

## 시판 우유중의 Lactulose 함량

박영희 · 홍윤호

전남대학교 식품영양학과

## Lactulose Contents in Market Milks

Young-Hee Park and Youn-Ho Hong

Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

### Abstract

The lactulose contents in market milks were analyzed by gas chromatographic method. The method is evaluated for accuracy and reproducibility using phenyl- $\beta$ -D-glucoside as an internal standard. The response factor(RF) of lactulose of standard mixture was 1.15, the recoveries were 97.4~101.3% and the reproducibility was determined on the coefficients of variation 24.8% for pasteurized milk and 4.6~4.9% for UHT milk. The lactulose contents of 16 brands of the market milks determined were 5.3~59.7mg/100ml in UHT milk and 1.3~1.8mg/100ml in pasteurized milk.

### 서론

Lactulose(4-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose)는 우유를 열처리하는 도중 lactose로부터 생성된다<sup>1)</sup>. 그 생성 경로는 복잡하고 아직도 자세히 밝혀지지 않고 있으며, Maillard반응의 간접적 결과로서, 혹은 lactose의 이성체화에 의해서 또는 lactulosyl-lysine의 가수분해에 의해 형성된다고 한다<sup>2-5)</sup>.

대부분의 lactulose에 관한 문헌들이 조제우유를 급식받는 유아들의 장에서 *Bifidobacterium bifidum*이 성장하는 효과에 중점을 두고 보고되었으며<sup>6,7)</sup>, lactulose의 존재와 중요성에 대해 Adachi와 Patton<sup>3)</sup>이 조사하였고 Mendez와 Olano<sup>8)</sup>는 임상적인 중요성에 대해 재검토하였다. 한편, 심한 열처리를 받은 우유 및 유제품 또는 장기간 저장된 조제분유 등에서 lactulose가 발견되었음이 보고되었으며<sup>9-11)</sup>, 최근 우유 및 유제품의 lactulose함량은 우유의 열처리 정도를 측정하는 지표

로서 연구되고 있다<sup>12)</sup>.

Martinez-Castro와 Olano<sup>13)</sup>는 살균유, 농축유, 초고온 멸균유 및 분유중의 lactulose함량을 측정함으로써 가열방식에 따라 lactulose생성량의 차이가 있다고 보고하였고 Andrews<sup>14)</sup>는 살균유, UHT(초고온 살균)우유 및 멸균유의 구별방법으로서 lactulose함량을 측정하여 우유의 열처리 정도를 평가할 수 있다고 하였다. 한편, 국제낙농연맹(IDF)<sup>15)</sup>에서는 UHT우유와 멸균우유를 정의하고 구별하고자 우유에 생성된 lactulose를 정량하기위한 여러 방법들을 제안하고 있다.

본 저자들은 열처리 정도의 지표가 되는 성분 중 hydroxymethylfurfural함량을 국내 시판우유를 대상으로 측정하여 보고<sup>16)</sup>한 데 이어 본 연구에서는 lactulose함량을 gas chromatography를 이용하여 측정함으로써 열처리를 받은 정도를 비교하여 국내 유가공산업에 필요한 기초자료를 얻어 개선점을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

국내에서 시판되고 있는 열처리 방법 및 시간이 다른 우유를 일주일 간격으로 수거하여 시료로 하였고, 분석용 시약은 일등급을 사용하였으며 lactulose, N-trimethylsilylimidazole(TMSI), phenyl-β-D-glucoside는 Sigma Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 표준용액은 Martinez-Castro와 Olano<sup>17)</sup>의 방법에 따라 제조하였다.

표준시료 및 우유시료의 제조

Lactulose의 반응계수(RF)를 구하기 위한 혼합 표준용액 A, B, C 시료의 제조과정은 다음과 같다.

10ml 용량 flask에 5% lactose 용액 1ml를 취하고 30mg% lactulose 용액을 각각 1, 2, 3ml 가한 후 1% phenyl-β-D-glucoside 용액 0.5ml를 넣고 눈금까지 methanol로 채워서 잘 혼합한 다음 1ml를 취해 N<sub>2</sub> gas를 이용하여 증발건조시켰다. 여기에 0.15ml의 N-trimethylsilylimidazole을 가하고 65℃에서 30분간 유지시키는 동안 때때로 흔들어서 줌으로써 trimethylsilylimidazole 유도체가 잘 형성 되도록 하였으며 상온에서 식힌 후 0.1ml의 hexane과 0.15ml의 물을 첨가한 다음 원심분리하여 투명한 상층액을 얻었으며 이 중 1μl를 gas chromatography에 주입하였다.

우유시료에 있어서는 우유 1ml에 내부표준물질인 1% phenyl-β-D-glucoside 용액 0.5ml를 가하고 10ml 용량 flask 눈금까지 methanol로 채워 잘 혼합한 다음 한 시간 동안 방치시키고 여과(No. 6)해서 1ml를 취해 증발건조시킨 다음 혼합표준용액과 동일하게 trimethylsilylimidazole유도체를 만들었다.

Lactulose의 함량 측정

우유중의 lactulose함량은 gas chromatography (GC)에 의하여 측정하였는데 분석조건은 다음과 같다.

GC : Shimadzu gas chromatograph GC-14A

검출기 : flame ionization detector

컬럼 : stainless steel(3m×3.2mm), packed with 2% OV-17 on chromosorb W-HP(80~100 mesh)

컬럼온도 : 240℃

주입부 및 검출기 온도 : 280℃

운반기체 : N<sub>2</sub>, 30ml/min

계 산

Lactulose의 반응계수(RF)와 우유중의 lactulose 함량은 gas chromatogram에 나타난 피크의 면적비로부터 산출하였다.

$$RF = \frac{\text{mg lactulose} \times \text{phenyl-}\beta\text{-D-glucoside의 peak 면적}}{\text{mg phenyl-}\beta\text{-D-glucoside} \times \text{lactulose의 peak 면적}}$$

Lactulose 함량

(mg/100ml)

$$= 100 \times \frac{RF \times \text{mg phenyl-}\beta\text{-D-glucoside} \times \text{lactulose peak 면적}}{\text{phenyl-}\beta\text{-D-glucoside peak 면적}}$$

정확도 및 재현성 측정

정확도는 원유에 lactulose 용액(10~50mg/100ml)범위를 첨가하면서 회수율을 측정하였다. 재현성은 저온살균유 및 UHT 직접법과 간접법 등 세 유형의 우유를 5회 반복 분석하여 변이계수(CV)를 나타내었다.

결과 및 고찰

Lactulose의 RF

Phenyl-β-D-glucoside를 표준물질로 사용하여 lactulose의 RF를 혼합표준용액 A, B, C에 대해 7회 측정하여 얻었는데 1.10~1.24의 값을 보였고 평균 RF(X)는 1.15이었다. 본 실험에서 얻어진 RF값들은 평균 RF(X)에 대해 10% 범위내에 속하여 Olano<sup>18)</sup>가 정의한 바와 일치하였다.

### 정확도 및 재현성

원유에 lactulose 용액 10~50mg/100ml 범위를 첨가했을 때 97.4~101.3%의 회수율(CV 4.9~8.9%)을 보였으며, 세 유형의 열처리 방법이 다른 우유에 대해 5회 반복 분석하여 lactulose 함량을 구한 결과는 pasteurized 법(63°C, 30분)은 1.4mg/100ml (CV 24.8%), UHT 직접법(135°C, 2초)이 8.1mg/100ml (CV 4.9%) 그리고 UHT 간접법(unlabeled)이 54.5mg/100ml (CV 4.6%)이었다. 이 결과들은 Olano 등<sup>19)</sup>이 micropacked column을 사용해서 GC 방법으로 분석한 값들과 유사하였다. Renner<sup>20, 21)</sup>는 UHT우유의 열처리 방식에 있어서 간접식이 더 높은 열부담을 받는다고 하였는데 본 실험에서도 간접식의 lactulose 함량이 높았다.

### 시판우유의 lactulose 함량

시판우유에서 분석한 lactulose 함량 결과는 Table 1에 나타내었다.

UHT처리된 우유에는 살균과 멸균용으로 판매되고 있으므로 같은 회사 제품끼리는 같은 기호로(A-a, B-b, C-c, D-d, E-e), 그 외 UHT 살균유는 F~I로 표시하였고 LTLT(low temp. long time) 법은 J로, HTST(high temp. short time) 법은 K로 비교하였다.

16종류의 제품에서 측정된 lactulose 함량은 UHT우유의 경우 5.3~59.7mg/100ml로 제조회사에 따라 큰 차이를 보였으며 저온살균제품은 1.3~1.8mg/100ml로 비교적 낮게 나타났다.

Martinez-Castro와 Olano<sup>22)</sup>는 gas chromatography 방법을 이용해서 lactulose를 정량한 결과, 저온살균유(reconstituted dried milk 포함) 중에는 4~15mg/100ml, UHT유에서는 10~30mg/100ml였다고 보고하였으며, Geier와 Klostermeyer<sup>23, 24)</sup>는 130~150°C에서 수초간 열처리한 20종류의 UHT우유와 6종류의 멸균유를 효소적 분석방법으로 측정한 결과 UHT우유에서는 lactulose 함량이 10~51mg/100ml이었고, 한 개의 sample만이 72mg/100ml를 함유한 반면 멸균유는 87~137mg/100ml라고 보고하였다. 한편, Andrews<sup>14)</sup>는 상업용

우유 85개를 효소적 방법으로 lactulose를 분석하여 우유의 종류를 구별하였는데 원유와 저온살균유는 lactulose가 검출되지 않았으며 UHT우유는 5~71.5mg/100ml이고 멸균유는 71.5mg/100ml 이상으로 UHT우유의 최상한선을 71.5mg/100ml로 제외하였다.

또한 몇몇 연구자들<sup>24-27)</sup>은 UHT우유를 열처리 방식에 따라서 구별하였는데, UHT 직접식은 9mg/100ml 미만이고 간접식은 19mg/100ml 이상으로 제안하였으며 간접식 UHT로 제조되는 우유에서는 부착되는 열교환기에 따라 차이가 있어 tublar 열교환기가 plate 열교환기에 비해서 lactulose 함

Table 1. Lactulose contents of market milks\*

Heat treatment	Lactulose (mg/100ml)	Coefficient of variation (%)
UHT pasteurized		
A : 130°C, 2~3sec	12.3±0.4	3.5
B : 135°C, 2sec	10.9±1.0	8.8
C : 130°C, 2sec	22.6±0.9	3.9
D : 135°C, 2sec	18.0±1.1	6.1
E : unlabeled	7.6±0.2	2.8
F : 135°C, 2sec	22.9±1.1	4.9
G : 135°C, 2sec	13.9±0.4	2.9
H : 135°C, 2sec	8.1±0.4	4.8
I : 135°C, 2sec	14.5±0.6	4.3
UHT sterilized		
a : 140°C, 2~3sec	5.4±0.4	7.9
b : 135°C, 2sec	5.3±0.4	7.2
c : 140°C, 3sec	12.6±1.2	9.5
d : unlabeled	59.7±1.4	2.4
e : unlabeled	31.9±1.6	5.0
Pasteurized		
J : LTLT** (63°C, 30min)	1.3±0.2	16.5
K : HTST*** (72°C, 15sec)	1.8±0.2	11.1

\* number of samples (n=5)

\*\* LTLT : low temp. long time

\*\*\* HTST : high temp. short time

량이 더 적다고 하였다<sup>14)</sup>. 장<sup>28)</sup>의 보고에 의하면 우리나라 UHT우유 열처리중 간접법과 직접법의 사용비율이 9:1정도이고 UHT멸균유에는 직접법 기계를 사용하는 경향이 높게 나타났다고 하였는데 본 실험의 UHT우유 가운데 직접법의 lactulose기준치인 9mg/100ml 미만에 해당되는 것이 4개 제품으로 대부분이 간접법에 따른 것으로 생각된다.

한편, 박<sup>29)</sup>은 국내에서 생산되는 우유 및 유제품중 lactulose함량을 HPLC분석방법을 이용하여 측정하였는데 UHT살균유(135°C, 2초) 7제품과 UHT멸균유(135°C, 4초) 4제품 중에서는 lactulose가 검출되지 않았다고 보고하였으며, 이는 가열시간이 짧은 때문으로 설명하였는 바 모든 시판유에서 검출된 본 실험결과와는 상이하였다.

박과 홍<sup>16)</sup>은 우유가 받은 열처리 정도를 평가할 수 있는 한 지표로 시판유중에서 총 HMF값을 구하여 제품들의 용기포장에 표시된 열처리 온도와 비교하였다. 측정된 총 HMF값은 UHT살균유(A~D)중 C제품이 130°C이상으로 표시되어 가장 높았고 다음이 D, A, B순이었으며 UHT멸균유(a~d)중 온도와 시간이 기재되어 있지 않은 d제품이 가장 높았고 a, b, c 3개사 제품간에는 큰 차이가 없게 나타났었다. 동일한 제품에 대해 측정된 lactulose함량 역시 HMF값과 비슷한 양상을 보임으로써 이들이 다양한 열처리의 강도를 구별할 수 있는 지표가 됨을 알 수 있었다.

현재 우리나라에서 사용되고있는 우유 열처리 기 보유상황에 대한 조사<sup>28)</sup>에 따르면 LTLT(65°C, 30분) 1대, HTST(72°C, 15초) 1대, UHT살균(130~135°C, 2초) 56대, UHT멸균(131~140°C, 2~4초) 7대로 대부분이 UHT처리시스템에 의하는 것으로 나타났는데, 국내 시판우유의 용기포장에는 제조일로부터 보존기간에 따라서 4~5일 보존용은 살균유로, 6주간 보존용은 멸균유로 구분하고 있으나 전보의 결과<sup>16)</sup>와 본 실험결과에 따르면 제품 표시(labeling)가 실제의 열처리 강도에 따라 수정되어야 할 것으로 사료된다.

서독을 비롯한 서구 여러나라에서 수행하는 우유 열처리방법 유형에서는 110~120°C에서 10~30분간 멸균처리된 것을 멸균유, 135~150°C에서

2~8초간 열처리된 것을 UHT우유로 규정짓고 있으며 이 UHT우유는 상온에서 최소 6주간 그리고 멸균유는 1년간 보존을 허용하고 있다<sup>21)</sup>.

국내 시판유의 용기 포장에는 열처리 조건이 제시되지 않은 제품도 있을 뿐 아니라 UHT 열처리 방식이 표시되어 있지 않고 있어 실제로 어느정도의 열처리를 받았는지를 소비자가 알기 어렵다. 그러므로 열처리의 온도와 시간에 따른 미생물학적 및 이화화학적 지표를 설정하여 살균처리우유와 멸균처리우유의 명확한 구분이 선행되고, 이에 의한 제품의 표지를 분명히 하도록 규정함이 바람직하다고 생각된다.

## 요 약

국내에서 시판되고 있는 열처리 방법 및 시간이 다른 우유를 수거하여 lactulose함량을 gas chromatography 방법으로 측정하였다. Phenyl-β-D-glucoside를 표준물질로 사용하여 혼합표준용액에 대해 구해진 lactulose의 반응계수는 1.15, 회수율은 97.4~101.3%, 재현성은 저온살균처리유에서 CV는 24.8%, 그리고 UHT처리유는 4.6~4.9%를 보였다. 시판유 16종류의 제품에서 측정된 lactulose함량은 UHT처리유에서는 5.3~59.7mg/100ml 그리고 저온살균유의 경우는 1.3~1.8mg/100ml이었다.

## 문 헌

1. Adachi, S. : Formation of lactulose and tagatose from lactose in strongly heated milk. *Nature*, London, 181, 840(1958)
2. Adachi, S. : The mechanism of the degradation of lactose in strongly heated milk. *15th International Dairy Congress*, 3, 1686(1959)
3. Adachi, S. and Patton, S. : The presence and significance of lactulose in milk products : a review, *J. Dairy Sci.*, 44, 1375(1961)
4. Greig, B. D. and Payne, G. A. : Epimerization of lactose to free lactulose in heated model milk solutions. *J. Dairy Res.*, 52, 409(1985)
5. Richards, E. L. and Chandrasekhara, M. R. : Chemical changes in dried skim-milk during storage. *J. Dairy Res.*, 27, 59(1960)

6. Petuely, F. Z. : *Bifidus* flora in bottle-fed infants through bifidogenic substances. *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, **79**, 174(1957)
7. Andrews, G. R. : Formation and occurrence of lactulose in heated milk. *J. Dairy Res.*, **53**, 665(1986)
8. Méndez, A. and Olano, A. : Lactulose. A review of some chemical properties and application in infant nutrition and medicine. *Dairy Sci. Abstracts*, **41**, 531(1979)
9. Bernhart, F. W., Gagliardi, E. D., Tomarelli, R. M. and Stribley, R. C. : Lactulose in modified milk products for infant nutrition. *J. Dairy Sci.*, **48**, 399(1965)
10. Corbett, W. M. and Kenner, J. : The degradation of carbohydrates by alkali. II. Lactose. *J. Chem. Soc.*, 2245(1953)
11. Corbett, W. M. and Kenner, J. : The degradation of carbohydrates by alkali. V. Lactulose, maltose, and maltulose. *J. Chem. Soc.*, 1701(1954)
12. Burton, H. : The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100~150°C. *IDF, Bull., Doc.*, 157(1983)
13. Martinez-Castro, I. and Olano, A. : Influence of thermal processing on carbohydrate composition of milk. *Milchwiss.*, **35**, 5(1980)
14. Andrews, G. R. : Distinguishing pasteurized, UHT and sterilized milks by their lactulose content. *J. Soc. Dairy Technol.*, **37**, 92(1984)
15. International Dairy Federation : Definitions of heat treatment as applied to milk products. Brussels, *IDF D-Doc.*, 120(1984)
16. 박영희, 홍윤호 : 국내 시판 우유중의 HMF (5-hydroxymethylfurfural) 함량. *한국낙농학회지*, **11**, 265(1989)
17. Matinez-Castro, I., Calvo, M. M. and Olano, A. : Chromatographic determination of lactulose. *Chromatographia*, **23**, 132(1987)
18. Olano, A. : Determination of lactulose in heated milk by gas-liquid chromatography. *Fil. Ide, Questionaire*, 189/E(1988)
19. Olano, A., Calvo, M. M. and Reglero, G. : Analysis of free carbohydrates in milk using micropacked columns. *Chromatographia*, **21**, 538(1986)
20. Renner, E. : Milk and dairy products in human nutrition. Volkswirt, Verlag, München, pp. 280~322(1983)
21. Renner, E. : 영양에 있어서 유제품의 역할. *유가공 연구*, **5**, 137(1988)
22. Matinez-Castor, I. and Olano, A. : Determination of lactulose in commercial milks. *Rev. Esp. Lecheria*, **110**, 213(1978)
23. Geier, H. and Klostermeyer, H. : Enzymatic determination of lactulose. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **171**, 443(1980)
24. Geier, H. and Klostermeyer, H. : Formation of lactulose during heat treatment of milk. *Milchwiss.*, **38**, 475(1983)
25. Weiss, G. : Erhitzungsnachweise bei konsummilch-bedeutung und analytik. *Deutsche Molkerie-Zeitung*, **110**, 168(1989)
26. Olano, A., Calvo, M. M. and Corzo, N. : Changes in the carbohydrate fraction of milk during heating processes. *Food Chemistry*, **31**, 259(1989)
27. Fink, R. and Kessler, H. G. : Comparison of methods for distinguishing UHT treatment and sterilization of milk. *Milchwiss.*, **43**, 275(1988)
28. 장성종 : 한국의 우유처리 온도와 시간의 실태조사. *유가공연구*, **6**, 131(1989)
29. 박승용 : 유당의 이성화화  $\beta$ -galactosidase에 의한 lactulose의 분해에 관한 연구. 서울대학교 대학원 박사학위 논문(1986)

(1990년 2월 27일 접수)