



## ARTICLE

# 유당분해 우유를 이용한 고령자용 요구르트 배양

오세종<sup>1</sup> · 김범근<sup>2</sup> · 천용기<sup>2</sup> · 박동준<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 동물자원학부, <sup>2</sup>한국식품연구원

## Fermentation Characteristics of Starter Cultures in Lactose-Hydrolyzed Milk for the Elderly

Sejong Oh<sup>1</sup>, Bum Keun Kim<sup>2</sup>, Yong-Gi Chun<sup>2</sup>, and Dong June Park<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal Science, Chonam National University, Gwangju, Korea

<sup>2</sup>Korea Food Research Institute, Wanju, Korea



Received: March 18, 2021

Revised: March 22, 2021

Accepted: March 22, 2021

\*Corresponding author :  
Dong June Park  
Korea Food Research Institute, Wanju,  
Korea  
Tel : +82-63-219-9132  
E-mail : djpark@kfri.re.kr

Copyright © 2021 Korean Society of Dairy Science and Biotechnology.  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### ORCID

Sejong Oh  
<https://orcid.org/0000-0002-5870-3038>  
Bum Keun Kim  
<https://orcid.org/0000-0002-9752-741X>  
Yong-Gi Chun  
<https://orcid.org/0000-0001-7699-5524>  
Dong June Park  
<https://orcid.org/0000-0001-9452-9391>

### Abstract

Lactase ( $\beta$ -galactosidase) is abundant in the small intestine during early childhood and gradually decreases with age. Lactic acid bacteria (LAB) present in yogurt could survive in the stomach, and lactase produced by these LAB can aid in lactose breakdown in the small intestine, thereby reducing lactose intolerance. This study aims to provide preliminary data for development of lactose-free yogurts for the elderly, and investigate the effect of lactose-hydrolyzed milk on the growth of starter cultures. The pH during yogurt fermentation using lactose-free milk was slightly higher at 2 and 4 h of incubation, but reached 4.5 at the end of incubation, similar to that of the yogurt prepared from regular milk. The number of viable cells of *Streptococcus thermophilus* reached  $10^8$  CFU/mL after 2 h of incubation and increased to  $10^9$  CFU/mL after 4 h of incubation. During yogurt fermentation, the viable cells of *Lactobacillus* species and *Bifidobacterium longum* did not affect lactose hydrolysis. Although lactose-hydrolyzed milk did not promote the growth of starter cultures, manufacturing yogurt with lactose-free milk could be beneficial for the intestinal health of lactose-sensitive elderly.

### Keywords

lactase, starter elderly, lactose, yogurt

## 서론

우유와 유제품은 풍부한 미네랄, 비타민, 양질의 단백질을 구성하고 있어 우리의 식단에서 중요한 역할을 한다[1]. 어린이와 성인의 뼈 건강을 위하여 칼슘의 우수한 급원으로 섭취가 권장되며, 유제품은 또한 대사 증후군 위험을 줄이기 위한 식품으로 제안되었다[2].

우유중의 유당은 신생아에 있어서 좋은 영양원으로 꼭 필요한 성분이지만, 고령자나 유당을 분해하지 못하는 사람들이 과도하게 섭취시 유당불내증이 나타날 수 있다. 유전적으로 유당분해효소를 생성할 수 없는 사람과 구분해서 hypolactasia(저유당분해효소증)는 유전적뿐만 아니라 후천적으로 생기기도 하지만, hypolactasia로 인하여 유당을 적절하게 분해를 못 시키는 유당불내증을 일으킨다[3].

유당을 분해할 수 있는 능력은 인종과 식이 습관에 따라 차이를 보이는데 유아보다는 성인에게 흔하게 발생된다. 우유 및 유제품의 지속적인 섭취는 우리 몸에 어느정도 tolerance를 유발시켜 유당에 대한 적응성이 높아졌을 것으로 생각되어, 우리나라 소비자들이 과거와 같은 우유 섭취에 따른 불편함은 많이 줄어들었을 것이다. 흔히 유당불내증이 있는 경우, 우유나 유제품을 섭취할 때 1회분

으로 한 컵 이하로 마시거나 요구르트 유산균과 함께 마시는 등으로 식이 제한을 권장 받고 있지만 [4], 건강식품과 의약품에도 유당이 함유되어 있다는 사실은 간과되어 왔다. 유당은 낮은 강도의 단맛을 가진 백색 분말로써 냄새가 없으며, 주성분과 반응하지 않고, 물에 녹기 쉽고, 결합력이 우수한 장점이 있기 때문에 정제(tablets) 형태의 건강기능식품과 의약품의 부형제로 많이 사용되고 있다. Cheon 등[5]은 경구고형제제의 유당함유 제제(lactose-containing drug, LCD)와 비유당 제제(lactose-free drug, LFD)의 분포와 약품 내 유당 함량, 유당 외 부형제 등에 대해 살펴보았다. 전체 1,109품목 중 LCD는 45.18%였으며, 유당 함량이 확인된 LCD 228품목의 제형 단위당 유당 함량은 최소 7.4 mg에서 최대 601.4 mg까지로 나타났다. 제형 당 400 mg 미만의 약품 내 유당과 유당불내증 발현 사이에 유의한 인과관계가 성립하지는 않았지만, 다중약물요법 시 5,277.6 mg을 초과하는 유당을 섭취할 수도 있어, IBS, IBD 환자나 유당불내증 환자에게는 임상적 증상 발현의 요인이 될 수도 있을 것이다[5]. 따라서 유당불내증의 원인으로 우유와 유제품만을 거론하기보다는 정제 형태의 경구용 약품과 건강기능식품 등을 포함시켜야 올바른 유당불내증의 발생빈도를 알 수 있을 것이다.

일본인을 대상으로 유당 섭취에 따른 불편감을 조사한 결과, 유당 30 g을 섭취한 경우 설사를 일으키지 않았으며, 50 g을 섭취한 경우 참가자 42명 중 16명에서 설사를 유발시켰다. 이 자료를 바탕으로 일본인에게 유당의 설사유발섭취량은 체중 1 kg당 유당은 0.71 g으로 체중 50 kg인 사람은 35.5 g의 유당을 섭취해도 특이체질이 아닌 이상 거의 설사를 하지 않는 것으로 나타났다고 보고 하였다[6]. 이 연구는 유당을 물에 녹여서 섭취시킨 것으로 우유에 유당을 단계별로 첨가하여 실험한 경우에 우유로 인한 설사유발이 증가되지 않아 실제 우유 중에 함유된 유당의 경우에는 섭취 온도, 물성, 우유 중에 함유된 다른 영양성분과의 영향 등이 유당소화를 증진시킨 것으로 생각된다. 그러나 우리나라 고령자 계층에서는 아직까지 우유를 기피하고 유당에 대한 민감성이 있다고 생각하는 사람이 많기 때문에 이들을 위한 발효유 제품 개발이 요구된다.

본 논문은 발효에 이용되는 우유에 유당분해효소를 처리하여 유당을 분해시킨 후 발효유 스타터에 영향을 주는지를 조사하여 고령자를 위한 저유당 발효유제품을 개발하는 데 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 스타터 제조

본 실험에 사용된 유산균 스타터는 *S. thermophiles*, *Lactobacillus acidophilus*, *B. longum*의 혼합 스타터에 Song 등[7]의 선행 연구에서 개발한 *L. plantarum* L67 균주를 혼합하여 사용하였다. 각 유산균에 10% 환원탈지유 0.02% yeast extract, 0.5% glucose를 첨가하여 제조된 멸균탈지유에 접종한 후 37°C(*L. acidophilus*, *B. longum* 및 *L. plantarum* L67)와 43°C(*S. thermophilus*)에서 18시간 배양한 후 사용하였다.

### 2. 유당분해효소 활성 및 생균 수 평가

본 실험에 사용한 유당분해효소는 Maxilact® Super(DSM Food Specialties, The Netherlands)로 유당분해 활성은 ONPG(*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Sigma-Aldrich, USA)를 기질로 하여 측정하였으며, 반응조건에서 1분 동안에 1  $\mu$ mol의 nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit으로 하였다. 살균된 우유에 우유 mL당 0.01 unit과 0.05 unit을 각각 첨가하여 반응시킨 다음 HPLC를 이용하여 유당 분해율을 최종 확인하였다[8].

*Lactobacillus*의 생균 수 측정은 MRS 배지(BD, Difco Laboratories, USA)에서 dextrose를 maltose로 대체한 배지에서 37°C에서 2일간 배양 후 생균 수를 측정하였으며, *S. thermophilus*는

M17 배지(BD)를 사용하여 43°C에서 24시간 배양 후 생균 수를 평가하였다. *B. longum*은 NPNL 배지[9]를 사용하여 혐기성 chamber(Concept 400, Ruskinn Technology, UK)에서 37°C, 48시간 배양한 다음 측정하였다.

### 3. 유당분해 요구르트의 제조

유당분해 우유는 살균된 우유(Seoul Dairy, Korea)에 Maxilax<sup>®</sup> Super를 0.05 unit 첨가하여 3시간 반응시킨 후, 85°C에서 10분간 열처리하여 효소를 불활성화 시킨 다음, *S. thermophiles*(약  $5 \times 10^6$  CFU/mL), *L. acidophilus*(약  $5 \times 10^6$  CFU/mL), *L. plantarum* L67(약  $5 \times 10^6$  CFU/mL), 및 *B. longum*(약  $5 \times 10^6$  CFU/mL)의 스타터를 각각 접종하여 40°C에서 배양하여 요구르트를 제조하였다.

### 4. 유당 측정

시료에 80% ethanol을 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 원심분리하여 상등액을 여과하여 HPLC 시료로 사용하였으며, 유당 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1에 나타내었다.

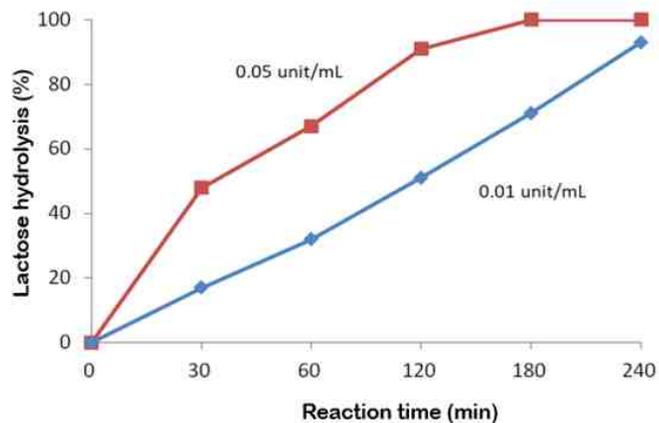
## 결과

### 1. 유당분해 효소 활성

유당분해효소의 유당분해는 0.05 unit/mL 첨가한 경우 반응시간 180분에 100% 분해율을 보였으며, 0.01 unit/mL을 첨가한 경우에는 반응 240분에 100% 분해율을 보였다(Fig. 1). 이는 Oh et al.[8]에서 보고한 유당분해율과는 다소 차이가 있었는데 유당분해효소의 활성 차이에 기인한 것으로 본 실험에서는 유당분해 사립유 제조에 3시간의 반응 시간으로 하여 제조하였다. 반응 1시간에 50% 이상의 유당분해를 하여 실제 공정적용시 유산균이 성장하는 시간을 고려할 때, 60분 반응을

**Table 1.** Condition of HPLC for the analysis of lactose

Column	Nucleogel sugar 810 Ca (300×7.8 mm, Macherey-Nagel, Germany)
Column temp.	85°C
Detector	Refractive index
Mobile phase	Water
Flow rate	0.6 mL/min



**Fig. 1.** Time course of the degree of lactose hydrolysis by commercial lactase in milk.

한 후에 유산균을 접종하는 것도 가능한 것으로 파악되었다.

### 2. 요구르트 배양중 pH의 변화

Fig. 2는 요구르트 배양중 pH 변화를 나타낸 것으로 유당분해유로 배양한 경우 배양 2시간과 4시간에서는 다소 높게 나타났으나, 배양 종료 pH인 4.5에 도달하는 시간은 유당 분해와 관계없이 유사한 결과를 보였다. Oh et al.[8]의 보고에서도 배양 6시간 이내의 단기배양에서는 pH 감소가 유당분해율을 달리하여 요구르트를 배양한 결과에서도 서로 간의 차이를 보이지 않았다. 그러나 *L. acidophilus*와 *B. bifidum*만을 접종한 단독 배양에서는 유당을 분해시킨 경우에서 산생성이 촉진 되었으며 생균 수 또한 높았다고 보고 하였다.

### 3. 요구르트 배양중 스타터 생균 수의 변화

요구르트 배양중 *S. thermophilus*의 생균 수는 Fig. 3에 나타난 바와 같으며, 배양 2시간에 약  $10^8$  CFU/mL에 이르렀으며, 배양 4시간에는  $10^9$  CFU/mL까지 성장하여 빠른 배양을 보였다. 배양 초기에는 오히려 유당을 분해하지 않은 대조구에서 다소 높게 나타났다.

Fig. 4는 요구르트 배양중에 *Lactobacillus* 유산균의 생균 수를 나타낸 것으로 *L. acidophilus*와 *L. plantarum* L67의 생균 수를 같이 확인 것이다. 비록 이들 두 종류의 균을 각각 평가하지는 않아

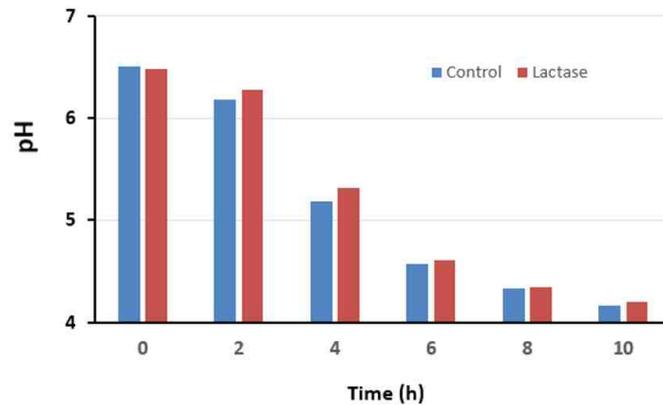


Fig. 2. Changes of pH in lactose hydrolyzed-milk during fermentation at 40°C.

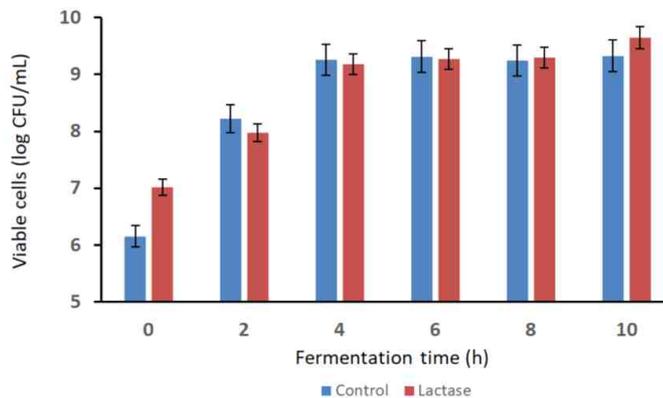


Fig. 3. Growth of *Streptococcus thermophilus* during yogurt fermentation.

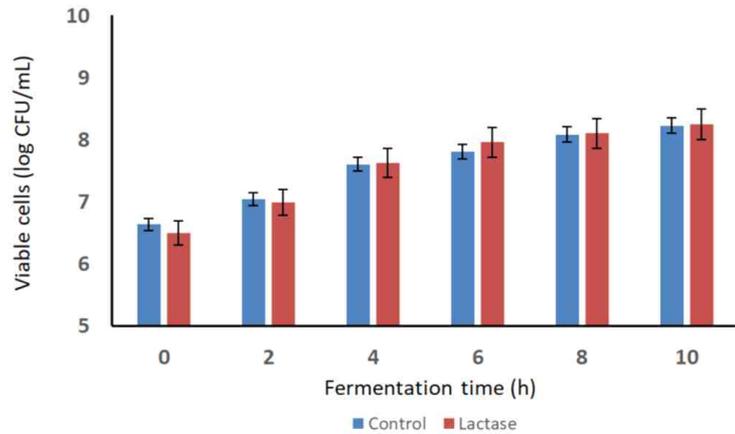


Fig. 4. Growth of *Lactobacillus* species during yogurt fermentation.

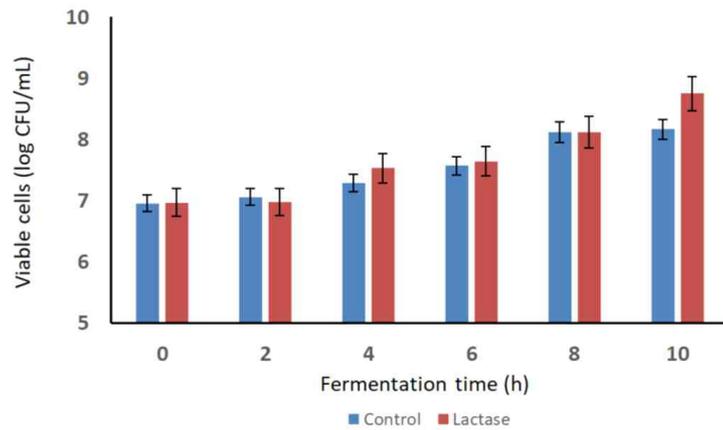


Fig. 5. Growth of *Bifidobacterium longum* during yogurt fermentation.

어느 유산균이 유당분해의 영향을 덜 받는지 혹은 더 받는지 알 수 없었으나, 배양 10시간까지 총 생균 수에는 영향을 주지 않았다.

요구르트 배양중에 *B. longum* 또한 생균 수에 영향을 주지 않았으며 배양 10시간에 생균 수의 차이를 나타내었다(Fig. 5). 그러나 배양종료 시점인 5시간 이후에는 생균 수에 차이가 없었다. 따라서 *B. longum*의 단독배양과 같이 장시간 배양인 경우에는 유당의 분해 사입유를 사용하여 생균 수를 증진시킬 수 있음을 시사한다.

## 고찰

요구르트에는 전통적으로 *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 혼합 스타터가 사용되었지만 *L. acidophilus*, *Bifidobacterium*과 같이 probiotics 활성이 높은 유산균을 첨가하여 많이 사용되고 있다.

*Streptococcus thermophilus*은 성장이 빠르며 젖산생성을 많이 하는 요구르트의 주발효 균으로 유산균 스타터가 성장하는 시간은 스타터의 종류와 활성 그리고 첨가되는 스타터의 양에 따라 다르겠지만, 통상적으로 배양 2시간 이후부터 급격히 *S. thermophilus*가 성장하여 우유의 pH를 낮춘다 [8]. 이는 *S. thermophilus*의  $\beta$ -galactosidase 활성은 *Lactobacillus*속 유산균보다 5-10배 이상

높기 때문이다. 따라서 요구르트의 배양에서 pH를 낮추는데 주로 *S. thermophilus*가 역할을 더 많이 한다[10,11].

*Streptococcus thermophilus* lacoperon은 유당의 운반과 가수 분해를 위해 lactose permease(lactose transport protein, lacS)와  $\beta$ -galactosidase(lacZ)를 인코딩하는 유전자를 포함하고 있으며, *S. thermophilus*의 성장중에 유당이 이들의 전사를 유도시킨다. LacS는 주로 세포질 막에 존재하며 약 180개의 아미노산으로 이루어진 카복실 말단 세포질 영역으로 구성된 복합단백질이다. 친수성 영역은 박테리아에 의해 사용되는 2차 전달시스템인 PTS(phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems)의 IIA 단백질 도메인이다[12,13].

본 연구에서도 그동안 생리적 활성이 보고된 *L. acidophilus* NCFM 균주와 본 연구팀에서 고령자용 장건강 증진 소재로 개발한 *L. plantarum* L67 균주를 각각 첨가하여 요구르트제조에 적용하였다. 요구르트와 같은 발효유의 섭취는 유당불내증을 완화시키는 것으로 알려져 있는데, 젖산 발효중에 유당이 40-50% 정도 감소되기 때문이며, 발효유에 함유된 유산균이 소장과 대장에서 유당분해 작용을 도와주고 발효유 특유의 점성으로 체내에 머무르는 시간을 증진시켜 궁극적으로 유당에 의한 불편함을 줄여준다.

따라서 본 연구에서도 요구르트에 *L. plantarum* L67 균주를 스타터의 한 종류로 첨가하면서 유당에 감수성이 높은 고령자들의 섭취를 용이하도록 유당을 분해시킨 우유로 요구르트를 제조하였다.

흥미롭게도, 복합 유산균의 사용은 스타터 유산균들끼리 서로의 성장과 산 생성을 촉진하는데 이러한 상호 자극은 성장 촉진 대사물의 교환에 기초한다. *Streptococcus thermophilus*는 다른 유산균에 비하여 빠르게 성장하면서 포름산, 엽산, 이산화탄소 등을 생성하여 *Lactobacillus*속 유산균들이 이들 생성물로 인하여 생육이 촉진되며, 이들 화합물들은 모두 purine biosynthesis의 전구체 또는 보조인자로 여겨지고 있다[14].

Lactose-free 유제품 시장은 유제품 산업에서 가장 빠르게 성장하고 있으며, 2022년까지 약 90억 유로의 매출액이 예상되며 전체 유제품(7.3% vs. 2.3%)보다 상대적으로 높은 성장율을 기록할 것이다. 특히 전체 시장의 70% 정도는 음용유가 차지하지만 lactose-free 발효유와 치즈 제품 성장은 이보다 높은 약 8.4%의 성장을 예상하고 있다[15].

비록 유당분해우유가 요구르트 배양시 사용된 스타터 유산균의 성장을 촉진시키지는 못하였으나, 유당을 함유하지 않은 발효유의 제조는 유당에 민감한 고령자의 장건강을 위한 건강식품을 제공한다는 데 의의가 있을 것이다.

## Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

## Acknowledgement

본 연구는 한국식품연구원(Korea Food Research Institute) 연구사업(과제번호: E01930-01)에 의해 이루어진 것임.

## References

1. Weaver C, Wijesinha-Bettoni R, McMahon D, Spence L. Milk and dairy products as part of the diet. In: Muehlhoff E, Bennett A, McMahon D, editors. Milk and dairy

- products in human nutrition. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. p. 103-206.
2. Chen GC, Szeto IM, Chen LH, Han SF, Li YJ, Van Hekezen R, et al. Dairy products consumption and metabolic syndrome in adults: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 2015;5:1-10.
  3. Yoon SS. Review: distribution, lactose malabsorption, and alleviation strategies of lactose intolerance. *Korean J Dairy Sci Technol.* 2009;27:55-62.
  4. Savaiano DA, Hutkins RW. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review. *Nutr Rev.* Forthcoming 2020. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa013>
  5. Cheon YJ, Lim SC. Clinical implication of the lactose contents contained in oral drug formulations for lactose intolerant patients in Korea. *Yakhak Hoeji.* 2017;61:203-209.
  6. Oku T, Nakamura S, Ichinose M. Maximum permissive dosage of lactose and lactitol for transitory diarrhea, and utilizable capacity for lactose in Japanese female adults. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2005;51:51-57.
  7. Song S, Lee SJ, Park DJ, Oh S, Lim KT. The anti-allergic activity of *Lactobacillus plantarum* L67 and its application to yogurt. *J Dairy Sci.* 2016;99:9372-9382.
  8. Oh S, Lim WS, Huh CS, Baek YJ. A study on the effects of  $\beta$ -galactosidase treatment on the growth of yogurt starters in milk. *Korean J Dairy Sci.* 1991;13:282-290.
  9. Teraguchi S, Uehara M, Ogasa K, Mitsuoka T. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Nippon Saikingaku Zasshi.* 1978;33:753-761.
  10. Lee KH. Lactase activity in yoghurt and lactic acid bacteria, *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1992;21:60-63.
  11. Kilara A, Shahani KM. Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *J Dairy Sci.* 1976;59:2031-2035.
  12. van den Bogaard PT, Kleerebezem M, Kuipers OP, de Vos WM. Control of lactose transport,  $\beta$ -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol.* 2000;182:5982-5989.
  13. Knol J, Veenhoff L, Liang WJ, Henderson PJF, Leblanc G, Poolman B. Unidirectional reconstitution into detergent-destabilized liposomes of the purified lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* 1996;271:15358-15366.
  14. Sieuwerts S, Molenaar D, van Hijum SAFT, Beerthuyzen M, Stevens MJA, Janssen PWM, et al. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:7775-7784.
  15. Dekker PJT, Koenders D, Bruins MJ. Lactose-free dairy products: market developments, production, nutrition and health benefits. *Nutrients.* 2019;11:551.