

수집 방법에 따른 한국인 모유의 미생물 분포에 관한 연구

이조윤* · 배형철¹ · 남명수¹

중부대학교 생명과학부, ¹충남대학교 동물자원학부

A Study on Microbial Aspects of Korean Human Milk by Collection Methods

Jo-Yoon Lee*, Hyoung-Churl Bae¹ and Myoung-Soo Nam¹

Division of Life Science, Joongbu University

¹Division of Animal Resources and Sciences, Chungnam National University

Abstract

This study was carried out to evaluate the safety of Korean human milk. The microorganisms were identified from human milk of 149 healthy mothers by two collection methods, hand and pump expression. The means of total bacterial counts were 2.33×10^4 cfu/mL on the samples collected by the pump expression and 7.83×10^3 cfu/mL on those collected by the hand expression. Therefore, the total bacterial counts of pump expression samples was $9.80 \times 10^2 \sim 3.06 \times 10^4$ cfu/mL more than that of hand expression samples. The coliform counts of pump expression was $9.36 \times 10^3 \sim 8.57 \times 10^4$ cfu/mL more than that of hand expression. However, there was any significant differences of the lactic acid bacterial counts between the two samples collected by each methods. 100 strains of 5 patterns of total bacterial counts were isolated based on the morphology of colony in the standard plate count agar. 13 species were identified among the isolated strains. The dominant species in Korean human milk were *Staphylococcus* which 7 subspecies identified(81% in the rate of total bacteria, 1.07×10^4 cfu/mL). Other species identified were *Micrococcus*, *Bacillus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Yersinia* and *Acinetobacter*. 36 strains of 6 patterns of lactic acid bacterial counts were isolated based on morphology of colony in the BCP agar. 7 species were identified among the isolated strains. The dominant species of lactic acid bacteria in Korean human milk were *Lactobacillus brevis*(50.9% in the rate of lactic acid bacteria, 4.72×10^4 cfu/mL). Others species identified(49.1% lactic acid bacteria) were *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostic lactis* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Key words : human milk, microorganism, identification

서 론

모유는 영유아들에게는 완전 식품으로서 영양학적인 우수성, 위생학적인 안정성, 모체로부터의 선천적인 면역성분과 모자간의 신뢰감을 형성하는 정서적인 측면에서 영유아들에게 필수적으로 공급되어야 하는 식품이다.

그러나, 미국을 비롯한 선진국에서는 1930년대 이후 분유

의 품질이 크게 향상되고 사회에 진출하는 여성이 늘어나면서 인공수유가 선풍적인 인기를 끌기 시작하였으며, 그에 따른 부작용 또한 속속 나타나기 시작하여 면역 결핍이나 영양 실조, 설사 등으로 목숨을 잃는 유아들이 늘어났다. 이에 따라 유엔의 국제연합 아동기금(UNICEF)을 비롯하여 각 여성 단체 및 사회단체에서는 모유먹이기 운동을 전개하여 미국의 경우, 1966년에 18%에 불과한 모유수유가 오늘까지 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 우리나라의 경우 모유 먹이기 운동이 다소 늦게 시작되어 순수 모유만을 수유한 비율이 1985년에 59%에서 1997년에 14.1%, 2000년도에는 10.2%의 비율로 계속 감소 추세를 나타내고 있으나 모유와 혼합수유

* Corresponding author : Jo-Yoon Lee, Division of Life Science, Joongbu University, 101 Daehak-Ro, Chubu-myeon, Geumsan-gun, Chungcheongnam-do 312-700, Korea. Tel: 82-41-750-6729, Fax: 82-41-753-8489, E-mail: joyoon@joongbu.ac.kr

의 경우가 1997년 66.6%에서 2000년 75.2%로 다소 높아지고 있어 모유의 중요성에 대하여 지속적인 홍보가 요구되고 있다(Kim et al., 2000).

모유수유가 유아들의 건강에 가장 중요한 요인으로서 인식되고 국제적으로 모유먹이기 운동이 증가됨에 따라, 모유의 위생상태 지표라 할 수 있는 미생물의 오염 및 분포에 대하여 파악하는 것은 신생아들의 건강에 더없이 중요한 문제이다. 모유 중 미생물은 유산균을 비롯하여 영유아들에게 설사를 일으키는 대장균 및 기타 병원성 세균도 다양하게 분포하고 있으며, 이들 미생물들은 영유아들의 장내미생물 균총을 형성하는 주된 환경요인으로서 보고되고 있다(Eugenia, 1997; Lewis, et al., 1980; Wharton, et al., 1994). 특히 모유의 수집방법 및 수유방식에 따라 모유중 미생물 분포에는 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있다. Myron 등(1978)이 모유의 수집방법에 따라서 일반세균을 조사한 결과, 손으로 수집한 경우 10^3 cfu/mL 정도의 일반세균이 존재하고 있으며, 유즙기로 수집한 경우 10^5 cfu/mL 까지 일반세균이 존재하고 있음을 보고하였으며, Pittard 등(1985)은 모유중 세균을 동정한 결과 산모의 유두와 유륜의 피부에 많이 존재하는 *staphylococci*와 *streptococci* 등의 그람음성 세균이 $10^2 \sim 10^4$ cfu/mL 정도로 존재하고 있다고 보고한 바 있다.

현재까지 우리나라에서는 모유의 아미노산 조성(Goh et al., 1970), 지방산 및 vitamin(Lee et al., 1997; Lee and Kim, 1994), 무기질(In et al., 1997) 등의 성분에 대한 연구를 수행하였으며, 모유 중의 미생물 분포에 대한 연구는 많이 알려져 있지 않고 있으므로 우리나라 산모의 모유 중에 존재하는 미생물을 실험적 방법으로 증명하기 위하여 유산균의 종류와 균 수, 대장균군의 유무, 일반세균의 종류와 균수 등을 시험하여 보고한다.

재료 및 방법

모유의 수집

공시모유는 대전지역에 위치한 산후조리원 두 곳으로부터 약 4개월 동안 149명의 산모로부터 모유를 수집하였으며, 이 중 31명으로부터 손 착용에 의한 모유를 수집하였고 118명으로부터 전동식 펌프를 이용한 기계착유를 통하여 모유를 수집하였다. 모유 수집시 산모들의 일반적인 착유습관에 따른 미생물 오염 정도를 측정하기 위해 산모에게 수집방식 또는 수집시 위생과 관련된 교육을 하지 않았다. 산후조리원의 유즙기는 수집전에 끓는물에 의한 가열소독을 하고 있었으며, 손착유의 경우 착유전 위생티슈나 물세척을 하고 착유하고 있었다. 착유된 모유는 멸균된 50 mL conical tube(FALCON Co., USA)에 1회 수집량을 30 mL 이상 수집하고 이를 즉시

냉장 운반하여 일반세균수, 대장균수, 유산균수 및 일반성분을 측정하고 일반세균과 유산균을 순수분리하였다.

모유중 대장균수 측정

수집된 모유를 심진법에 의해 희석하여 MacConkey agar(Difco, USA)에 평판배양법으로 37°C에서 24시간 배양후 계측하였으며 각각의 집락을 육안 관찰을 통한 크기, 색상, 투명도, 형태 등의 특성에 따라 집락을 구분하여 EMB agar(BBL, USA)와 Brilliant Green Bile Broth(BBL, USA)를 통하여 확정시험하였다.

모유중 일반세균 수 측정 및 동정

수집된 모유를 심진법에 의해 희석하여 Standard plate agar(Difco, USA)에 평판배양법으로 37°C에서 48시간 배양후 각각의 집락을 육안 및 현미경 관찰을 통한 크기, 색상, 투명도, 형태 등의 특성에 따라 집락형을 구분하고, 각 시료마다 형태별로 집락수를 계수하였다. 분리된 일반세균은 Moore 등(1994)과 Kononen 등(1996)에 의한 방법에 준하여 세포지방산 조성을 비교하여 동정하였다. 균체의 지방산 조성 분석은 Standard plate agar에서 37°C, 48시간 배양한 40~50mg의 균체를 취하여 1N NaOH(50% methanol) 1 mL에 현탁한 후 30분간 끓여서 비누화 하였다. 여기에 6N HCl(46% methanol) 2 mL를 넣고 80°C에서 10분 동안 methylation 시킨 다음 추출용액(hexane : methyl-tert butyle ether = 1 : 1) 1.25 mL를 가하여 가볍게 진탕하여 용매층을 회수한 후 여기에 0.3N NaOH 3 mL를 첨가하여 5분 동안 염기세척하여 용매층을 회수하고 Hewlett Packard series II gas chromatograph model 6890 (Microbial ID Inc., USA)을 사용하여 균체지방산을 분석하였으며, separation column은 HP19091B-102를 사용하였다. FAMES profile은 Microbial Identification System Software package(version 3.9, Microbial ID, Inc., USA)를 사용하여 동정하였다. 실험에 사용된 gas chromatography의 분석조건은 다음과 같다. Carrier gas, H₂ ; Column head pressure, 10 psi ; Split ratio, 100:1 ; Split vent, 50 mL/min ; Septum purge, 5 mL/min ; FID hydrogen, 30 mL/min ; FID nitrogen, 30 mL/min ; FID air, 400 mL/min ; Initial temperature, 170°C ; program rate, 5°C/min ; Final temperature, 270°C ; FID temperature, 300°C ; Injection port, 250°C ; Injection volumn, 2 μ L.

모유중 유산균 수 측정 및 동정

수집된 모유를 심진법에 의해 희석하여 CaCO₃ 0.5%를 함유하는 BCP agar(Eiken Chemical Co. LTD., Japan)에 평판배양법으로 37°C에서 48시간 CO₂ incubator에서 배양후 투명환 및 노란색을 나타내는 집락을 잠정적으로 유산균 집락으로

판정하여 분리하였으며, 육안 및 현미경 관찰을 통한 크기, 색상, 투명도, 형태 등의 특성에 따라 집락형을 구분하고(So et al., 1994), 각 시료마다 집락형별로 집락수를 계수하였다. 분리된 유산균중 혐기성 유산균을 분리 및 확인하기 위하여 modified BCP broth(yeast extract 2.5 g, beef extract 5 g, glucose 2 g, Tween80 1 g, L-cystein 0.1 g, bromo purple cresol 0.04 g, D.W 1 L, pH 6.8)에 접종하여 mineral oil을 첨가하여 혐기적 상태에서 배양하였으며, 배양된 유산균중 bifidobacterium의 확인은 F6PPK 실험(Sneath et al., 1986)을 통하여 확인하였고, 분리된 유산균들의 동정은 API 50CH system(BioMérieux SA, France)과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Sneath et al., 1986)에 준하여 생리적 및 생화학적 특성을 시험하여 동정하였다(Harrigan and McCance, 1976).

통계처리

비유기간에 따른 일반성분의 함량 및 수집방법에 따른 모유중의 균수의 통계분석은 MYSTAT statistical analysis program(ver 2.0, Korea)을 사용하여 평균, 표준편차 및 Duncan's multiple range test를 이용하여 0.5% 범위 내에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

비유기간에 따른 일반성분 변화

분만 후 4주간 모유의 일반성분은 Table 1과 같다. Table 1

에 나타난 결과에 의하면, 총고형분의 함량은 비유 4주 동안에는 10.90~18.20% 범위로 평균 12.88~14.04%로서 비유기간별 유의적 차이는 보이지 않았으나, 지방함량의 경우 0.70~6.92% 범위로 평균 2.46~3.70%로서 평균함량이 1.5배의 함량 차이를 보이고 있어 산모에 따른 유성분 중 가장 큰 변이를 보이고 있다. 모유의 지방 함량은 모유의 성분 중 가장 변이가 큰 것으로 알려져 있으며, 수유단계, 산모의 영양상태와 식사내용, 하루중의 시간대, 출산횟수 및 계절 등에 따라 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(Choi et al., 1991; Ferris and Jensen, 1984). 일반적으로 모유의 지방함량은 평균 3~5%로 보고되어 있으나(Gaull et al., 1982), 최근에 이르러 생활 패턴의 변화와 함께 전착유(fore milk)와 후착유(hind milk)에 따라 산모 개개인의 변이가 크게 나타나고 있어 비유기간에 따른 평균 지방함량은 큰 의미가 없는 것으로 여겨진다. 단백질은 평균 1.65~1.96%, 탄수화물은 평균 7.65~7.95%의 범위로 산모에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다.

수집 방법에 따른 모유중의 일반세균, 대장균 및 유산균 수 차이

분만 후 4주간 착유하는 방법에 따른 모유의 미생물 분포는 Table 2와 같다. Table 2에 나타난 결과에 의하면, 손착유시 일반세균수는 평균 7.83×10^3 cfu/mL 인데 비하여, 기계착유시에는 평균 2.33×10^4 cfu/mL 로서 손착유시보다 평균 $9.80 \times 10^2 \sim 3.06 \times 10^4$ cfu/mL 많이 존재하였으며, 또한 기계착유시 대장균군도 1.08×10^4 cfu/mL 이상 존재하는 것으로 나

Table 1. Contents of human milk with time postpartum

Nutrients	Stage of lactation (weeks postpartum)			
	1(n=34) ¹⁾	2(n=56)	3(n=20)	4(n=12)
Fat(%)	2.96± 1.27 ^{a2)}	3.23± 1.38 ^{ab}	3.70± 1.68 ^b	2.46± 0.97 ^a
Range	0.70~ 6.51	1.20~ 6.91	0.74~ 6.92	1.11~ 3.66
Protein(%)	1.96± 0.39 ^a	1.87± 0.28 ^a	1.65± 0.45 ^a	1.78± 0.86 ^a
Range	1.34~ 3.39	1.32~ 2.63	0.73~ 2.29	1.04~ 3.44
Carbohydrate(%)	7.86± 0.29 ^a	7.89± 0.43 ^a	7.65± 1.16 ^a	7.95± 0.48 ^a
Range	7.22~ 8.31	6.22~ 8.59	3.35~ 9.01	7.08~ 8.53
Moisture(%)	86.42± 1.33 ^a	86.17± 1.45 ^a	85.96± 1.66 ^a	87.12± 0.85 ^a
Range	82.30~ 89.10	81.80~ 88.30	81.90~ 88.60	86.00~ 88.10
Total solid(%)	13.58± 1.33 ^a	13.83± 1.45 ^a	14.04± 1.66 ^a	12.88± 0.85 ^a
Range)	10.90~ 17.70	11.70~ 18.20	11.40~ 18.10	11.90~ 14.00
Mineral(%)	0.80± 0.25 ^a	0.84± 0.38 ^a	1.03± 0.57 ^a	0.69± 0.33 ^a
Range	0.48~ 1.54	0.20~ 1.76	0.07~ 2.34	0.27~ 1.27

1) Number of subjects.

2) Values are mean±SD.

^{a,b} Means with same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test.(P<0.05).

Table 2. Bacterial colony counts in human milk samples using hand-expression and pump-expression methods

Stage of lactation (weeks postpartum)	Total bacterial counts (CFU/mL)		Coliform counts (CFU/mL)		Lactic acid bacteria (CFU/mL)	
	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Hand-expression						
1(n=14) ¹⁾	4.77 ^a ×10 ³	160~29,667	6.15 ^a ×10 ⁰	0~ 60	2.10 ^a ×10 ³	23~18,000
2(n=32)	7.22 ^a ×10 ³	90~58,000	2.04 ^{ab} ×10 ²	0~5,300	5.39 ^a ×10 ³	39~15,800
3(n=6)	5.67 ^a ×10 ³	677~20,620	1.00 ^b ×10 ³	0~5,000	3.52 ^a ×10 ⁴	250~65,909
4(n=4)	1.81 ^a ×10 ³	117~ 6,627	1.44 ^b ×10 ³	0~5,095	5.43 ^a ×10 ³	647~25,972
Mean	7.83×10 ³		2.14×10 ²		1.29×10 ⁴	
Pump-expression						
1(n=7)	3.24 ^b ×10 ⁴	0~180,667	1.43 ^c ×10 ⁴	0~ 75,000	8.63 ^a ×10 ²	28~ 2,722
2(n=15)	2.57 ^b ×10 ⁴	117~110,000	1.10 ^c ×10 ⁴	0~ 55,000	3.52 ^a ×10 ³	439~ 8,829
3(n=9)	8.35 ^b ×10 ³	70~ 40,667	1.08 ^c ×10 ⁴	0~ 55,000	7.64 ^a ×10 ⁴	884~274,600
4(n=6)	8.20 ^b ×10 ³	1,516~18,000	8.57 ^c ×10 ⁴	345~251,795	6.89 ^a ×10 ³	310~ 67,200
Mean	2.33×10 ⁴		2.01×10 ⁴		1.35×10 ⁴	

¹⁾ Number of subjects.

^{a,b,c} Means with same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test(p<0.05).

타나 손착유시보다 평균 $9.36 \times 10^3 \sim 8.57 \times 10^4$ cfu/mL의 대장균군이 더 많이 존재하는 것으로 나타났다. 반면에 유산균수는 평균 $8.63 \times 10^2 \sim 7.64 \times 10^4$ cfu/mL로서 기계착유와 손착유 방법에 따른 차이점이 나타나지 않았다. 한편, 비유주간에 따른 미생물의 변화는 기계착유시에는 유의적 차이는 없으나, 손착유시 대장균군은 분만후 1주에는 6.15×10^0 cfu/mL이었으나 4주째에는 1.44×10^3 cfu/mL로서 분만후 계속 증가하였다.

이와 같은 결과는 Myron 등(1978)이 캐나다인 산모로부터 착유방법에 따른 총균수를 조사한 결과, 손착유시 2.5×10^3 cfu/mL 인데 비하여 기계착유시 1.35×10^5 cfu/mL 으로 존재한다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내고 있다. 또한 개체간에 편차가 큰 것으로 나타나 손착유의 경우 개인의 위생상태와 기계착유의 경우 유즙기 및 수집용기의 위생상태에 따라 미생물의 오염에 크게 영향을 받는 것으로 생각된다. Heyworth와 Brown(1978)은 영유아들의 질환중 장내균총의 변화에 의한 설사는 가장 흔한 질병으로서 영유아들의 소장내 10^5 cfu/mL 이상의 *E. coli*, *bacteroides* 등의 세균이 존재할 경우 세균에 의한 설사를 유발할 수 있다고 하였다. 그러므로 대장균이 심하게 오염된 모유를 급여시 영유아들의 설사를 유발하는 질병을 초래할 수 있으므로 모유 착유시 위생상태에 각별한 주의가 필요하며, 특히 면역력이 약한 영유아에게 직접 포유하기가 어려울 경우 기계착유보다 손착유에 의해 모유를 공급하는 것이 바람직하며, 부득이 기계착유를 하여야 할 경우는 기계의 위생상태에 따라서 미생물의 분포가 많은 차이를 나타내므로 유즙기의 위생에 각별한 주의가 필요

한 것으로 생각된다.

수집 방법에 따른 모유중의 일반세균 및 유산균의 동정

모유 중 일반세균을 분리 및 동정하기 위하여 standard plate agar에 접종하여 배양하고 각 colony의 형태학적 양상에 따라 분리하였으며, Microbial Identification System(MIDI)을 사용하여 세포지방산 조성에 의한 일반미생물을 동정한 결과 Table 3과 같다. 모유 수집 방법에 따른 즉, 손에 의한 수집방법과 유즙기에 의한 수집방법에 따른 일반세균들의 형태학적인 colony 양상은 차이가 없었으며 5가지 형태로 구분할 수 있었다. 5가지 유형으로 분리한 일반미생물 100여개의 균주를 동정을 실시한 결과 총 13개 균종으로 분포하고 있었다. 그 중 *Staphylococcus*속이 7가지의 아종(subspecies)으로 전체 일반세균의 81%(1.07×10^4 cfu/mL)로서 가장 많이 존재하고 있는 것으로 나타났으며, 특히 *Staphylococcus hominis* 균종이 전체 일반세균중 22%(2.48×10^3 cfu/mL)로서 가장 많이 분포하고 있었다. 그 외 *Micrococcus*속, *Bacillus*속, *Providencia*속, *Pseudomonas*속, *Yersinia*속 및 *Acinetobacter*속이 각각 1종씩 검출되었다.

이와 같은 결과는 Pittard 등(1985)과 Salles와 Goulart(1997)가 모유중의 세균을 동정한 결과, 산모의 피부에 존재하는 세균의 양상과 유사한 경향을 보이고 있으며, 그 중 *staphylococci*속은 모든 산모의 모유중에 존재하고 있었다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내고 있다. 또한 Myron 등(1978)과 Nikodemusz(1986)는 모유중 미생물을 동정한 결과, *Staphylo-*

Table 3. Cultural characteristics, viable cell counts and identifications of microorganism in human milk

Characteristics	Isolation groups of microorganisms				
	A	B	C	D	E
Cultural characteristics of colony					
Size(diameter)	1~4 mm	0.5~2 mm	1.2~2 mm	1.5~5 mm	0.3~1.5 mm
Shape	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Filamentous
Elevation	Umbonate	Convex	Umbonate	Convex	Flat
Margin	Undulate	Entire	Undulate	Entire	Ciliate
Color	White	Yellow	White	White	White
Surface appearance	Smooth	Smooth	Rough	Smooth	Coarsely
Consistency	Opaque	Opaque	Opaque	Translucency	Translucency
Identification					
Species identification	<i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
Rate of total bacterial counts(%)	11	17	7	3	19
Means of bacterial counts(CFU/mL)	1.65×10^3	2.52×10^3	1.07×10^3	4.63×10^2	2.02×10^3
Species identification	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas flectens</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Rate of total bacterial counts(%)	4	6	3	3	13
Means of bacterial counts (CFU/mL)	6.00×10^2	8.90×10^2	4.58×10^2	4.63×10^2	1.39×10^3
Species identification		<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		<i>Staphylococcus auricularis</i>
Rate of total bacterial counts(%)		2	2		9
Means of bacterial counts(CFU/mL)		2.97×10^2	3.05×10^2		9.59×10^2
Species identification			<i>Acinetobacter baumannii</i>		
Rate of total bacterial counts(%)			1		
Means of bacterial counts(CFU/mL)			1.53×10^2		

*Staphylococcus aureus*가 가장 많이 오염되었으며 그 외 *Pseudomonas aeruginosa*, Micrococci와 Coliforms이 오염되어 있다고 보고한 것과 같이 한국인의 모유에서도 이와 유사한 결과를 나타내었다.

한국인 모유에 오염된 일반세균 중 17%(2.52×10^3 cfu/mL)의 비중을 차지하는 *Staphylococcus aureus*는 황색포도상구균으로서 식품 중에 오염되어 독성발현양상에 따라 심각한 식중독을 일으킬 수 있는 가장 흔한 원인균으로 알려져 있으며, 특히 사람의 피부의 정상 세균총을 구성하는 주요 병원균으로 보고되어 있어(Choe et al., 1991; Elek and Levy, 1950; Magaret and Elmer, 1989), 영유아들에게 착유하여 급여하는 경우에 산모의 위생상태에 특별한 주의가 필요하며, 가능하다면 가열처리 등에 의한 살균처리를 하여 영유아에게 급여하는 것이 바람직하다고 생각된다.

한편, 신생아의 장내는 출생 전에 무균상태로 있다가 출생

후부터 주위환경과 위생상태, 분만형태, 모유와 인공영양의 형태, 수유방법 등에 따라 영유아들의 장내에 미생물의 정착 상태가 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 모유영양아의 경우 장내 *Bifidobacterium*을 비롯한 유산균이 주류를 이루는 균총으로 상재하고 있다고 알려져 있다(Jin et al., 1999; Carlsson and Gothefors, 1975; Tannock et al., 1990; Fitzgerald, 1977; Bezirtzoglou, 1997). 또한 분유에 의한 인공영양을 하고 있는 영유아보다 모유를 수유하는 영유아의 장내에는 더욱 많은 유산균이 분포하고 있다고 보고하고 있다(Balmer and Wharton, 1989; Haenel, 1970; Moon et al., 1988; Moreau et al., 1986). 이와 같이 영유아들의 장내 유산균은 대부분의 경우 모유로부터 유래되는 유산균이 많을 것이라 생각되어 모유 중 유산균을 분리 동정한 결과는 Table 4 및 5와 같다. BCP agar와 modified BCP broth를 사용하여 모유로부터 분리된 유산균은 수집방법에 따른 colony의 형태학적 양상은 차이가

Table 4. Cultural characteristics and viable cell counts of lactic acid bacteria in human milk

Characteristics	Isolation groups of lactic acid bacteria						
	A	B	C	D	E	F	G
Cultural characteristics of colony							
Size(diameter, mm)	1.5~2.0	0.5~1.8	0.5~1.0	0.5~1.7	0.1~0.3	0.1~0.5	0.1~0.5
Shape	circular	circular	spindle	circular	circular	spindle	twin spindle
Elevation	raised	convex	convex	flat	convex	convex	convex
Margin	entire	entire	entire	entire	entire	entire	entire
Color	white	white	white	white	white	white	white
Surface appearance	smooth	smooth	smooth	finely	smooth	smooth	smooth
Consistency	opaque	opaque	opaque	translucency	opaque	opaque	opaque
Physiological characteristics of cell							
Morphology	spherical	rods	rods	spherical	rods	rods	spherical
Size(μ m)	0.5~0.7	0.5~0.8	0.7~1.0	0.3~1.4	0.5~1.0	0.3~0.8	0.7~1.0
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 10 $^{\circ}$ C	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	+	+
F6PPK test	-	-	-	-	-	-	-
Acidification of carbohydrates							
L - Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	-	\pm	\pm	\pm	\pm
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
D - Xylose	-	-	-	-	-	+	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	\pm	+	\pm	\pm	+	+	+
Fructose	-	-	-	-	-	-	\pm
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-
Rates of lactic acid bacterial counts(%)	5.2	6.2	25.4	2.6	50.9	2.6	7.1
Means of lactic acid bacterial counts (CFU/mL)	4.87×10^5	5.75×10^5	2.35×10^4	2.41×10^5	4.72×10^4	2.41×10^5	6.63×10^5

Table 5. Carbohydrate fermentation patterns of lactic acid bacteria isolated from human milk

No.	Carbohydrates	Isolated lactic acid bacteria						
		A	B	C	D	E	F	G
0	Control	-	-	-	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+	+	±	-
5	Ribose	+	+	+	+	+	+	±
6	D-Xylose	-	-	-	-	+	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
9	β Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-
10	Galactose	+	+	+	+	+	+	-
11	D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	±	+	±
14	L-Sorbose	+	-	-	+	-	-	-
15	Rhamnose	+	±	+	+	+	±	-
16	Dulcitol	±	-	-	±	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-	-
18	Mannitol	+	+	+	+	+	+	-
19	Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
20	α Methyl- D- mannoside	-	-	-	-	-	-	-
21	α Methyl-D-glucoside	±	-	-	±	-	-	-
22	N Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	-
23	Amygdaline	+	-	-	±	-	-	-
24	Arbutine	+	±	+	+	±	±	-
25	Esculine	-	-	-	-	-	-	-
26	Salicine	+	±	+	+	+	+	-
27	Cellobiose	+	+	+	+	+	+	-
28	Maltose	+	+	+	+	+	+	-
29	Lactose	+	+	+	+	+	+	+
30	Melibiose	+	+	+	+	+	+	-
31	Saccharose	+	+	+	+	+	+	+
32	Trehalose	+	+	+	+	+	+	-
33	Inuline	-	-	-	-	-	-	-
34	Melezitose	+	+	+	+	+	+	-
35	D - Raffinose	-	+	+	+	+	+	-
36	Amidon	±	-	-	-	-	-	-
37	Glycogene	-	-	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
39	β Gentiobiose	+	-	-	+	-	-	-
40	D-Turanose	+	±	±	+	±	±	±
41	D-Lyxose	+	-	-	+	-	-	±
42	D-Tagatose	+	±	±	+	±	±	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
47	Gluconate	+	±	±	+	±	±	±
48	2 keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-
49	5 keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	±
Identification results	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Lactobacillus s brevis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	

없었으며, 그 특성에 따라 6가지 형태로 나누어 115명의 산모로부터 36개균의 유산균들을 분리하였다. 분리된 유산균은 modified BCP broth를 사용하여 혐기적 상태에서 배양한 결과 모든 분리유산균이 잘 생육하였다. 따라서 분리된 유산균 중 *Bifidobacterium* 균주의 확인을 위해 F6PPK 시험을 한 결과 모두 음성으로 나타나 모유 유산균중 *Bifidobacterium*은 분리 및 확인할 수 없었다. 분리된 유산균을 동정하기 위하여 *Bergey's Manual* 및 API system을 사용하여 균체의 생리적 및 생화학적 시험을 실시한 결과, 총 7개 유산균종으로 분포하고 있었으며 *Lactobacillus brevis* 균주가 전체 유산균중 50.9% (4.72×10^4 cfu/mL)로서 가장 많이 존재하고 있는 것으로 나타났다. 그 다음으로 *Lactobacillus curvatus* 균주가 25.4% (2.35×10^4 cfu/mL)로 존재하고 있었으며, 그 밖에 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus* 등 85.1% (7.89×10^4 cfu/mL)가 간균으로 분포하고 있었다. 또한, 구균으로는 *Leuconostoc lactis*가 7.1% (6.63×10^3 cfu/mL), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*가 5.2% (4.87×10^3 cfu/mL) 등 총 14.9% (1.39×10^4 cfu/mL)가 구균으로 동정되었다.

이와 같은 결과는 Goh(1983)가 모유중에 유산균 수를 측정 한 결과 9.6×10^3 cfu/mL 검출되었다고 보고한 것과 유산균수로는 유사하게 존재하였으나, 모유의 유산균중 bifidobacterium이 가장 우점하고 있었다고 보고한 것과는 상이하게 나타났으며, 이것은 모유 중 유산균의 유래가 유두부위에 존재하고 유방 내에는 무균상태로 있기 때문에 bifidobacterium과 같은 혐기성 유산균이 유두부위와 같이 노출된 부위에서는 생육하기가 어려운데서 기인된 것으로 생각된다.

요 약

한국인 모유중 미생물을 분리 및 동정하여 미생물의 분포를 파악함으로써 영·유아의 건강에 대한 안정성을 확보하고자 하였다. 건강한 한국인 149명의 산모로부터 비유기간을 고려하여 유즙기에 의한 수집과 손에 의한 수집방법에 따라 모유를 나누어 미생물의 동정을 실시하였다.

유즙기로 수집한 경우 일반세균수는 평균 2.33×10^4 cfu/mL 이고, 손으로 착유시는 평균 7.83×10^3 cfu/mL로서 유즙기를 이용하여 착유한 경우 평균 $9.80 \times 10^2 \sim 3.06 \times 10^4$ cfu/mL 많이 존재하였으며, 대장균군 또한 유즙기를 이용하여 착유할 경우 평균 $9.36 \times 10^3 \sim 8.57 \times 10^4$ cfu/mL 많이 존재하는 것으로 나타났다. 반면에 유산균수는 평균 $8.63 \times 10^2 \sim 7.64 \times 10^4$ cfu/mL로서 기계착유와 손착유 방법에 따른 차이점이 없었다.

일반세균의 동정은 산모로부터 수집된 모유를 Standard plate count agar를 이용하여 콜로니의 형태학적 특성에 따라

5가지 형태로 나누어 100개균으로 분리하였으며, Microbial Identification System(MIDI)을 이용하여 일반세균군을 동정한 결과, 총 13개 균종으로 분포하고 있었으며, 그 중 *Staphylococcus*속이 7가지의 아종으로 전체 일반세균의 81% (1.07×10^4 cfu/mL)로서 가장 많이 존재하고 있는 것으로 나타났다. 그 밖에 *Micrococcus*속, *Bacillus*속, *Providencia*속, *Pseudomonas*속, *Yersinia*속 및 *Acinetobacter*속이 각각 1종씩 검출되었다.

유산균의 동정은 BCP agar를 이용하여 콜로니의 형태학적 특성에 따라 6가지 형태로 나누어 36개균의 유산균을 분리하였다. 그리고 *Bergey's Manual* 및 API 50CH system을 이용하여 생리적 및 생화학적 동정을 실시한 결과, 총 7개 균종으로 분포하고 있었으며, *Lactobacillus brevis* 균주가 전체 유산균중 50.9% (4.72×10^4 cfu/mL)로서 가장 많이 존재하고 있는 것으로 나타났다. 그 밖에 *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus* 등 85.1% (7.89×10^4 cfu/mL)가 간균으로 분포하고 있었으며 구균으로는 *Leuconostoc lactis*와 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*가 총 14.9% (1.39×10^4 cfu/mL)분포하고 있는 것으로 동정되었다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 중부대학교 교내연구개발비 지원에 의해 수행한 연구결과로서 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Balmer, S. E. and Wharton, B. A. (1989) Diet and faecal flora in the newborn : Breast milk and infant formula. *Archiv. Dis. Child* **64**, 1672-1677.
- Bezirtzoglou, E. (1997) The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* **3**, 173-177.
- Carlsson, J. and Gothefors, L. (1975) Transmission of *Lactobacillus jensenii* and *Lactobacillus acidophilus* from mother to child at a time of delivery. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 124-128.
- Choe, H. G., Son, W. G., and Kang, K. J. (1991) Characterization and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from patient and healthy human. *Kor. J. Food Hygiene* **6**(2), 89-93.
- Choi, M. H., Moon, S. J., and Ahn, H. S. (1991) An ecological study of changes in the components of human milk during the breast feeding and the relationships between

- the dietary behavior of lactating women and the growth of breast-fed infants. *Kor. J. Nutrition*. **24**(2), 77-86.
6. Elek, S. D. and Levy, E. (1950) Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic Staphyococci. *J. Path. Bact.* **62**, pp. 541.
 7. Eugenia, B. (1997) The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. **3**, 173-177.
 8. Ferris, A. M. and Jensen, R. G. (1984) Lipid in human milk: a review 1. : sampling, determination, and content. *J. Pediatr. Gastroentrol Nutr.* **3**, 108-122.
 9. Fitzgerald, J. F. (1977) Colonization of the gastrointestinal tract. Mead Johnson Symposium on Perinatal & Developmental Medicine. **11**, 35-38.
 10. Gaull, G. E., Jensen, R. G., Rassin, D. K., and Malloy, M. H. (1982) Human milk as food. *Advances Perinatal Med.* **2**, 47-120.
 11. Goh, J. S. (1983) The Study of lactic acid bacteria from Korean milk. *Bachelor thesis*, Sookmyoung Womens Univ., Seoul, Korea. pp. 1-20.
 12. Haenel, H. (1970) Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**(11), 1433-1439.
 13. Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976) Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
 14. Heyworth, B. and Brown, J. (1975) Jejunal microflora in malnourished Gambian children. *Arch. Dis. Child* **50**, 27-33.
 15. Jin, H. S., Lee, K. J., and Moon, S. J. (1999) Relations between the microfloral composition and the environmental factors. *The Korean Nutrition Society* **32**(1), 64-74.
 16. Kim, S. H., Sung, H. J., Shin, Y. S., Kim, D. H., and Lee, K. S. (1994) Inhibitory effect of lactic acid bacteria and its metabolites on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**(5), 644-648.
 17. Kononen, E., Vaisanen, M. L., Finegold, S. M., Heine, R., and Jousimies-Somer, H. (1996) Cellular fatty acid analysis and enzyme profiles of porphyromonas catoniae - a frequent colonizer of the oral cavity in children. *Anaerobe* **2**, 329-335.
 18. Lewis. A. B., Peter. R. D., Horner. A., Platon. J. C., Buford, L. N. Walker, W. A., and Calvin, W. W. (1980) Human milk banking. *Pediatrics* **64**, 854-857.
 19. Magaret, T. H. D. and Elmer, H. M. (1989) *Staphylococcus aureus*: Production of extracelular compounds and behavior in foods-A review. *J. Food Protec.*, **52**, pp. 267.
 20. Moon, S. J., Lee, K. J., and Jin, H. S. (1998) Composition of the gastrointestinal microflora in Korean breast-fed and formula-fed newborn infants. *The Korean Nutrition Society* **31**(1), 80-87.
 21. Moore, L. V. H., Bourne, D. M., and Moore, W. E. C. (1994) Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic gram-negative bacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 338-347.
 22. Moreau, M. C., Thomasson, M., Ducluzeau, R., and Raibaud, P. (1986) Kinetics of establishment of digestive microflora in the human newborn infant as a function of the kind of milk(French). *Reprod. Nutr. Develop.* **26**, 745-753.
 23. Nikodemusz, I. (1986) Microflora in human milk samples. *Nahrung*. **30**, 901-906.
 24. Salles, R. K. and Goulart, R. (1997) Diagnosis of hygienic-sanitary and microbiological conditions of hospital human milk banks. *Rev. Saude Publica*. **31**, 131-139.
 25. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins Company, Baltimore.
 26. So, M. H., Kim, S. H., Oh, H. J., and Park, S. Y. (1994) Identification of lactic acid bacteria isolated from gel-type yoghurt in Korea and cell count by species. *Kor. J. Food Sci. Resour.* **14**, 204-210.
 27. Tannock, G. W., Fuller, R., Smith, S. L., and Hall, M. A. (1990) Plasmid prophiling of members of the family enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1225-1228.
 28. Wharton, B. A., Balmer, S. E., and Scott, P. H. (1994) Faecal flora in the newborn - Effect of lactoferrin and related nutrients. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357**, 91-98.