ml)



2) SCFAs 분석

단쇄지방산(SCFAs, Short chain fatty acids)은 사람이 소화시키지 못하는 식이섬유나 난소화성 올리고당 등을 장내미생물이 분해해서 만드는 대사산물이다. 단쇄지방산 농도 변화와 질병 발생 사이의 연관성을 고려하면, 생물학적 샘플에서 이러한 산을 정량화하는 방법이 중요하다. 제한적이고 복잡한 생물학적 샘플에서 단쇄지방산을 정량화하는 가장 일반적인 방법으로는 GC-MS(Gas Chromatography Mass Spectrometry) 측정법이 있다.



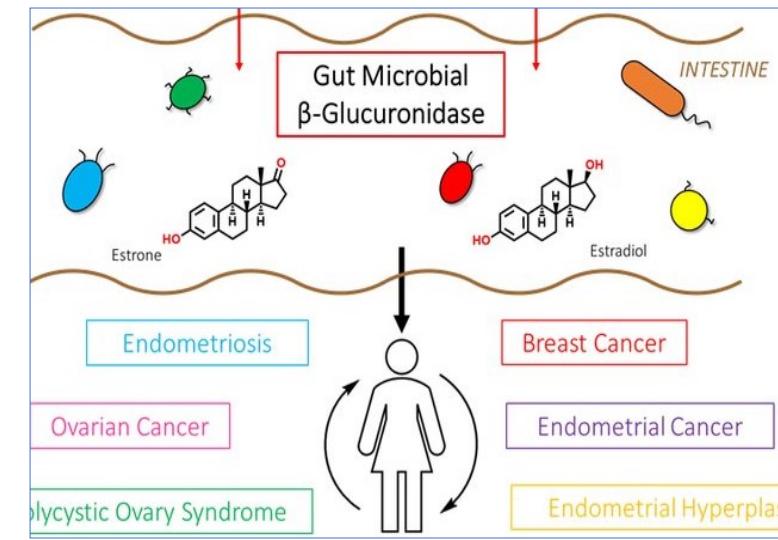
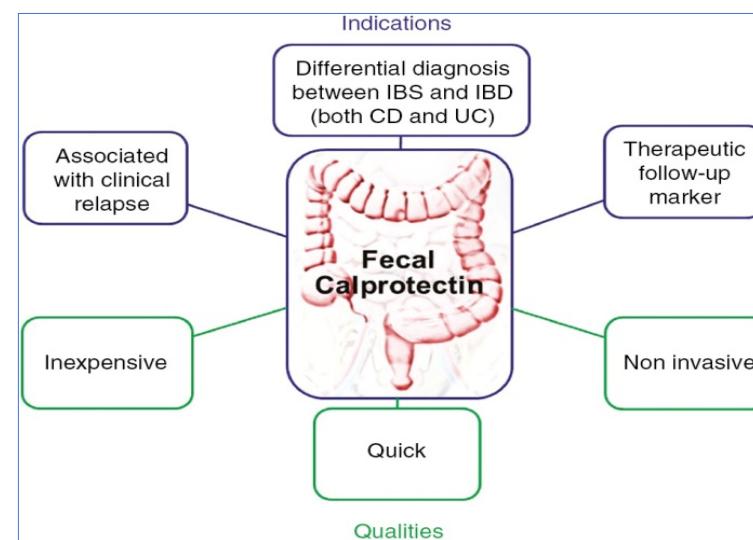
3) Calprotectin 분석

Calprotectin은 분자량 36kDa의 칼슘-아연 결합 단백질이다. 단구와 대식구에도 나타나기도 하며, 대부분 호중구 세포질에 존재하는데 염증 자극으로 분리되어 체내 염증상태를 반영하는 생물학적 표지자(biomarker) 역할을 한다. Calprotectin 분석을 통해 소화기계 염증의 유/무를 임상적으로 확인할 수 있다.

4) β -Glucuronidase 분석

β -glucuronidase는 장내미생물에 의해 생성되는 효소로 장관 내 각종 질환에 핵심적 역할을 있다고 알려져 있다. 장관 내 염증은 장내총균에 의해 생성되는 β -glucuronidase의 활성에 기인하며, 몇몇 연구에서는 이 효소의 활성 증가가 결장 종양 형성 증가와 관련되어 있음을 검증하였다.

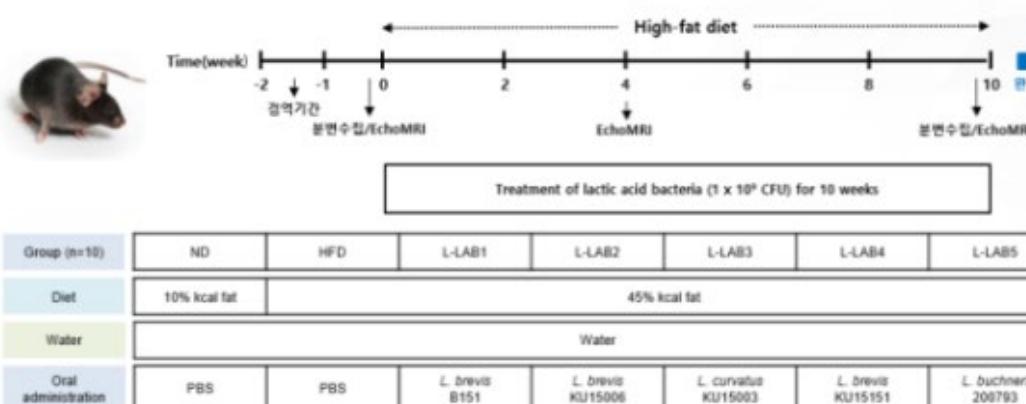
β -Glucuronidase 분석을 통해서 개발하고자 하는 건강기능식품의 정장작용의 정도를 유추할 수 있다.



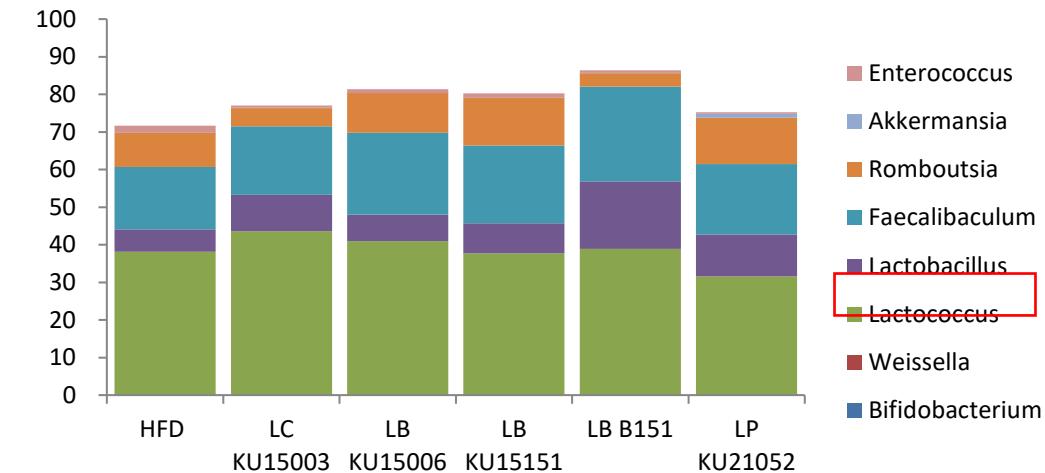
IV-1. Clinical efficacy evaluation

비만 동물모델을 활용한 프로바이오틱스의 장 건강 개선

- C57BL/6N, male, 5주령 마우스
- 45% 고지방식이를 통한 비만마우스 모델 유도함.
- 비만을 유도하면서 8주간 매일 선발균주(1×10^9 CFU) 경구 투여함.
- 실험군은 정상식이군(ND), 45% 고지방식이군(HFD), HFD+L-LAB1(*L. brevis* B151), HFD+L-LAB2(*L. brevis* KU15006), HFD+L-LAB3(*L. curvatus* KU15003), HFD+L-LAB4(*L. brevis* KU15151), HFD+L-LAB5(*L. plantarum* 21052)로 구성함.



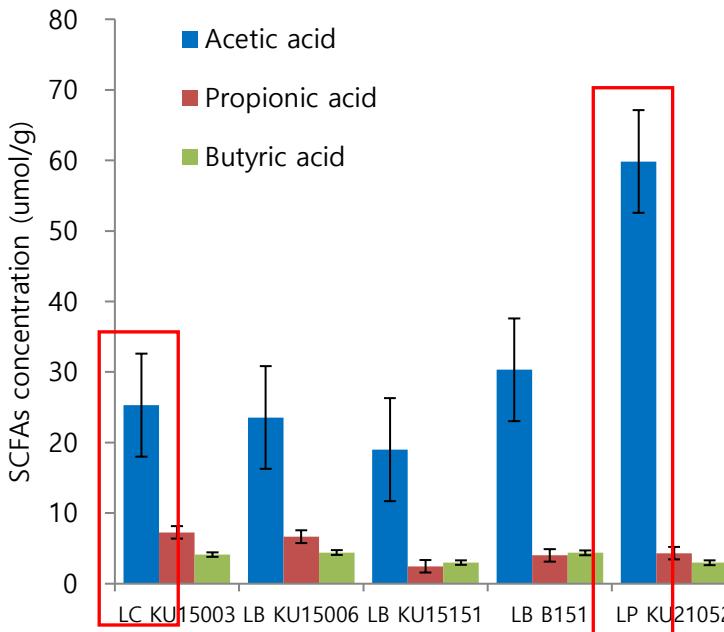
Genus level to improve intestinal environment



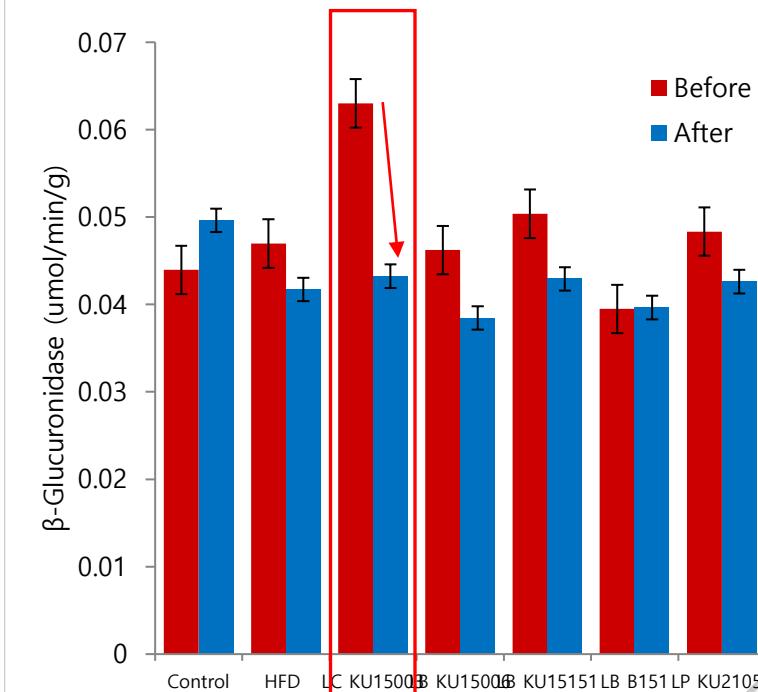
유의균	HFD	LC KU15003	LB KU15006	LB KU15151	LB B151	LP KU21052
<i>Bifidobacterium</i>	0.004	0.004	0.002	0.002	0.001	0.024
<i>Weissella</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Lactococcus</i>	38.104	43.556	40.918	37.687	38.913	31.577
<i>Lactobacillus</i>	6.019	9.692	7.128	8.060	17.910	11.143
<i>Faecalibaculum</i>	16.603	18.209	21.776	20.660	25.192	18.753
<i>Akkermansia</i>	0.046	0.075	0.024	0.007	0.043	1.034
<i>Enterococcus</i>	1.731	0.546	0.969	1.070	0.699	0.379
합계	62.507	72.082	70.816	67.486	82.758	62.910

- Genus level에서 *Lactococcus* 속이 우점을 차지

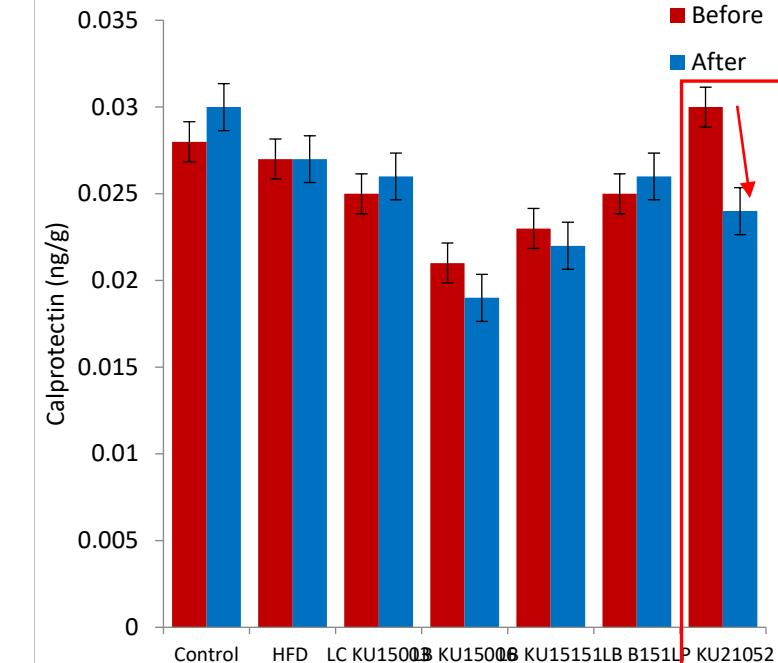
Production of SCFAs



Production of β -glucuronidase

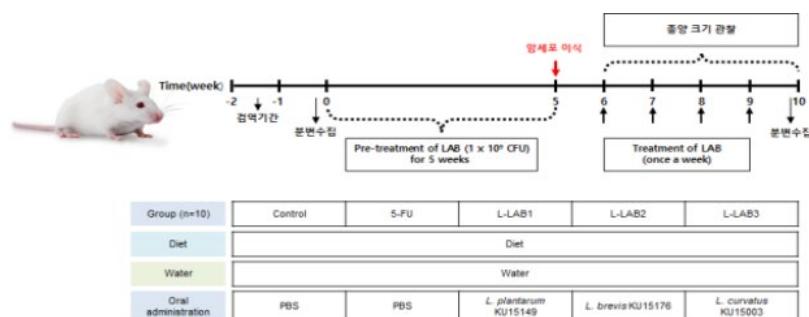


The contents of calprotectin



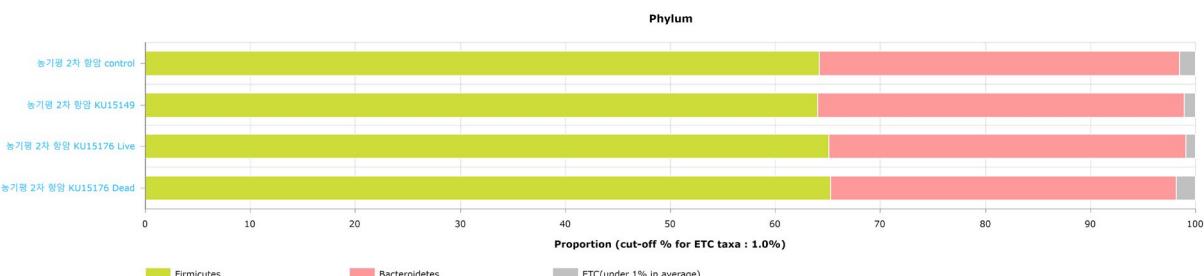
항암 동물모델에 대한 마이크로바이옴 및 메타오믹스 분석

- Balb/c, male, 5주령 마우스
- 종양마우스모델 유도 전 5주간 매일 선발균주(1×10^9 CFU)를 경구 투여함.
- 마우스 유래 대장암세포(CT26)를 피하이식하여 종양마우스모델 유도함 (사전 스크리닝 실험을 통해 대장암세포는 5×10^5 cells/mouse 이식함).
- 종양마우스모델 유도 후 4주간 주 1회 선발균주(1×10^9 CFU)를 경구 투여함.
- 종양마우스모델 유도 후 종양의 성장을 주기적으로 관찰하고, 부피가 80-100 mm³에 도달한 후 항암제를 투여함.
- 평균 종양 용적: $V(\text{mean tumor volume}) = [(A \times B^2)/2]$ (A=장축길이, B=단축길이)
- 실험군은 대조군(PBS), 항암제(5-FU, 50mg/kg), LAB1(*L. plantarum* KU15149), LAB2(*L. brevis* KU15176), LAB3(*L. curvatus* KU15003)로 구성하였음.

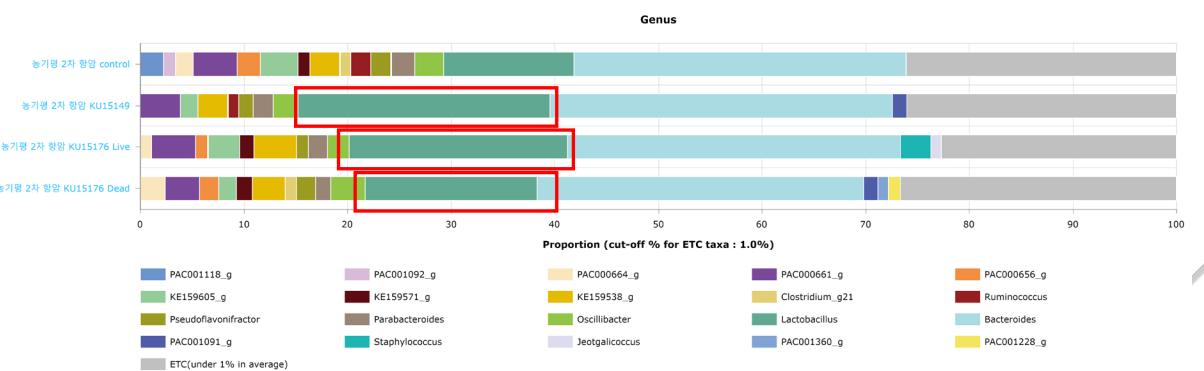


Taxonomic compositions by probiotics consumption

a. Phylum level



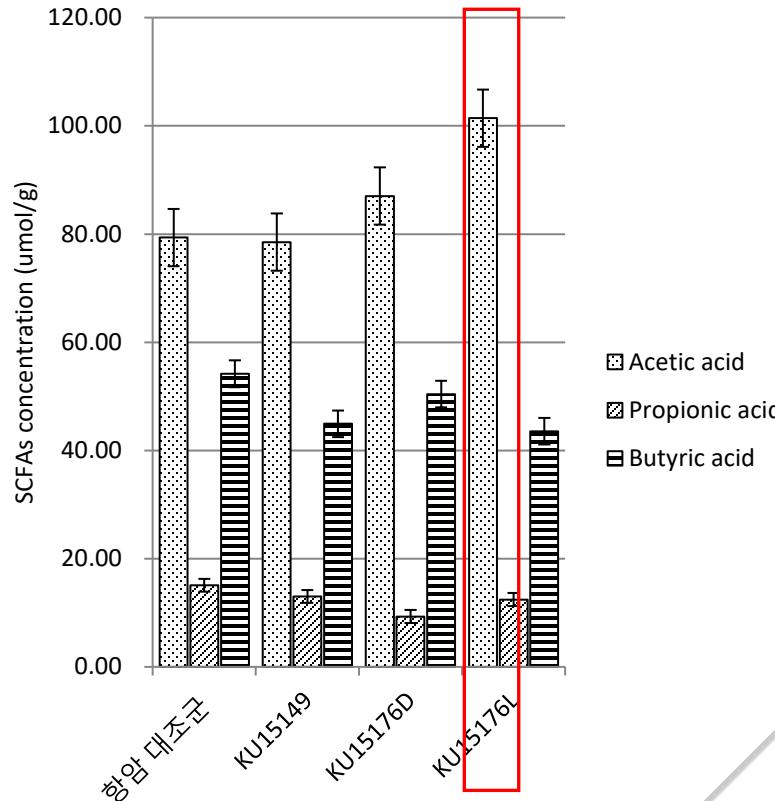
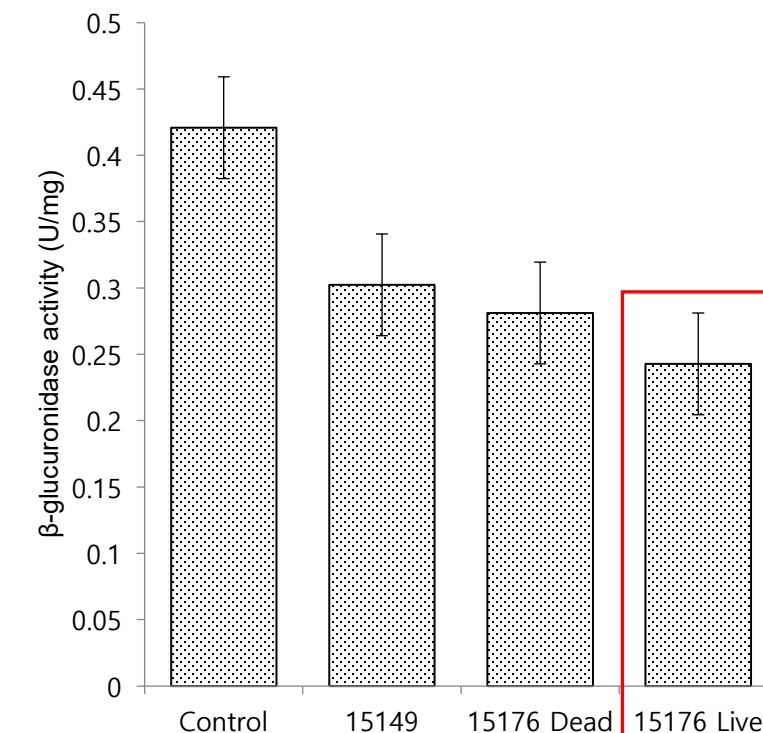
b. Genus level



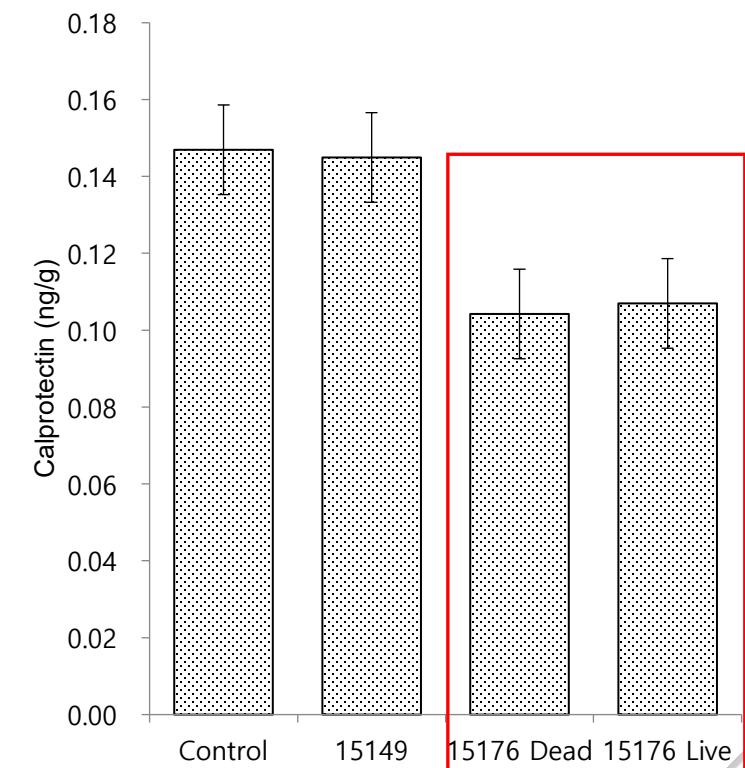
- Firmicutes* 문이 64% 이상 우점 형성, *Bacteroidetes* 문이 30%
- 유산균 섭취에 의해 *Lactobacillus* 속 비율이 증가

IV-1. Clinical efficacy evaluation

Production of SCFAs

Production of β -glucuronidase

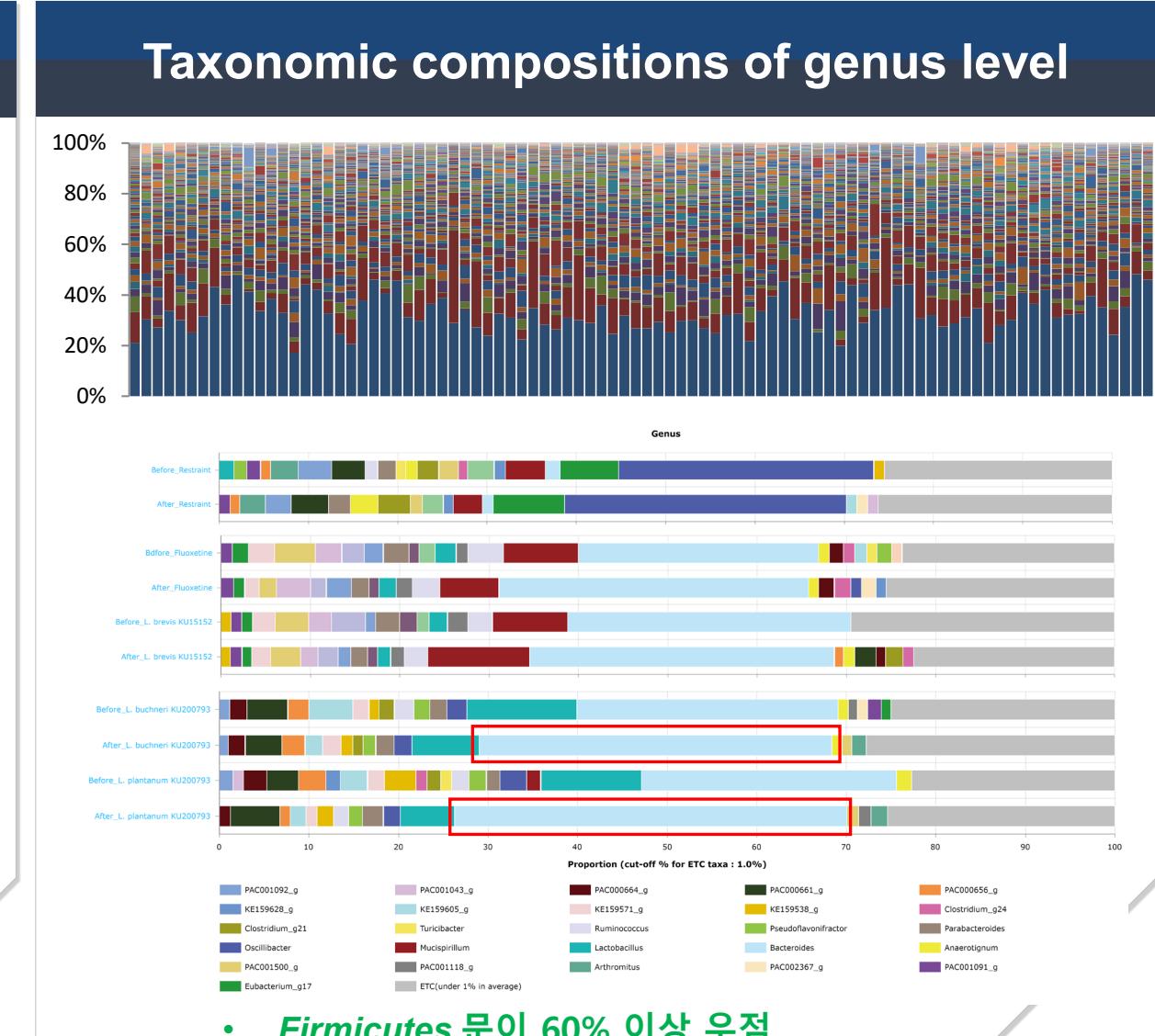
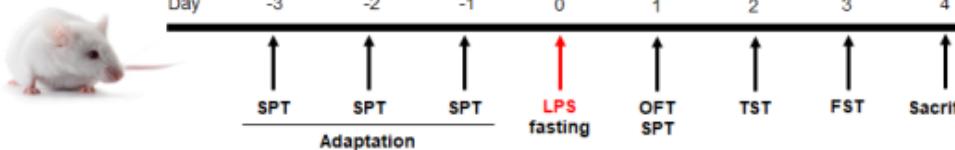
The contents of calprotectin



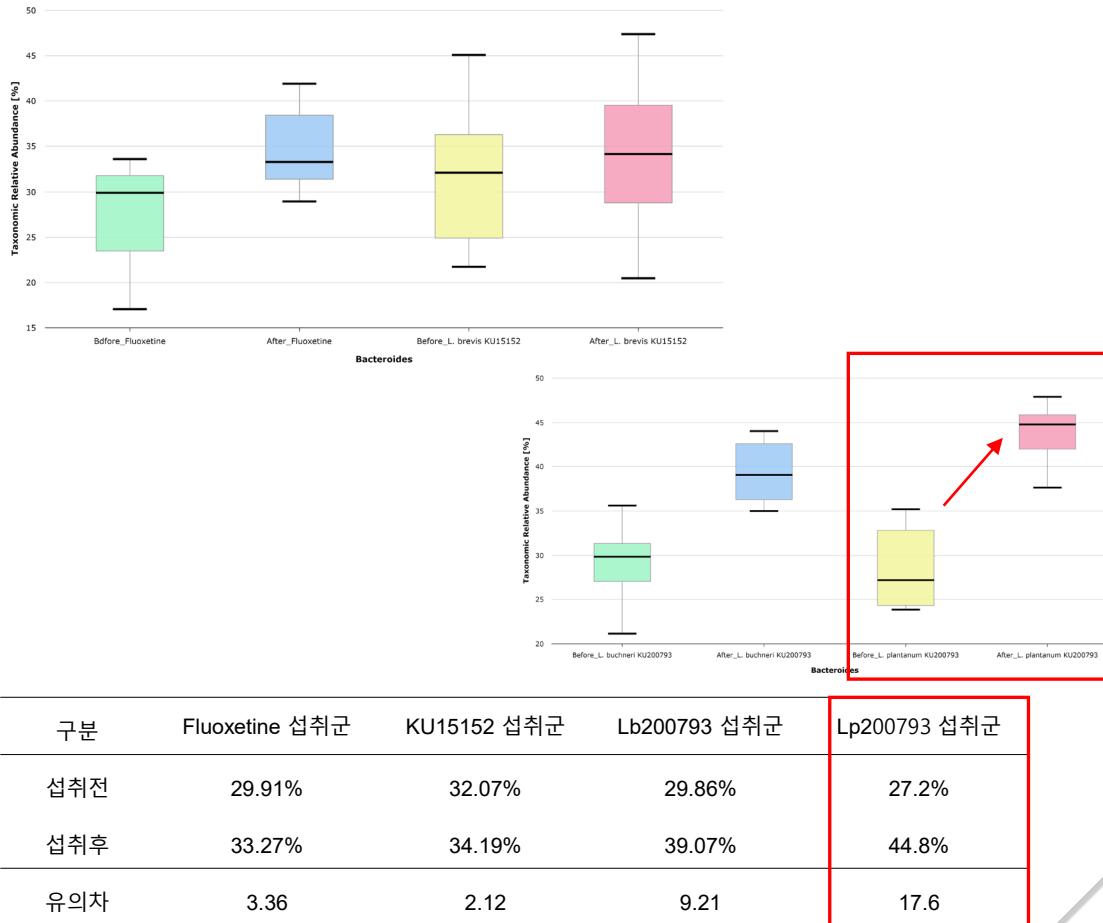
IV-1. Clinical efficacy evaluation

우울증 개선 동물모델에 대한 마이크로바이옴 및 메타오믹스 분석

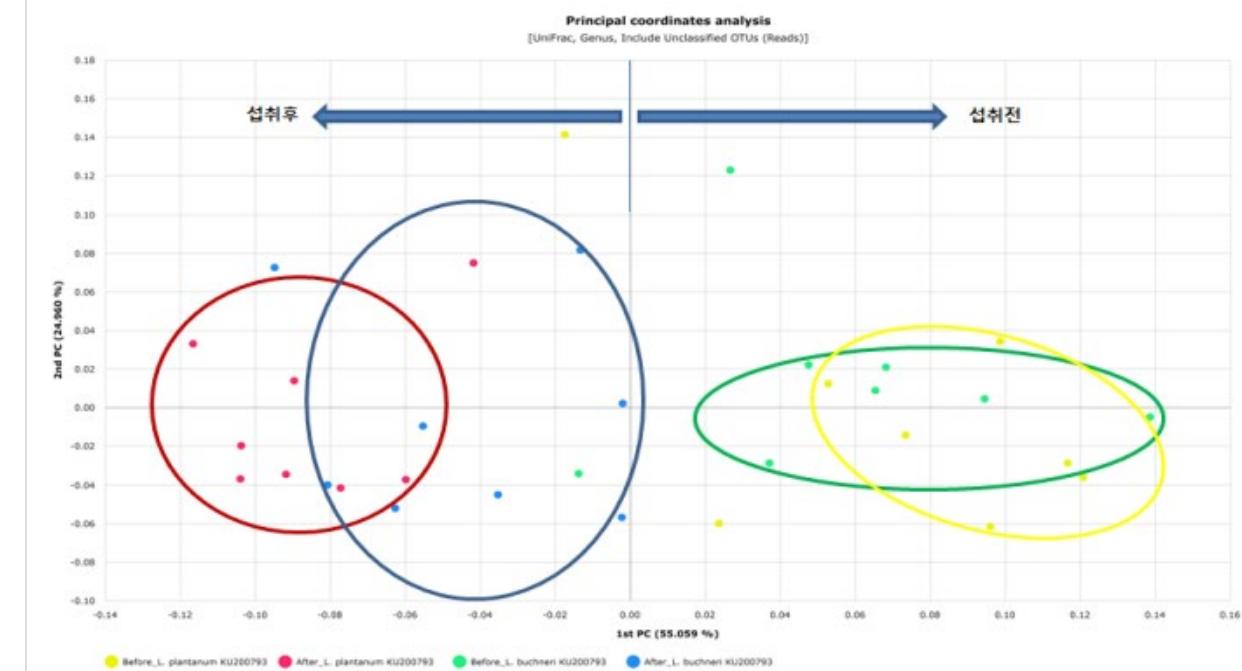
- 신규 프로바이오틱스 선발을 위한 우울증 유도 동물모델의 수립을 위하여, ICR 마우스를 이용하여 연구를 진행함(WIKIM IACUC 202140). 실험동물은 체중 40 ± 2 g 의 ICR(Crl:CD1) 마우스를 (주)지바이오 (Gwangju, Korea)에서 구입하여 이용하였고, 1주일간의 순화기간을 주고, 11주령의 성체를 이용함.
- 실험동물은 control군(PBS 투여, n=4), 0.85 mg/kg의 LPS 투여군(n=3), 1.5 mg/kg 의 LPS 투여군(n=3)으로 나누어 복강으로 투여함. 우울증의 유도에 사용된 LPS의 농도는 O'Connor et al.(2009)과 Murray et al.(2020)를 참고하여 설정하였고, LPS(Sigma-Aldrich, MO, USA)는 *Escherichia coli* serotype O111:B4를 이용함. LPS의 복강투여 후, 24시간 fasting시킨 뒤 행동 분석을 진행함.



IV-1. Clinical efficacy evaluation

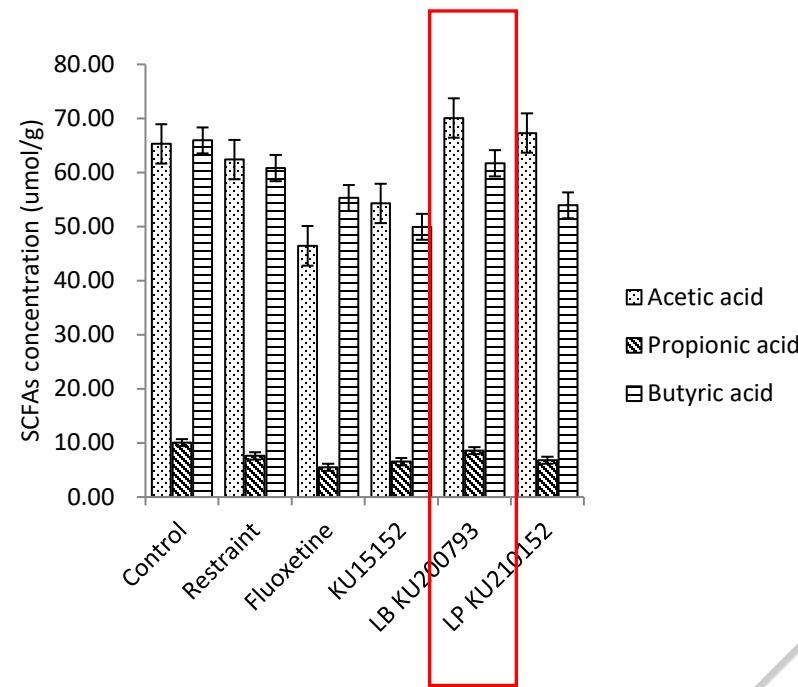
Composition of *Bacteroides* spp. for alleviating depression

Principal coordinates analysis of Genus

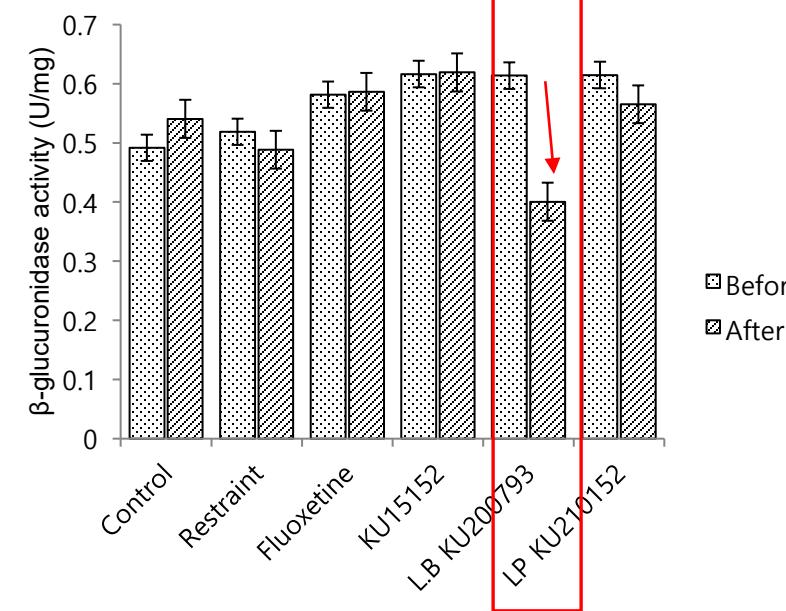


- Beta-diversity 분석: 정상군과 우울증 발현군 사이에 군집변화 확인

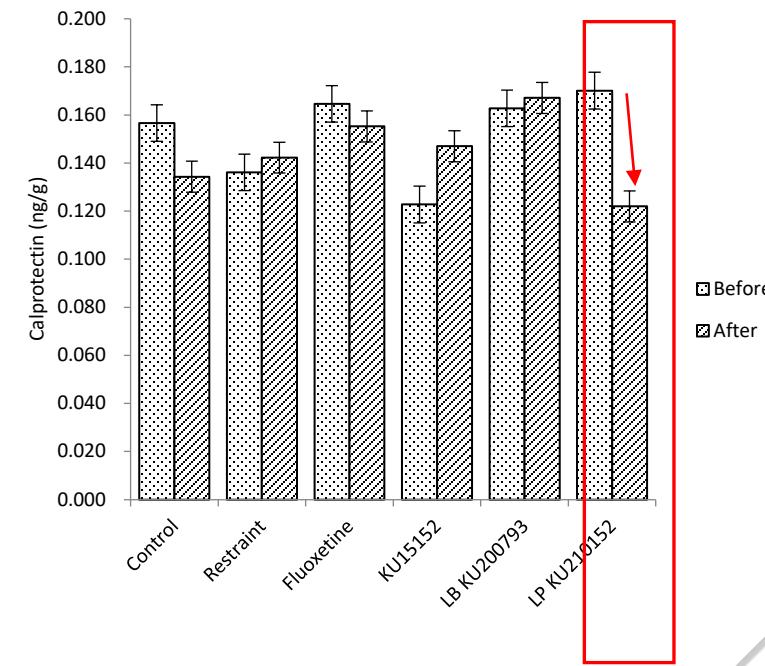
Production of SCFAs



Production of β -glucuronidase



The contents of Calprotectin



- To obtain one commercially viable candidate microorganism, research on approximately 7 types is required.

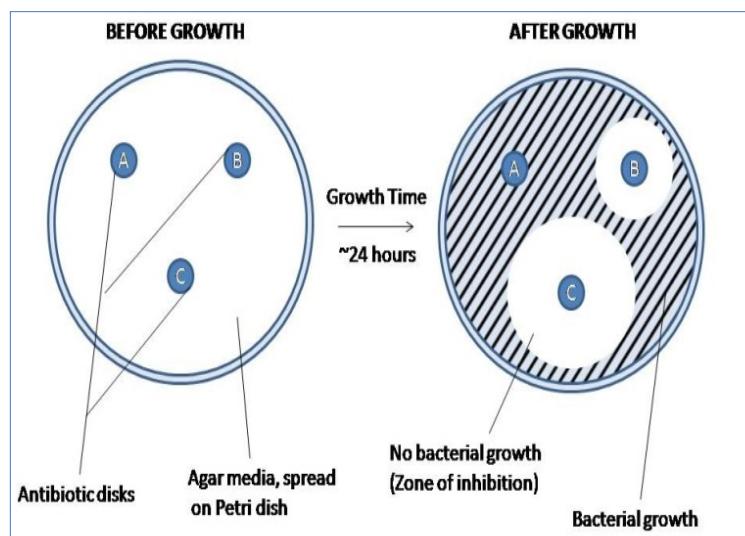


Antibacterial / Antiviral activity test

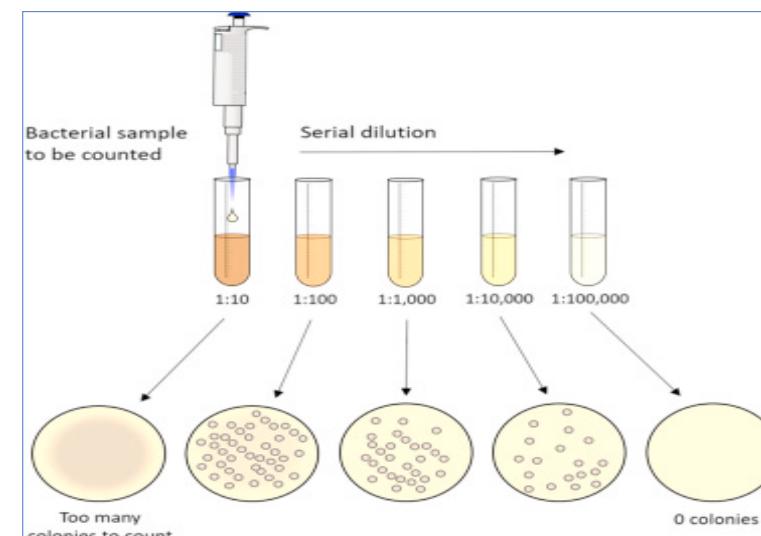
2020년 시작된 코로나의 여파로 개인 위생의 중요성이 강조되면서 플라스틱과 금속 등 소재시장에서도 '항균과 항바이러스 기능'을 갖춘 신소재들이 부상하고 있다. 방역용품 등 보건, 의료분야 뿐 아니라 식품포장재와 생활용품, 생활가전 등 다양한 분야에 항균소재가 적용되면서 항균과 항바이러스 관련 R&D 규모도 갈수록 커지고 있다.

1) 항균능 평가

크게 정성평가와 정량평가로 나눌 수 있다. 정성평가는 정확한 항균능을 수치로 표현하지 않고 능력의 유무를 판단해 주는 평가이며, 정량평가는 얼마나 균을 억제시키는지에 대한 감소율을 수치로 평가하게 된다. 대표적으로 디스크확산법과 희석법을 많이 사용한다.



정성평가_디스크 확산법 (Paper disc method)



정량평가_희석법 (Dilution method)

IV-2. Functional evaluation (antibacterial/antiviral activity)

<규격 시험>

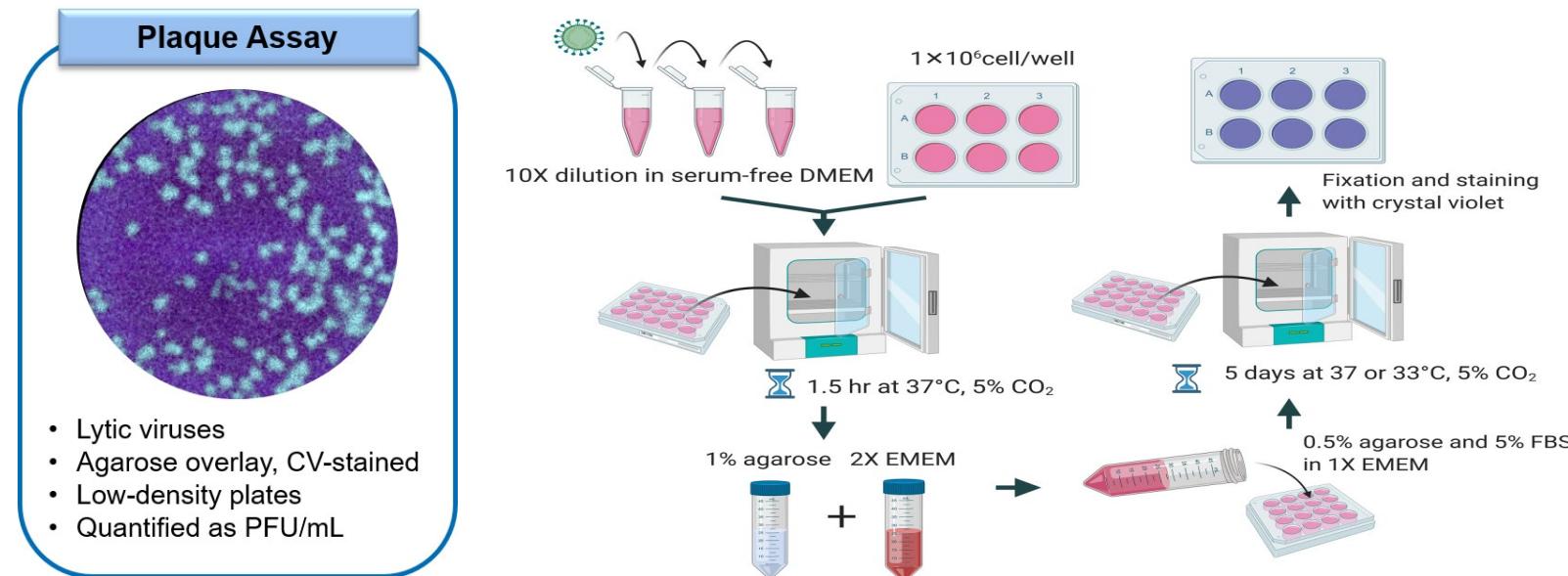
시험법	시험명	대상 및 방법	시료형태	시험결과
ASTM E 2149	Antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions	K. pneumoniae	고형시료, 액상시료	%
ASTM E 2315	Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure	S. aureus, K. pneumoniae	액상시료	Log, %
식약처 가이드라인	외용소독제(의약외품) 효력평가법 가이드라인	포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 6538), 대장균(<i>Escherichia coli</i> , ATCC 11229 또는 ATCC 10536)	액상시료	%
KS K 0890	텍스타일 재료의 항균성 시험방법: 평행 구획선법	S. aureus, K. pneumoniae	섬유, 다공성 시료	mm
KS K ISO 20645	텍스타일 — 항균성 측정 — 한천 확산 평판 시험	S. aureus, K. pneumoniae	섬유, 다공성 시료	mm
KS K 0693	직물의 항균도 시험방법	S. aureus, K. pneumoniae	섬유, 다공성 시료	%
KS M ISO 22196	플라스틱 및 기타 비다공성 표면에서 항균 활성 측정	S. aureus, K. pneumoniae	플라스틱, 금속 및 비다공성 시료	Log, %

<기타 시험>

시험법	시험명	대상 및 방법	시료형태	시험결과
항균성(정성)분석	한천확산법(agar diffusion test)을 통한 clear zone 분석	S. aureus 외 병원균	고형시료, 액상시료	mm
항균도(정량)분석	flask cultivation을 통한 항균활성 정량분석	S. aureus 외 병원균	고형시료, 액상시료	%
MIC 및 MBC 분석	희석감수성 분석을 통한 시료의 최저 항균활성 분석	S. aureus 외 병원균	고형시료, 액상시료	μg/mL
항생제 감수성분석	희석법과 원판확산법을 통해 항생제 내성 분석	S. aureus 외 병원균	고형시료, 액상시료	μg/mL
부유세균분석	챔버 내 부유세균 저감능 분석	S. aureus 외 병원균	고형시료, 액상시료	%

1) 항바이러스능 평가

바이러스 정량평가를 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법은 플라크 분석, 50% 조직 배양 감염 용량(TCID50) 등이 있다. 플라크(plaque)란 바이러스감염에 의하여 세포 변성을 일으킨 단층세포 부위로서, 플라크 주위의 정상세포는 염색되므로 구별 된다. 한 개의 감염성이 있는 바이러스 입자는 하나의 플라크를 형성한다는 이론 하에 plaque assay은 각종 바이러스의 정량에 사용된다.



The antiviral activity of probiotic candidate strains must be tested in animals and humans.

IV-2. Functional evaluation (antibacterial/antiviral activity)

<규격 시험>

시험법	시험명	대상 및 방법	시료형태	시험결과
ASTM E 1052	Efficacy of Antimicrobial Agents Against Viruses in Suspension	Influenza A virus, Calicivirus, Coronaviru	고형시료, 액상시료	%
KS K ISO 18184	텍스타일 – 섬유제품의 항바이러스 활성도 측정	Influenza A virus, Calicivirus, Coronaviru	섬유, 다공성 시료	Log, %
KS M ISO 21702	플라스틱 및 기타 비다공성 표면에서 항바이러스 활성도 측정	Influenza A virus, Calicivirus, Coronaviru	플라스틱, 금속 및 비다공성 시료	Log, %
국립환경과학원 지침	코로나-19 소독효과 검증을 위한 효과·효능 시험기준	Coronavirus	고형시료, 액상시료	Log, %

<기타 시험>

시험법	시험명	대상 및 방법	시료형태	시험결과
부유바이러스분석	챔버 내 부유바이러스 저감능 분석	Influenza A virus	고형시료, 액상시료	Log, %
ISO 10993-5	세포독성평가	MTT assay	고형시료, 액상시료	%

Thank you