

ARTICLE

국내 수유부로부터 수집한 모유의 항산화 및 항용혈 효과

이정은¹, 이은지¹, 국무창^{2,*}

¹경기대학교 대체의학과, ²배화여자대학교 식품영양학과

Antioxidant and Anti-Hemolytic Effects of Human Breast Milk from Koreans

Jeong-Eun Lee¹, Eun-Ji Yi¹, Moochang Kook^{2,*}

¹Department of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 03746, Korea

²Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea

Received: November 18, 2022

Revised: December 16, 2022

Accepted: December 16, 2022

*Corresponding author :

Moochang Kook

Department of Food & Nutrition,

Baewha Women's University,

Seoul 03039, Korea

Tel : +82-2-399-0765

E-mail : bmse153@gmail.com

Copyright © 2022 Resources Science Research Institute, Kongju National University. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Jeong-Eun Lee

<https://orcid.org/0000-0002-7442-7045>

Eun-Ji Yi

<https://orcid.org/0000-0002-1346-415X>

Moochang Kook

<https://orcid.org/0000-0003-4098-8298>

Abstract

To confirm the antioxidant and anti-hemolytic activity in human breast milk (HBM), evaluated DPPH radical scavenging and anti-hemolytic activities against hemolytic strains. As a result of measuring the pH of HBM according to the days after childbirth, the pH of the HBM less than 10 days after childbirth was 6.63 ± 0.26 , the longer the lactation period, the lower the pH of breast milk. As a result of measuring the pH of HBM according to the days after childbirth, the pH of HBM less than 10 days after childbirth was 6.63 ± 0.26 and over 30 days after childbirth was 6.45 ± 0.15 . These results indicated that the pH of HBM decreases as the days after childbirth increases. In contrast DPPH radical scavenging activity was the highest in HBM of over 30 days after childbirth ($63.72 \pm 12.24\%$), that is presumed to be due to the fatty acid content in HBM. As a result of confirming hemolysis of HBM, weak hemolysis was observed in some HBM samples, that are caused to be hemolysis by bacteria produced the hemolysin in HBM. Therefore, result of analyzing the anti-hemolytic effect of HBM against the hemolytic bacteria, the effect of breast milk against the gram-positive *S. aureus* CCARM 3855 was $66.37 \pm 21.36\%$, gram-negative *P. aeruginosa* CCARM 0223 was $29.74 \pm 9.31\%$. In addition, HBM samples of the less than 10 days after childbirth showed highest each anti-hemolytic activity against hemolytic strain. Thus, this study can be suggested that it will be basic study for preventing hemolytic disease in newborns.

Keywords

Human breast milk, Antioxidant effect, Anti-hemolytic activity

1. 서론

모유(breast milk)는 신생아가 생후 6개월 또는 1년까지 섭취하는 영양공급원으로(Jang *et al.*, 2016), 아기의 적절한 성장과 발육을 위해 필요한 균형 있는 영양을 공급할 뿐만 아니라 필수 영양소, 효소, 호르몬과 같은 생리활성 인자(bioactive factors)를 함유하고 있어 생후 6개월간 아기에게 필요한 영양분을 모두 충족시킬 수 있다(Kang, 1999; Kim, 2010a). 또한 신생아의 면역과 관련된 수많은 면역학적 및 생화학적 성분과 세포성분을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다(Witkowska and Kaminska, 2017).

모유는 수분 약 87-88%, 탄수화물 7%, 단백질 1%, 지방 3.8%로 구성되어 있으며(Kim and Yi, 2020), 특히 모유의 단백질은 우유와 다르게 유청단백(whey)이 casein보다 높은 비율을 보이며, 총 단백질량의 60% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있다(Sung, 2000). 모유 유청단백의 주성분은 락토페린(lactoferrin), 면역글로불린(sIgA), 혈청 알부민으로 감염방지, 면역기능, 성장촉진 및 세포활성 촉진 등의 효능이 있으며(Choi *et al.*, 2015; Kim, 2010b), 그 중 락토페린은 면역력이 완전히 생성되지

않은 영아의 몸에 세균이 침투했을 때, 세균의 철 이용을 방해하여 세균의 발육을 억제하는 작용을 통해 장내 면역 환경을 구성한다(Rhim et al., 2002). 또한 모유지질은 성장 및 발달에 필수적인 복합 지질 및 지방산 등을 제공하고, 일반적인 우유에 비하여 지질구성과 지방산 조성이 더 유익한 것으로 나타났다(He et al., 2021). 이외에도 모유의 항균 활성, 모유의 항산화 효능, 신생아 황달 예방 및 빈혈 예방 효과 등 다양한 이점에 대해 연구된 바 있다(Jeong and Kang, 2016; Kim et al., 1995; Noh et al., 2008; Shin, 2000).

한편, 신생아에게 나타나는 질환에는 신생아 뇌실내 출혈, 황달, 용혈성 빈혈, 패혈증 등이 있다(An et al., 2013; Jang, 1998; Jin et al., 2005; Kwon et al., 2003; Lee, 2002; Park and Shin, 1988). 신생아의 뇌실내 출혈은 주로 미숙아에게서 흔히 발생할 수 있으며 약 15%의 유병률을 보이는 것으로 보고되었다(Jin et al., 2005). 또한 신생아 황달의 주요한 원인은 적혈구의 파괴로 인한 빌리루빈 생성, 골수에서 일어나는 비정상적인 적혈구 조혈(hematopoiesis)과 간에서 생기는 조직 내 heme 및 heme 단백질의 변환에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다(Jeong and Kang, 2016; Lee, 2006). 신생아에게서 나타나는 질환 중 사망률의 주요 원인이 되는 패혈증은 감염성 질환으로 그 원인균에는 group A β -hemolytic *Streptococcus* spp., group B *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *S. epidermidis*, methicillin resistant *S. aureus*(MRSA) 등이 중요한 원인균으로 부각되었다(Belachew and Tewabe, 2020; Jang, 1998). 이러한 원인균은 용혈을 유발할 수 있으며, 신생아 패혈증은 황달증상을 동반하는데 고빌리루빈혈증을 동반하는 신생아의 경우 용혈에 의한 것으로 추측된다(Christensen et al., 2014a; Christensen et al., 2014b; Eickhoff et al., 1964; G/eyesus et al., 2017).

따라서, 본 연구에서는 출산 6개월 이내의 건강한 산모로부터 모유를 수집하여 분만형태, 산모의 연령, 출산경과일 및 재태수주에 따라 모유의 일반적 특성과 항산화 효능 및 용혈을 일으키는 균주에 대한 모유의 항용혈 효과를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

모유 시료의 수집 및 보관

본 연구는 연구윤리심의위원회(institutional review board, IRB)의 승인을 받아 진행되었다(KGU-20191018-HR-046-04). 모유시료는 2020년 2월부터 2021년 2월에 수집되었으며, 모유 수집 대상자는 재태수주 36-40주 사이에 출산한 산후 6개월 이내의 만 20-40세 여성으로 고위험군 임신부에 해당된 이력이 없는 건강한 수유부를 대상으로 선정하였다. 모유는 1일 1회, 50 mL 이상 착유하여 멸균된 tube에 수집하였고, 수집한 모유는 분만형태, 출산경과일, 산모의 연령 및 재태수주로 분류하였다(Table 1). 수집한 모유는 -70°C에서 냉동보관 후, 연구 시 1 mL씩 무균적으로 소분하여 사용하였으며, 연구 종료 후 남은 모유시료는 폐기하였다.

모유의 pH 및 건조중량 측정

모유의 pH 측정은 pH meter(ORION STAR A211, Thermo SCIENTIFIC, Indonesia)를 이용하여 측정하였고, 모유의 건조중량은 Kim 등(2007)의 방법을 참고하여 모유 시료를 각각 1 mL씩 취해 105°C에서 가열하여 수분을 증발시킨 후, 건조중량을 측정하여 고형분 함량(%)으로 나타내었다.

모유의 DPPH Radical 소거능 측정

모유의 DPPH radical 소거능은 Blois(1958)의 방법을 참고하여 측정하였다. 대조군으로 0.1%(w/v) vitamin C를 사용하였으며, ethanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH solution 500 μ L에 모유시료 100 μ L를 혼합하여 30분간 암반응 후, UV/VIS-spectrophotometer(BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 520 nm

Table 1. The list of the collected human breast milk

No.	Delivery type	Collected year	Age	Days after childbirth (days)	Gestation period (wks)
V1	Vaginal birth	2020	30~35	13	40
V2			25~30	25	38
V3			30~35	27	39
V4			25~30	4	39
V5			25~30	7	39
V6		2021	20~25	5	38
V7			30~35	10	40
V8			25~30	13	40
V9			20~25	7	38
V10			30~35	9	39
V11			30~35	12	39
C1	Cesarean section	2020	30	108	40
C2			30~35	66	38
C3			30~35	15	38
C4			25~30	72	39
C5			35~40	109	38
C6			25~30	13	38
C7			30~35	107	40
C8			35~40	10	38
C9			30~35	94	37
C10			25~30	14	40
C11			35~40	12	38
C12		2021	25~30	12	39
C13			25~30	10	37
C14			25~30	8	39
C15			35~40	9	37
C16			25~30	14	36
C17			35~40	15	39
C18			20~25	10	38

에서 O.D.를 측정하였다. 소거능 값은 시료 첨가군(A)과 시료를 첨가하지 않은 blank군(A₀)간의 흡광도 비(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging(\%)} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

모유의 용혈성 확인

모유의 용혈성을 확인하기 위해 blood agar base(Kisan Bio Co., Seoul, Korea)에 5% defibrinated sheep blood(Kisan Bio Co., Seoul, Korea)를 첨가한 blood agar plate에 모유시료와 대조군으로 hemolysin을 생성하는 박테리아 *S. aureus* CCARM 3855, *P. aeruginosa* CCARM 0223을 희석도말하여 37°C에서 48시간 반응시킨 후, Argyri 등(2013)의 방법에 따라 용혈성을 확인하였다.

모유의 항용혈 효능 측정

모유의 항용혈 효능은 Bezerra 등(2020)의 방법을 참고하여 측정하였다. 모유시료는 각각 0°C에서 5분간 원심분리(20,000 × g) 하여 0.45 μm filter(SM13P045SL, Hyundai micro Co., Seoul, Korea)로 여과하여 실험에 사용하였으며, hemolysin을 생성하는 박테리아 *S. aureus* CCARM 3855와 *P. aeruginosa* CCARM 0223은 각각 Tryptone Soy Broth(TSB, Difco)에 2%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 5분간 원심분리(20,000 × g)하여 0.2 μm filter(Hyundai micro Co.)로 여과하여 hemolysin을 포함하는 배양액을 실험에 사용하였다. 항용혈 효능을 측정하기 위해, 0.1 M Phosphate Buffered Saline(PBS, pH 7.0) 775 μL에 defibrinated sheep blood(Kisan Bio Co.) 25 μL와 hemolysin을 포함하는 배양액과 모유시료를 각각 100 μL 씩 첨가하여 혼합 후, 37°C에서 24시간 반응시켰다. 이후 5분간 원심분리(20,000 × g) 하여 상등액을 취해 UV/VIS-spectrophotometer(BioTek)를 이용하여 543 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 모유시료 첨가군(A₀), 음성대조군(blank, A), 양성대조군(B) 간의 흡광도 비(%)를 계산하여 항용혈 효능을 비교하였다.

$$\text{Anti-hemolytic activity(\%)} = 100 - \left[\frac{(A_0 - A)}{B} \times 100 \right]$$

통계분석

본 연구에서는 모든 실험을 3회 이상 반복 수행하였으며, 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver. 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계분석하였다. 각 실험군에 대한 분석은 분산분석(ANOVA)을 실시하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검토하였고, 시료들의 특성에 대한 유의적인 차이는 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

수집된 모유의 일반적인 특성

본 연구에서는 인체 유래물 제공 대상자가 직접 작성한 설문지를 바탕으로 분만형태, 수집연도, 대상자의 연령, 출산경과일, 재태주수 등 모유시료의 일반적인 특성을 확인하였다(Table 2). 수집된 모유시료는 총 29개로 자연분만 및 제왕절개한 모체로부터 수집된 모유시료는 각각 11개(37.93%), 18개(62.07%)였다. 2020년도에 수집된 모유시료의 경우 자연분만은 5개(45.45%), 제왕절개는 6개(54.55%)였으며, 2021년도에 수집된 모유시료는 자연분만 11개(61.11%), 제왕절개 7개(38.89%)였다.

대상자의 연령 분포에 따라 분류한 결과, 25-30세에 해당되는 모유시료가 11개(37.93%)로 가장 많았고, 다음으로는 30-35세가 10개(34.48%), 35-40세가 5개(17.24%), 20-25세가 3개(10.34%) 순이었다.

출산경과일에 따라 분류하였을 때, 10일에서 30일 미만인 모유시료가 16개(55.17%)로 가장 많았고, 10일 미만은 7개(24.15%), 30일 이상에 해당되는 모유시료는 6개(20.69%)였다. 재태주수는 총 29개 모유시료 중 임신기간이 34주에서 36주인 후기조산(late preterm)에 해당하는 모유시료 1개를 제외하고 모두 37주 이상 완전주에 해당되었다.

모유의 pH와 건조중량

모유가 산성화(acidification)될 경우 모유 내 세포 및 영양성분의 변화를 발생시킬 수 있으며, Erickson 등(2012)의 연구에 의하면, 산성화된 모유에서 백혈구 및 총 단백질 함량이 감소됨을 보고한 바 있어 모유의 산성화 정도는 모유의 신선도를 판단하는데 중요한 지표가 된다. 따라서 본 연구에서 수집한 모유의 신선도를 판단하기 위하여 분만형태, 대상자의 연령, 출산경과일, 재태주수에 따른 모유의 pH 및 건조중량의 차이를 분석하였다(Table 3).

Table 2. General characteristics of the collected human breast milk

Characteristics	Delivery type N (%)		Total N (%)
	Vaginal birth	Cesarean section	
Collected year			
2020	5 (45.45)	11 (61.11)	16 (55.17)
2021	6 (54.55)	7 (38.89)	13 (44.83)
Age			
20-25	2 (18.18)	1 (5.56)	3 (10.34)
25-30	4 (36.36)	7 (38.89)	11 (37.93)
30-35	5 (45.45)	5 (27.78)	10 (34.48)
35-40	0	5 (27.78)	5 (17.24)
Lactation stage			
Less than 10 days	5 (45.45)	2 (11.11)	7 (24.14)
10-30 days	6 (54.55)	10 (55.56)	16 (55.17)
More than 30 days	0	6 (33.33)	6 (20.69)
Gestation period			
less than 37 weeks	0	1 (5.56)	1 (3.45)
37 weeks or more	11 (100.00)	17 (94.44)	28 (96.55)
Total (N)	11 (100.00)	18 (100.0)	29 (100.00)

Table 3. pH and solid content rate of the collected human breast milk

Characteristics	pH	Solid content rate (%)	Total (N)
Delivery type			
Vaginal birth	6.64±0.38	11.27±0.78	11
Cesarean section	6.48±0.19	11.33±0.80	18
Age			
20-25	6.56±0.32	11.12±0.32	3
25-30	6.56±0.34	11.58±0.73	11
30-35	6.56±0.26	11.11±0.90	10
35-40	6.44±0.25	11.19±0.86	5
Lactation stage			
Less than 10 days	6.63±0.26	11.72±0.69	7
10-30 days	6.53±0.33	11.09±0.67	16
More than 30 days	6.45±0.15	11.40±1.05	6
Gestation period			
Less than 37 weeks	6.50	10.70	1
37 weeks or more	6.54±0.29	11.33±0.79	28

Data are expressed the mean ± SD of milk samples of mothers who followed the delivery type, ages, lactation stages and gestation period.

분만형태별 자연분만과 제왕절개 모유시료의 pH를 측정된 결과, 자연분만 모유 시료는 pH 6.64 ± 0.38 , 제왕절개 모유 시료는 pH 6.48 ± 0.19 로 제왕절개에 해당되는 모유 시료의 pH가 낮았으나 두 그룹간 pH의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

대상자의 연령이 35-40세에 해당되는 모유 시료의 pH는 6.44 ± 0.25 로 다른 연령대에 해당되는 모유 시료보다 낮았으나 연령 간 모유의 pH에 대한 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

또한 출산경과일이 10일 미만에 해당되는 모유 시료의 pH는 6.63 ± 0.26 , 10일 이상 30일 미만의 모유 시료는 6.53 ± 0.33 , 30일 이상의 모유 시료는 6.45 ± 0.15 로 나타나, 출산경과일이 오래될수록 모유의 pH가 낮아졌으나 각 그룹간 pH의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

재태주수가 37주 미만의 모유 시료의 pH는 6.50, 완전주에 해당되는 모유 시료의 pH는 6.54 ± 0.29 로 나타나 37주 미만의 모유 시료의 pH가 낮았으나 각 그룹간 pH의 유의적 차이는 없었다($p > 0.05$).

일반적으로 모유의 pH는 6.8-7.3으로 알려져 있다(Kim, 2010a). Erickson 등(2013)의 연구에서 측정된 모유의 pH 또한 6.8 ± 0.1 로 보고되었으나 본 연구에서 수집된 모유의 pH는 다소 낮게 측정되었다. 이러한 결과는 Hung 등(2018)이 보고한 바와 같이, 냉동과정에 의해 우유 지질의 결정화로 인한 지방구 막(fat globule membrane)이 손상되어 우유의 지방분해가 일어나 유리지방산 함량이 높아짐에 의한 것으로 추측해볼 수 있다. 또한 Hung 등(2018)의 연구에서 모유의 acid value는 보관기간이 길어질수록 높아지고, 유리지방산의 함량 또한 증가함을 보고하였으며, Floris 등(2020)은 수유기간이 길어짐에 따라 모유 내 지방산 함량이 증가함을 보고한 바 있어 본 연구에서 수집한 모유의 pH 변화는 모유 내 지방산에 의한 것으로 추정할 수 있다.

수집된 모유의 건조중량 측정결과, 자연분만 모유의 경우 $11.27 \pm 0.78\%$, 제왕절개 모유의 경우 $11.33 \pm 0.80\%$ 로 제왕절개 모유에서 더 높게 나타났으나 두 그룹간 건조중량의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 대상자의 연령별로는 25-30세에 해당되는 모유시료의 건조중량이 $11.58 \pm 0.73\%$ 로 가장 높았으며, 35-40세가 $11.19 \pm 0.86\%$, 20-25세가 $11.12 \pm 0.32\%$, 30-35세가 $11.11 \pm 0.90\%$ 순으로 나타났으나 대상자의 연령별 건조중량의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 출산경과일로 분류한 결과, 10일 미만인 모유시료가 $11.72 \pm 0.69\%$ 로 가장 높았으며, 다음으로 60일 이상 100일 미만인 $11.52 \pm 1.48\%$, 100일 이상이 $11.29 \pm 0.72\%$, 10일 이상 60일 미만인 $11.09 \pm 0.67\%$ 순으로 나타났으나 출산경과일 별 건조중량의 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). Lee(1988)의 연구에 의하면 모유의 총 고형분 함량이 12%인 것으로 보고하였는데, 이는 본 연구결과와 유사하였다.

모유의 DPPH Radical 소거능

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 과도한 생성은 뇌실 주위 백혈병, 심실내 출혈, 기관지 폐 이상형증, 미숙아 망막병증, 괴사성 장염 등과 같은 신생아 질환과 관련이 있으며, 감염 및 염증반응과 관련된 대식세포 및 호중구 활성화에 의해 방출된다(Trindade and Rugolo, 2007). 출생 후 신생아가 섭취하는 모유에는 vitamin A, C, E, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Seo, 2010; Xavier et al., 2011). 따라서 신생아의 경우, 출생 후 면역 및 항산화에 필요한 모유를 섭취하는 것이 권장되므로 본 연구는 출산경과일에 따른 모유의 항산화 효능에 대한 차이를 분석하기 위해 수행되었다.

출산경과일 별 모유의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군인 0.1% vitamin C의 DPPH radical 소거능은 $96.65 \pm 0.52\%$, 수집한 모유에서는 출산경과일이 30일 이상인 모유가 $63.72 \pm 12.24\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 다음으로는 10일 이상 30일 미만 모유가 $60.51 \pm 11.10\%$, 10일 미만의 모유가 $57.27 \pm 4.00\%$ 로 나타났으나 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

Ramiro-Cortijo 등(2020)에 의하면 포화지방산 함량이 초유보다 성숙유에서 더 높은 것으로 보고되었다. 또한 기간이 오래될수록 포화지방산인 palmitic acid(C16:0), capric acid(C10:0), lauric acid(C12:0), myristic acid(C14:0)와 불포화지방산인 linoleic acid(C18:2n-6), α -linolenic acid(C18:3n-3)의 함량과 비율

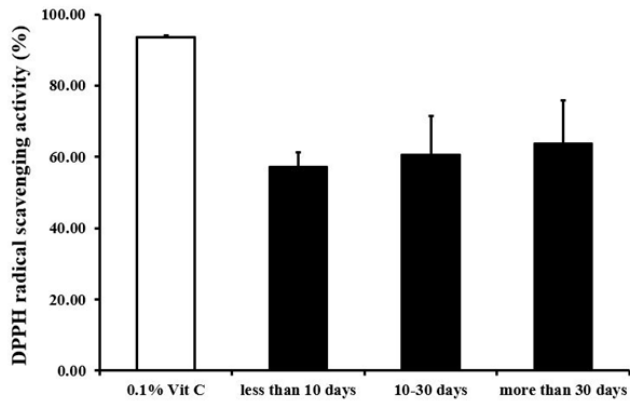


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of human breast milk according to the lactation stage. □ ; 0.1% vitamin C, ■ ; human breast milk samples. Data are expressed the mean±SD of human breast milk samples of mothers who followed the lactation stages. No statistical difference among groups was found by one-way ANOVA coupled with Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

이 크게 증가하거나 안정적으로 유지되며, arachidonic acid(C20:4n-6)와 docosahexaenoic acid(DHA, C22:6n-3), eicosapentaenoic acid(EPA, C20:5n-3)의 감소됨이 보고된 바 있다(Bobiński and Bobińska, 2020; Floris *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021). 포화지방산의 탄소사슬 수에 비례하여 DPPH radical 소거 능력이 높아지는 Han 등(2008)의 연구결과와 비교해볼 때, 본 연구에서 측정된 모유의 DPPH radical 소거능 결과는 모유 내 지방산 함량에 의한 것으로 추측된다.

모유의 용혈성 확인

건강한 여성의 모유에는 세균이 존재하고, 산모의 유선관을 통해 외부로부터 미생물이 유입되거나, entero-mammary pathway를 통해 소화관에 의해 기인하여 모유 내 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다(Fernández *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2015). 또한 모유의 미생물은 출산경과일, 분만 형태, 산모의 건강상태 또는 비만도, 화학적 치료 여부 등의 요인에 의해 영향을 받을 수 있다고 보고 있다(Lee and Kim 2019). 따라서 모유의 항응혈 효과를 확인하기 위해 앞서 본 연구에서는 모유의 용혈성 유무를 확인하여 비교하였다. 그 결과, 자연분만 11개 모유시료 중 8개(72.73%), 제왕절개 18개 모유시료 중 8개(44.44%)에서 약한 용혈성을 나타내는 박테리아 집락이 관찰되어, 제왕절개보다 자연분만 모유 시료에서 상대적으로 더 높은 비율의 용혈이 확인되었다(Fig. 2). 또한 용혈이 확인된 16개의 모유시

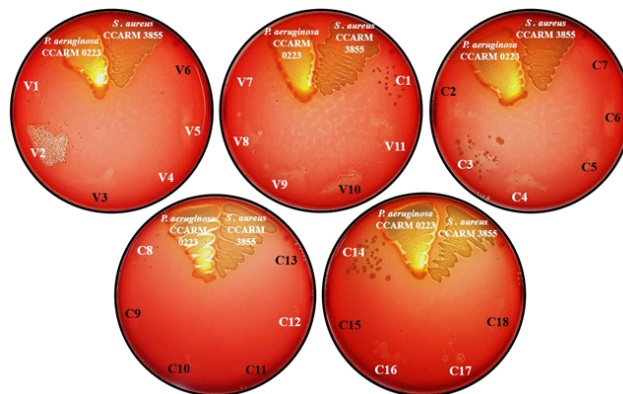


Fig. 2. Hemolysis of human breast milk samples.

료 중 출산경과일이 10일 미만인 시료는 4개(25.00%), 10일 이상 30일 미만의 시료는 10개(62.50%), 30일 이상의 시료는 2개(12.50%)로 10일 이상 30일 미만의 시료에서 가장 높은 비율로 용혈이 확인되었다.

모유에서 발견되는 가장 흔한 박테리아는 *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Enterococcus* 및 *Lactobacillus* 속 등이 있다(Jost T et al., 2013; Witkowska and Kaminska, 2017). 그 중 *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* 속은 hemolysin을 생성하여 용혈을 일으키는 것으로 보고된 바 있어(Bhakdi et al., 1988; Braïek and Smaoui, 2019; May et al., 2000; Oh et al., 2020; Schwan et al., 2003), 본 연구에서 수집된 모유의 용혈성은 이러한 균주에 의해 용혈성을 보이는 것으로 추정되며, 모유 내 미생물은 분만 형태, 출산경과일 및 약물복용 등의 화학적 치료 여부에 따라 달라질 수 있음이 보고된 바, 본 연구결과 또한 이러한 원인에 기인한 것으로 판단된다.

모유의 항용혈 효과

*S. aureus*와 *P. aeruginosa*가 분비하는 α , β -hemolysin은 감염된 동물 모델에서 중요한 독성 인자로 작용하여 여러 임상에서 독성을 강화하는 것으로 보고되었다(Bhakdi et al., 1988; May et al., 2000; Schwan et al., 2003). 따라서 박테리아가 생산하는 hemolysin에 의한 신생아의 용혈질환을 예방하기 위해, *S. aureus* CCARM 3855, *P. aeruginosa* CCARM 0223가 유발하는 용혈에 대한 모유의 억제 효과를 확인하였다.

그람 양성균인 *S. aureus* CCARM 3855에 대한 모유의 항용혈 효과가 그람 음성균인 *P. aeruginosa* CCARM 0223에 대한 항용혈 효과보다 우수하였으며, 모유의 pH가 가장 높고, 건조중량이 가장 높았던 10일 미만의 모유시료에서 모두 가장 우수한 결과를 보였다(Fig. 3).

출산경과일에 따른 모유의 항용혈 효과를 확인한 결과, *S. aureus* CCARM 3855의 경우 출산경과일이 10일 미만인 모유시료가 66.37±21.36%로 가장 높았으며, 다음으로는 30일 이상이 53.48±22.03%, 10일 이상 30일 미만이 50.42±22.13% 순으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 또한 *P. aeruginosa* CCARM 0223의 경우 10일 미만인 모유시료가 29.74±9.31%로 가장 높았으며, 다음으로는 10일 이상 30일 미만이 21.68±12.96%, 30일 이상이 21.14±7.77% 순으로 나타났으나 유의한 차이는 없었다($p>0.05$).

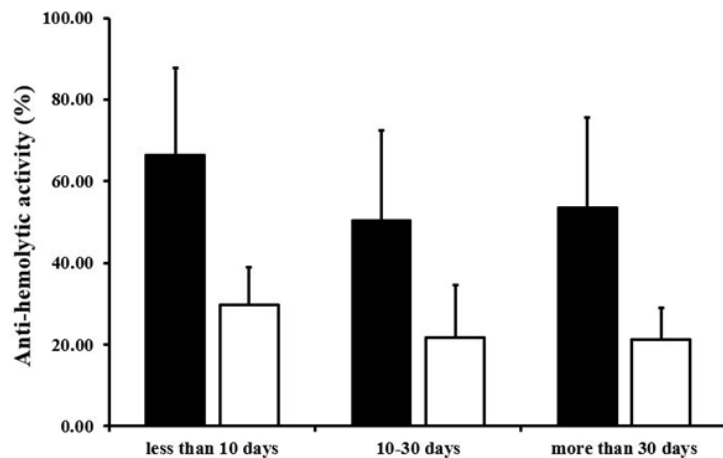


Fig 3. Anti-hemolytic activity of human breast milk according to the lactation stage against *S. aureus* CCARM 3855 and *P. aeruginosa* CCARM 0223. ■ ; *S. aureus* CCARM 3855, □ ; *P. aeruginosa* CCARM 0223. Data are expressed the mean±SD of human breast milk samples of mothers who followed the lactation stages. No statistical difference among groups was found by one-way ANOVA coupled with Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

모유의 항용혈 효과는 신생아의 발달, 보호, 항암, 항염증 및 항산화 등 생물학적 기능에 대해 광범위하게 연구된 모유 내 지방, 장쇄 다중 불포화지방산(long chain polyunsaturated fatty acids), 단백질 및 다양한 세포성분에 의한 것으로 추정할 수 있다(Kim and Yi, 2020; Ramiro-Cortijo *et al.*, 2020; Witkowska and Kaminska, 2017). 본 연구결과를 통해 박테리아가 유발하는 신생아의 용혈질환에 대한 모유의 예방효과가 입증되어 추후 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 신생아의 용혈질환을 예방하기 위해 출산 6개월 이내의 건강한 산모로부터 모유를 수집하여 분만형태, 산모의 연령, 출산경과일 및 재태수주에 따라 모유의 항산화 효과 및 용혈을 유발하는 박테리아에 대한 항용혈 효과를 확인하고자 하였다. 분만형태, 대상자의 연령, 출산경과일, 재태수주에 따른 모유의 pH 및 건조중량의 차이를 분석한 결과, 모유의 pH는 출산경과일이 길수록 낮아졌으며, 반대로 고형분 함량의 경우 출산경과일이 짧을수록 높게 나타났다. 반면, 모유의 항산화 효과는 출산경과일이 가장 짧은 10일 미만의 모유에서 가장 낮게 측정되었는데, 이러한 결과는 출산경과일이 경과됨에 따라 모유 내 지방산 함량이 증가하는 선행연구 결과로 유추해볼 수 있으며, 이를 뒷받침하기 위해 출산경과일 별 모유 내 지방산 함량 변화에 따른 항산화 효능에 대한 분석이 필요할 것으로 판단된다. 모유의 용혈성을 확인한 결과, 총 모유시료 29개 중 16개 모유에서 약한 용혈성을 나타내는 colony가 관찰되었는데, 이러한 결과는 hemolysin을 생성하는 모유 내 *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* 속 등의 박테리아에 의해 용혈성을 보이는 것으로 추정된다. 용혈을 유발하는 박테리아에 대한 모유의 항용혈 효과를 확인한 결과, 그람 양성균인 *S. aureus* CCARM 3855에 대한 항용혈 효과가 그람 음성균인 *P. aeruginosa* CCARM 0223에 대한 항용혈 효과보다 우수하였으며, 10일 미만의 모유시료에서 모두 가장 우수한 결과를 보였다. 모유 내 지방성분, 불포화지방산, 단백질 및 다양한 세포성분 등은 신생아의 보호, 항암, 항염증 및 항산화 등 생물학적 기능에 대해 광범위하게 연구된 바 있다. 본 연구에서는 모유의 항산화 효과와 모유 내 박테리아에 의한 용혈성이 확인되었음에도 세균성 용혈에 대한 모유의 항용혈 효과를 입증할 수 있었다. 따라서, 본 연구는 모유가 세균성 용혈에 대한 예방 및 신생아에게 나타나는 용혈질환을 예방할 수 있는 기초자료가 될 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

1. An YS, Kim MK, Lee YK, Ko SY, Yoon SY, Jung KY, Park SY, Shin SM. 2013. The effect of continuing breastfeeding during treatment of breast milk jaundice. *Korean J Perinatol* 24:259-264.
2. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas K AG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ and Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol* 33:282-291.
3. Belachew A, Tewabe T. 2020. Neonatal sepsis and its association with birth weight and gestational age among admitted neonates in Ethiopia: Systematic review and meta-analysis. *BMC Pediatrics* 20:55.
4. Bezerra Filho CM, Nascimento da Silva LC, Vanusa da Silva M, Lobner-Olesen A, Struve C, Krofelt KA, Santos Correia MTD, Vilela Oliva ML. 2020. Antimicrobial and antivirulence action of *Eugenia brejoensis* essential oil *in vitro* and *in vivo* invertebrate

- models. *Frontiers in Microbiology* 19:11-424.
5. Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, Holland IB. 1988. The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur J Epidemiol* 4:135-143.
 6. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
 7. Bobiński R, Bobińska J. 2020. Fatty acids of human milk – a review. *Int J Vitam Nutr Res* 1-12.
 8. Braiek OB, Smaoui S. 2019. *Enterococci*: Between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed Res Int* 2019:1-13.
 9. Choi YK, Kim NY, Kim JM, Cho MS, Kang BS, Kim YR. 2015. Studies of nutrient composition of transitional human milk and estimated intake of nutrients by breast-fed infants in Korean mothers. *J Nutr Health* 48:476-487.
 10. Christensen RD, Nussenzveig RH, Yaish HM, Henry E, Eggert LD, Agarwal AM. 2014b. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. *Journal of Perinatology* 34:616-619.
 11. Christensen RD, Yaish HM, Lemons RS. 2014a. Neonatal hemolytic jaundice: Morphologic features of erythrocytes that will help you diagnose the underlying condition. *Neonatology* 105:243-249.
 12. Eickhoff TC, Klein, JO, Daly AK, Ingall D, Finland M. 1964. Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic *Streptococci*. *N Engl J Med* 271:1221-1228.
 13. Erickson T, Gill G, Chan GM. 2013. The effects of acidification on human milk's cellular and nutritional content. *J Perinatol* 33:371-373.
 14. Fernández L, Langaa S, Martina V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. 2013. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 69:1-10.
 15. Floris LM, Stahl B, Abrahamse-Berkeveld M, Teller IC. 2020. Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 102023.
 16. Geyesus T, Moges F, Eshetie S, Yeshitela B, Abate E. 2017. Bacterial etiologic agents causing neonatal sepsis and associated risk factors in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatrics* 17:137.
 17. Han DS, Park YK, Kim HJ, Lee JS, Baek SH. 2008. Anticancer and antioxidant effects of saturated fatty acid against skin cancer cell lines. *Kor J Oriental Preventive Medical Society* 12:47-58.
 18. He G, Li G, Jiang Y, Hua J, Chu X, Xiong L, Gong J, Xiao G, Ye X. 2021. Macronutrient content and fatty acid composition and their positional distribution in human breast milk from Zhejiang province, China in different lactation periods. *Food Sci Nutr* 00:1-16.
 19. Hung HY, Hsu YY, Su PF, Chang YJ. 2018. Variations in the rancid-flavor compounds of human breastmilk under general frozen-storage conditions. *BMC Pediatrics* 18: 94.
 20. Jang HL, Cho JY, Kim MJ, Kim EJ, Park EY, Park SA, Kim IY, Choi YS, Bae CW, Chung SH. 2016. The experience of human milk banking for 8 years: Korean perspective. *J Korean Med Sci* 31:1775-1783.

21. Jang SH. Neonatal sepsis. 1998. PIV 5:197-205.
22. Jeong MJ, Kang KW. 2016. A review of the treatment to prevent neonatal jaundice - Based on traditional Chinese medicine. J Pediatr Korean Med 30:99-110.
23. Jin HS, Park KA, Goo HW, Yoon JH, Kim AR, Kim KS, Pi SY. 2005. Intrauterine intraventricular hemorrhage in premature infants. Korean J Pediatr 48:27-33.
24. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2015. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. Nutr Rev 73:426-437.
25. Kang NM. 1999. Primiparous couples' knowledge, attitude and practice regarding breastfeeding. Korean J Women Health Nurs 5:379-388.
26. Kim AR. 2010a. Drugs and breastfeeding. Hanyang Medical Reviews 30:41-48.
27. Kim HK, Hwang SY, Yoon SB, Chun DS, Kong SK, Kang KO. 2007. A study of the characteristics of different coffee beans by roasting and extracting condition. J Korean Soc Food Sci Nutr 20:14-19.
28. Kim JS, Shim KH, Kim MS, Kim KW, Lee KY, Chung HY. 1995. Study on the antioxidative activity of human milk. J Korean Soc Food Sci Nutr 24:651-657.
29. Kim MJ. 2010b. Nutrition in breastfeeding: Infants and nursing mothers. Hanyang Medical Reviews 30:31-40.
30. Kim SY, Yi DY. 2020. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. Clin Exp Pediatr 63:301-309.
31. Kwon HS, Kang JC, Won SC, Oh SH, Lyu CJ. 2003. A clinical study on childhood hemolytic anemia according to etiological classification. J Korean Pediatr Soc 46:883-888.
32. Lee JE, Kim GB. 2019. Human milk microbiota : A review. J Milk Sci Biotechnol 37:15-26.
33. Lee JS. 1988. Changes in specific gravity, total solid and protein contents of human milk during the course of lactation in Korean women. Korean J Nutr 21:129-133.
34. Lee SL. 2006. Neonatal jaundice. Korean J Pediatr 49:6-13.
35. Lee WR. 2002. Neonatal sepsis. Korean J Pediatr 45:289-294.
36. May AK, Gleason TG, Sawyer RG, Pruett TL. 2000. Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. Infect Immun 1:176-86.
37. Noh SJ, Na BM, Kim MJ. 2008. Iron deficiency and early, low-dose iron supplementation in breast-fed infants. Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr 11:169-178.
38. Oh YM, Kong HR, Jeong DW, Lee JH. 2020. Technological characteristics and safety of *Enterococcus faecium* isolates from Meju, a traditional Korean fermented soybean food. Microbiol Biotechnol Lett 49:255-263.
39. Park JH, Shin SM. 1998. A clinical observation on 55 cases of neonatal sepsis. The Yeungnam Univ Med J 5:161-169.
40. Ramiro-Cortijo D, Singh P, Liu Y, Medina-Morales E, Yakah W, Freedman SD, Martin CR. 2020. Breast milk lipids and fatty acids in regulating neonatal intestinal development and protecting against intestinal injury. Nutrients 12:534.
41. Rhim SL, Lee JH, Lee HY, Suh SC. 2002. Development strategy for functional rice improved with human lactoferrin and enhancement of nutrient compounds. Korean J

- Crop Sci 48-50.
42. Schwan WR, Langhorne MH, Ritchie HD, Stover CK. 2003. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus* agr mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 38:23-28.
 43. Seo JW. 2010. Nutrients and bioactive factors in breastmilk. *Hanyang Medical Reviews* 30:8-16.
 44. Shin YH. 2000. Nutritional and immunological characteristics of breast milk. *Korean Parent Child Health J* 3:94-107.
 45. Sung MH. 2000. Nurse's knowledge to breast-feeding and nursing activities related to breast-feeding. *Korean J Women Health Nurs* 6:258-268.
 46. Trindade CEP, Rugolo LMSS. 2007. Free radicals and neonatal diseases. *Neo Reviews* 8:e522-e532.
 47. Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. 2017. Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters* 22:11.
 48. Xavier AM, Rai K, Hegde AM. 2011. Total antioxidant concentrations of breastmilk-an eye-opener to the negligent. *J Health Popul Nutr* 29:605-611.