

Bacillus 발효액 Enzamin의 투여가 인체의 NK세포 활성도와 Hamster의 골밀도에 미치는 탐색연구

류서원¹ · 藤井登起男² · 이형환³

¹류서원동의연구소, ²日本 藤田保健衛生大學 大學醫學研究科, ³건국대학교 생명과학과

Research on the *Bacillus*-fermented Enzamin Administration on Human NK Cell Activity and Bone Density of Hamster: A Pilot Study

Ryu Seo Won¹ · Tokio Fujii² · Hyung H. Lee³

¹RSW Dongeu Research Institute, Uirim Daero 50-gil, 16-1, Jecheon, Chungcheongbuk-do, 21137, Korea
²Fujita Health University Education and Research Center of Animal Models for Human Diseases, Aichi, Japan
³Dept. of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

(Received September 18, 2018 / Revised September 20, 2018 / Accepted September 21, 2018)

Abstract Purpose: The purpose of this study was to investigate the effects of *Bacillus* fermentation broth (ENM) on the human NK cell activity, and bone matrix density, matrix content and area of hamsters fed ENM. **Methods:** NK cell activity was tested, and bone mineral density were measured by x-ray. **Results:** NK cell activity was significantly higher in the control group (644.71 pg/ml) and in the test group (1796.37 pg/ml) ($p < .004$). Test groups were significantly increased by 1110.37 pg/ml in the pre-test and 1796.37 pg/ml in the post-test ($p < .001$). Behavioral observations after feeding ENM to hamsters showed normal behavior with no difference between control and test groups. The hamster body weight of the control was 106 g at the initial and final 27 days. In the test group, the initial weight was 96.6 g and the final 27 days was 114 g. No morphological changes were observed in the X-ray photographs of the hamster hind legs. The bone matrix density was 0.059 g/cm³ in control and 0.062 g/cm³ in the test, which was increased by 0.003 g/cm³. The bone matrix content was 0.175 g in the control and 0.196 g in the test. The bone area was 2.95 cm² in the control and 3.19 cm² in the test, which was increased by 0.19 cm². In the autopsy, neither the control nor the test group showed any remarkable abnormality, and each organ was normal. **Conclusions:** It is thought that ingestion of ENM is useful for immunity enhancement.

Key words: natural killer cell, hamster, *Bacillus* broth, fermentation, immunity

초록 목적: 본 연구는 *Bacillus* 발효액(ENM)을 섭취한 사람의 NK세포활성도와 Hamster의 골밀도, 골량과 골면적에 미치는 영향을 연구하는 것이 목적이었다. 방법: NK세포 활성도 측정과 x-ray를 통한 골밀도 검사를 하였다. **결과:** NK 세포의 활성도는 대조군은 644.71 pg/ml, 임상군이 1796.37 pg/ml로 높게 나타나 유의성이 있었다($p < .004$). 그리고 임상군은 섭취 전 검사에서 1110.37 pg/ml, 사후검사에서는 1796.37 pg/ml로 유의성이 있게 증가하였다($p < .001$). ENM 먹인 후의 햄스터들의 행동관찰에서는 대조군과 임상군 간의 행동은 차이가 없이 정상적으로 행동하였다. 체중의 변화는 대조군에서는 최초 및 최종 27일째에 측정한 체중은 106 g로 거의 변동이 없었으며, 임상군은 최초 측정이 96.6 g, 최종 27일째는 114 g로 증가하여 유의성이 있었다. 햄스터 뒷다리를 X-선 촬영한 사진에서는 형태적인 변화는 관찰되지 않았다. 대조군의 골밀도는 0.059 g/cm³, 임상군은 평균 골밀도는 0.062 g/cm³로 0.003 g/cm³만큼 증가하였다. 골중량은 대조군은 0.175 g, 임상군은 0.196 g로 증가하였다. 골면적은 대조군은 2.95 cm², 임상군은 3.14 cm²으로 0.19 cm²만큼 증가하였다. 부검에서 대조군과 임상군은 모두 특기할만한 이상은 없고, 각 장기도 정상이었다. **결론:** ENM 섭취는 NK세포활성도와 Hamster의 골밀도를 증가시키는 유용한 식품이라 생각한다.

주제어: natural killer세포, 햄스터, *Bacillus* 발효액, 발효, 면역

서 론

세계보건기구(WHO)와 국제식량기수(FAO)의 합동전문가 위원회는 2001년도에 ‘probiotics를 살아있는 미생물로 적당한 양을 섭취하면 건강에 유익한 세균’이라고 정의하였다(FAO/WHO, 2001). Prebiotics는 probiotics의 성장에 필요한 영양소를 의미한다(FAO/WHO, 2001). Oligosaccharide는 glucose나 galactose 등의 단당이 2-10개 정도 결합한 저분자 물질로 신체내의 소화효소에 분해되지 않고 대장에 도달하여 장내 유용 세균들이 선택적으로 이용하게 된다(Ku *et al.*, 1997; Oh, 2008). 최근에 다양한 형태의 요구르트 및 유산균 함유 건강식품이 생산되어 유산균과 prebiotics가 혼합된 형태의 제품이 유행하고 있으며 이렇게 조합된 제품을 synbiotic이라 한다고 하였다(Choi *et al.*, 2004).

Kubo *et al.*(2011)은 Natto는 아포를 형성하는 *Bacillus subtilis var. natto* 균이 콩을 발효하여 만든 일본의 대표적 전통 식품이라 하였다. Kazumi Akasawa가 선발한 *B. subtilis* AK균주는 probiotics 유사 기능을 가진 대사산물을 생산하며, *B. subtilis* AK (EMBSAK)와 SARABAGAN으로 상품화되어 있다(Kubo *et al.*, 2011). Natto가 쥐와 인체의 실험에서 NK 세포활성에 효과가 있다고 보고하였다(Takeda *et al.*, 2016).

Cooper *et al.*(2001)은 인체의 NK(natural killer)세포는 모든 순환 림프구의 약 15%를 차지한다. cytokines 및 chemokines의 초기 생성 및 사전 감각 없이 표적세포에 부착하여 용해시키는 능력으로 인해 NK세포는 선천성 면역계의 중요한 구성 요소이다. 인간 NK 세포는 CD56-CD56(bright)과 CD56(dim)의 세포 표면 밀도에 따라 두 개의 하위 집합으로 나눌 수 있으며, 각각의 표현형은 특성이 다르다. NK세포 부분적으로 독특한 기능적 특성을 가지고 있으며, 따라서 인간 면역반응에서 뚜렷한 역할을 한다. CD56(dim) NK세포는 보다 자연적인 세포독성이 있고, CD56(bright) NK세포보다 높은 수준의 Ig 유사 NK수용체 및 FCgamma 수용체 III (CD16)을 발현한다. 대조적으로, CD56 (밝은) 하위 집합은 monocytes의 활성화에 따라 풍부한 cytokines를 생산할 수 있는 능력을 가지고 있지만 낮은 자연세포독성을 가지고 있다고 하였다. Koo *et al.*(2013)과 Barkin *et al.*(2017)은 전립선 암세포에 대해서 약 74-86%의 효과를 보고하였다. Jung *et al.*(2018b)은 육체적 기능 저하나 건강하지 않은 신진대사 상태는 NK세포 활성화의 저하로 기인한다고 하였다. Jung *et al.*(2018a)과 Jobin *et al.*(2017)은 NK세포활성이 결장직장암의 생성을 억제한다고 하였다. 이상의 결과들을 보면 NK세포의 활성이 중요한 면역성의 기능을 향상시킨다는 논리이다. 본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 연구를 도출하였다.

Bacillus subtilis 균주의 발효액(ENM)이 인체의 건강에 도움이 되는 것으로 이미 보고되어 있어서 한국인을 대상으로 연구를 하고자 임상대상자들에게 *Bacillus* 발효 용액(ENM)을 8주간 섭취시킨 후에 임상대상자들의 NK세포의 활성이

촉진되는지를 연구하고, 또한 UMx햄스터(자연발증심근증 햄스터)를 이용하여 뼈의 골밀도, 골량, 및 골면적의 변화를 연구하는 것이 목적이었다.

재료 및 방법

NK 세포 임상대상자, 기간 및 장소

임상대상자는 대조군 16명, 임상군 16명으로 총 32명이었다. 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. NK 세포활성도의 임상 기간은 2018년 2월 19일~4월 16일 사이에 8주간 실시하였다. 연구기획 및 장소는 류서원동의연구소(충북 제천시 의림대로50길16-1)와 건국대학교 생명과학과에서 공동으로 기획실시하였다. 활성화 측정은 서울대학교분당병원 면역학실험실(경기도 성남시 구미로173길82)에서 수행하였다.

햄스터 동물실험기간은 실험기간 2012년 4월 20일~5월 30일의 40일간에 실시하였으며, 수행기관은 Fujita Health University Education and Research Center of Animal Models for Human Disease (1-98 Dengakugakubo Kutsukake, Toyoake, Aichi, Japan)에서 하였다.

Bacillus 발효액, 섭취량 및 혈액 채취

NK세포 활성화도 검사 임상대상자인 대조군에게는 유사음료인 물을 10 ml씩, 임상군은 *Bacillus subtilis* AK균주의 발효

Table 1. General characteristics of Subjects for NK cell activity

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	Mean			56.3

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

산물인 ENM 발효용액(Lot. 001641, Enzamin Laboratory Co., LTD., 1 Chome-6-8 11F Higashitenma, Kita, Osaka, Japan)을 매일 10 ml을 아침식전에 컵에 담아서 8일간 섭취하게 하였다. 8주간 섭취 후에 멸균 튜브에 혈액을 받아서 검사에 사용하였다.

Enzamin 발효액의 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) 및 Ryu & Lee(2018)를 Table 2에 제시하였다.

사용한 동물

햄스터 자성을 사용하였으며, 일본 중부과학 자재 회사(Kyoto, Japan)에서 구입하였다. 대조군은 정상 자성으로 체중이 106.8 g이었다. 임상용은 자성으로 UM-X7.1 strain(자연발병 심근증 햄스터)을 사용하였으며, 체중은 평균 96.6 g이었다.

NK세포 활성도 변화 검사 방법

임상대상자들에게 식전에 ENM발효액 10ml씩을 8주 동안 매일 섭취하도록 하였다. 대조군에게는 유사 음료로 물을 섭취하도록 하였다. NK세포의 활성도 조사방법은 NK vue kit(ATgen Co., Seongnam, Korea)을 사용하여 회사의 실행 방법대로 수행하였다. NK vue kit를 이용하여 양적 샌드위치(quantitative sandwich) ELISA를 수행하여 방출되는 INF-gamma를 측정하였다. 요약하면, ENM을 섭취한 후 8주 후에 바로 임상대상자의 피를 1 ml를 채취하여 미리 준비하여 냉

장(2-8°C)을 시킨 튜브(PROMECA, CA, USA)에 직접 넣어서 가볍게 튜브를 앞뒤로 손으로 10번 정도를 흔들어서 혼합을 하여 주었다. 다음에 혈액 튜브를 37°C의 항온실에서 24시간을 보관하였다. 24시간 후에 pipette로 붉은색의 혈구 등이 혼입되지 않도록 노란색의 상층액을 1.5 ml microtube에 옮겨 담았다. 상층액이 든 튜브를 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 한 다음에 혈구를 제외한 상층액을 1.5 ml microtube에 옮겨 담아 냉장 보관하였다. 광도(optical density: O.D.)를 CODA microplate processor(Biorad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 그 다음에 O.D. 수치를 software가 장착된 NK vue kit에 주입하면 자동으로 측정치가 pg/ml 단위로 나타난다.

햄스터 사육방법 및 실험 계획

햄스터를 분양 받아 항온사육실의 온도가 22±2°C, 12시간 light/dark cycle, 습도가 45±5%에서 사육하였다. 첫 주는 항온실에서 7일간 적응단계의 사육을 하였다. 실험은 5개 군으로 나누어서 각 군별 1마리씩 나눈 후 실험군 햄스터에게 ENM 발효액을 0.2 ml을 한천분말 10 g에 혼합하여 만든 혼합먹이를 28일간 자유롭게 섭취하도록 배식하였다. 그리고 지속적으로 먹이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 대조군은 ENM이 포함되지 않은 먹이를 주었다. 개별로 사육 상자에 별도로 사육을 하였다.

햄스터의 일반 행동관찰

사육 상자별로 1마리씩을 5개의 상자로 나누어서 사육하면서 햄스터들의 행동을 3일 간격으로 4주간을 육안으로 10분간씩 행동 및 먹이 상태 등을 관찰하여 기록하였다.

UMX햄스터의 뒷다리 뼈의 검사

햄스터 5마리를 촬영대 위에 교대로 고정을 하고 골밀도 DXA측정기(General Radiographic System, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)로 촬영하였다. Scan method는 Fan Beam, Scan site는 소형 동물 전체, Scan time은 25초, 측정치는 BMC, BMD, Mass, bone area의 등의 분석, Image areas는 210×315 mm, pixel size는 108×108로 하였다.

햄스터의 체중 변화의 측정

햄스터를 사육하면서 1주일 간격으로 일회씩 체중 측정기로 측정하였다.

햄스터의 부검

햄스터의 부검(dissection)은 시험 종료 후에 수행하였다. 부검 순서는 햄스터를 지름 25 cm 건조기에 넣고, 증류한 ether로 3-4분간 마취시킨 후 해부대에서 복부(ventral)가 보이도록 놓고 네다리를 압핀으로 고정하였다. alcohol로 복부 전 면을 소독한 후 핀셋으로 복부피부를 집어서 해부가위로 정중선을 따라서 절개하고, 해부칼로 장기가 보이도록 절개하였다. 절개 후에 주요장기의 이상 유무를 눈으로 관찰하였다.

통계자료처리방법

통계처리는 SPSS/WIN 통계프로그램 22.0을 활용하였으며 분석방법은 다음과 같다. 첫째, 집단에 따른 NK세포의 활성도의 차이를 알아보기 위해 독립표본 t-test를 실시하였고 검사 사전 사후에 따른 NK세포의 활성도의 차이를 알아보기 위해 대응표본 t-test를 실시하였다. 햄스터의 체중과 골밀도 등의 데이터를 분석하였다.

결과 및 고찰

대상자들의 일반적 특성

임상대상자는 임상대상자 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, 50-55 kg이 5명, 56-60 kg이 5명, 61-67 kg 4명이었으며, 평균체중은 56.6세이었다. 임상군은 49 kg이 1명, 50-55 kg이 8명, 56-60 kg이 5명, 61-65 kg이 3명, 67 kg이 1명이었으며, 평균 체중은 56.3 kg이었다(Table 1). 대조군과 임상군의 평균체중이 56세로서 평형을 이루고 있었다.

ENM섭취 전후의 NK세포의 활성도 변화

대상자들이 ENM섭취 사전 사후간의 대조군과 임상군의 NK세포의 활성도 변화는 Table 3과 Fig. 1에 제시하였다. 섭취하기 전의 사전검사에서는 대조군은 740.06 pg/ml, 임상군은 1110.37 pg/ml로 임상군이 더 높게 나타나서 통계적

Table 3. Changes of NK cell activity before and after ENM ingesting according to groups

Tested time	Group	N	Mean (pg/ml)	SD	t	p*
Before	Control	16	740.06	530.727	1.043	0.306
	Test	16	1110.37	1230.295		
After	Control	14	644.71	522.04	3.094	0.004*
	Test	16	1796.37	1301.974		

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

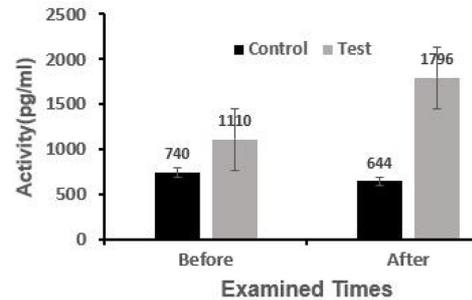


Fig. 1. NK cell activity on control and test groups before and after ENM ingesting.

으로 유의성은 없어서 연구 집단 간에 동질성이 확보되었다.

사후검사에서는 대조군은 644.71 pg/ml, 임상군이 1796.37 pg/ml로 높게 나타나 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p<.004). 따라서 ENM섭취로 임상군의 사후검사에서 NK 세포 활성수치가 유의하게 증가한 것을 알 수 있었다.

Takeda et al.(2016)은 사람이 *Lactobacillus casei* Shirota (LcS)를 섭취하였을 때에 NK세포의 활성을 실시했다. NK세포활성은 위약(placebo) 섭취기간 동안 감소하는 경향을 보였으나, NK세포 활성은 4주간의 LcS가 함유된 3주간의 발효유 섭취 후 증가했다고 보고하였다. 이러한 결과는 LcS가 NK 세포 활성을 증진시킬 수 있음을 입증하였다. 이런 결과는 본 연구의 결과 유사한 결과를 나타냈다고 판단한다.

ENM섭취 후 그룹간의 NK세포 활성도의 변화

대조군과 임상군 간의 사전사후의 NK세포 활성도의 변화는 Table 4 및 Fig. 2에 제시하였다. 대조군에서는 사전이 740.06 pg/ml이었으며 사후에서는 644.71 pg/ml으로 약간 감소하였으나 통계적으로 유의성은 없었다. 임상군은 사전이 1110.37 pg/ml, 사후에서는 1796.37 pg/ml으로 686 pg/ml이 증가하여 통계적으로 유의성이 있었다(p<.001).

Takeda et al.(2016)은 사람의 말초 혈액 단핵세포를 열에 살균된 *Lactobacillus casei* Shirota (LcS)를 함유한 배지에서 배양하였을 때에 NK세포 활성이 향상되었다. LcS가 NK세포활성을 증가시키고 인터루킨(IL)-12 생산을 유도하는 능력은 상관관계가 있었으며, 항 IL-12 모노클로 날 항체의 첨가는 LcS에 의해 유발된 NK세포활성의 증진을 감소시킨 것을

Table 4. Changes of NK cell activity between groups after ENM ingesting

Group	Time tested	N	Mean (pg/ml)	SD	t	p*
Control	Before	16	740.06	530.727	1.566	.141
	After	16	644.71	522.04		
Test	Before	16	1110.37	1230.295	-4.061	.001
	After	16	1796.37	1301.974		

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

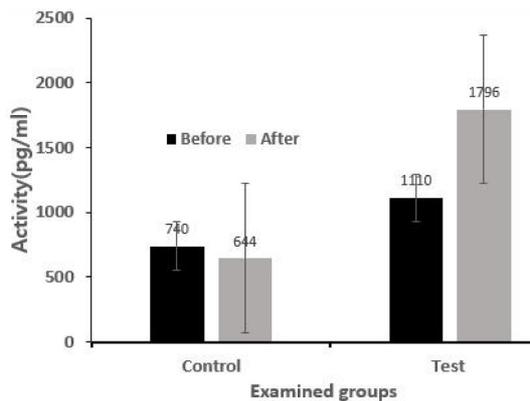


Fig. 2. NK cell activities between groups.

발견하였다. 이러한 결과는 LcS가 NK 세포 활성을 증진시킬 수 있음을 입증하였다. 이런 결과는 본 연구의 결과 유사한 결과를 나타냈다고 판단한다.

ENM섭취한 후의 햄스터들의 행동관찰

햄스터를 사육실에서 사육하면서 매일 실험군에게는 ENM 발효액을 2 ml씩을 섞은 한천젤을 그리고 대조군에게는 한천젤 만을 28일간을 먹이면서 관찰을 하였다. 대조군과 임상군의 왕복성, 달리는 속도, 개체간의 친밀도 등을 관찰한 결과 모두에 특기할 만한 이상행동은 군 간에 차이가 없이 정상적으로 행동하였다(Table 5).

ENM섭취 햄스터의 체중의 변화

대조군 햄스터에는 한천젤만, 그리고 임상군 햄스터에게는 2 ml의 ENM 발효액을 섞은 한천배지를 투여한 후에 대조군과 임상군의 체중을 측정된 것을 Table 6와 Fig. 3에 제시하였다. 체중 증가 경향은 대조군에서는 첫날 측정된 체중은 106.8 g에서 27일째에 측정된 체중은 106 g이라서 거의 변동이 없었다.

임상군의 ENM 발효액을 먹인 햄스터는 최초 측정이 96.6 g에서 27일째는 114 g로 17.4 g가 증가하여 유의할 만큼 증가하였다. Fig. 3의 성장곡선의 추세선에서도 연속적으로 증가하는 양상을 띠고 있었다.

본 결과는 ENM의 성분이 함유된 사료가 햄스터에게는 높

Table 5. Observation charts of hamster's behaviour

Groups	Behaviour (reciprocity, running speed, intimacy between individuals) of hamsters observed at the days				
	1	7	14	21	27
Control	N	N	N	N	N
Test	N	N	N	N	N

Test group was fed with ENM, control group was fed water. N: Special symptoms were not observed in the hamsters.

Table 6. Changes of weights of the hamsters during 27 feeding days

Group	Weights(g) of hamsters measured at the days				
	1	7	14	21	27
Control	106.8	109.0	104.7	105.3	106.0
Test	96.6	95.9	100.0	105.4	114.0

Test group was fed with 2 ml of ENM plus agar medium, and control group was fed water plus agar medium.

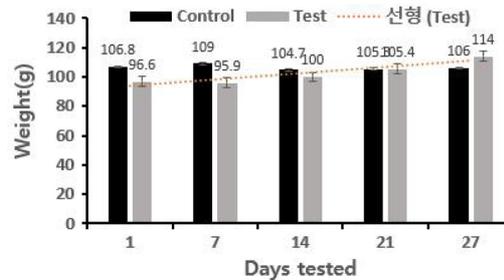


Fig. 3. Changes of weights of hamsters during 27 feeding days.

은 사료효율의 개선에 기여했다고 판단된다.

연X선 촬영

ENM섭취한 대조군과 임상군햄스터의 뒷다리부위를 X선 촬영을 한 결과는 Table 7 및 Fig. 4에 제시하였다. 대조군은 1번과, 임상군 2-5번의 햄스터 뒷다리의 형태적인 변화는 관찰되지 않았다.

Hamsters의 골밀도, 골중량, 면적의 조사

ENM 섭취한 임상군 햄스터와 대조군 햄스터의 뒷다리 부위를 Dual-energy X-ray Absorptiometry를 이용하여 골밀도, 골중량, 면적을 측정된 결과는 Table 8 및 Fig. 5에 제시하였다.

골밀도(bone matrix density: BMD)는 대조군은 1번의 GN 햄스터군의 0.059 g/cm³이었고, UM-X7.1햄스터 임상군 2-5번의 평균밀도는 0.062 g/cm³로 밀도가 0.003 g/cm³만큼 높아졌다.

골중량은 GN햄스터 대조군은 0.175 g, UM-X7.1햄스터 임상군은 0.196 g로 0.021 g이 증가하였다.

골면적(bone area)은 GEN대조군은 2.95 cm², UM-X7.1햄스터 임상군은 3.14 cm²으로 0.19 cm²만큼 증가하였다.

임상군의 UM-X7.1햄스터 뒷다리의 골밀도, 골중량 및 골

Table 7. Morphological observation of the hamster's hind legs shooting by X-ray illustration

No.	Observations	Changes
1	normal shape : control group	non
2	normal shape : test group	non
3	normal shape : test group	non
4	normal shape : test group	non
5	normal shape : test group	non

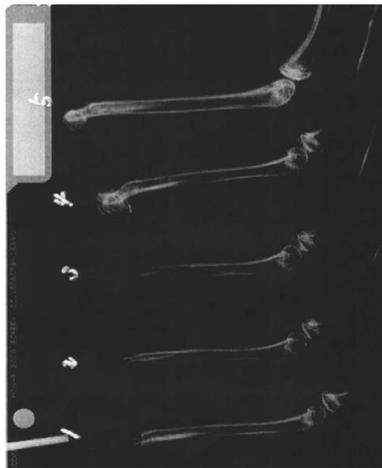


Fig. 4. X-ray photograph of the hind leg bones of hamsters tested.

면적이 높아진 이유는 ENM-5의 성분이 골 대사와 골의 형성에 유의미하게 작용을 하였다고 판단된다.

부검의 결과

대조군과 임상군의 햄스터를 해부대에서 해부하여 장기의 해부적 일반 형태를 관찰한 결과 모두 특기할만한 이상은 없고, 각 장기 또한 정상이었다.

결론적으로 ENM 발효액을 섭취 후에 인체의 면역성 NK세포의 활성화도는 증가하였고, 햄스터에서도 임상군에서 체중, 골밀도와 골면적도 증가하였다. ENM 발효액이 성분이나 동물의 건강에 효과적으로 작용하였다고 판단한다.

결 론

본 연구는 *Bacillus* 발효액(ENM)을 섭취하였을 때에 인체의 NK세포활성에 미치는 영향과 Hamster의 골밀도, 골량과 골면적에 미치는 영향을 연구하는 것이 목적이었다. NK세포 활성화도 측정과 x-ray를 통한 골밀도 검사를 하였다.

1. ENM의 섭취 후의 사람의 NK세포의 활성화도는 대조군은 644.71 pg/ml, 임상군이 1796.37 pg/ml로 높은 유의성이 있는 차이를 보였다($p<.004$). 임상군에서는 섭취전의 사전이 1110.37 pg/ml, 사후에서는 1796.37 pg/ml으로 686 pg/ml이 증가하여 유의성이 있었다($p<.001$).

Table 8. Bone mass density, contents and area of hamsters tested

Group	BMD (g/cm ³)	MC (g)	Area (cm ²)
Control	0.059	0.175	2.95
Test	0.062	0.196	3.14

BMD: Bone matrix density, BMC:Bone matrix content. Area: Bone area.

Table 9. Morphological differences of hamsters viscera after ENM ingestion

Control group	Test groups
Normal shapes of liver and guts	Normal shapes of liver and guts like the control group.

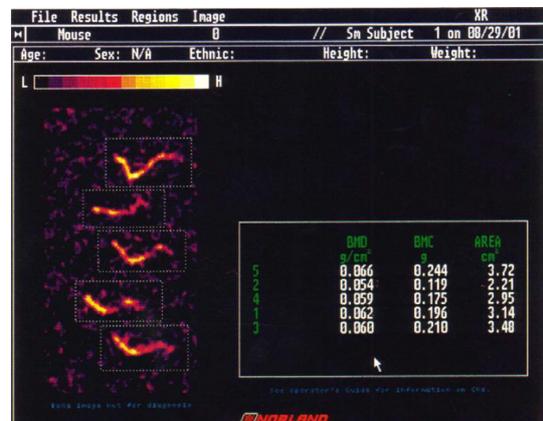


Fig. 5. Graphs of BMC, BMD and areas of hamster bones.

2. 햄스터들에게 ENM 섭취시킨 후의 행동관찰에서는 대조군과 임상군 간의 행동은 왕복성, 달리는 속도, 개체 간의 친밀도 등에서 차이가 없이 정상적으로 행동하였다.

3. 햄스터들에게 ENM 섭취 후의 체중 증가는 대조군에서는 첫날과 마지막 27일째에 측정한 체중은 106.0 g로 거의 변동이 없었다. 그러나 임상군의 최초 측정값이 96.6 g에서 27일째는 114 g로 17.4 g가 증가하여 효과가 있었다.

4. 햄스터 뒷다리를 X선 촬영한 사진에서는 임상군에서는 형태적인 변화는 관찰되지 않았다.

5. 햄스터의 골밀도는 대조군은 0.059 g/cm³, 임상군은 0.062 g/cm³로 0.003 g/cm³만큼 높아졌다. 골중량은 대조군은 0.175 g, 임상군은 0.196 g로 0.021 g가 증가하였다. 골면적(bone area)은 대조군은 2.95 cm², 임상군은 3.14 cm²으로 0.19 cm²만큼 증가하였다.

6. 햄스터의 부검에서 대조군과 임상군은 모두 특기할만한 이상은 없고, 각 장기 또한 정상이었다.

결론적으로 *Bacillus* 발효액인 ENM용액의 섭취로 사람의 NK세포의 활성화도가 높아졌고, 햄스터의 골밀도와 골량이 증가하였다. 즉 인체의 면역성과 골 건강에 유익한 음료라 판단된다.

References

- ATGen. 2018. Manual on diagnostic test to measure NK cell activity. www.nkvue.com. Accessed on August, 2018.
- Barkin, J., R. Rodriguez-Sauarez, and K. Betito. 2017. Association between natural cell killer activity and prostate cancer: A pilot study. *Can. J. Urol.* 24(2): 8708-8713.
- Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22(11): 633-640.
- Choi, J.B., Y.W. Shin, N.S. Paek, and Y.M. Kim. 2004. Influence of herbal extract on lactic acid bacteria growth and cyoprotectants. *Kor. J. Food & Nutr.* 17(1): 286-293.
- 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.
- Jobin, J., R. Rodriguez-Suarez, and K. Betito. 2017. Association between natural killer cell activity and colorectal cancer in high-risk subjects undergoing colonoscopy. *Gastroenterol.* 153(4): 980-987.
- Jung, Y.S., M.J. Kwon, D.I. Park, C.I. Sohn, and J.H. Park. 2018a. Association between natural killer cell activity and the risk of colorectal neoplasia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 33(4): 831-836.
- Jung, Y.S., J.H. Park, D.I. Park, C.I. Sohn, J.M. Lee, and T.I. Kim. 2018b. Physical inactivity and unhealthy metabolic status are associated with decreased natural killer cell activity. *Yonsei Med. J.* 59(4): 554-562.
- Kim, B.T. and S.H. Lee. 2013. Diagnostic approach to osteoporosis: Interpretation of bone density measurement. *Kor. J. Fam. Pract.* 3(1): 6-15.
- Koo, K.C., D.H. Shim, C.M. Yang, S. Lee, S.M. kim, T.Y. Shin, K.H. Kim, H.G. Yoon, K.H. Rha, and S.J. Hong. 2013. Reduction of CD16⁻ CD56^{bright} NK cell subset precedes NK cell dysfunction in prostate cancer. *PLoSOne* 8(11): e78049.
- Ku, K.H., D.J. Park, and C.K. Mok. 1997. Effect of yeast fermentation on the production of soy-oiligosaccharides 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. 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(1): 252-255.
- Oh, S.J. 2008. Probiotics and prolongation of life. *Kor. J. Dairy Sci. Technol.* 26(1): 31-37.
- Ryu, S.W. and H.H. Lee. 2018. Distribution of beneficial bacteria in the intestines after ENM ingestion of *Bacillus subtilis* AK strain fermentation. *J. Naturopathy* 7(2): 27-38.
- 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>. <http://www.enzamin.com/product04a.html>. (in Japanese). Accessed at July 1, 2018.