

모유영양아와 인공영양아의 장내균총 조성과 이유보충식 도입에 따른 변화

이경자 · 진효상¹⁾ · 문수재²⁾

기전여자전문대학 식품영양과, 전주대학교 생명과학부,¹⁾ 연세대학교 식품영양학과²⁾

Composition and Changes of Gastrointestinal Microflora in Breast-fed and Formula-fed Infants before and after Weaning

Lee, Kyung-Ja · Jin, Hyo-Sang¹⁾ · Moon, Soo-Jae²⁾

Department of Food and Nutrition, Kijeon Women's Junior College, Jeonju 560-701, Korea

School of Life Science,¹⁾ Jeonju University, Jeonju, 560-759, Korea

Department of Food and Nutrition,²⁾ Yonsei University, Seoul 120-749, Korea.

ABSTRACT

Microflora in 14 breast-fed(BF) and 15 formula-fed(FF) infants were investigated before(2 - 3 months after birth) and after weaning(5 - 7 months after birth) to find the floral differences between the two lactation groups and the floral changes after weaning. Bifidobacteria showed the highest count among the species of microflora in the BF group before and after weaning, but in the FF group, streptococci showed the highest count before weaning and bifidobacteria after weaning. Before weaning, the counts of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes were significantly higher in the BF group than in the FF. However, the frequencies of clostridia and klebsiella, along with the counts of streptococci and eubacteria, were higher in the FF group. After weaning, the only difference was that the total count of aerobic bacteria was higher in the BF group. The counts of streptococci in the BF group and lactobacilli and total anaerobes in the FF group after weaning were significantly higher than before weaning. However, the count of total aerobes in the FF group after weaning was significantly lower than the count before weaning. (*Korean J Nutrition* 31(3) : 305~314, 1998)

KEY WORDS : gastrointestinal microflora · bifidobacteria · breast-fed infants · formula-fed infants · weaning.

서론

장내세균은 위에서부터 직장에 이르기까지 두루 분포되어 있으며, 총 수는 10¹⁴에 이르고 그 종류는 약 400여종으로 다양하다¹⁾. 그 대부분은 혐기성 균으로 숙주의 생리적 특성과 환경인자의 상호작용의 결과로 특이한 균총을 형성하며, 단기간적인 자극으로는 변화되지 않는 안정된 것으로 인식되어져 왔다²⁾. 이들 균총은 채택일 : 1997년 10월 10일

장에 침투하는 병원성 미생물이 장에서 착생 및 생육을 못하도록 방해하여 숙주를 감염으로부터 보호하는 미생물 방벽(microbial barrier)으로서의 역할을 한다^{3,4)}. 이러한 감염의 방지는 침투병원성균이 장벽표면의 부착부위 및 필수영양성분에 대하여 장내세균과 경쟁하게 됨으로써 착생을 방해받거나, 장내세균이 생성하는 단쇄지방산(short chain fatty acids, SCFA)⁵⁾ 및 bacteriocin 등 여러 가지 억제물질⁶⁾ 때문인 것으로 알려져 있다. 이외에도 장내세균은 여러 가지 대사적, 생화학적 기능을 수행한다⁷⁾. 즉, 여러 가지 효소들에 의하

여 숙주 소화효소들이 분해하지 못하는 식사 및 노폐장벽세포 같은 중합체를 가수분해시키고 이에 따라 생성된 당과 아미노산을 발효하여 SCFA 같은 미생물 대사물을 생성한다. 장내에서 생성된 SCFA는 장의 pH를 떨어뜨려 병원성 미생물의 생육을 방해하고, 흡수되어 에너지원으로 이용되기도 한다. 영유아에서의 장내세균의 역할은 실사와 같은 장질환의 감염에 저항을 나타내어 영유아의 성장이 방해받지 않도록 하는 기능을 나타낸다.

많은 연구에서 모유영양아는 인공영양아에 비해 장질환을 비롯한 감염성 질환에 잘 걸리지 않고, 걸렸다고 해도 사망률이 훨씬 낮은 것으로 밝혀졌는데⁸⁻¹¹⁾, 그 원인들 중 하나는 모유영양아와 인공영양아의 장내균총의 차이에 의한 것으로 알려져 있다¹²⁾. 모유영양아의 장내에는 초산(acetic acid) 및 유산(lactic acid)을 생성하는 비피더스균이 압도적으로 많아 장의 환경을 산성으로 유지하여 병원성 미생물의 번식을 막아주는데 비해 인공영양아의 장내에는 비피더스균 이외에도 호기성균이나 유해균이 우세하게 검출되고 있다¹²⁾. 영유아의 장내균총이 영유아식의 차이에 따라 그 조성이 다르다는 것은 Tissier¹³⁾에 의해 최초로 보고되었는데, 모유영양아는 출생 3일 후부터 비피더스균이 주류를 이루는 반면, 인공영양아는 생후 4일째까지도 아무런 단일 균이 주류를 이루지 않고 혐기성균과 통성균들이 다양한 균총을 이룬다고 하였다. 모유영양아와 인공영양아의 장내균총의 차이는 조제유와는 다른 모유의 특성에서 비롯되는 것으로 여겨지고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

출생 후 착생된 장내세균은 서식지와 영양 등 외부작용이 조절기능을 갖추게되어 장관 생태계에 적합한 균종이 선택되어 안정화되는데¹⁷⁾, 이유기에 들어가면 장내균총이 크게 변화된다. Stark와 Lee¹⁸⁾에 의하면 이유전 모유영양아는 장내균총이 주로 bifidobacteria로 구성되고 이외에 소수의 enterobacteria와 enterococci가 자리잡고 있는 단순한 형태를 나타내는데 반하여 인공영양아는 다른 혐기성균과 통성혐기성균에 의해 자주 착생되어 있다. 이유를 시작하면서 고형물 음식이 도입되면 모유영양아는 통성혐기성균인 enterobacteria와 enterococci가 급격히 증가하면서 혐기성인 bacteroides, clostridia, streptococci가 착생하기 시작하는데 반해, 인공영양아는 이유시작 전부터 높았던 통성혐기성 세균의 수가 그대로 높게 유지되면서 bifidobacteria 이외의 혐기성균들의 착생이 지속되는 것으로 나타났다.

장내균총의 연구는 인공영양아를 위한 조제유를 개선하고, 영유아의 장질환을 예방하고 치료하기 위한 유

산균제 개발에 기초자료가 되므로, 본 연구에서는 우리나라 영유아를 대상으로 분변을 수집하여 수유방법에 따른 장내세균총의 차이를 조사하고, 이유를 시작한 후의 변화를 관찰하여, 우리나라 영유아의 전형적인 장내균총의 모형을 제시하고, 이유식 도입에 따른 변화를 살펴보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상자 선정과 분변시료의 수집 및 처리

1) 대상자 선정 및 조사기간

전주시에 소재하는 병원에서 만기 출산된 신생아 중 산모가 협조하기로 동의한 모유영양아 14명과 인공영양아 15명을 무작위로 선정하였다. 장내세균의 분석은 배설 직후 분변 중의 세균을 대상으로 분석하므로 분변상에서 설사나 변비 등의 특이성을 지속적으로 나타내거나, 거주지가 너무 멀어 분변시료의 처리시간이 1시간이 넘게 될 경우에는 대상에서 제외하였다. 조사기간은 1995년 10월부터 1996년 7월까지였다.

2) 분변시료의 수집

분변시료의 수집에 의한 장내세균의 분석은 각 조사대상자에 대해 이유시작 전인 생후 2~3개월 및 이유시작 1개월 후인 생후 5~7개월에 각 1회씩하여 총 2회 실시하였다. 그러나, 분변의 상태나 장내세균의 분석에서 특이성을 나타내는 경우에는 반복하여 시행하였다.

분변시료는 영유아가 평소 양육되는 방식대로 자연스럽게 배변한 직후 즉시 연락하도록 양육자를 사전교육 하였고, 이러한 방식대로 연락된 영유아의 분변시료는 거주지로 가서 거저귀에 쌓인 채로 실험실로 즉각 운반하였다. 수집 예정된 시기에 대상자가 설사를 하거나 감기 등의 질환 중일 경우에는 증상의 소실 후 최소 1주 이상이 경과된 후 수집하였다.

3) 분변시료의 처리

분변시료의 처리는 Balmer와 Wharton의 방법¹⁹⁾에 준하여 시행하였다. 실험실로 운반된 시료는 잘 혼합한 후 일부를 취하여 냉동저장용 배지에 넣고 칭량, 분쇄(homogenization), 분액하여 -60℃ 냉동고에 즉시 저장하였다. 배변에서 냉동저장까지의 시간은 1시간이 넘지 않도록 하였다. 냉동용 배지(BHI 37g, glycerol 100ml, cysteine 0.5g, resazurin 0.1% sol. 1ml, pH 7.0)의 조제, 분변의 분쇄 및 분액은 CO₂ 가스 하에서 혐기적으로 수행하였고, 분액은 mineral oil 1ml가 담긴 작은 용기에 3ml씩 분주하고 탄산가스를 취입

한 다음 고무마개 하였다.

2. 세균의 배양, 계수 및 동정

1) 세균의 배양 및 계수

냉동 저장된 분변액은 실온에서 서서히 용해하고, SEPA Tube에서 CO₂ 가스 하에 희석액에 10배씩 희석하였다. 희석액은 혐기성균은 Mitsuoka의 조성¹²⁾을 사용하고, 호기성균은 1/4 역가의 Ringer액을 사용하였다. 적당한 배율의 분변희석액을 15μ씩 각 세균 종류별 선택배지에 가한 다음 콘라디 봉으로 도말하였다. Clostridia를 계수하기 위한 희석액은 80℃에서 10분간 처리한 다음 도말하였다. 분변희석액이 도말된 평판 배지는 일반배양기 및 혐기배양기(anaerobic chamber)에서 37℃로 배양했는데, 호기성 균은 1일, 혐기성 균은 2~3일간 배양하였다. 혐기배양기의 공기 조성은 N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%로 하고, 배양기 중에 남아있는 산소를 제거하기 위하여 Platinum 촉매를 사용하였다. 각 주요 세균별 사용한 선택배지와 배양조건은 Table 1과 같다.

배양된 평판배지의 colony는 크기, 모양, 색 등을 바탕으로 종류별로 구별하고 colony counter 또는 BAC module(Cream image analysis)을 사용하여 계수하

였다.

2) 세균의 동정

검출된 장내세균의 동정은 Mitsuoka¹²⁾의 방법에 준하였다. 세균의 속의 수준까지는 평판배지 상의 colony의 모양과 색, 그람염색 후의 현미경 관찰된 세포의 형태 및 균집의 모양, Catalase 시험, 호기 및 혐기 배양시험 등에 의하여 동정하였다. 위의 방법으로 동정이 애매한 혐기성균의 경우에는 발효산물의 형태를 HPLC(Shimadzu)로 확인하였다. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* 등의 속과 종을 동정하기 위하여는 Rapid ID, 32A(bio-Merieux, France)를 이용하였고, *Bifidobacterium*의 속 및 종의 구별에는 API 50 CHL을 보조로 사용하였다. 호기성균의 속 및 종은 API 20 E를 사용하였고, 구균의 경우에는 VITEK(bioMerieux)를 이용하였다.

3. 통계처리

조사자료의 통계처리는 SAS package²⁰⁾를 사용해 수유집단별로 세균수의 평균수와 표준편차를 구하고, 집단간 및 기간별의 차이는 t-test와 chi-square test를 사용해 검증하였다.

Table 1. Culture media and conditions of incubation

Culture medium	Dilutions cultured (log ₁₀)	Incubation		Bacteria
		Time	Atmosphere	
Reinforced clostridial media with 0.5% glucose, 7.5% horse blood, 0.03% China blue ¹⁾ , Kanamycin +Vancomycin ²⁾	3-5	3 days	N ₂ +CO ₂ +H ₂	<i>Corynebacteria</i> <i>Fusobacteria</i> <i>Veillonella</i> <i>Bacteroides</i>
Tomato-juice agar with 0.5% cysteine, 0.2% Tween 80, Bromcresol green, Kanamycin ³⁾	4-6	3 days	N ₂ +CO ₂ +H ₂	<i>Eubacteria</i> <i>Bifidobacteria</i>
Sulfite-Polymixin-Milk agar ¹⁾	1-3	3 days	N ₂ +CO ₂ +H ₂	<i>Clostridia</i>
Brain heart infusion with 0.5% yeast extract, 7.5% horse blood, Haemin-menadione solution 1% ²⁾	4-6	3 days	N ₂ +CO ₂ +H ₂	Total anaerobes
MRS agar ²⁾ with Bromcresol green	3-5	3 days	CO ₂	<i>Peptococci</i> <i>Lactobacilli</i>
MacConkey agar ²⁾	2-4	1 day	air	<i>Enterococci</i> <i>Enterobacteria</i>
5% Blood agar ²⁾	3-5	1 day	air	Total aerobes

1) Mevissen-Verhage et al., 1987²⁰⁾

2) Stark & Lee, 1982²¹⁾

3) Jin, 1994²²⁾

결과 및 고찰

1. 연구대상자의 일반사항

본 연구의 대상자는 전주시 소재 2개의 종합병원에서 만기 출산된 영유아로서, 모유영양아가 14명, 인공영양아가 15명으로 총 29명이었으며, 이중 남자는 17명, 여자는 12명이었다. 이들에 관한 일반적 사항을 Table 2에 제시하였다.

영유아 어머니의 평균 연령은 모유영양군이 28.3±2.8세, 인공영양군이 30.9±5.6세로 두 군간에 유의적 차이는 없었다. 어머니의 학력은 모유영양군은 중졸이 7.2%, 고졸이 71.4%, 대졸 이상이 21.4%인 반면, 인공영양군은 중졸이 없고, 고졸이 33.3%, 대졸이상이 66.7%로 인공영양군의 어머니의 학력이 모유영양군에 비해 유의적으로 더 높았다(p<0.05). 어머니의 직업유무는 모유영양군에서는 직업이 있는 경우가 7.1%, 없는 경우가 92.9%로 대부분 직업이 없었으나, 인공영양군에서는 직업이 있는 경우가 40%, 없는 경우가 60%로 두 군간에 유의적인 차이를 보였다(p<0.05). 분만형태를 보면 모유영양군은 자연분만이 85.7%로 대부분을 차지하였으나, 인공영양군은 자연분만이 40%, 제왕절개 수술이 60%로 제왕절개 수술에 의한 분만이 더 많아 두 군간에 유의적인 차이를 보였다(p<0.05). 영유아의 평균 출생시 체중은 모유영양군이 3.1±0.4kg, 인공영양군이 3.3±0.4kg으로 두 군간에 유의적 차이는 없었다.

2. 모유영양아와 인공영양아의 장내균총의 차이와 이 유식 도입에 따른 변화

1) 검출된 장내세균의 종류

본 연구에서 검출된 장내 균총은 총 15종이었으며,

대부분 모유영양군과 인공영양군 모두에서 검출되어, 두 군간에 균총의 차이는 거의 없었다. 그러나, 평균 검출된 균총의 수는 두 군간에 약간의 차이가 있어 모유영양군의 균총의 수가 인공영양군에 비해 적었다.

혐기성 배지에서는 *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *C. perfringens*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae* 와 *Veillonella* 등이 검출되었고, 호기성 및 혐기성 배지 모두에서 검출된 균은 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* 와 yeast 등이었다.

두 군에서 시기별로 검출된 균총의 수는 Table 3과 같다.

이유시작 전에서는 모유영양군에서 6.3±1.4종, 인공영양군에서 6.6±1.6종으로 모유영양군에서 약간 적었고, 이유시작 후에서도 각각 6.7±0.7, 7.3±0.9종으로 모유영양군의 균종이 더 적었으나 유의적 차이는 아니었다. 조사 시기별 변화를 보면, 두 군 모두 이유시작 후에 균종 수가 증가하였으나, 유의적인 차이는 아니었다.

Benno 등²³⁾이 모유영양아와 인공영양아 각각 35명을 대상으로 조사한 연구에서는 모유영양군에서 21종, 인공영양군에서 20종이 검출되었고, megasphera와 corynebacteria가 모유영양군에서만 검출된 것을 제외하면, 두 군간에 검출된 균종이 서로 같았다. 본 연구에서는 Benno 등²³⁾이 분리한 균 중 megasphera, corynebacteria, micrococci, pseudomonas, bacilli 등은 분리되지 않았는데, 이것은 본 연구에서 사용한 배지와 배양조건이 달랐기 때문이라고 생각된다.

본 연구결과 모유영양군이 인공영양군에 비해 검출된 균종 수가 더 적어 단순한 균총을 형성하고 있었는데, 이는 우리 나라 영유아 대상의 김상희와 강국희의 연구²⁴⁾ 및 외국의 Stark와 Lee의 연구¹⁸⁾와도 일치하고

Table 2. Characteristics of breast-fed and formula-fed infants and their mothers

Items		BF	FF	Statistics
Mother's age(years)		28.3±2.8 ¹⁾	30.9±5.6	t= -1.60, p=0.125
Infant's birth weight(kg)		3.1±0.4	3.3±0.4	t= -1.17, p=0.251
Mother's education level (No., %)	Middle school	1(7.2)	0(0.0)	$\chi^2=6.41$ df=2 p=0.041
	High school	10(71.4)	5(33.3)	
	College	3(21.4)	10(66.7)	
	Total	14(100.0)	15(100.0)	
Mother's occupation (No., %)	Unoccupied	13(92.9)	9(60.0)	$\chi^2=4.27$ df=1 p=0.039
	Occupied	1(7.1)	6(40.0)	
	Total	14(100.0)	15(100.0)	
Parturition (No., %)	Natural	12(85.7)	6(40.0)	$\chi^2=6.43$ df=1 p=0.011
	Caesarian	2(14.3)	9(60.0)	
	Total	14(100.0)	15(100.0)	

BF : breast-fed infants,

FF : formula-fed infants

1) mean±SD

있다.

2) 모유영양아와 인공영양아의 장내균종의 차이

(1) 이유시작 전

모유영양군과 인공영양군의 이유시작 전(생후 2~3개월, 제 1차 조사)에 조사된 각 장내세균의 검출율과 세균 수는 Table 4와 같다.

Bifidobacteria는 모유영양군의 85.7%, 인공영양군의 80.0%에서 검출되었으며, 검출된 집단의 평균 세균 수는 모유영양군에서 유의적으로 더 많았다($p < 0.01$). Lactobacilli는 모유영양군의 78.6%, 인공영양군의 66.7%에서 검출되어 모유영양군에서 검출빈도가 약간 더 높았으며, 검출된 세균수는 모유영양군에서 유의적으로 더 많았다($p < 0.01$). Streptococci는 모유영양군에서 1명을 제외하고는 모두 검출되어 검출율이 92.9%였고, 인공영양군에서는 모든 대상자에서 검출되어 검출율이 매우 높았다. 검출된 균수는 인공영양군에서 유의적으로 더 많았다($p < 0.01$). Bacteroides는 모유영양군의 71.4%, 인공영양군의 60.0%에서 검출되어 두 군간에 유의적 차이가 없었으며, 검출된 세균수는 서로 비슷하였다. Clostridia는 모유영양군에서 28.6%, 인공영양군에서 73.3% 검출되어 인공영양군의 검출율이 유의적으로 더 높았다($p < 0.05$). 검출된 세균수는 유의적 차이가 없었다. C. perfringens는 검출율이 매우 낮아, 모유영양군의 1명(7.1%)과 인공영양군의 2명(13.3%)에서 검출되었다. Peptococcaceae는 모유영양군의 1명(11.8%), 인공영양군의 5명(50.0%)에서 검출되어 인공영양군에서의 검출율이 더 높았다. Eubacteria는 모유영양군의 28.6%, 인공영양군의 20.0%에서 검출되었으며, 검출된 세균의 수는 인공영양군에서 유의적으로 많았다($p < 0.05$). Veillonella는 모유영양군의 21.4%에서 검출되었으나 인공영양군에서는 검출되지 않았다. E. coli는 모유영양군과 인공영양군 모두에서 각각 1명씩만 제외하고 모두 검출되어 검출율이 각각 92.9%, 93.3%였다. 검출된 세균수는 두 군간에 유의적인 차이가 없었다. Klebsiella는 모유영양군의 42.9%, 인공영양군의 86.7%에서 검출되어 인공영양군의 검출율이 유의적으로 더 높았으며($p < 0.05$), 모유영양군에서 검출된 세균수가 더 많았으나 유의적 차이는 아니었다. Enterobacter는 모유영양군의 1명(7.1%)에서만 검출되었고, 인공영양군에서는 4명(26.7%)에서 검출되었다. Staphylococci는 모유영양군의 42.9%에

Table 3. Number of bacterial genera found in the feces of breast-fed and formula-fed infants

Time ¹⁾	BF	FF	t-value	p-value
1	6.3±1.4 ²⁾	6.6±1.6	-0.556	0.583
2	6.7±0.7	7.3±0.9	-1.831	0.078

BF : breast-fed infants, FF : formula-fed infants

1) 1 : before weaning(2 - 3months after birth)

2 : after weaning(5 - 7months after birth)

2) Mean±SD of number of bacterial genera

Table 4. Comparison of fecal flora between breast-fed and formula-fed infants before weaning¹⁾

Bacteria	Breast-fed(n=14)		Formula-fed(n=15)	
	Counts ²⁾	Frequency ³⁾	Counts	Frequency
Bifidobacteria	10.06±0.44	12(85.7)	9.17±0.91**	12(80.0)
Lactobacilli	8.53±0.57	11(78.6)	7.69±0.70**	10(66.7)
Streptococci	8.57±1.06	13(92.9)	9.58±0.69**	15(100)
Bacteroides	8.52±1.12	10(71.4)	8.63±1.21	9(60.0)
Clostridia	5.79±0.79	4(28.6)	6.00±0.93	11(73.3)*
C. perfringens	4.37	1(7.1)	6.94±0.39	2(13.3)
Peptococcaceae	9.86	1(7.1)	9.26±0.74	5(33.3)
Eubacteria	8.61±0.58	4(28.6)	9.54±0.15*	3(20.0)
Veillonella	8.56±0.06	3(21.4)	-	-
E. coli	8.70±1.24	13(92.9)	8.86±0.49	14(93.3)
Klebsiella	8.35±1.60	6(42.9)	7.67±1.18	13(86.7)*
Enterobacter	9.24	1(7.1)	7.04±2.01	4(26.7)
Staphylococci	8.01±0.75	6(42.9)	-	-
Yeast	7.72	1(7.1)	-	-
Proteus	-	-	7.97	1(6.7)
Total anaerobes	10.77±0.68	14(100)	10.06±0.53**	15(100)
Total aerobes	9.26±0.72	14(100)	9.73±0.44*	15(100)

1) Data were analyzed statistically by t-test(bacterial counts) and chi-square test(frequencies).

*p < 0.05, **p < 0.01

2) Bacterial counts expressed as mean±SD of log₁₀(CFU/gram of wet feces)

3) Frequencies of occurrence expressed as No. of subjects(%)

서 검출되었으나, 인공영양군에서는 검출되지 않았다. Yeast는 모유영양군의 1명(7.1%)에서만, *Proteus*는 인공영양군의 1명(6.7%)에서만 검출되었다. 총 혐기성균수는 모유영양군에서 검출된 균수가 유의적으로 많았고($p < 0.01$), 총 호기성균수는 인공영양군에서 유의적으로 많았다($p < 0.05$).

두 집단간의 이유시작 전 장내세균의 검출율을 보면 모유영양군의 균총에서는 bifidobacteria, lactobacilli, bacteroides, eubacteria, veillonella, staphylococci가 더 높은 양상을 보이고, streptococci, clostridia, Peptococcaceae, enterobacteria가 더 낮았다. 이중 clostridia와 klebsiella의 검출율은 인공영양군에 비해 유의적으로 낮았는데, 이러한 결과는 생후 4~7주 경의 모유영양아와 인공영양아 각각 45명씩을 대상으로 분석한 Benno 등²³⁾의 결과와 비교해 볼 때 모유영양군에서 bifidobacteria의 검출율이 더 높은 점과 인공영양군에서 clostridia의 검출율이 더 높은 점에서 일치하였다. 특히 인공영양군에서 clostridia가 유의적으로 높았던 점은 양측 모두의 결과에서 볼 수 있었다. 한편 1~3개월 된 한국의 모유영양아 6명과 인공영양아 11명을 비교한 지근억²⁵⁾은 모유영양군은 *Lactobacillus*에서 인공영양군은 *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *C. perfringens*, *Staphylococcus*가 더 높았다고 하였다.

검출된 세균의 균수를 비교하였을 때 모유영양군은 bifidobacteria, lactobacilli, enterobacteria, staph-

ylcocci, 총 혐기성균에서 더 높았고, bacteroides, clostridia, enterobacteria에서는 비슷하였으며, streptococci, eubacteria, 총 호기성균에서는 더 낮았다. 이중 bifidobacteria, lactobacilli, eubacteria, 총 혐기성균, 총 호기성균은 유의적인 차이가 있었다. 이러한 결과를 Benno 등²³⁾의 결과와 비교하면 인공영양군은 bacteroides, eubacteria, peptococci, lecithinase-positive clostridia, lactobacilli, enterobacteria, streptococci, bacilli 등에서 유의적으로 더 높았던 데 비해 본 연구의 결과는 총 호기성균, streptococci, eubacteria에서만 인공영양군이 유의적으로 더 높은 것으로 나타났다. 한편 지근억²⁵⁾은 인공영양군은 *Bacteroides*, *Eubacterium*, *E. coli*, *Streptococcus*에서 더 높았고, 모유영양군은 *Lactobacillus*, *C. perfringens*에서 더 높았으며, *Bifidobacterium*과 *Staphylococcus*는 비슷한 것으로 보고하였다.

이러한 연구자들의 결과의 차이는 일차적으로 표본 크기나 실험방법의 차이로부터 기인되는 것으로 사료된다. 이러한 결과의 차이에도 불구하고 이유 시작전의 영유아들의 장내균총이 수유방식에 따라 특징적인 차이를 나타내고 있으며, 그것은 모유영양아는 bifidobacteria가 검출율과 균수 모두에서, 인공영양아는 clostridia의 검출율이 높게 나타난다는 점이다.

(2) 이유시작 후

이유시작 후에는 이유시작 전에 형성된 비교적 안정

Table 5. Comparison of fecal flora between breast-fed and formula-fed infants after weaning¹⁾

Bacteria	Breast-fed(n=14)		Formula-fed(n=15)	
	Counts ²⁾	Frequency ³⁾	Counts	Frequency
Bifidobacteria	9.50±1.28	13(92.9)	9.69±0.74	13(86.7)
Lactobacilli	8.71±0.90	14(100)	8.94±0.53	14(93.3)
Streptococci	9.54±0.51	13(92.9)	9.32±0.71	15(100)
Bacteroides	9.11±1.31	12(85.7)	9.25±0.90	15(100)
Clostridia	5.39±0.55	7(50.0)	5.40±0.97	11(73.3)
<i>C. perfringens</i>	5.81±1.54	4(28.6)	6.38±1.48	2(13.3)
Peptococcaceae	7.06±1.32	2(14.2)	8.97±1.20	5(33.3)
Eubacteria	9.01	1(7.1)	9.01	1(6.7)
Veillonella	8.30±0.90	4(28.6)	8.78±0.29	4(26.7)
<i>E. coli</i>	8.53±0.76	14(100)	8.61±0.71	15(100)
Klebsiella	7.34±1.05	9(64.3)	7.39±1.26	13(86.7)
Enterobacter	7.11±1.03	2(14.3)	6.29±1.25	3(20.0)
Staphylococci	5.95±1.41	2(14.3)	8.11	1(6.7)
Yeast	7.13	1(7.1)	-	-
Proteus	-	-	-	-
Total anaerobes	10.56±0.45	14(100)	10.54±0.49	15(100)
Total aerobes	9.66±0.50	14(100)	9.28±0.38*	15(100)

1) Data were analyzed statistically by t-test(bacterial counts) and chi-square test(frequencies) *p < 0.05

2) Bacterial counts expressed as mean±SD of log₁₀(CFU/gram of wet feces)

3) Frequencies of occurrence expressed as No. of subjects(%)

된 장내균총이 이유보충식에 따라 도입되는 새로운 영양성분과 미생물에 의해 크게 교란되면서 조정되다가 결국에는 성인의 균총에 접근하여 가는 시기로 알려져 있다. 특히 모유영양아는 이유시작 전에 bifidobacteria를 위주로 하는 단순한 균총을 보이다가, 이유보충식-특히 곡분을 먹기 시작하면 통성혐기성균인 enterobacteria와 streptococci가 급격히 증가하는 큰 변화를 겪게 되나, 이유시작 전부터 이들의 수가 많았던 인공영양아는 별 변화가 없는 것으로 보고되어 있다¹⁸⁾. 본 연구에서는 곡분음식을 먹기 시작한 후에 분변을 수집하였다.

모유영양아와 인공영양아의 이유시작 후(생후 5~7개월, 제2차 조사)에 조사된 각 장내세균의 검출율과 균수는 Table 5와 같다.

Bifidobacteria는 모유영양군에서는 1명이 제외된 모든 대상자에서 검출되어 검출율이 92.9%였고, 인공영양군에서는 2명에서 검출되지 않아 검출율이 86.7%였다. 검출된 집단의 평균 균수는 유의적 차이가 없었다. Lactobacilli는 모유영양군의 모든 대상자에서 검출되었고, 인공영양군에서는 1명만이 검출되지 않아 검출율이 93.3%였다. 검출된 lactobacilli의 수는 유의적 차이가 없었다. Streptococci는 모유영양군의 경우 1명에서 검출되지 않아 검출율이 92.9%였고, 인공영양군에서는 모든 대상자에서 검출되었다. 검출된 streptococci의 수는 유의적 차이가 없었다. Bacteroides는 모유영양군의 85.7%에서 검출된 반면, 인공영양군에서는 모든 대상자에서 검출되었다. 검출된 세균수는 서로 비슷하였다. Clostridia는 모유영양군의 50.0%, 인공영양군의 73.3%에서 검출되어 인공영양군의 검출율이 더 높았으나 유의적인 차이는 아니었다. 검출된 세균수는 두 군간에 거의 비슷하였다. *C. perfringens*는 모유영양군의 4명, 인공영양군의 2명에서 검출되어 검출율이 각각 28.6%, 13.3%였다. Peptococcaceae는 모유영양군의 14.2%, 인공영양군의 33.3%에서 검출되어 인공영양군의 검출율이 모유영양군보다 높았으나 유의적인 차이는 아니었다. Eubacteria는 검출율이 낮아 두 군 모두 1명씩에서만 검출되어 검출율이 7.1%, 6.7%였다. Veillonella도 두 군 모두 4명씩에서 검출되어 검출율이 각각 28.6%, 26.7%였다. 검출된 균수는 유의적인 차이가 없었다. *E. coli*는 모든 대상자에서 검출되었고, 검출된 세균수는 두 군에서 서로 비슷하였다. Klebsiella는 모유영양군의 64.3%, 인공영양군의 86.7%에서 검출되어 유의적 차이는 아니었지만 인공영양군에서 검출율이 더 높았다. 검출된 세균수는 서로 비슷하였다. Enterobacter는 모유영양군의 2명(14.3%),

인공영양군의 3명(20.0%)에서 검출되었다. Staphylococci는 모유영양군의 2명(14.3%), 인공영양군의 1명(6.7%)에서 검출되었다. Yeast는 모유영양군의 1명(7.1%)에서만 검출되었다. 총 혐기성균 수는 두 군에서 서로 비슷하였으나, 총 호기성균 수는 인공영양군에서 유의적으로 더 많았다($p < 0.05$).

이상의 결과를 보면 이유시작 후에는 이유시작 전까지 형성되었던 모유영양군과 인공영양군간의 검출율 및 균수에서의 유의적인 차이들이 거의 해소되어 있음을 알 수 있다. 이것은 모유영양군의 대다수가 혼합영양이나 인공영양으로 전환하여 식이적인 차이가 없어진 때문인 것으로 추측된다. 그러나 유의적이지는 않지만 이유 전에 보였던 두 군의 특징적인 균종들간의 검출율의 차이는 여전히 존재하여, 모유영양군에서는 bifidobacteria, staphylococci, 인공영양군에서는 streptococci, clostridia 등이 높다. 따라서 이유 전 수유방식이 장내세균에 미치는 영향은 장기적일 수 있음을 시사하고 있으나 그 영향이 얼마나 오래 지속되는지를 알아보기 위해서는 더 연구 되어야겠다.

한편 이렇한 차이가 여전함에도 모유영양군에서 총 호기성균이 인공영양아에 비해 유의적으로 더 많았던 점은 모유영양아는 이유기 중 곡분도입과 함께 호기성 미생물들의 증가가 급속하게 이루어지는 것을 알 수 있다.

이유식 도입 후에 분리된 streptococci 중 임의로 40 균주를 선택하여 속 또는 종의 수준까지 동정한 결과 Table 6과 같았다. Enterococcus가 총 28균주(70%)로 가장 많았고, Lactococcus가 8균주(20%), Streptococcus가 4균주(10%)였다. Enterococcus 중에서는 *E. faecium*이 14균주로 가장 많았고, *E. avium*은 10균주였으며, *E. faecalis*는 4균주였다. Streptococcus는 *S. bovis* 2균주, *S.*

Table 6. Kinds of genera and species among the 40 strains isolated randomly from the fecal streptococcal colonies

Species	Frequency ¹⁾	Counts ²⁾
Enterococcus	28/40(70.0)	
<i>E. faecium</i>	14/40(35.0)	9.16 ± 0.86
<i>E. avium</i>	10/40(25.0)	9.36 ± 0.66
<i>E. faecalis</i>	4/40(10.0)	9.09 ± 0.74
Streptococcus	4/40(10.0)	
<i>S. bovis</i>	2/40(5.0)	9.4 ± 0.35
<i>S. intermedius</i>	1/40(2.5)	8.45
<i>S. salivarius</i>	1/40(2.5)	10.31
Lactococcus sp.	8/40(20.0)	9.58 ± 0.44

1) Frequencies are expressed as No. of species/total No. of streptococci selected randomly and identified

2) Counts expressed as mean ± SD of log₁₀(CFU/g of wet weight)

*intermedius*와 *S. salivarius*가 각각 1균주였다.

3) 이유식 도입에 따른 장내균총의 변화

장내세균은 성인의 경우 착생세균의 strain이 새로운 것들로 승계(succession)되기도 하지만 대체로 종의 수준에서는 별 변화가 없는 안정된 동적 평형에 놓여있다고 볼 수 있다. 이에 반해 수유기의 영유아들은 이유 전까지는 도입되는 여러 장내세균들이 상호작용 등의 선택과정을 거치면서 안정된 균총을 형성해 가다가 다시 이유기를 맞아 새로운 이유보충식 도입으로 이러한 균총이 조정되면서 새로운 평형을 향해 가는 과정이기 때문에, 장내세균의 변화면에서는 일생 중 가장 혼란한 시기라고 볼 수 있다. 그러나 이러한 혼란에도 불구하고 각 시기별로는 독특한 균총을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 장내세균의 조성을 이유시작 전후에 측정하여 비교함으로써 이유식 도입에 따른 변화를 살펴보고자 하였다.

이유식도입 후에 균수가 유의적으로 증가된 것은 모유영양군의 streptococci($t = -2.464, p = 0.031$)와 인공영양군의 lactobacilli($t = -5.077, p = 0.001$), 총 혐기성균($t = -2.291, p = 0.038$)이었고, 유의적으로 균수가 감소된 것은 인공영양군의 총 호기성균($t = 3.574, p = 0.003$)이었다.

유의적인 차이는 아니지만 이유식도입 후에 균수가 증가된 것은 모유영양군의 bacteroides와 총 호기성균, 인공영양군의 bifidobacteria와 bacteroides 였다. 유의적인 차이는 아니지만 이유식도입 후에 균수가 감소된 것은 모유영양군의 bifidobacteria, clostridia, veillonella, *E. coli*, klebsiella, staphylococci와 총 혐기성균, 인공영양군의 streptococci, clostridia, *C. perfringens*, Peptococcaceae, *E. coli*, klebsiella, enterobacter였다. 이유식도입 전후에 균수의 차이가 거의 없었던 것은 모유영양군의 lactobacilli였다.

본 연구결과 bifidobacteria의 검출율은 이유식 도입 후에 두 군 모두에서 증가되었으나, Stark와 Lee의 연구¹⁰⁾에서는 모유영양군에서는 이유시작 전후에 별 변화가 없었고, 인공영양군에서는 이유직전까지 증가하다가 이유시작 후 감소하였다. Bacteroides의 검출율은 본 연구와 Stark와 Lee의 결과에서 두 군 모두 이유식 도입 후에 증가되었다. Clostridia의 검출율은 본 연구와 Stark와 Lee의 연구에서 모유영양군의 경우 이유식 도입 후 증가되었으나, 인공영양군에서는 변화가 없었다. *E. coli* 등을 포함한 enterobacteria는 본 연구에서는 모유영양군에서는 이유식 도입 후에 증가되었으나, 인공영양군에서는 변화가 적었고, Stark와 Lee의 연구

에서는 모유영양군은 이유 후에 크게 증가하였고 인공영양군은 서서히 감소하는 경향을 보여 주고 있다.

수유기간 중 양 집단에서 검출된 균수의 변화를 비교해 보면 모유영양군은 *E. coli* 등의 enterobacteria와 bifidobacteria가 지속적인 감소의 경향을 보였고, staphylococci는 이유기간 중에 유의적으로 감소되었으나 다른 균종들은 별 차이가 없었다.

인공영양군에서도 모유영양군에서와 같이 *E. coli* 등의 enterobacteria의 균수가 지속적으로 감소하는 경향이 보였고 bifidobacteria, bacteroides, lactobacilli 등은 이유를 거치면서 상승하였으나 나머지 균종들은 별 유의적인 변화가 적었다.

4) 장내 우세균의 종류와 이유식도입에 따른 변화

각 조사대상자의 장내균총 중 가장 높은 균수를 나타내는 우세균을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

이유를 시작하기 전(1차 조사)에 모유영양아군에서는 bifidobacteria가 우세균인 경우가 10명(71.4%)으로 가장 많았고, 다음으로 klebsiella가 2명(14.3%), streptococci와 *E. coli*가 각각 1명(7.1%)씩이었다. 그러나 인공영양아군에서는 streptococci가 우세균인 경우가 가장 많아서 8명(53.3%)이었으며, bifidobacteria가 우세균인 경우는 4명(26.7%)이었고, *E. coli*, Peptococcaceae와 eubacteria가 각각 1명(6.7%)씩이었다.

이유를 시작한 후(2차 조사)에 모유영양아군에서는 bifidobacteria가 우세균인 경우가 8명(57.1%)으로 가

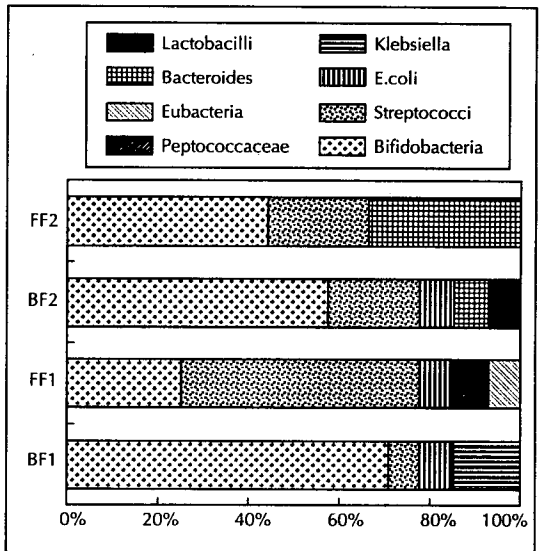


Fig. 1. Dominant fecal bacteria in Breast-fed and Formula-fed infants before and after weaning. BF ; Breast-fed infants, FF ; Formula-fed infants, 1 ; Before weaning, 2 ; After weaning.

장 많았고, 다음은 streptococci가 3명(21.4%), bacteroides, lactobacilli와 E. coli가 각각 1명(7.1%)씩이었다. 인공영양군에서는 bifidobacteria가 우세균인 경우가 7명(46.7%)으로 가장 많았고, 다음으로는 bacteroides가 5명(33.3%), streptococci가 3명(20.0%)이었다.

즉, 모유영양군에서는 이유시작 전후 모두 bifidobacteria가 우세균으로 자리잡고 있었는데, 이는 Balmer와 Wharton¹⁹⁾의 결과 및 김상희와 강국희²⁰⁾의 연구와 일치하였으나, 지근익²⁰⁾의 streptococci가 우세균이라는 결과와는 달랐다. 인공영양군에서는 이유시작 전에는 streptococci가 우세하다가 이유시작 후에 두드러진 우세균이 없이 bifidobacteria, streptococci, bacteroides 등이 비슷하게 나타나는 차이를 볼 수 있었다.

이러한 결과는 모유영양군과 인공영양군의 장내균총의 차이를 분명하게 보여주고 있다. 즉 이유 전에는 모유영양아의 장내균총에는 bifidobacteria가 주이지만 인공영양아는 streptococci가 주이며, 이유 후에는 두 군 모두에서 bifidobacteria가 주가 되며 비슷한 양상을 보이지만 그 차이는 여전히 보여준다. 즉 모유영양아가 이유 후에도 bifidobacteria가 압도적으로 주류를 이루는 데 반하여 인공영양아는 bifidobacteria와 함께 bacteroides나 streptococci가 거의 비슷한 빈도로 주류를 이루고 있는 것을 보여준다. 이유 후에는 모유영양아와 인공영양아의 수유방식과 이유방식이 서로 비슷하게 접근함에도 불구하고 양 집단간에 우세균의 차이가 존재한다는 점을 고려해 볼 때, 이유전의 수유방식의 차이에 의해 다르게 형성된 장내균총이 단기간의 식사의 변화에 의해서 교정되지 않는다는 점을 보여주고 있다. 따라서 인공영양아가 이용하는 조제유의 영향이 장기적일 수 있다는 것을 보여주고 있다.

요약 및 결론

우리 나라 영유아의 수유방식에 따른 전형적인 장내균총의 차이와 이유식도입에 따른 장내균총의 변화를 알아보고자 모유영양아 14명, 인공영양아 15명을 대상으로 이유시작 전(생후 2~3개월)과 이유시작 후(생후 5~7개월)에 분변을 수집하여 장내균총을 조사하였다.

1) 이유시작 전에 모유영양군에서는 bifidobacteria를 우세균으로 하는 보다 단순한 균총을 형성하는데 비해, 인공영양군에서는 streptococci를 우세균으로 하는 보다 다양한 균총을 형성하였고, 이유시작 후에는 두 군 모두 bifidobacteria를 우세균으로 하는 다양한 균

총을 형성하였다.

2) 이유시작 전인 생후 2~3개월의 모유영양군은 인공영양군에 비해 bifidobacteria(p<0.01), lactobacilli(p<0.01)와 총 혐기성균(p<0.01) 수가 유의적으로 더 많았고, 유의적인 차이는 아니었지만 lactobacilli, bacteroides, eubacteria, veillonella와 staphylococci 등의 검출율이 더 높았다. 인공영양군은 모유영양군에 비해 clostridia(p<0.05)와 klebsiella(p<0.05)의 검출율이 유의적으로 더 높았고, streptococci(p<0.01), eubacteria(p<0.05)와 총 호기성균(p<0.05) 수가 유의적으로 더 많았으며, 유의적 차이는 아니었지만 streptococci, Peptococcaceae와 enterobacter의 검출율이 더 높았다.

3) 이유시작 후인 생후 5~7개월의 모유영양군은 인공영양군에 비해 총 호기성균 수가 유의적으로 더 많았고(p<0.05), 유의적 차이는 아니나 C. perfringens의 검출율이 더 높았으며, enterobacter의 균수가 더 많았다. 인공영양군은 모유영양군에 비해 streptococci, bacteroides, clostridia, klebsiella와 Peptococcaceae의 검출율이 더 높았고, C. perfringens와 Peptococcaceae의 균수가 더 많았지만 유의적 차이는 아니었다.

4) 이유시작 전에 비해 이유식도입 후에 모유영양군의 streptococci(p<0.05)와 인공영양군의 lactobacilli(p<0.001), 총 혐기성균(p<0.05) 수가 유의적으로 증가되었고, 인공영양군의 총 호기성균 수는 유의적으로 감소되었다(p<0.01).

결론적으로 본 연구 결과 이유시작 전에는 모유영양아와 인공영양아의 장내균총 조성이 서로 다르게 나타났으며, 모유영양아는 bifidobacteria가 우세균인 것으로 나타나 질병에 대한 저항력 면에서 모유영양아의 균총이 인공영양아의 장내균총에 비해 바람직한 것으로 생각된다. 이유시작 후에는 이러한 차이가 많이 소실되었으나, 여전히 차이는 존재하여 이유전 수유방식의 영향이 장기적일 수 있음을 암시하였다.

Literature cited

- 1) Tannock GW. The normal microflora : New concepts in health promotion. *Microbiol Sci* 5 : 4-8, 1988
- 2) Savage DC. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Ann Rev Nutr* 6 : 155-78, 1986
- 3) Tannock GW. Microbial interference in the gastrointestinal tract. *ASEAN J Clin Sci* 2 : 2-34, 1981
- 4) Tannock GW. Control of gastrointestinal pathogens by normal microflora. In : Klug MJ, Reddy CA(eds) *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society for

- Microbiology, Washington DC, pp.374-382, 1984
- 5) Rolfe RD. Role of volatile acids in colonization resistance to *Clostridium difficile* *Infect Immun* 45 : 185-191, 1984
 - 6) Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 31 : 107-133, 1977
 - 7) Macfarlane GT, Gibson GR. Metabolic activities of the normal colonic flora. In : Gibson SAW(eds) Human Health : the contribution of microorganisms. Springer-Verlag, London, New York, Hong Kong, pp.17-52, 1994
 - 8) Cunningham AS. Morbidity in breast-fed and artificially fed infants. *J Pediatr* 90(5) : 726-729, 1977
 - 9) Cunningham AS. Morbidity in breast-fed and artificially fed infants II. *J Pediatr* 95(5) : 685-689, 1980
 - 10) Arnon SS, Damus K, Thompson B, Midura TF, Chin J. Protective role of human milk against sudden death from infant botulism. *J Pediatr* 100(4) : 568-573, 1982
 - 11) Bullen CL, Willis AT. Resistance of the breast-fed infant to gastroenteritis. *Br Med J* 3 : 338-343, 1971
 - 12) Mitsuoka T. A Color Atlas of Anaerobic Bacteria. Sobunsha, Tokyo, Japan, 1980
 - 13) Tissier H. Repartition des microbes dans l'intestin du nourrisson. *Ann Inst Pasteur* 19 : 109-123, 1905. In : Rasic JL, Kurmann JA, Bifidobacteria and Their role. Birkhauser Verlag, Basel Boston Stuttgart, 1983
 - 14) Bullen CL, Tearle PV, Stewart MG. The effect of "humanised" milks and supplemented breast feeding on the fecal flora of infants. *J Med Microbiol* 10 : 403-413, 1977
 - 15) Bullen CL, Tearle PV, Willis AT. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants : an in-vivo study. *J Med Microbiol* 9 : 325-333, 1976
 - 16) Bullen CL, Tearle PV. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants : an in-vitro study. *J Med Microbiol* 9 : 335-344, 1976
 - 17) Tannock GW. The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. In : Gibson SAW(eds) Human Health : the contribution of microorganisms. Singer Verlag, London, New York, Hong Kong, pp.1-16, 1994
 - 18) Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* 15 : 189-203, 1982
 - 19) Balmer SE, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn : Breast milk and infant formula. *Archiv Dis Child* 64 : 1672-1677, 1989
 - 20) Mevissen-Verhage E AE, Marcelis JH, Machiel N. de VOS, Wilhelmina CM. Harmsen-van Amerongen, Jan Verhoef. *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, and *Clostridium* spp. in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J Clin Microbiol* 25(2) : 285-289, 1987
 - 21) Jin HS. A modified commercial medium for the enumeration of bifidobacteria in feces. *J Jeonju Univ* 23 : 395-403, 1994
 - 22) SAS/STAT. Guide for personal computer, version 6.03, 1987
 - 23) Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 28(9) : 975-986, 1984
 - 24) Kim SH, Kang KH. Distribution of Bifidobacterium in feces of Korean infants. *Korean J Dairy Sci* 6(2) : 126-134, 1984
 - 25) Ji JE. Composition and distribution intestinal Microbial flora in Korean. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 22(5) : 453-458, 1994
 - 26) 지근억. 한국인 유아의 장내세균 분포. 한국산업미생물학회 특별강연, 춘계학술 발표대회 초록집, pp.101-114, 1992