

Bacillus subtilis AK균 발효액(Enzamin)의 섭취 후 장내 유익세균의 분포조사

류서원^{1*} · 이형환^{2*}

¹류서원동의연구소, ²건국대학교 생명과학과

Distribution of Beneficial Bacteria in the Intestines after Enzamin Ingestion of *Bacillus subtilis* AK Strain Fermentation

Ryu Seo Won^{1*} · Hyung H. Lee^{2*}

¹RSW Dongeu Res. Institute, Jecheon 21137, Korea

²Dept. of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

(Received September 3, 2018 / Revised September 11, 2018 / Accepted September 17, 2018)

Abstract Purpose: The purpose of this study was to investigate whether intestinal proliferation is promoted in beneficial intestinal bacteria or decreased in harmful bacteria before and after ingesting *Bacillus* fermentation broth (ENM) for 8 weeks in the 16 subjects. **Method:** Intestinal bacteria were identified by PCR amplification using specific 16S rRNA primers. **Results:** The *Bifidobacterium* gene index(%)(gi%) increased to 58.92% in the control group and 69.53% in the test group after the ingestion of ENM, but there was no significant difference. *Lactobacillus* gi% increased significantly (49.37% in the control and 66.43% in the test) ($p < .029$). *Clostridium* gi% was significantly decreased after treatment (83.16% in the control and 67.76% in the test) ($p < .077$). *Bacteroides* gi% increased significantly (12.58% in the control and 20.87% in the test) after ingesting ($p < .095$). *Prevotella* gi% increased significantly (7.55% in the control and 17.28% in the test) after ingesting ($p < .005$). After ingesting, the median bacteria increased significantly in the control (20.06%) and the test (35.88%) ($p < .001$). **Conclusions:** After ingestion of the ENM, the number of beneficial bacteria increased and the number of harmful bacteria *Clostridium* tended to decrease. This suggests that ingestion of the *Bacillus* fermented beverage ENM has an effect on the proliferation of intestinal bacteria.

Key words: *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, Intestine bacteria

초록 목적: 본 연구는 임상대상자 16명에게 *Bacillus* 발효용액(ENM)을 8주간 섭취시키기 전 후에 임상대상자들의 변에서 주요 목표 장내 유익세균의 증식이 촉진 되는지 및 유해균은 감소하는지를 연구하는 것이 목적이었다. **방법:** 장내세균은 16S rRNA 특정 Primer를 이용하여 PCR 증폭기로 동정 검색하였다. **결과:** *Bifidobacterium*속 gene index (%) (=gi%)는 ENM섭취 후에는 대조군이 58.92%, 임상군은 69.53%로 증가하였으나 유의성은 없었다. *Lactobacillus*속 지수는 사후에는 대조군이 49.37%, 임상군은 66.43%로 유의성이 있게 증가하였다 ($p < .029$). *Clostridium*속 지수는 사후에는 대조군이 83.16%, 임상군은 67.76%로 유의하게 감소하였다($p < .077$). *Bacteroides*속 지수는 사후에는 대조군이 12.58%, 임상군은 20.87%로 유의성이 있게 증가하였다($p < .095$). *Prevotella*속 지수는 사후에는 대조군이 7.55%, 임상군은 17.28%로 유의성이 있게 증가하였다($p < .005$). 중간균체는 사후검사의 경우에는 대조군이 20.06%, 임상군은 35.88%로 유의성이 있게 증가하였다($p < .001$). **결론:** *Bacillus* 발효액(ENM)을 섭취 후에는 유익균 수는 주로 증가하였고, 유해균인 *Clostridium*균수는 감소하는 경향을 보였다. 이는 발효음료 ENM의 섭취가 유익한 장내세균의 증식에 영향을 주는 것으로 판단된다.

주제어: *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, 장내세균

*Corresponding author. Hyung H. Lee (Professor); Ryu Seo Won (Ph.D.)
E-mail: sanggido@nate.com; rswregina@naver.com

서 론

장내 미생물은 병원균의 침입을 방어하고 면역체계를 보강시키고 비타민 및 지방산을 생산 공급하여 인체대사 조절에 관여한다. 또한 인체와 상호작용을 통해 인간의 건강과 질병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Ley *et al.*, 2006; Clemente *et al.*, 2012). 신생아의 장내 미생물은 *Lactobacillus*, *Prevotella*가 주종으로 엄마의 질 미생물과 유사하고, 제왕절개로 태어난 신생아는 *Staphylococcus*, *Corynebacterium*이 주종으로 엄마의 피부 미생물과 유사하여 출산방법이 초기 미생물 정착에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다(Dominguez-Bello *et al.*, 2010).

모유 수유를 하는 영아의 장내 미생물은 분유 수유아동에 비하여 생물다양성이 풍부하고 이질적이다(Schwartz *et al.*, 2012). 장내 미생물이 정착하게 되면 다른 바이러스, 세균을 포함한 병원균의 침입을 막는 역할을 한다. 출생 후부터 2.5년 동안 12회에 걸쳐 영아 1명의 장내 미생물총을 분석한 논문에서, 출생 초기에는 유당분해 효소가 풍부하고, 이유식을 시작하기 전부터 식물 다당류 대사에 관여하는 유전자가 증가하고, 일상 식사를 시작하면서 *Bacteroides*가 주종인 안정적인 미생물총이 되며, 2.5세에 성인과 유사한 미생물총을 이루며 식사의 변화나 항생제 치료가 미생물 유전체의 주요한 변화를 가져온다(Koenig *et al.*, 2011).

장내미생물은 인체의 장내에서 상호공생 또는 길항 관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체 성분을 이용하고 증식 및 배설이 되고 있다.

이러한 장내 미생물군은 사람의 나이와 식이 등에 따라서 크게 영향을 받으며, 이들 군 집단의 조성은 노화, 변비, 장관 관련 질환발생 등과 관계가 깊은 것으로 알려져 있다(Mitsuoka, 1990; Lee 등, 2001). 장내의 세균집단이 다양하여 이의 분류방법이 필요하다. Weinstock(2012)은 16S ribosomal RNA gene (rRNA)를 분석하여 장내의 많은 균을 분석하는 방법을 개발하였다. 16S rRNA에는 모든 종(species)에 공통적인 보존영역과 특정 종을 분류할 수 있는 초기변영역이 존재해서 염기서열분석을 통해 미생물의 종을 분리해낼 수 있다. 계통형(phylogroup)에 따라서 종은 16S rRNA의 97% 이상이 일치하고, 속(genus)은 94% 이상, 과(family)는 90% 이상, 목(order)은 85% 이상, 강(class)은 80% 이상, 문(phylum)은 75% 이상이 일치한다고 하였다.

장내미생물은 크게 유익균인 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 속과 유해균인 *Clostridium*, *Eubacterium*, *Veilonella* 속 등으로 나뉜다. 대표적인 유익균인 *Bifidobacterium* 속은 장내에서 유익한 물질을 생산하는 것으로 보고되어 있고, 반면에 대표적인 유해균인 *Clostridium*속은 여러 가지 다양한 독소를 생산하여 장염 등에 깊이 관여하는 병원체이다(Smith, 1979; Bartlett, 2002).

세계보건기구(WHO)와 국제식량기수(FAO)의 합동전문가 위원회는 ‘probiotics를 살아있는 미생물로 적당한 양을 섭취

하면 건강에 유익한 세균’이라고 정의하였다(FAO/WHO, 2001). 유기산과 항생물질을 생산하여 병원균의 성장과 유해균의 과잉성장을 억제하는 *Lactobacillus*속, *Saccharomyces*속 *Bifidobacterium*속, *Bacillus*속 등이 이에 속한다(Oh, 2008).

Prebiotics는 probiotics의 성장에 필요한 영양소를 의미하며, lactinol, lactulose, fructooligosaccharide, galactooligosaccharide 및 oligosaccharide등이 있다고 하였다(FAO/WHO, 2001). oligosaccharide는 glucose나 galactose등의 단당이 2~10개 정도 결합한 300~20,000의 저분자 물질로 생체내의 소화효소에 분해되지 않고 대장에 도달하여 유용세균인 *Bifidobacterium* 등이 선택적으로 이용할 수 있다(Ku *et al.*, 1997). 최근에 많은 형태의 유산균함유 건강식품에서 유산균과 prebiotics가 혼합된 형태의 제품이 유행하고 있으며 이렇게 조합된 제품을 synbiotic이라한다(Choi *et al.*, 2004).

Harrison & Peat(1975)는 인공수유를 하는 신생아의 변에서 *Lactobacillus acidophilus*균의 수가 증가함에 따라서 혈청 콜레스테롤이 감소하는 것을 발견하였고, Grunewald(1982)는 쥐에게 *L. acidophilus*균 발효유를 먹였을 때에 혈청콜레스테롤이 낮아지는 것을 보고하였다.

Kubo *et al.*(2011)은 아포를 형성하는 *Bacillus subtilis* var. *natto* 균주는 벧짚에서 분리하였으며, 이 균을 이용하여 콩을 발효하여 얻은 natto가 일본의 대표적 전통식품이 되었다고 하였다. Kazumi Akasawa가 선발한 *B. subtilis* AK균주는 probiotics 유사 기능을 가진 대사산물을 생산하며, *B. subtilis* AK ‘EMBSAK’와 ‘SARABAGAN’으로 상품화되어있으며, 쥐와 인체의 실험에서 NK(natural killer) 세포활성에 효과가 높았다고 보고하였다(Takeda *et al.*, 2016). 이와 같이 *Bacillus subtilis* 균주의 발효액이 인체의 건강에 도움이 되는 것으로 보고되어 있어서 연구의 동기를 부여하였다.

본 연구는 한국인 대상자에게 *Bacillus* 발효용액(ENM)을 8주간 섭취시킨 후에 대상자들의 주요 장내 유익세균이 장내에서 증식이 촉진되는지 또는 유해균은 감소되는지를 연구하는 것이 목적이었다.

재료 및 방법

임상대상자, 실험기간 및 실험장소

임상대상자는 모두 32명으로 대조군 대상자 16명, 임상군 대상자 16명으로 구성되었다. 대조군은 남성이 8명, 여성이 8명이었다. 임상군은 남성이 6명, 여성이 10명이었다(Table 1). 본 연구에 참여한 대상자들은 본 연구의 목적을 충분히 이해하고 참여를 자의적으로 결정하여 모두가 동의하고 서명을 하고 참여하였다.

임상기간은 2018년 2월 19일~2018년 4월 16일(8주간) 사이에 실시하였다. 연구기획 및 장소는 류서원동의연구소(충북 제천시 의림대로50길 16-1)와 건국대학교 생명과학과(서울 광진구 능동로120)에서 공동으로 기획실시하였다. 미생물검정은 “(주)바이오일레븐 기업부설_김석진좋은균연구소”(서울 강

Table 1. General characteristics of Subjects

Control group				Experimental group			
Name	Sex	Age	Weight (kg)	Name	Sex	Age	Weight (kg)
1	F	58	50	1	F	53	55
2	F	56	51	2	F	61	54
3	F	57	52	3	F	52	55
4	F	56	49	4	F	56	52
5	F	60	50	5	F	61	54
6	F	59	48	6	F	57	52
7	F	56	53	7	F	58	54
8	F	57	60	8	F	57	57
9	M	61	63	9	F	50	52
10	M	66	65	10	F	49	47
11	M	55	65	11	M	53	60
12	M	66	67	12	M	52	58
13	M	56	58	13	M	57	59
14	M	50	60	14	M	61	65
15	M	52	58	15	M	60	64
16	M	63	57	16	M	59	62
Mean			56.6				56.3

남구 테헤란로 34길6 태광타워 10층)에 의뢰하여 분석하였다.

Enzamin(ENM) 발효 공정윤곽

배지의 조성분(주요성분 배합비율은 전체 중량 비율: 육즙 추출물 5.0, 펩톤 10.0, 염화나트륨 5.0, 환천 15.0, 야채(양배추, 당근, 셀러리, 피슬리)의 압착 주스) [일본 특허 No. 3902

015호, 2007년 1월 12일 보건영양식품의 제조방법(상표: ENM)] (Enzamin Research Institute, 2007)을 계량한 후에 혼합하여 증류수에 혼합분말을 넣고 배지 제조준비를 완료하였다. 다음에 배지 용액을 121°C에서 20분간 멸균하였다. 별도로 배양된 종균인 *Bacillus subtilis* AK균을 접종하여 발효를 32°C의 항온실에서 60일 이상 진행한 후에 숙성을 15°C 항온실에서 120일 이상을 시켰다. 발효액을 다시 멸균을 110°C에서 20분간 시킨 후에 냉방에서 자연 냉각을 하였다. 냉각 후에 종이여과지(pore size: 3 µm)로 여과를 하였고, 구연산으로 pH 3.5~3.7로 조정하였다. 여과액을 95°C에서 살균을 20분간 한 다음에 90°C에서 샘플병 등에 담고 탁도 검사(Brix, pH, 세균 등)를 실시하였고, 30°C 이하로 냉각을 하여 냉암소에 보관하였다(Enzamin Research Institute, 2007; The future of Enzamin, 2018).

ENM발효액 성분

Bacillus subtilis AK균주로 발효하여 얻은 ENM 배양액 600 ml 중의 성분을 퍼센트(%)로 분석한 자료(Enzamin laboratory Company, Kyoto, Japan; The future of Enzamin, 2018)를 Table 2에 제시하였다.

Bacillus 발효액, 섭취량 및 번 채취

임상대상자인 대조군에게는 유사음료인 물을 10 ml씩, 임상군에게는 *Bacillus* 발효한 ENM 발효용액(Lot. 001641, Enzamin Laboratory Co., LTD., 1 Chome-6-8 11F Higashi-tenma, Kita, Osaka, Japan)을 매일 10 ml를 컵에 담아서 8주간 섭취시켰다. 8주간 섭취 후에 아침식사 전에 멸균 튜브

Table 2. Ingredients of ENM liquids fermented by *B. subtilis*

Field materials	Quantity (%/600 ml)	Field materials	Quantity (%/600 ml)
Enzamin (plant fermented extract)	25%	niacin	0.06
galactooligosaccharides	proper Quantity (pq)	valine	0.048
apple fruit juice	pq	threonine	0.045
honey	pq	isoleucine	0.04
ume fruit juice	pq	methionine	0.035
fructose	pq	Ca pantothenate	0.03
apple vinegar	pq	histidine	0.025
yeast extract powder	0.06	stevia extract	pq
rankanka extract	pq	arginine	0.02
NaCl-decreased brine	0.7	tryptophan	0.015
Ca lactate	0.5	thiamine HCl	0.006
ascorbic acid	0.5	riboflavin5'-p-na	0.006
caramel color	pq	pyridoxine HCl	0.006
leucine	0.09	folic acid	0.0012
phenylalanine	0.085	cyanocobalamine	0.000012
lysine	0.08	refinement water	53.128
citric acid	pq	Total sum	100%

Analysed at the Dept. of Quality Control, Kyoto Factory, Enzamin Laboratory Co., LTD. Kyoto, Japan. URL/www.enzamin.com

(Sarstedt, Numbrecht, Germany)에 변을 받아서 가정용 -20°C 냉동실에 보관하였다가 분석실에서는 -80°C에 보관하였다가 PCR분석에 사용하였다.

세균 동정에 사용한 PCR용 primers

목표 장내세균을 탐색하기 위하여 기존의 특정세균 그룹의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 만든 PCR용 탐침자(primer)를 Table 3에 제시하였다(Kook *et al.*, 2018).

대상자들의 변 샘플에서 세균 DNA의 추출

ENM 용액을 10 ml을 섭취 후 8주 뒤에 대변을 받아서 냉동을 하였으며, 냉동된 stool DNA추출은 Kook *et al.*(2018)의 방법을 이용하였다. 대상자들이 플라스틱 튜브 키트에 받은 변에서 200 mg을 채취하여 생리식염수 3 ml에 분주한 다음에 유리구슬(0.1 mm diameter)(Biospec, Orlando, FL., USA)을 넣고 균질하게 분쇄하였다. 변의 세균 DNA는 QIAamp stool DNA extraction kits (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 회사의 기술서대로 추출을 하였다. 추출한 DNA를 농축한 후에 순도검사는 spectrophotometer (Nano Drop Technology, Washington, DE, USA)로 하였다. 모든 추출한 DNA는 -80°C 저온냉동고에 사용하기 전까지 보관하였다.

PCR검사용 장내세균 종류와 동정법

검색하고자 하는 목표세균은 Table 4에 제시하였으며, 세균들은 Rinttila *et al.*(2004); Schmittgen & Livak(2008);

Kook *et al.*(2018) 등의 qPCR방법으로 대상자들의 변 샘플(stool sample)에 있는 균들을 DNA를 추출하여 동정하였다. Table 2의 특정세균 속(genus)의 16s rRNA 유전자를 증폭하여 만든 Table 1의 탐침자 DNAs들을 ABI SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 혼합하여 qPCR를 진행하였다. 변 샘플에서 추출한 DNA를 농축한 후에 순도검사는 spectrophotometer로 230 nm, 260 nm, 280 nm에서 비율을 측정하였다(Nano Drop Technology, Washington, DE, USA). PCR후에 각 세균의 속(genus)별로 농축한 DNAs는 세균의 ΔCT(threshold cycle) values로 정량계산을 하였다(Schmittgen & Livak, 2008).

$$\Delta CT \text{ values} = (\text{특정 세균의 종(species)의 CT gene} - 16s \text{ RNA의 CT})$$

Bacteria gene index(=ΔCT values) 수치는 유전자의 상대정량 방법으로 목적 유전자와 참고 유전자의 발현량을 측정하여 도출하였다. 이 수치를 ‘김석진중은균연구소’에서 축적한 한국인의 장내세균구성 데이터와 비교 분석하여 세균을 지수화할 때 유익균 수가 평균보다 많고 적음을 판단하였다(Kook *et al.*, 2018).

Bacteria gene copy index(%)=(number of bacteria%)는 분석된 bacteria의 양을 한국인의 장내세균구성 데이터베이스와 비교 분석하여 백분율로 환산한 수치이다(Kook *et al.*, 2018).

Table 3. Primer sequences and sizes used in PCR

Bacterial genus	Primer directions	Primer Sequences (5'→3')	PP size (bp)
<i>Lactobacillus</i>	forward	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	341
	reverse	CACCGCTACACATGGAG	
<i>Bifidobacterium</i>	forward	GGGTGGTAATGCCGGATG	442
	reverse	TAAGCGATGGACTTTTCACACC	
<i>Bacteroides</i>	forward	ATAGCCTTCCGAAAGRAAAGAT	495
	reverse	CCAGTATCAACTGCAATTTTA	
<i>Clostridium</i>	forward	CGGTACCTGACTAAGAAGC	429
	reverse	AGTTTTYATTCTTGCGAACG	
Universal	forward	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	467
	reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	

pp size : predicted PCR product size(bp), bp: base pair. Quoted from Kook *et al.*,(2018).

Table 4. Target bacterial strains for determination of qPCR

Bacterial genus	Standard strains	qPCR effc. (%)	Sources
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC393	103.5	Kook <i>et al.</i> (2018)
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM10602	90.7	
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	96.9	
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium sphenoides</i> ATCC19403	96.8	
Universal	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC393	101.6	

Quoted from Kook *et al.*,(2018). effc: efficiency.

통계자료처리방법

통계처리는 SPSS/WIN 통계프로그램 22.0을 활용하였으며 분석방법은 다음과 같다. 첫째, 집단에 따른 장내세균의 차이를 알아보기 위해 독립표본 *t*-test를 실시하였고 검사전후에 따른 장내세균의 차이를 알아보기 위해 대응표본 *t*-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

대상자들의 일반적 특성

임상대상자는 16명, 대조군 16명으로 총 32명이었다. 대조군은 남성이 8명, 여성이 8명, 연령대는 49-55세가 6명, 56-60세가 9명, 61-67세가 6명이었다. 임상군은 49-55세가 6명, 56-60세가 7명, 61-67세가 3명이었다. 전체적으로 중장년층이 주를 이루고 있다. 체중은 대조군은 40-49 kg이 2명, 50-60 kg이 10명, 61-67kg 4명이었으며, 평균체중은 56.6세이었다. 임상군은 49 kg이 1명, 50-60 kg이 13명, 61-67 kg이 2명이었으며, 평균 체중은 56.3 kg이었다(Table 1). 대조군과 임상군의 평균체중이 56 kg으로서 평형을 이루고 있었다.

Bifidobacterium genus 유전자검색 수치

임상대상자 16명에게 ENM 발효용액 10 ml을 8주간 섭취시킨 후에 임상대상자들의 변 샘플을 채취하여 장내세균 증폭표 대상 균 중의 하나는 *Bifidobacterium* 속의 유전자를 qPCR법으로 동정을 하였다. 임상 전후의 검색한 *Bifidobacterium*의 지수를 계산하여 Table 5에 제시하였다. 결과를 살펴보면 ENM음용전의 사전검사의 경우에는 대조군(61.88%)과 임상군(63.51%)의 gene index(%) (=gi%)는 유의한 차이를 보이지 않아서 사전검사는 동질성이 확보되었다. 사후검사의 경우에는 대조군이 58.92%, 임상군은 69.53%로 임상군의 *Bifidobacterium* gi%가 10.61%나 높게 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

유사한 연구로 Kook *et al.*(2018)은 qPCR을 이용하여 장내세균 중에서 *Bifidobacterium*속이 28.69%가 서식하는 것을

Table 5. Differences of estimated gi% of *Bifidobacterium* genus before and after ingesting

Test time	Group	N	M(%)	SD	<i>t</i>	<i>p</i>
Before	Test	16	63.51	28.098	.151	.881
	Con	16	61.88	32.885		
After	Test	16	69.53	22.284	1.032	.310
	Con	16	58.92	34.561		

p*<.05, *p*<.01, ****p*<.001.

Con: control group, N: number, M: mean, SD: standard deviation. gi%: gene index(%). The abbreviations are the same in the following tables.

확인하였다. 본 연구에서도 rRNA primer를 이용하여 *Bifidobacterium* 속이 서식하는 것을 확인한 결과와 일치하였다. Table 5의 데이터는 대조군과 실험군 각각 16명의 전체적인 총괄 데이터이었다. 대상자 중의 1번의 대상자를 분석하여 보았다. 2018년 2월 19일에 분석한 자료(Fig. 1A)와 2018년 4월 16일에 분석한 자료(Fig. 1B)를 비교분석하였다. 대상자 1번의 *Bifidobacterium*속의 PCR에서 산출한 대상유전자의 함량을 ‘김석진좋은균연구소’의 축적한 한국인 전체 장내세균 구성 데이터로 나눈 수치는 Fig. 1A 와 Fig. 1B에 제시되었다. 여기서 *Bifidobacterium* gene-index(=gi)는 Fig. 1A데이터에서는 대상자 1번의 지수는 3.4×10^{-3} 이었고, 8주 후의 Fig. 1B데이터에서는 1.45×10^{-2} 으로 약 유익균 수가 4.26배가 증가하였다(Table 6).

또한 *Bifidobacterium* gene-index(%) (=gi%)는 분석된 *Bifidobacterium*의 양을 한국인의 장내세균구성 데이터베이스와 비교분석하여 백분율로 환산한 수치이다. *Bifidobacterium* 균수는 Fig. 2A에서는 64.9%, 8개월 후의 조사한 Fig. 2B 및 Table 6에서는 93.1%로 28.2%가 증가하였다. 김석진 연구소의 데이터베이스의 한국인 장내세균 평균치는 68%이었는데 대상자-1번은 93.1%로 높게 나타났다. ENM음료의 섭취가 장내의 상기 박테리아의 증가에 기여하는 것으로 평가된다.

Fig. 1과 2의 수치는 유전자의 상대정량 방법으로 목적 유

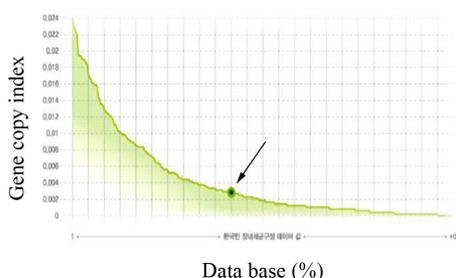


Fig. 1A. *Bifidobacterium* genus gene index estimated at Feb. 19, 2018. The spot indicates the mean value of No.1 subject.

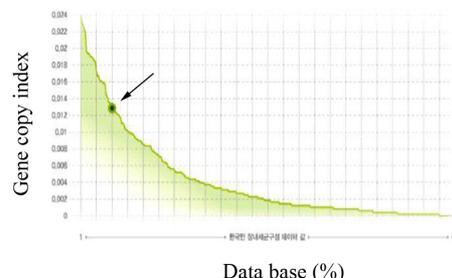


Fig. 1B. *Bifidobacterium* genus gene index estimated at April 16, 2018. The spot indicates the mean value of No.1 subject.

Gene index(gi) 수치는 유전자의 상대정량 방법으로 목적 유전자와 참조 유전자의 발현량을 측정하여 도출하였다. 이 수치를 ‘김석진좋은균연구소’에서 축적한 한국인의 장내세균구성 데이터와 비교 분석하여 *Bifidobacterium*지수화 할 때 유익균 수가 평균보다 많고 적음을 판단하였다.

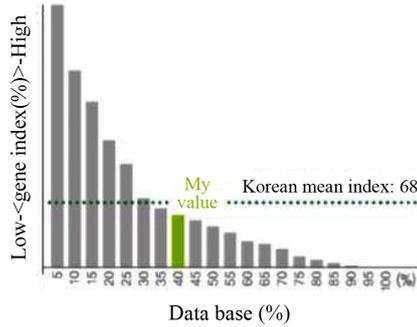


Fig. 2A. *Bifidobacterium* genus gene index(%) at Feb. 19, 2018.

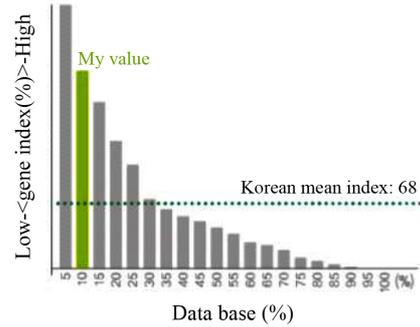


Fig. 2B. *Bifidobacterium* genus gene index(%) at April 16, 2018.

Bifidobacterium genus gene index(%)는 분석된 균의 양을 한국인의 장내세균구성 데이터베이스(‘김석진좋은균연구소’에서 축적한 한국인의 장내세균구성 데이터)와 비교·분석하여 백분율(%)로 환산한 수치이다.

전자와 참고 유전자의 발현량을 측정하여 도출하였다. 이 수치를 ‘김석진좋은균연구소’에서 축적한 한국인의 장내세균구성 데이터와 비교 분석하여 비피도지수화 할 때 유익균 수가 평균보다 많고 적음을 판단할 수 있다. 대추추출물을 첨가한 배지에서 *B. bifidum*의 생육이 증가한다는 Jeong *et al.*(2011) 결과도 본 연구결과인 *Bacillus subtilis* AK균의 발효액을 섭취 후에 장내에서 서식이 증가하는 결과는 유사한 예라 본다. AK균주로부터 생성된 ENM에는 저분자 아미노산 잔기를 포함하고 있는 기능성 식품(The future of enzamin, 2018)이라서 *Bifidobacteria*의 증식에 발효물이 효과를 높였다고 판단할 수가 있다.

Table 7에서 보는 바와 같이 대조군과 임상군별 사전 및 사후의 *Bifidobacterium* gi%의 차이를 제시하였다. 유사음료를 섭취한 대조군의 경우에는 사전이 61.88%, 사후가 58.92%로 유사물질 섭취 전보다 섭취 후에 *Bifidobacterium* 수치가 약 2.96%가 낮아졌으나 유의성이 없었다. 임상군의 경우에는 사전이 63.51%, 사후가 69.53%로 ENM음료섭취 전보다 섭취 후에 *Bifidobacterium*의 수치는 약 6.01%가 높아졌으나 유의성은 없었다. 그러나 섭취 후에 균의 수치가 6.01%가 증가한 것은 *Bacillus subtilis*균의 발효액(ENM)을 섭취 후에 장내에서 서식이 증가하였다고 판단된다.

Lactobacillus genus DNA검색 수치

임상대상자 16명에게 ENM발효용액 10 ml을 8주간 섭취

Table 6. Gene index and gene index(%) of bacteria of subject-1 after ingesting

Bacteria	Gene index		Gene index (%)	
	A	B	A	B
<i>Bifidobacterium</i>	3.4×10^{-3}	1.45^{-2}	64.9	93.1
<i>Lactobacillus</i>	1.98×10^{-5}	2.45^{-4}	29.3	66.7
<i>Clostridium</i>	1.19×10^{-4}	3.28×10^{-1}	92.8	99.7
<i>Bacteroides</i>	-	-	-	-
<i>Prevotella</i>	-	-	-	-

A: examined at February 19, 2018. B: examined at April 16, 2018.

전후에 임상대상자들의 변 샘플을 채취하여 장내세균 중 목표 대상균 중의 하나는 *Lactobacillus* genus의 유전자를 qPCR법으로 동정을 하였다. 임상 전후의 검색한 *Lactobacillus*의 지수를 계산하여 Table 8 및 Fig. 3에 제시하였다. 결과를 살펴보면 섭취전의 사전검사의 경우에는 대조군(59.13%)과 임상군(53.5%)의 gi%비교는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아서 사전 동질성이 확보되었다.

사후검사의 경우에는 대조군이 49.37%, 임상군은 66.43%로 임상군이 *Lactobacillus* gi%가 17.06%나 높게 증가하여 통계적으로 유의하였다($p < .029$).

Kook *et al.*(2018)은 qPCR을 이용하여 장내세균 중에서 *Lactobacillus* genus 균이 3% 정도가 서식하는 것을 확인하였다. 본 연구에서도 rRNA primer를 이용하여 *Lactobacillus* genus균이 서식하는 것을 확인한 결과 일치하였다.

Table 9 및 Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군과 임상군별 사전 및 사후의 *Lactobacillus* gi%의 차이를 제시하였다. 유사음료를 섭취한 대조군의 경우에는 사전이 59.13%, 사후가 49.37%로 유사물질 섭취 전보다 섭취 후에 낮아졌으나 유의성이 없었다.

임상군의 경우에는 사전이 53.5%, 사후가 66.43%로 ENM 섭취 전보다 섭취 후에 *Lactobacillus*의 수치는 약 12.93%가 높아져서 유의성은 있었다($p < .091$). 본 연구와 *Bacillus subtilis*균의 발효액ENM을 섭취 후에 장내세균의 서식이 증가하였는데, Jeong *et al.*(2011)은 대추추출물을 첨가한 배지에서 *B. adolescentis*의 생육이 증가한다는 연구와 유사한 예라 본다.

Table 7. Comparison of gi% differences between groups of *Bifidobacterium* genus before and after ingesting

Group	Time tested	N	M(%)	SD	t	p*
Test	Before	16	63.51	28.098	-1.028	.320
	After	16	69.53	22.284		
Con	Before	16	61.88	32.885	1.453	.167
	After	16	58.92	34.561		

* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

Table 8. Difference of estimated gi% of *Lactobacillus* genus before and after ingesting

Test time	Group	N	M (%)	SD	t	p*
Before	Con	16	59.13	32.718	-.534	.597
	Test	16	53.50	26.562		
After	Con	16	49.37	23.587	2.296*	.029*
	Test	16	66.43	18.070		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

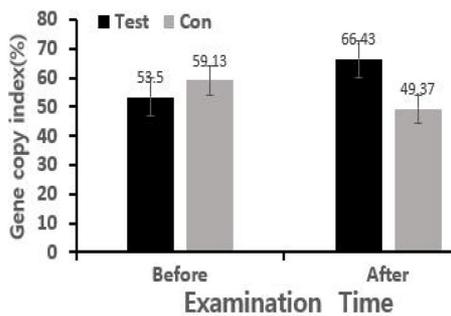


Fig. 3. Differences of estimated gi% of *Lactobacillus* genus after ingesting.

Table 9 및 Fig. 4의 데이터는 대조군과 실험군 각각 16명의 전체적인 총괄 데이터이었다.

대상자 중의 1번의 대상자를 분석하여 보았다. ENM섭취 시작한 2018년 2월 19일과 최종 섭취일인 2018년 4월 16일에 분석한 자료를 비교분석하였다. 대상자1번의 *Lactobacillus* genus의 PCR에서 산출한 대상 유전자의 함량을 ‘김석진좋은균연구소’의 축적한 한국인 전체 장내세균 구성 데이터로 나눈 수치는 Table 6에 제시되어있다.

Lactobacillus genus의 gene index(gi) A와 B데이터에서는 대상자 1번의 데이터 지수는 8주 전에는 1.98×10^{-5} 이었고, 8주 후의 B데이터에서는 2.45×10^{-1} 으로 유익균 수가 약 1,237배가 증가하였다고 본다(Table 6).

또한 *Lactobacillus* gi%는 분석된 *Lactobacillus*의 균수는 한국인의 장내세균구성 데이터베이스와 비교분석하여 백분율로 환산한 수치는 Table 6에 제시되었다. *Lactobacillus* 균수(gene copy수)는 Table 6에서는 29.3%, 8주 후의 조사에서는 66.7%로 37.6%가 증가하였다. ENM음료의 다양한 성분의 섭취가 장내의 상기 *Lactobacillus* 균의 증가에 기여하는 것으로 평가된다.

Clostridium genus DNA검색 수치

임상대상자 16명에게 ENM 발효용액 10 ml을 8주간 섭취 시킨 후에 임상대상자들의 변 샘플을 채취하여 장내세균 중 목표 대상균 중의 하나는 *Clostridium* genus의 유전자를 qPCR법으로 동정을 하였다. 임상 전후의 검색한 *Clostridium*

Table 9. Comparison of gi% differences between groups of *Lactobacillus* before and after ingesting

Test time	Group	M	SD	t	p*
Test	Before	53.50	26.562	-1.805	.091*
	After	66.43	18.070		
Con	Before	59.13	32.718	2.019	.602
	After	49.37	23.587		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

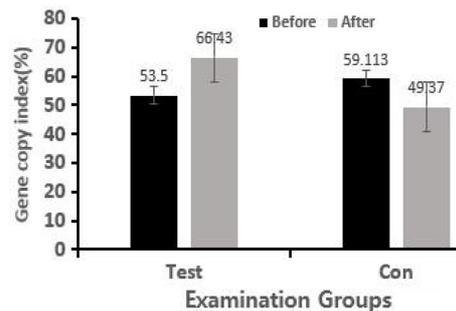


Fig. 4. Differences of estimated gi% between groups of *Lactobacillus* after ingesting ENM.

의 지수를 계산하여 Table 10 및 Fig. 5에 제시하였다. 결과를 살펴보면 ENM음용전의 사전검사의 경우에는 대조군(78.95%)과 임상군(89.21%)의 gi%비교에서는 유의한 차이를 보이지 않아 사전검사에서 동정성이 확보되었다. 사후검사의 경우에는 대조군이 83.16%, 임상군은 67.76%로 임상군이 *Clostridium*지수가 15.37%나 낮게 감소하여 통계적으로 유의하였다(p<.077). Kook et al.(2018)은 qPCR을 이용하여 장내세균 중에서 *Clostridium* genus 균이 28.69% 정도가 서식하는 것을 확인하였다. 본 연구에서도 rRNA primer를 이용하여 *Clostridium* genus균이 서식하는 것을 확인한 결과 일치하였다. *Bacillus subtilis* 발효액 ENM을 섭취하면 유해균인 *Clostridium*균의 수가 감소하는 경향을 나타냈다고 본다.

Table 10 및 Fig. 5의 데이터는 대조군과 임상군 각각 16명의 전체적인 총괄 데이터이었다. 대상자 중의 1번의 대상자를 분석하여 보았다. 2018년 2월 19일 자료와 2018년 4월 16일에 분석한 자료를 비교분석하였다. 대상자1번의 *Clostridium* gene의 PCR에서 산출한 대상 유전자의 함량을 ‘김석진좋은균연구소’의 축적한 한국인 전체 장내세균 구성 데이터로 나눈 수치는 Table 6에 제시되었다. 여기서 *Clostridium* gene의 지수는 gene index A와 B 데이터에서는 대상자 1번의 데이터 지수는 1.19×10^{-4} 이었고, 8주 후의 B데이터에서는 3.28×10^{-1} 으로 약 2,756배가 증가하였다(Table 6).

또한 *Clostridium* index(%)는 분석된 *Clostridium*의 수는 한국인의 장내세균구성 데이터베이스와 비교분석하여 백분율로 환산한 수치는 Table 6에 제시되었다. *Clostridium* 균수(gene

Table 10. Difference of estimated gi% of *Clostridium* genus before and after ingesting

Test time	Group	N	M (%)	SD	t	p*
Before	Test	16	89.21	18.247	1.237	.226
	Con	16	78.95	27.715		
After	Test	16	67.76	26.070	-1.832	.077*
	Con	16	83.16	21.214		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

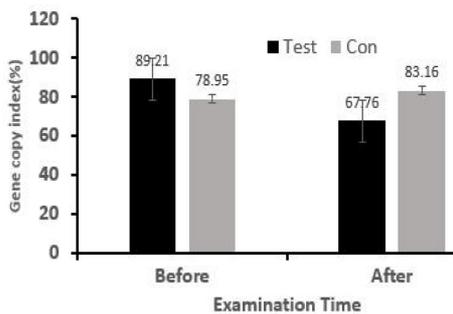


Fig. 5. Differences of estimated gi% between groups of *Clostridium* genus after ingesting.

copy수)는 Table 6에서는 92.8%, 8주 후의 조사에서는 99.7%로 6.9%가 증가하였다. ENM음료의 섭취가 장내의 저해균의 수가 감소에 기여하는 것으로 평가된다. 그 이유는 유익균에 필요한 영양소가 많아서 유익균의 수가 증가하면서 저해균이 상대적으로 생존경쟁에서 밀려서 숫적인 감소가 이루어졌다고 판단한다.

Table 10 및 Fig. 5의 데이터는 대조군과 실험군 각각 16명의 전체적인 총괄 데이터이었다. 대상자 중의 1번의 대상자를 분석하여 보았다. 2018년 2월 19일에 분석한 자료와 2018년 4월 16일에 분석한 자료를 비교분석하였다. 대상자 1번의 *Clostridium* gene의 PCR에서 산출한 대상유전자의 함량을 “김석진좋은균연구소”의 축적한 한국인 전체 장내세균 구성 데이터로 나눈 수치는 Table 6에 제시되었다. 여기서 *Clostridium* gene의 지수는 gene index A와 B데이터에서는 대상자 1번의 데이터 지수는 1.19×10^{-4} 이었고, 8주 후의 B데이터에서는 3.28×10^{-1} 으로 약 3000배가 증가하였다(Table 6).

또한 *Clostridium* index(%)는 분석된 *Clostridium*의 수는 한국인의 장내세균구성 데이터베이스와 비교·분석하여 백분율로 환산한 수치는 Table 6에 제시되었다. *Clostridium* gi% (gene copy수)는 Table 6에서는 92.8%, 8주 후의 조사에서는 99.7%로 6.8%가 증가하였다. ENM음료의 섭취가 장내의 상기 박테리아의 소폭 증가에 머물렀다고 평가된다. 이는 앞에서 언급하였듯이 유익균에 대한 영양공급으로 유익균의 수가 증폭이 되면서 반대로 억제된 것으로 평가된다.

Table 11 및 Fig. 6에서 보는 바와 같이 대조군과 임상군별 사전 및 사후의 *Clostridium* gi%의 차이를 제시하였다. 유사

Table 11. Comparison of differences between groups of *Clostridium* before and after ingesting

Group	Time tested	N	M (%)	SD	t	p*
Test	Before	16	89.21	18.247	4.408	.001*
	After	16	67.76	26.070		
Con	Before	16	78.95	27.715	-1.136	.274
	After	16	83.16	21.214		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

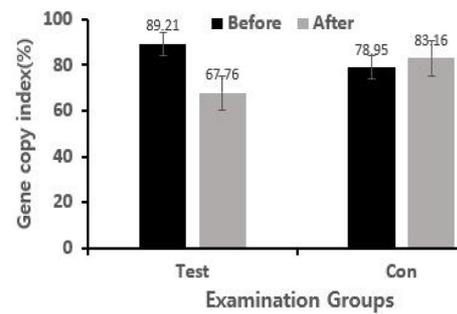


Fig. 6. Differences of estimated gi% between the groups of *Clostridium* after ingesting.

음료를 섭취한 대조군의 경우에는 사전이 78.95%, 사후가 83.16%로 유사물질 섭취 전보다 섭취 후에 *Clostridium*수치가 약4.2%가 증가하여 유의성이 없었다.

임상군의 경우에는 사전이 89.21%, 사후가 67.76%로 ENM 섭취 전보다 섭취 후에 *Clostridium*의 수치는 약 21.45%가 감소하여 통계적으로 유의성은 있었다(p<.001).

Bacteroides genus DNA검색 수치

임상대상자 16명에게 *Bacillus subtilis* 발효액인 ENM 발효액 10 ml을 8주간 섭취시킨 후에 임상대상자들의 변 샘플을 채취하여 장내세균 중 목표 대상군 중의 하나는 *Bacteroides* genus의 유전자를 qPCR법으로 동정을 하였다. 임상 전후의 검색한 *Bacteroides*의 지수를 계산하여 Table 12 및 Fig. 7에 제시하였다. 결과를 살펴보면 음용전의 사전검사의 경우에는 대조군(13.63%)과 임상군(16.13%)의 지수는 2.5%가 증가하여 통계적으로 유의성이 없었다.

ENM섭취 후의 사후검사의 경우에는 대조군이 12.58%, 임상군은 20.87%로 임상군의 *Bacteroides* gi%가 8.28%나 높게 증가하여 통계적으로 유의하였다(p<.095). 임상 전 검사보다 임상 후 검사가 임상군에서 약 8.28%가 높게 나타났다. ENM 섭취가 균의 증가를 높이는 효과가 있다고 판단한다. Kook et al.(2018)은 qPCR을 이용하여 장내세균 중에서 *Bacteroides* genus 균이 40% 정도가 서식하는 것을 확인하였다. 본 연구에서도 rRNA primer를 이용하여 *Bacteroides* genus균이 서식 증가하는 것을 확인한 결과 일치하였다.

Table 13 및 Fig. 8에서 보는 바와 같이 대조군과 임상군별

Table 12. Difference of estimated gi% of *Bacteroides* genus before and after ingesting

Test time	Group	N	M	SD	t	p*
Before	Test	16	16.13	16.859	.488	.629
	Con	16	13.63	11.680		
After	Test	16	20.87	16.753	1.725	.095*
	Con	16	12.58	9.445		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

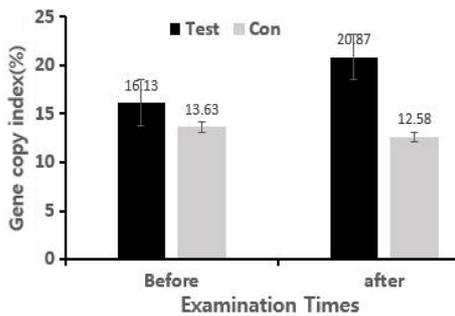


Fig. 7. Differences of estimated gi% of *Bacteroides* genus before and after ingesting.

사전 및 사후의 *Bacteroides* gi%의 차이를 제시하였다. 유사음료를 섭취한 대조군의 경우에는 사전이 13.63%, 사후가 12.58%로 유사물질 섭취 전보다 섭취 후에 *Bacteroides* 수치가 약 1.05가 낮아졌으나 통계적으로 유의성이 없었다. 임상군의 경우에는 사전이 16.13%, 사후가 20.87%로 ENM섭취 전보다 섭취 후에 *Bacteroides*의 수치는 약 4.74%가 높아져서 유의성은 있었다. 본 연구와 ENM발효액을 섭취 후에 장내세균의 서식은 약간 증가하였다고 본다. 그 이유는 ENM성분이 유익균에게 필요한 성분이 균의 증식을 촉진시켰기었다고 판단한다.

Prevotella genus DNA검색 수치

임상대상자 16명에게 ENM 발효용액 10 ml을 8주간 섭취시킨 전후에 임상대상자들의 변 샘플을 채취하여 장내세균 중 목표 대상 균 중의 하나는 *Prevotella* genus의 유전자를 qPCR법으로 동정을 하였다. 임상 전후의 검색한 *Prevotella*의 지수를 계산하여 Table 14 및 Fig. 9에 제시하였다. 결과를 살펴보면 음용전의 사전점사의 경우에는 대조군(10.03%)과 임상군(11.5%)의 비교지수는 유의한 차이는 없었다.

사후점사의 경우에는 대조군이 7.55%, 임상군은 17.28%로 임상군이 *Prevotella* 지수가 9.73%나 높게 증가하여 유의성이 있었다(p<.005). 본 연구와 ENM발효액을 섭취 후에 중간균의 장내세균의 서식은 유의하게 증가하였다고 본다. 그 이유는 ENM성분 중에는 유익균에 유익한 성분들, oligosaccharide나 아미노산 성분들이 *Prevotella* 균에게도 증식에 효율적이었다고 판단한다.

Table 13. Comparison of gi% between groups of *Bacteroides* before and after ingesting

Group	Time tested	N	M	SD	t	p*
Test	Before	16	16.13	16.859	-2.368*	.032*
	After	16	20.87	16.753		
Con	Before	16	13.63	11.680	.675	.510
	After	16	12.58	9.445		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

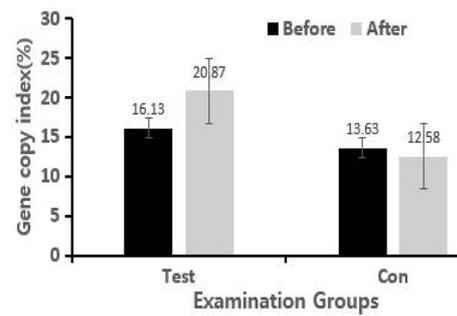


Fig. 8. Differences of estimated gi% between groups of *Bacteroides* after ingesting.

Table 14. Difference of estimated gi% of *Prevotella* genus before and after ingesting

Time tested	Group	N	M	SD	t	p*
Before	Test	16	11.50	10.526	.334	.741
	Con	16	10.03	14.206		
After	Test	16	17.28	8.908	3.046	.005*
	Con	16	7.55	9.153		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

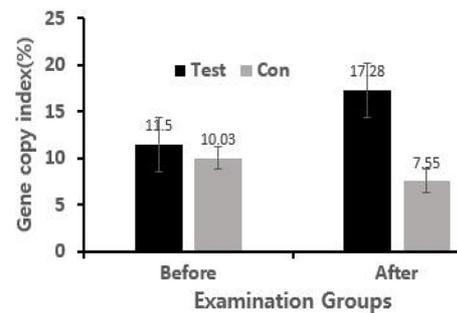


Fig. 9. Differences of estimated gi% of *Prevotella* gene before and after ingesting.

Table 15 및 Fig. 10에서 보는 바와 같이 대조군과 임상군 별 사전 및 사후의 *Prevotella* 수치의 차이를 제시하였다. 유사음료를 섭취한 대조군의 경우에는 사전이 10.03%, 사후가 7.55%로 유사물질 섭취 전보다 섭취 후에 *Prevotella* 수치가 약

Table 15. Comparison of gene index(%) between groups of *Prevotella* before and after ingesting

Group	Time tested	N	M	SD	t	p*
Test	Before	16	11.50	10.526	-2.955	.010*
	After	16	17.28	8.908		
Con	Before	16	10.03	14.206	1.378	.188
	After	16	7.55	9.153		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

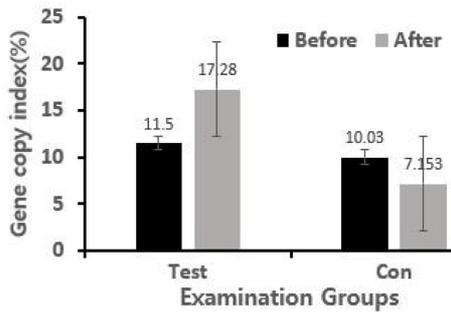


Fig. 10. Differences of estimated gene index(%) between groups of *Prevotella* after ingesting.

2.48%가 감소하였으나 유의성이 없었다. 임상군의 경우에는 사전이 11.5%, 사후가 17.28%로 *Bacillus* 음료섭취 전보다 섭취 후에 *Prevotella*의 수치는 약 5.78%가 높아진 것으로 나타나 유의성이 있었다(p<.01). 유사하게 Kook *et al.*(2018)도 장내세균을 qPCR로 특정 primers를 이용한 것과 일치하였다.

중간군 전체 genus DNA검색 수치

임상대상자 16명에게 ENM 발효용액 10 ml을 8주간 섭취 시킨 전후에 임상대상자들의 변 샘플을 채취하여 장내세균 중 목표대상 균 중의 하나는 중간군체 속의 유전자를 qPCR 법으로 동정을 하였다. 임상 전후의 검색한 중간군체의 지수를 계산하여 Table 16 및 Fig. 11에 제시하였다. 결과를 살펴 보면 음용전의 사전검사의 경우에는 대조군(23.66%)과 임상군(27.62%)에서는 지수가 3.96% 증가하였으나 유의성은 없었다. 사후검사의 경우에는 대조군이 20.06%, 임상군은 35.88%로 임상군이 중간군체 지수가 15.82%나 높게 증가하여 유의성이 있었다(p<.001). Kook *et al.*(2018)도 유사하게 장내세균을 qPCR로 특정 primers를 이용한 것과 일치하였다. 중간군체가 높게 증식을 한 것은 ENM성분 중에 유익한 균들에게 유익한 성분들이 중간군체에게도 높은 효율을 나타냈다고 판단한다.

Table 17 및 Fig. 12에서 보는 바와 같이 대조군과 임상군 별 사전 및 사후의 중간군체의 gi%의 차이를 제시였다. 유사 음료를 섭취한 대조군의 경우에는 사전이 20.06%, 사후가 23.66%로 유사물질 섭취 전보다 섭취 후에 중간군체 수치가 약 3.6%가 감소하였으나 유의성은 없었다. 임상군의 경우에

Table 16. Difference of estimated gi% of median group genus before and after ingesting

Time tested	Group	N	M	SD	t	p*
Before	Test	16	27.62	13.084	.807	.426
	Con	16	23.66	14.645		
After	Test	16	35.88	12.589	4.065	.001
	Con	16	20.06	9.156		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

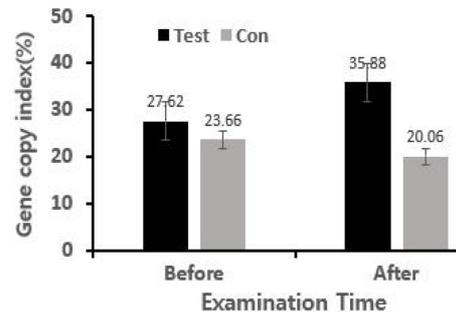


Fig. 11. Differences of estimated gi% of Middle group genus before and after ingesting.

Table 17. Comparison of gi% between groups of middle group before and after ingesting

Group	Time tested	N	M	SD	t	p*
Test	before	16	27.62	13.084	-2.116	.050*
	After	16	35.88	12.589		
Con	Before	16	23.66	14.645	1.577	.136
	After	16	20.06	9.156		

*p<.05, **p<.01, ***p<.001.

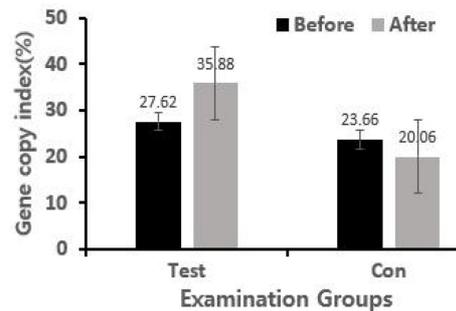


Fig. 12. Differences of estimated gi% of median between groups after ingesting.

는 사전이 27.62%, 사후가 35.88%로 ENM섭취 전보다 섭취 후에 중간군체의 수치는 약 8.26%가 높아진 것으로 나타났으나 통계적으로 유의성이 있었다. 중간군체 군도 유익균에 필수적인 성분이 ENM발효액에 함유되어있어서 이의 영향으로

균체 수가 증가하였다고 판단한다.

결론

본 연구는 임상대상자에게 *Bacillus* 발효용액(ENM)을 8주간 섭취시킨 후에 임상대상자들의 변에서 주요 장내 유익세균이 장내에서 증식이 촉진되는지 또는 저해균이 감소하는지를 연구하는 것이 목적이었다. 장내세균은 특정 Primer를 이용하여 PCR 증폭기로 동정 검색하였다.

1. *Bifidobacterium* 유전자의 지수는 사후검사에서 대조군이 58.92%, 임상군은 69.53%로 임상군이 10.61%나 높게 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

대상자 1번의 *Bifidobacterium* gene의 지수는 사전 8주 전에는 3.4×10^{-3} , 8주 후에는 1.45×10^{-2} 으로 약 420배가 증가하였다. 또한 *Bifidobacterium* gene index(%)(균수)는 사전에는 64.9%, 8주 사후의 조사에서는 93.1%로 28.2%가 증가하였다.

2. *Lactobacillus* 유전자 지수는 사후검사에서 대조군이 49.37%, 임상군은 66.43%로 임상군이 17.06%나 높게 증가하여 유의성이 있었다($p < 0.029$).

대상자 1번의 *Lactobacillus* gene index 사전은 1.98×10^{-5} , 사후에서는 2.45×10^{-1} 으로 약 1.23×10^4 배가 증가하였다. 또한 *Lactobacillus* gene index(%)는 사전에는 29.3%, 사후에서는 66.7%로 37.6%가 증가하였다.

3. *Clostridium* 지수가 사후검사의 경우에는 대조군이 83.16%, 임상군은 67.76%로 임상군이 15.37%나 낮게 감소하여 유의하였다($p < 0.077$).

대상자 1번의 대상자의 *Clostridium* gene index는 사전은 1.19×10^{-4} , 사후에는 3.28×10^{-1} 으로 약 2.756×10^3 배가 증가하였다. 또한 *Clostridium* gene index(%)는 사전에는 92.8%, 8개월 지난 사후는 99.7%로 6.9%가 증가하였다.

4. *Bacteroides* 지수가 사후검사의 경우에는 대조군이 12.58%, 임상군은 20.87%로 임상군의 8.28%나 높게 증가하여 유의하였다($p < 0.095$).

5. *Prevotella* 지수는 사후검사의 경우에는 대조군이 7.55%, 임상군은 17.28%로 임상군이 9.73%나 높게 증가하여 유의성이 있었다($p < 0.005$).

결론적으로 장내세균은 *Bacillus subtilis*균의 발효액(ENM)을 섭취 후에 장내에서 유익균은 증식이 증가하고, 유해균은 억제되는 현상을 발견하였다. ENM 발효액은 장 건강에 유익한 음료라 평가한다.

Acknowledgements

We are grateful to Mr. S.J. Kim and Ms. E.H. Yang, Probioticslab R&D Institute. Bioeven Co., Seoul, Korea. for their technical assistances.

This research was supported by the RSW Dongeu Research Institute in Jecheon, Korea.

References

- Bartlett, J.G. 2002. Antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 346(1): 334-339.
- Chang, J.Y., S.M. Shin, J. Chun, J.H. Lee, and J.K. Seo. 2011. Pyrosequencing-based molecular monitoring of the intestinal bacterial colonization in preterm infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 53(5): 512-519.
- Choi, J.B., Y.W. Shin, N.S. Paek, and Y.M. Kim. 2004. Influence of herbal extract on lactic acid bacteria growth and cytoprotectants. *Kor. J. Food & Nutr.* 17(1): 286-293.
- Clemente, J.C., L.K. Ursell, L.W. Parfrey, and R. Knight. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148(6): 1258-1270.
- Dominguez-Bello, M.G., E.K. Costello, M. Contreras, et al. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(26): 11971-11975.
- Enzamin Research Institute. 2007. Method for producing health nutritive food. Issued by Japan Patent Office, P3902015. (in Japanese).
- FAO/WHO. 2001. 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, Ont., Canada.
- Grunewald, K.K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 47(6): 2078-2079.
- Harrison, V.C. and G. Peat. 1975. Serum cholesterol and bowel flora in the new born. *Am. J. Clin. Nutr.* 28(12): 1351-1355.
- Jeong, H.M., Y.S. Kim, S.J. Ahn, M.S. Auh, J.B. Ahn, and K.Y. Kim. 2011. Effects of *Zizyphus jujuba* var. *boeunensis* extracts on the growth of intestinal microflora and its antioxidant activities. *J. Kor. Soc Food Sci. Nutr.* 40(4): 500-508. DOI: 10.3746/jkfn.2011.40.4.500
- Ko, J.S. 2013. The intestinal microbiota and human disease. *Kor. J. Gastroenterol.* 62(2): 85-91.
- Koenig, J.E., A. Spor, N. Scalfone, A.D. Fricker, J. Stombaugh, R. Knight, L.T. Angenent, and R.E. Ley. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(Suppl 1): 4578-4585.
- Kook, S.Y., Y. Kim, B. Kang, Y.H. Choe, Y.H. Kim, and S. Kim. 2018. Characterization of the fecal microbiota differs between age group in Korea. *Intest. Res.* 16(2): 246-254.
- Ku, K.H., D.J. Park, and C.K. Mok. 1997. Effect of yeast fermentation on the production of soy-oil-glycosaccharides from bean cooking water. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29(1): 133-137.
- Kubo, Y., A.P. Rooney, Y. Tsukakoshi, R. Nakagawa, H. Hasegawa, and K. Kimura. 2011. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(18): 6463-6469.
- Lee, H.S., J.J. Sang, S.D. Lee, J.Y. Moon, A.J. Kim, and K.S. Ryu.

2001. Effect of dietary mulberry leaf on the composition of intestinal microflora in SD rats. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33 (2): 252-255.
- Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124(4): 837-848.
- Mitsuoka, T. 1990. A color atlas of anaerobic bacteria. Shobunsha, Tokyo, Japan. p. 51.
- Oh, S.J. 2008. Probiotics and prolongation of life. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* 26(1): 31-37.
- Rinttila, T., A. Kassinen, F. Malinene, I. Krogius, and A. Palva. 2004. Development of an extensive a set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in fecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 97(4): 1166-1177.
- Schmittgen, T.D. and K.J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3(6): 1101-1108.
- Schrezenmeir, J., and M. de Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definitions. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (supple): 361S-364S.
- Schwartz, S., I. Friedberg, and I.V. Ivanov, J.S. Goldsby, D.B. Dahl, D. Herman, M. Wang, S.M. Donovan, and R.S. Chapkin. 2012. A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biol.* 13(4): r32.
- Smith, L.D.S. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Rev. of Infect. Dis.* 1(2): 254-262.
- Takeda, K., T. Suzuki, S.I. Shimada, K. Shida, N. Nanno, and K. Okumura. 2016. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin. Exp. Immunol.* 146(1): 109-115.
- The future of Enzamin. 2018. <http://www.enzamin.com/product/04a.html> (in Japanese). Accessed 1th July, 2018.
- Weinstock, G.M. 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 489(9): 250-256.
- Won, H.R., Y.J. Park, S.H. Choi, and J.S. Go. 2001. The Effect of fermented milk by *Bifidobacterium bifidum* on serum lipid metabolism in rats treated high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 30(5): 933-936.
- Zoetendal, E.G., C.T. Collier, S. Koike, R.I. Mackie, and H.R. Gaskins. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J. Nutr.* 134(2): 465-472.