최 종
연구보고서

GA0374-0250

우유소비 확대를 위한 케퍼의 생산체계 확립 및 기능성 증진연구

A Study on Establishment of Kefir Production System and Enhancement of Functionality for Expansion of Milk Consumption

연 구 기 관
한 국 식 품 개 발 연 구 원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우유소비 확대를 위한 케퍼의 생산체계 확립 및 기능성 증진연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 30 일

주관연구기관명 : 한국식품개발
연구원
총괄연구책임자 : 차 성 관
세부연구책임자 : 임 상 동
세부연구책임자 : 김 종 태
세부연구책임자 : 한 찬 규
연 구 원 : 임 성 일
연 구 원 : 안 병 학
연구원(위촉) : 박 선 정
연구원(위촉) : 주 영 철
참 여 기 업 : 비앤아이티(주)
연 구 원 : 장 윤 현

요 약 문

Ⅰ. 제 목

우유소비 확대를 위한 케퍼의 생산체계 확립 및 기능성 증진연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

케퍼 자가생산체제를 확립하여 우유소비 확대에 기여하기 위한 본 연구의 최종 연구개발 목표는 아래와 같다. 또한 1차년도 연구개발목표 및 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

- 케퍼그레인을 이용한 케퍼제조 시스템의 개발
- 케퍼그레인 미생물 분석
- 케퍼 및 케퍼미생물의 항균성, 항암성과 같은 프로바이오틱 효과검증
- 케퍼그레인 보급시스템 및 케퍼 제조기계의 개발

2. 연구개발의 필요성

우유는 균형된 영양소를 공급하는 가장 완전한 식품이라 할 수 있다. 그렇지만 한국인의 90% 이상이 가지고 있다고 보고되는 유당불내증으로 인하여 많은 한국인들이 우유소비를 기피하고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 한국인의 유당불내증 문제를 해결하고 우유소비 촉진을 위해서는 유당이 분해되어 있는 요구르트, 치즈와 같은 발효유제품의 소비를 유도하는 것이라 할 수 있다. 케퍼는 요구르트와 같은 발효유제품의 일종으로 외국에서는 제품으로 생산이 되고 있으나 한국에서는 아직까지 제품화되어 있지 않다. 케퍼 발효의 특징은 요구르트가 젖산균에 의해서만 발효되는 것에 반하여 케퍼 발효는 젖산균과 효모가 함께 작용하여 발효가 이루어진다는 것이다. 요구르트와 비교한 케퍼의 장점은 요구르트는 발효에 36-42℃ 정도의 높은 온도를 필요로 하지만, 케퍼는 20-25℃의 상온에서도 발효시킬 수가 있다는 점이다. 요구

르트와 비교한 케퍼의 또 한 가지 장점은 케퍼 제조가 눈에 보이는 케퍼그레인을 이용하여 이루어지기 때문에 발효에 관한 전문적 지식이 없는 일반인들도 손쉽게 집에서 제조할 수 있다는 것이다. 그렇지만 이러한 케퍼 제조시의 한가지 문제점은 케퍼그레인을 멸균시킬 수가 없기 때문에 부주의에 의한 오염가능성을 배제할 수가 없다는 것이다. 이러한 문제를 해결하기위해서는 본 연구과제를 통하여 확립된 케퍼의 자가제조 시스템과 케퍼의 기능성 조사결과를 통하여 일반 소비자의 케퍼에 대한 올바른 이해를 돕고 케퍼의 자가제조 시스템의 보급으로 우유소비 확대에 기여할 수 있게 하는 것이 시급히 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

◉ 케퍼 그레인의 수집 및 수집된 케퍼그레인의 형태학적·미생물학적 특징조사

1. 케퍼 그레인의 수집
2. 수집된 케퍼 그레인의 형태학적 성질조사 및 균수의 측정
3. 수집된 케퍼 그레인으로부터 미생물의 분리, 동정 및 미생물 균총조사

◉ 케퍼 그레인을 이용한 케퍼의 자가제조 시스템 개발

1. 케퍼의 자가제조 시스템 개발을 위한 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조
2. 요구르트 신맛에 대한 기호도의 조사
3. 케퍼 그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 관능검사

◉ 케퍼 그레인의 보급 시스템 개발

1. 케퍼 그레인 증체를 위한 조건 조사 실험
2. 케퍼 그레인의 저장성 실험
3. 케퍼 제조 기계의 개발

◉ 케퍼 및 케퍼 그레인의 항균, 항암효과 실험

1. 케퍼의 병원성 균에 대한 항균성 조사
2. 케퍼의 세포독성 실험
3. 케퍼 및 케퍼 그레인의 항암효과 검증 동물실험

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

케퍼그레인을 이용한 케퍼 제조실험을 위하여 국내에서 10여 종류의 케퍼그레인이 수집되었다. 이들 수집된 케퍼그레인의 형태학적 성질이 조사되었는데, 실험에 이용된 6종류의 케퍼 그레인은 포도송이, 융털, 나뭇잎, 좁쌀 그리고 수건과 같은 다양한 형태를 가지고 있었으며, 젤라틴 같은 끈적한 조직감을 나타내었다. 케퍼그레인의 미생물 균수의 측정을 위하여 5가지 균수측정 배지(SPC, MRS, M17, Rogosa, APT 한천배지)를 사용하여 일반세균과 효모균수를 측정한 결과 SPC, MRS 그리고 Rogosa 한천배지가 균수측정에 가장 적합하였으며, M17과 APT 한천배지는 상대적으로 적은 수의 미생물 균수 측정치를 보여주었다. 케퍼그레인의 우점하는 미생물 균총을 조사하기 위하여 케퍼그레인 일반세균수 측정에 이용되었던 SPC 한천배지로부터 40-50개의 집락을 보여주는 평판의 모든 집락을 순수 분리하여 미생물 동정을 한 결과 *L. fermentum*과 *L. brevis*가 각각 41-88% 그리고 2-54%의 점유율을 나타내어 우점균으로 나타났다. 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 자가제조 시스템을 개발하기 위하여 수행된 조건조사 실험에서는 발효온도의 변이(20, 25, 30℃)에 따른 산생성 및 미생물 균수의 차이를 보여주지 않았고 뚜렷한 경향도 보여주지 않았으나 접종량의 변이(5, 10, 15%)에 따라서는 산생성 및 균수 측정값의 큰 차이를 보여주었다. 즉, 15% 케퍼그레인 접종량을 사용할때는 12시간 이내에 pH-값이 4.5 이하로 떨어지고 적정산도 값이 1% 가까이 되었으나, 10% 그리고 5% 접종에서는 12-48시간 혹은 12-72 시간이 소요되었다. 요구르트 신맛에 대한 기호도 조사에서는 전체의 응답자 중 71.1%인 303명이 요구르트의 신맛을 좋아한다라는 대답을 하였고, 과일 첨가의 경우 딸기의 선호도가 30.3%로서 가장 높았다. A, B, F, H, I, J 와 같은 6가지 종류의 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 관능검사에서 A, H 그리고 I type의 세 가지 케퍼그레인이 종합적으로 우수한 관능도를 보여 주었다. 케퍼그레인 보급 시스템 개발을 위한 실험에서 케퍼그레인 접종량 비율이 낮아짐에 따라 케퍼그레인 증체율이 높아지는 경향을 보여주었다. 20℃, 25℃, 30℃의 발효온도에서는

발효온도가 높아질수록 케퍼그레인의 증체량이 많아졌으나 35℃에서는 오히려 증체량이 낮아졌다. 또한 우유에 당을 첨가해 줌으로서 케퍼그레인의 증체율을 높여주는 효과를 가져왔다. 케퍼그레인의 저장성 실험에서는 동결건조 방법이 케퍼그레인 형태유지와 활력유지 면에서 케퍼그레인을 보존하기 위한 가장 좋은 방법으로 밝혀졌으며, -20℃에서 6개월 냉동시킨 케퍼그레인도 케퍼그레인의 형태유지와 활력유지에 큰 문제가 없는 것으로 나타났다. 그러나 3개월 냉장보존한 케퍼그레인은 보존방법으로 적합하지 않은 것으로 밝혀졌다. 케퍼의 항균활성 조사 실험에서는 *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* 그리고 *Bacillus cereus*와 같은 병원균에 대한 항균활성을 보여 주었으며, 케퍼그레인 A와 H가 다른 종류보다 항균활성이 큰 것으로 밝혀졌다. 케퍼의 세포독성 실험에서는 대장암 세포주인 SNU-C4에 대한 IC_{50} 값이 300μg/ml 내외로 추정되었다. 케퍼 및 케퍼그레인 A와 H 타입의 항종양효과 분석을 위한 동물실험에서는 암세포(Sarcoma 180)를 투여한 마우스에 대하여 뚜렷한 항종양효과는 보여주지 않았다.

2. 활용에 대한 건의

가. 활용실적

1)학술지 발표논문

1. 박선정. 주영철. 장윤현. 차성관. 2003. 한국에서 수집된 케퍼 그레인의 특성에 대한 연구. 한국축산식품학회지 논문게재 접수 완료.
2. 주영철. 이수원. 박선정. 한찬규. 차성관. 2003. 케퍼 및 케퍼그레인의 항균 및 항종양 활성. 한국식품과학회지 논문게재 준비중.
3. 박선정. 서미영. 장진희. 차성관. 2003. 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조. 한국식품과학회지 논문게재 준비중.
4. 차성관. 박선정. 이광호. 2003. 케퍼그레인의 증체를 위한 조건조사. 한국식품과학회지 논문게재 준비중.

2)학술대회 발표

1. 이광호, 박선정, 차성관. 2002. 다양한 kefir grain의 증체량 증가 및 항균효과. 한국식품과학회 2002 제68차 학술발표회. 2002.5.25. 서울산업대학교
2. 박선정, 이영미, 차성관. 2002. Kefir grain을 이용한 kefir의 실험실적 제조. 한국식품영양과학회 2002 제51차 학술발표회. 2002.6.1. 경상대학교
3. Park, Sun Jung, Kwang Ho Lee and Seong Kwan Cha. 2002. Microbial analysis of kefir grain and characteristics of kefir fermentation. 9th international symposium on the genetics of industrial microorganisms. 2002.7.1.-7.5. Gyeongju, Korea.
4. 박선정, 안병학, 차성관. 2002. 케퍼그레인을 이용한 원료유별 케퍼제조. 한국식품과학회 2002 제69차 학술발표회. 2002.10.24-26. 무주리조트 티롤호텔
5. 차성관. 박선정. 서미영. 주영철. 2003. 케퍼의 항균 및 세포독성 실험. 한국산업미생물학회 학술발표회, 2003. 6.24-26. 무주리조트 티롤호텔

4)일반잡지 게재 등 기타

1. 차성관. 2003. 케퍼의 신비. (소책자 발간예정)

나. 활용에 대한 건의

본 연구과제의 최종목표인 케퍼의 자가생산체제의 확립을 위한 실험이 성공적으로 이루어져 케퍼 그레인을 이용한 케퍼 제조 시스템이 개발되었다. 또한 케퍼그레인이 수집되어 미생물 분석이 이루어졌으며, 케퍼 및 케퍼 미생물의 항균, 항종양과 같은 기능성에 대한 조사가 이루어졌고, 케퍼 제조 기계의 개발과 케퍼그레인 보급시스템 구축을 위한 실험이 이루어졌다. 본 연구과제의 연구

결과물은 본 연구과제의 참여업체인 비앤아이티(주)에 연구결과물의 기술전수를 위한 우선적인 실시계약이 가능하나 중소기업인 비앤아이티(주)의 기술료 감면에 대한 상의가 이루어져야 함.

SUMMARY

I. Title

A study on establishment of Kefir production system and enhancement of functionality for expansion of milk consumption

II. Objectives and Importance of Research

1. Objectives of this research

The main purpose of this study was to contribute for expansion of milk consumption by establishing home-made system of Kefir. For this purpose, following four areas have been accomplished through the first and second year research.

- Development of Kefir manufacturing system using Kefir grains
- Microbial analysis of the collected Kefir grains
- Verification of probiotic effects of Kefirs and Kefir grains on the anti-bacterial and anti-tumor activity
- Development of supply system of Kefir grains and Kefir-producing machine

2. Importance of the research

Milk is generally known as the most nearly complete food, which offers balanced nutrients. But more than 90% of Korean people have lactose intolerance symptom, therefore many Koreans avoid milk consumption. The best way to solve this problem and to promote the milk consumption is introducing fermented milk products, such as cheese and yoghurt, which contain hydrolyzed lactose. Kefir is a kind of fermented milk, which is also called 'Tibetian mushroom' in Korea. Kefir products are manufactured abroad, however, it has not been

introduced as a product in Korea yet. The fermentation of Kefir is accomplished by lactic acid bacteria and yeast while that of yoghurt is proceeded by only lactic acid bacteria. The strong point of Kefir, compared to yoghurt, is the lower fermentation temperature of 20-25℃(room temperature), while yoghurt needs higher fermentation temperature of 36-42℃. Another advantageous point of Kefir is that fermentation of Kefir is accomplished by using Kefir grain, which is a visible starter, and can be easily used at home by non skillful Kefir-maker. But one disadvantageous point of Kefir is that it is very probable to be contaminated, because Kefir grain cannot be treated in sterile condition. To solve this problem, it is urgently necessary to establish home-made system of Kefir manufacturing. And also it is necessary to investigate functional effect(s) of Kefir and Kefir grain for helping people to understand Kefir to expand Kefir consumption.

III. Contents and Scope of the Research

1) Collection of Kefir grains, investigation of morphological characteristics and microbiological analysis of collected Kefir grains
   1. Collection of Kefir grains
   2. Investigation of morphological characteristics and viable cell counts of collected Kefir grain
   3. Isolation and identification of microorganisms and microbial flora analysis of collected Kefir grain
2) Development of home-made system of Kefir manufacture using Kefir grains
   1. Kefir Manufacture by using Kefir grains for developing home-made system
   2. Survey of preference on the sour taste of yoghurt
   3. Sensory evaluation of Kefir produced with Kefir grains
3) Development of Kefir grain supply system
   1. Conditions for increasing growth rate of Kefir grain

2. Preservation ability test of Kefir grain

3. Development of Kefir manufacturing machine

4) Anti-microbial and anti-tumor activity tests of Kefir and Kefir grains

1. Anti-microbial test of Kefir against pathogenic microorganisms

2. Cytotoxicity test (MTT assay) of Kefir

3. Anti-tumor activity (*in vivo*) test of Kefir and Kefir grains

IV. Results and Recommendation for Application

1. Results

Ten kinds of Kefir grain were collected in Korea for Kefir manufacture using Kefir grains. Morphological characteristics of these collected Kefir grains were studied and six kinds of Kefir grain were selected. These Kefir grains are gelatinous in texture and have various forms such as villus, grape, leaf, hulled millet and towel in shape. For counting the viable cells of Kefir grains, SPC, MRS, M17, Rogosa and APT agar media were used. MRS, SPC and Rogosa agar media were most appropriate for bacterial cell counting of the selected Kefir grains. Lower colony counting numbers were shown on M17 or APT agar medium, relatively.

To investigate predominant microflora of Kefir grains, all colonies of the SPC agar plates, which colonies shown ca. 40-50, were isolated and identified. Most predominant bacteria were found to *L. fermentum* and *L. brevis* with the dominance of 41-88% and 2-54%, respectively. For the development of home-made system of Kefir using Kefir grain, three different fermentation temperatures (20, 25, 30℃) and three different inoculation volumes (5, 10, 15%) were used to find out the effects on acid production and viable cell counts. Different kinds of inoculation volume (5, 10, 15%) have shown to have much influence on acid production and viable cell counts of Kefir, but the different

fermentation temperature (20, 25, 30℃) did not affect. With the use of 15% Kefir grain, pH value of the Kefir decreased to 4.5 within 12 hours while the result with 10% and 5% Kefir grain required 12-48 hours and 12-72 hours, respectively. During the survey of taste likeness for sour taste of yoghurt, 71.1% respondent (303 persons) from 426 persons answered 'the good' about yoghurt sour taste. Strawberry was shown to have most preference for yoghurt additives (30.3% respondent). Three Kefir grains of A, H, I among the 6 Kefir grains A, B, F, H, I, J have shown the best overall scores in sensory evaluation of Kefir produced by using Kefir grain. The growth rate of Kefir grain increased by the less inoculation volume and by the higher fermentation temperature from 20℃ to 30℃, but fermentation temperature of 35℃ brought a decrease. Addition of sugar to the milk also brought the effect of increasing growth rate of Kefir grain. Freeze drying method was found as the best preservation method of Kefir grain to preserve grain form and acid producing ability. Freezing temperature (at -20℃) was also found as a good method to preserve Kefir grain, but preservation at 5℃ in refrigerator was not a good method for preservation of Kefir grain. Kefir was found to have the ability to inhibit the growth of pathogenic microorganisms, such as *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. Anti-microbial activity of Kefir grain type A and H were greater than the other types. Cytotoxicity of Kefir on the colon cancer cell line SNU-C4 was estimated as 300 μg/ml for $IC_{50,\ anti\text{-}tumor}$ effect of Kefir and Kefir grain type A and H on tumor (Sarcoma 180), which were injected to mouse and was tested, but have not shown noticeable anti-tumor effects.

C O N T E N T

Submit report

Summary

Contents

Chapter 1. INTRODUCTION · · · · · · · · · · · · · ·

1) Objectives and necessity of the research .....

2) State of arts of the research .....

Chapter 2. MATERIALS AND METHODS · · · · · · · ·

1) Investigation of morphological characteristics and microbial flora of Kefir grains

1. Collection, investigation of morphological characteristics and viable cell counts of Kefir grain

2. Isolation and identification of microorganisms and microbial flora analysis of collected Kefir grain

2) Development of home-made system of Kefir using Kefir grain

1. Manufacture of Kefir using Kefir grains for developing home-made system

2. Survey of taste likeness for sour taste of yoghurt

3. Sensory evaluation of Kefir produced by using Kefir grain

3) Development of Kefir grain supply system

1. Condition investigation of Kefir grain growth rate

a. Effect of the ripening step on increase of Kefir grain

b. Effect of the starter volume and incubation temperature on increase of Kefir grain

c. Effect of the sugar addition on increase of Kefir grain

2. Preservation ability test of Kefir grain
a. Effect of preservation conditions on Kefir morphological characteristics and on the fermentation ability
b. Viable cell counts of the Kefir grain before and after freeze drying
3. Development of Kefir manufacturing machine
4) Anti-microbial and anti-tumor activity of Kefir and Kefir grain
1. Anti-microbial test of Kefir against pathogenic microorganisms
2. Cytotoxicity test (MTT assay) of Kefir
3. anti-tumor activity (*in vivo*) test of Kefir and Kefir grain

Chapter 3. RESULTS AND DISCUSSION ・・・・・・
1) Investigation of morphological characteristics and microbial flora of Kefir grains
1. Morphological characteristics of Kefir grains
2. Viable cell counts of Kefir grain
3. Identification of microorganisms and microbial flora analysis of Kefir grain
2) Development of Kefir home-made system using Kefir grain
1. Kefir manufacture using Kefir grains for developing home-made system
2. Survey of taste likeness for sour taste of yoghurt
3. Sensory evaluation of Kefir produced by using Kefir grain
3) Development of Kefir grain supply system
1. Condition investigation of Kefir grain growth rate
2. Preservation ability test of Kefir grain
3. Development of Kefir manufacturing machine
4) Anti-microbial and anti-tumor activity of Kefir and Kefir grain

1. Anti-microbial (*in vitro* and *in situ*) test of Kefir against pathogenic microorganisms
2. Cytotoxicity test (MTT assay) of Kefir
3. anti-tumor activity (*in vivo*) test of Kefir and Kefir grain

REFERENCES · · · · · · · · · · ·

목 차

제 출 문

요 약 문

Summary

Contents

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

제 2 절 국내외 기술개발 현황

제 2 장 연구개발수행 재료 및 방법

제 1 절 케퍼 그레인의 형태학적 특성 및 균총조사

1. 케퍼 그레인의 수집, 형태학적 특성조사 및 균수의 측정

2. 케퍼 그레인 미생물의 분리, 동정 및 균총조사

제 2 절 케퍼 그레인을 이용한 케퍼의 자가제조 시스템 개발

1. 케퍼의 자가제조 시스템 개발을 위한 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조

2. 요구르트 신맛에 대한 기호도의 조사

3. 케퍼 그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 관능검사

제 3 절 케퍼 그레인의 보급 시스템 개발

1. 케퍼 그레인 증체를 위한 조건 조사 실험

a. 케퍼 그레인 증체를 위한 숙성단계의 영향

b. 케퍼 그레인 증체를 위한 접종량 및 발효온도의 영향

c. 케퍼 그레인 증체를 위한 당첨가의 영향

2. 케퍼 그레인의 저장성 실험

a. 케퍼그레인의 저장이 케퍼그레인의 형태 및 발효능력에 미치는 영향

b. 동결건조 전, 후의 케퍼그레인 미생물 균수의 측정

3. 케퍼 제조 기계의 개발

제 4 절 케퍼 및 케퍼 그레인의 항균, 항종양효과 실험

1. 케퍼의 병원성 균에 대한 항균성 조사

2. 케퍼의 세포독성 실험

3. 케퍼 및 케퍼 그레인의 항종양효과 검증 동물실험

제 3 장 연구개발수행 결과 및 고찰

제 1 절 케퍼 그레인의 형태학적 특성 및 균총조사

1. 케퍼 그레인의 형태학적 특성조사

2. 케퍼 그레인의 미생물 균수측정

3. 케퍼 그레인의 미생물 동정 및 미생물 균총조사

제 2 절 케퍼 그레인을 이용한 케퍼의 자가제조 시스템 개발

1. 케퍼의 자가제조 시스템 개발을 위한 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조

2. 요구르트 신맛에 대한 기호도의 조사

3. 케퍼 그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 관능검사

제 3 절 케퍼 그레인의 보급 시스템 개발

1. 케퍼 그레인 증체를 위한 조건 조사 실험

2. 케퍼 그레인의 저장성 실험

3. 케퍼 제조 기계의 개발

제 4 절 케퍼 및 케퍼 그레인의 항균, 항종양효과 실험

1. 케퍼의 병원성 균에 대한 항균성 조사

2. 케퍼의 세포독성 실험

3. 케퍼 및 케퍼 그레인의 항종양효과 검증 동물실험

제 4 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

케퍼 자가생산체제를 확립하여 우유소비 확대에 기여하기 위한 본 연구의 최종 연구개발 목표는 아래와 같다. 또한 1차년도 및 2차년도의 연구개발 목표 및 연구개발 내용 및 범위는 아래의 표에서 보여주는 것과 같다.

- 케퍼그레인의 수집 및 케퍼그레인의 미생물 분석
- 케퍼그레인을 이용한 케퍼제조 시스템의 개발
- 케퍼 및 케퍼미생물의 항균성, 항종양과 같은 프로바이오틱 효과검증
- 케퍼그레인 보급시스템 및 케퍼 제조기계의 개발

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	- 케퍼그레인의 특성 및 균총조사	- 국내·외 케퍼그레인의 수집 및 특성조사 - 수집된 케퍼그레인의 미생물 균수측정 및 미생물의 분리, 동정
	- 케퍼그레인을 이용한 케퍼제조 시스템의 개발	- 케퍼그레인의 배양 및 저장 - 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 실험실적 제조 (원료유, 발효온도 및 접종량에 따른 발효 양상의 조사)
	- 케퍼 및 케퍼미생물의 항균성 조사	- Disc assay 방법을 이용한 병원성균에 대한 항균성 조사 - 동물실험에 의한 항종양효과 예비실험
	- 케퍼그레인 보급 시스템의 개발	- 케퍼그레인의 실험실적 대량배양 - 케퍼그레인의 보존방법(냉장, 동결 및 동결건조)에 따른 활력실험
2차 년도 (2002)	- 케퍼그레인의 저장 전·후의 균총변화조사	- 케퍼그레인 저장 전·후의 미생물 균수의 변화 조사 - 케퍼그레인 저장 전·후의 미생물 균총 변화의 조사
	- 케퍼 자가제조 시스템의 구축	- 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조실험 (발효온도, 접종량에 따른 발효양상 및 관능도의 조사) - 케퍼 자가제조 모델시스템의 정립
	- 케퍼 및 케퍼미생물의 항암성 조사	- *In vivo* 항종양효과 측정을 위한 동물실험
	- 케퍼 제조기계의 개발	- 제조기계 개발을 위한 케퍼 제조실험 - 사용자의 위생성을 고려한 케퍼 제조기계의 시작품 제조

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

◎ 우유는 소화가 잘 되는 식품일 뿐 아니라, 균형된 영양소를 공급하는 가장 완전한 식품(The most nearly complete food)으로 알려져 있다. 따라서 우유의 소비확대는 국민건강을 위하여 필요하다.

◎ 그렇지만 한국인의 약 90% 이상이 가지고 있다고 보고되는 유당불내증(lactose intolerance)으로 인하여 많은 한국인이 우유소비를 기피하고 있는 것으로 보고되고 있다.

◎ 이러한 한국인의 유당불내증으로 인한 우유소비 기피현상에 대한 문제를 해결할 수 있는 가장 좋은 방법은 요구르트, 치즈와 같은 발효유제품의 소비를 유도하는 것이라 할 수 있다.

◎ 케퍼(kefir)는 발효유제품의 일종으로 외국에서는 제품으로 생산이 되고 있으나 한국에서는 아직까지 제품화되어 있지 않고, 일부 일반 가정에서 속칭 “우유버섯” 혹은 “몽고버섯”이라는 이름의 케퍼그레인을 이용하여 케퍼가 만들어지고 있다.

◎ 케퍼그레인은 직경 2-20mm의 포도송이 혹은 버섯 모양과 같은 입자로서 우유에 넣고 발효시킨 후, 케퍼그레인은 체로 걸러 수돗물로 씻어 다시 사용하고, 체에서 걸러 빠져나온 발효액을 스타터로 사용하게 된다.

◎ 그렇지만 일반 가정에서 만들어지고 있는 케퍼 제조는 정확한 제조방법에 대한 지식전달이 되고 있지 않아 케퍼그레인의 오염가능성이 있고, 발효가 제대로 이루어지지 못하는 등 문제가 야기되고 있다.

◎ 따라서 우유소비의 확산을 위해서는 케퍼 생산체제와 케퍼 자가제조 방법을 확립하고, 확립된 제조방법을 보급함으로서 케퍼그레인의 오염가능성의 배제와 일반 가정에서 손쉽게 케퍼를 제조할 수 있게 함이 필요하다.

나. 경제・산업적 측면

◎ 우리나라에서의 젖소 사육두수는 1998년 현재 53만 9천두에 이르고 있고, 이들 젖소로부터 생산되어지는 원유는 202만 7천 M/T이다. 생산되어진 원유의 약 75%가 현재 시유와 같은 음용유 제품용으로 사용되고 있고, 나머지 25%는 치즈, 버터, 연

유, 발효유 등과 같은 유가공 제품용으로 가공되어 소비되고 있다.

◎ 유가공 산업은 1998년 약 3조 7,000억원의 매출액을 기록하여 식품산업 전체 매출액 27조 4,000억원중 약 13.5%를 차지하고 있고, 시유 시장은 1조 4천억으로 유가공산업 중 가장 많은 매출을 기록하고 있다.

◎ 1998년 가을 한국에 찾아 온 IMF 등과 같이 경제여건이 어려울 때는 시유의 소비가 침체되는 현상을 나타내고 분유의 적체문제가 발생되어 낙농가들이 피해를 입는 현상이 빈번히 발생하고 있다.

◎ 이러한 낙농가의 피해를 줄이고 낙농산업의 건전한 발전을 위해서는 유가공품의 제품다양화 및 우유소비 증진이 있어야 하는데, 케퍼제품의 생산체계 확립은 유제품의 다양화를 기할 수 있고 또한 케퍼의 자가제조시스템 확립으로 우유소비 증진 효과를 가져올 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

◎ 젖산 및 알콜발효유인 케퍼제품은 현재 러시아 및 동구를 중심으로 가장 많이 생산되어 소비되고 있는 발효유제품으로 독특한 맛과 향기로 인하여 세계적으로 그 소비가 확대되고 있는 경향에 있다.

◎ 국내에서의 발효유의 개발 전망에 대해서는 현재 발효유 시장의 70%이상을 점유하고 있는 액상발효유는 점차 고가의 호상 발효유로 전환될 것으로 전망하고 있고, 특히 발효유에 건강 기능성 균주를 이용하는 연구가 활발히 진행되리라 예상되고 있다.

◎ 또한 국민소득의 증대를 통한 식품소비구조의 변화 등으로 식품의 기능성, 편의성, 건강지향성 식품의 수요가 증가되는 경향에 있다. 이러한 소비자의 수요에 맞추어 케퍼 및 케퍼그레인의 기능성에 관한 연구는 절대적으로 필요하다.

◎ 일부 가정에서 nature yoghurt를 이용한 요구르트 제조도 이루어지고 있으나, 요구르트에 비하면 케퍼는 가시적인 눈으로 확인할 수 있는 케퍼그레인을 이용한다는 장점이 있고, 관능적인 면에서도 케퍼는 젖산발효 및 효모발효를 병행하고 있기 때문에 젖산발효에만 의존하는 요구르트보다 좋은 장점을 가지고 있다.

제 2 절 국내·외 기술개발 현황

◎ 케퍼(kefir) 제품은 소련 및 동구 유럽에서 많이 소비되고 있는 발효유제품으로 젖산발효 외에 효모에 의한 알콜발효가 일어나 독특한 맛과 향기가 있기 때문에 세계적으로 그 소비가 확대되고 있는 경향에 있다.

◎ 이러한 케퍼 제품에 대해 Gorski(1994)는 21세기에 기대할 수 있는 발효유로 지목하면서 케퍼그레인의 주요 미생물의 소개와 미국인들이 선호하는 맛은 diacetyl과 acetaldehyde의 비율이 3:1일 때이지만 더 바람직한 맛 성분이 필요함을 설명하고 있다.

◎ 케퍼 발효중의 유기산 및 flavor 생산에 관한 실험과(Guzel-Seydim 등, 2000[a]; Guzel-Seydim 등, 2000[b]), 케퍼 효모에 의한 알콜발효에 관한 실험결과 발표가 있고(Athanasiadis 등, 1999), 케퍼의 제조, 영양, 미생물 그리고 건강에 관한 문헌(Kroger, 1993), 쿠미스 및 케퍼의 제조방법, 미생물 성분분석, 영양 및 치료효과에 관한 문헌들이 소개되고 있다(Mann, 1989).

◎ 케퍼는 일반적으로 건강증진 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데(Farnworth, 1999), 케퍼의 건강 기능성에 관한 구체적인 실험연구 결과는 케퍼 및 케퍼 유산균의 항균 작용에 관한 실험연구 결과이다(Garrote 등, 2000; Morgan 등, 2000; Shimizu 등, 1999; Takanashi and Kawakami, 1999).

◎ 케퍼 유산균 및 케퍼 제품의 항돌연변이 활성에 관한 실험(Kubo 등, 1992; Yoon 등, 1999), 항암성에 관한 실험(Furukawa 등, 1990)과 cholesterol assimilation activity(Tamai 등, 1996; Vujicic 등, 1992; Yoon 등, 1998) 및 host immune response의 자극에 관한 실험(Furukawa, 1996)과 같은 케퍼 미생물 혹은 케퍼 제품의 기능성에 관한 연구결과가 발표 되었다.

◎ 케퍼그레인을 이용한 가정에서의 케퍼 제조는 외국에서도 많이 이루어지고 있는데, 많은 나라들에서 각기 사용되어지고 있는 케퍼그레인들이 수집되어져 미생물 균총 분석이 이루어졌다(Angulo 등, 1993; Ching and Lin, 1999; Chin 등, 1999; Libudzisz and Piatkiewicz, 1990; Motaghi 등, 1997; Neve, 1992; Ohara 등, 1997; Pintado 등, 1996; Rea 등, 1996; Takizawa 등, 1994; Takizawa, 1998; Wyder 등, 1997; Wyder and Puhan, 1997; Yoshida and Toyoshima, 1994; Zhang 등, 1998).

◎ 케퍼그레인으로부터 분리된 효모와 유산균의 상호협력 및 상승작용에 관한 실험이 실시되었고(Leori and Pidoux, 1993[a]; Leori and Pidoux, 1993[b]; Leori and Courcouz, 1996), 케퍼그레인으로부터 분리된 *Lactobacillus kefiranofaciens*의 β-galactosidase 효소에 관한 조사가 이루어졌다(Itoh 등, 1992).

◎ *Lactobacillus*를 케퍼그레인으로부터 분리할 수 있는 미생물 분리배지에 관한 연구가 있었고, 케퍼그레인 및 원료우유의 조성에 따른 발효양상에 관한 실험(Garrote 등, 1998) 그리고 lactose를 발효시키지 않은 효모를 이용한 케퍼 제조에 관한 연구가 있었다(Kwak 등, 1996).

◎ 케퍼그레인은 polysaccharide의 일종인 kefiran으로 구성되어 있는데, exopolysaccharide인 kefiran의 생산조건 조사 실험이 수행되었다(Micheli 등, 1999).

◎ 한국식품개발연구원에서는 1991-1992 2년에 걸쳐 "발효유제품의 생산 및 품질개선에 관한 연구(차 등, 1991)"와 "발효식품 제조를 위한 종균 개발연구(차 등, 1992)"를 수행하는 중에 일부 연구내용으로 케퍼의 생산에 관한 연구를 시도한 바가 있다. 이들 연구의 결과는 아래와 같이 몇가지로 요약할 수가 있다.

- 우유로부터 유산균의 분리 및 케퍼 제조용으로 사용 가능한 *Lactobacillus lactis* 균주의 선발
- 케퍼그레인으로보터 효모균주의 분리 및 동정
- 선발된 *Lactobacillus lactis* 균주와 효모균주를 이용한 케퍼의 제조

◎ 이들 연구에서 순수분리 미생물을 이용하여 케퍼를 제조하였던 이유는 케퍼그레인은 멸균시킬 수가 없는 단점을 가지고 있기 때문에 케퍼그레인을 이용하지 않기 위하여 순수분리 미생물을 이용한 케퍼 제조를 시도하였으나, 이들 연구결과는 유가공공장과 같은 제조 업체에서는 사용이 가능하지만 일반 가정에서는 사용이 어려운 단점을 가지고 있다. 따라서 일반 가정에서 시유를 구입하여 손쉽게 케퍼를 제조하게 하기 위해서는 본 연구과제에서 시도하려고 하는 케퍼그레인을 이용한 케퍼제조가 바람직하다.

제 2 장　연구개발 재료 및 방법

제 1 절　케퍼그레인의 특성 및 균총조사

1. 케퍼그레인의 수집, 형태학적 특성조사 및 균수의 측정

가. 케퍼 그레인의 수집 및 보존 : 국내·외에서 케퍼그레인을 소지한 민가 혹은 판매처로부터 케퍼그레인을 분양받거나 구입하였으며, 수집된 케퍼그레인은 수돗물로 씻은 후 시유에 5%씩 접종하여 상온에서 하루동안 발효시킨 후 냉장고에서 2-7일 동안 숙성시키는 방법으로 계속적으로 시유를 이용하여 케퍼를 제조하면서 케퍼그레인을 보존하였다.

나. 케퍼 그레인의 형태학적 특성조사 : 케퍼의 제조시 수돗물에 씻은 케퍼그레인을 디지털 카메라(Nikon Coolpix 950)로 외관상 형태를 관찰하였다.

다. 케퍼 그레인의 미생물 균수 측정 : 수집된 케퍼 그레인을 10g씩 취하여 Cell Master(CM-100, Iuchi, Japan)를 이용하여 균질화하였고, 0.1% 펩톤수로 10^4, 10^5, 10^6배 희석한 다음 SPC, MRS, M17, Rogosa, APT 한천 배지(Difco, USA)에 도말하여 30℃에서 24시간 배양한 후 콜로니 모양에 따라 일반세균과 효모의 수를 분별 측정하였다. 그리고 aerobic bacteria용 petrifilm(3M, USA)과 yeast & molds용 petrifilm(3M, USA)으로 일반세균과 효모의 수를 계수하여 5가지의 한천 배지로 측정한 결과와 비교하였다.

2. 케퍼그레인 미생물의 분리, 동정 및 균총 조사

가. 케퍼 그레인의 미생물 분리 및 보존 : 케퍼 그레인으로 미생물을 분리하기 위하여 케퍼그레인 미생물 균수 측정에 사용되었던 SPC 한천배지로부터 약 40-50개의 콜로니가 자란 plate를 선정하여 plate에 자란 모든 콜로니를 SPC 한천배지에 3차에 걸쳐 순수분리 한 후, 15% glycerol 상태로 -70℃에 보존하였다.

나. 미생물의 동정 및 케퍼그레인의 균총조사 : 케퍼 그레인의 균총조사를 위하여 케퍼그레인으로부터 분리된 미생물은 1차적으로 균주의 형태 관찰과 균락의 성상 관찰, Gram 염색, Catalase 검사, Oxidase 검사를 실시하여 미생물 동정을 실

시하였고, 2차적으로 젖산균 미생물 동정 kit인 API 50 CHL(Biomerieux, France)을 이용하여 미생물 동정을 한 후 케퍼그레인의 미생물 균총조사를 하였다.

제 2 절 케퍼그레인을 이용한 케퍼 자가제조 시스템 개발

1. 케퍼 자가제조 시스템 개발을 위한 케퍼그레인을 이용한 케퍼제조실험

시유에 A, B, F, H, I, J type 케퍼그레인을 5, 10, 15% 접종(w/v)한 후 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72시간에 시료채취 하여 pH, 유산균수(BCP배지), aerobic bacteria(petrifilm)수, yeast(petrifilm)수를 측정하였다. 또한 접종 후 0, 3, 6, 9, 12, 24시간 까지는 20, 25, 30℃에서 발효시키고, 접종후 24시간에서 72시간 까지는 10℃에서 숙성시키면서 관찰하였다.

2. 요구르트 신맛에 대한 기호도 조사

케퍼의 자가제조 시스템 확립에 필요한 케퍼 제품의 신맛에 영향을 줄 수 있는 발효시간의 결정을 위하여 일반인의 요구르트 섭취빈도와 신맛에 대한 기호도를 알아보고자 표 1과 같은 요구르트의 기호도 조사표를 이용하여 신맛에 대한 기호도를 조사 하였다.

표 1. 요구르트의 신맛에 대한 기호도 조사표

요구르트의 신맛에 대한 기호도 조사

성별: 남( ) 여( )

1. 귀하의 연령은?
19세 이하( )
29세 이하( )
39세 이하( )
49세 이하( )
59세 이하( )
60세 이상( )

2. 귀하의 최종학력은?
초등학교 졸업( )
중학교 졸업( )
고등하교 졸업( )
대학 졸업( )
대학교 졸업( )
대학원 이상( )

3. 위하의 직업은?
공무원( )
자영업( )
학생( )
주부( )
회사원( )
연구원( )
기타( )

4. 요구르트에 대한 귀하의 의견은?
대단히 좋아한다( )
아주 좋아한다( )
보통 좋아한다( )
약간 좋아한다( )
좋아하지도 싫어하지도 않는다( )
약간 싫어한다( )
보통 싫어한다( )

5. 귀하의 요구르트 섭취 빈도는?
수시로 사 먹는다( )
일주일에 세 개 이상( )
일주일에 한 개 이상( )
한달에 한 개 이상( )
거의 먹지 않는다( )
먹지 않는다( )

6. 요구르트의 신맛에 대한 귀하의 의견은?
대단히 좋아한다( )
아주 좋아한다( )
보통 좋아한다( )
약간 좋아한다( )
좋아하지도 싫어하지도 않는다( )
약간 싫어한다( )
보통 싫어한다( )

7. 떠먹는 요구르트에 과일을 첨가한다면 어떤 과일이 가장 좋다고 생각하는가?
사과( ) 포도( ) 오렌지( ) 망고( ) 복숭아( ) 귤( ) 자두( )
파인애플( ) 딸기( ) 기타( )

3. 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 기호도 관능검사

케퍼그레인을 시유에 5% 접종하여 25℃에서 24시간 배양하고 10℃에서 48시간 숙성하여 케퍼를 제조하였다. 제조된 케퍼는 표2와 같은 관능검사 설문지를 이용하여 한국식품개발연구원 관능검사실에서 관능검사를 실시하였다. 실시된 1차 관능검사에는 모두 82명의 패널이 참가하였다.

표 2. 관능검사에 사용한 관능검사 설문지

관능검사 설문지

이름: 날짜:

제시된 시료에 대한 귀하의 의견을 가장 잘 표시한 란에 그 시료에 대한 code를 표시해 주십시오.

1. 외관의 기호도

( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

대단히 낮음 보통 대단히 높음

2. 냄새(flavor)의 기호도

( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

대단히 낮음 보통 대단히 높음

3. 맛(taste)의 기호도

( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

대단히 낮음 보통 대단히 높음

스타터를 이용하여 제조한 케퍼의 당첨가 비율을 결정하기 위한 2차 관능검사가 수행 되었는데, 1차 관능검사를 바탕으로 하여 당첨가 비율의 결정과 케퍼맛에 익숙한 사람을 대상으로 한 관능검사가 이루어졌다. 관능검사에 이용된 케퍼의 제조는 케퍼그레인을 이용하여 만든 케퍼를 스타터로 사용하여 케퍼를 만들었다. 케퍼를 만들기 위하여 90% 시유에 2%의 탈지분유와 백설탕(3, 4, 7%)을 첨가하여 교반하고

이 액을 4℃ 냉장고에 넣어 overnight한 다음 중탕으로 온도를 올려 가면서 100℃가 된 후에 30분 살균한 우유에 4%의 케퍼스타터를 넣어 25℃에서 발효하였다. 이때 발효는 스타터가 접종된 우유의 pH가 4.5정도 일 때 냉각하여 관능검사 시료로 사용하였다.

케퍼스타터를 이용하여 제조한 케퍼의 3차 관능검사는 2차 관능검사에서 선택된 케퍼를 만드는 케퍼그레인(A, H, I type)을 이용하여 케퍼를 제조한 다음 만들어진 케퍼를 스타터로 사용하여 케퍼를 제조하였다. 이때 사용된 우유는 2차 관능검사에서 사용한 우유를 같은 방법으로 제조하여 사용하였다. 또한 시중의 유업회사에서 구입한 플레인 요구르트를 스타터로 TEFAL사의 요구르트제조기를 이용하여 제조한 요구르트를 대조군으로 사용하였다.

제 3 절 케퍼그레인의 보급시스템 개발

1. 케퍼그레인 증체를 위한 조건 조사 실험

가. 케퍼 제조시 숙성단계가 케퍼그레인의 증체에 미치는 영향 조사 실험 : 케퍼 제조시 숙성단계가 케퍼그레인의 증체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B와 F type의 케퍼그레인을 5, 10, 15% 시유 200ml에 접종한 후, 숙성배양의 경우, 상온에서 24시간 배양한 후 4℃에서 12시간 숙성하였고, 비숙성 배양의 경우, 상온에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 그레인을 씻고, 다시 시유에 계대배양 하였다.

나. 접종량 및 발효온도가 케퍼그레인의 증체량에 미치는 영향 조사 실험 : 접종량이 케퍼그레인의 증체량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 B와 F type의 케퍼그레인을 100ml 우유에 5, 10, 15%(w/w) 접종하여 25℃에서 48시간 배양 후, 케퍼그레인을 물로 씻고 무게를 측정하였다. 발효온도가 케퍼그레인의 증체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 95ml의 신선한 우유에 케퍼그레인 A, B, F, H, I 및 J type의 케퍼그레인을 5g 접종하였고, 20, 25, 30, 35℃의 배양기에서 24시간 배양한 후, 0, 24, 48, 72시간 후 케퍼그레인의 무게를 측정하였다.

다. 당성분 첨가에 따른 케퍼그레인의 증체량 조사 실험 : 시유와 10% 환원 탈지유, 10% 환원 탈지유+sucrose 3%, 10% 환원 탈지유+lactose 3%, 10% 환원 탈지유+glucose 3%+galactose 3%와 같은 당성분 첨가 배지를 제조 후, 121℃에서 멸

균하였고, A, B, F, H, I, J type의 케퍼그레인을 95ml의 각 배지에 5g 접종하여 25℃, 48시간 배양후, 케퍼그레인의 무게를 측정하였다.

2. 케퍼그레인의 저장성 실험

가. 케퍼그레인의 저장이 케퍼그레인의 형태 및 발효능력에 미치는 영향 : 케퍼그레인의 동결건조와 같은 저장 후 케퍼그레인의 형태가 동결건조 전의 원 상태와 같이 복원이 되는지 또한 저장 후 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조시 산생성능력과 같은 발효능력은 어떠한지 알아보기 위하여 케퍼그레인의 저장성 실험을 실시하였다. 먼저 저장후의 케퍼그레인 형태유지 여부를 알아보기 위하여 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type 각각 370g씩을 환원탈지유 1000ml와 혼합하여 20 X 30cm의 평판에 담아 동결건조기를 이용하여 동결건조 시킨 후 동결건조한 케퍼그레인을 이용하여 케퍼를 제조 하였을 때 케퍼그레인의 형태가 유지되는지 관찰하였다. 케퍼그레인의 저장실험은 케퍼그레인을 -20℃에서 6개월 동안 냉동보관 한 것, (10% 환원탈지유 100ml을 첨가한) 케퍼그레인을 6개월 동안 냉동보관 한 것, (10% 환원탈지유 100ml을 첨가한) 케퍼그레인을 3개월 동안 냉장보관한 것을 자연해동 시킨 후 시유에 접종하여 25℃에서 발효시키면서 산생성 능력을 측정하였다. 또한 동결건조 시킨 케퍼그레인을 3개월 후에 시유에 접종하여 케퍼생산 능력의 측정 및 케퍼그레인의 형태보존을 관찰하였다. 냉장, 냉동한 케퍼그레인의 산생성능력 실험은 3회 계대배양한 후 실시하였다.

나. 동결건조 전·후의 케퍼그레인 미생물 균수의 측정 : 동결건조 후의 케퍼그레인의 미생물 균수의 변화를 알아보기 위하여 수집된 케퍼 그레인을 각각 1g씩 10% 환원탈지유 2 mL와 함께 유리관에 담아 동결건조기(Bondiro, 일신엔지니어링, Korea)로 동결건조한 다음 진공상태에서 유리관을 밀봉하였다. 케퍼그레인의 동결건조 전의 일반세균수 측정은 케퍼그레인 일반세균수 측정방법을 그대로 이용하였고, 동결건조 후 케퍼그레인의 일반세균수 측정은 제조된 케퍼그레인 동결건조 vial을 깨뜨린 후, 내용물을 10ml 희석액(pepton dilution buffer)에 담아 standard homogenizer를 이용하여 homogenization 시킨 다음 pepton dilution buffer에 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}으로 희석한 다음 각각 다른 다섯 가지의 배지(PCA, MRS, M17, Rogosa,

APT)에서 동결건조 전의 일반 세균수 및 효모 균수를 측정하였다.

3. 케퍼 제조기계의 개발

케퍼그레인을 이용한 케퍼 제조기계의 제작은 케퍼그레인을 이용한 케퍼 자가제조 시스템 개발 실험결과를 토대로 하여 최대한 발효와 냉각이 자동시스템으로 가능하도록 그리고 발효기 부피를 고려하여 2가지 크기의 케퍼 제조기계를 시중 기계제조 회사에 의뢰 하여 제작 하였다.

제 4 절 케퍼 및 케퍼그레인의 항균성 및 항종양 조사 실험

1. 케퍼의 병원성균에 대한 항균성 조사(*in vitro* test)

서울과 경기도 지역에서 수집한 케퍼 그레인들을 특징적인 모양에 따라 6종류를 선별하였고 시중에서 구입한 시유에 각각 5%씩 접종한 후 25℃에서 24시간 배양하여 케퍼를 제조하였다. 케퍼그레인을 분리한 케퍼를 3,500 rpm에서 10분간 원심분리한 상등액과, 이를 0.2㎛, syringe filter로 정밀여과한 상등액을 각각 제조하여 항균 활성용 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 병원성 미생물은 Table 3와 같았고, 각각의 최적배지에서 O.D. 0.8수준으로 배양하여 사용하였으며 항균성 평가는 paper disc 방법으로 실시하였다.

Table 3. Kinds of media and growth temperature of pathogenic microorganismms

Pathogenic Microorganisms	Media (Growth Temperature)
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894	Trypticase soybean broth (37℃)
Staphlyococcus aureus KFRI 188	Nutrient broth (37℃)
Salmonella typhimurium KFRI 251	Nutrient broth (37℃)
Pseudomonas auruginosa KFRI 190	Nutrient broth (37℃)
Bacillus cereus KFRI 181	Nutrient broth (30℃)
Candida albicans KFRI 432	YM broth (25℃)
Listeria monocytogenes KFRI 799	Brain heart infusion broth (37℃)

또한 케퍼 타입중 paper disc방법에서 좋은 항균효과를 보인 케퍼그레인을 선발하여 제조한 케퍼를 다시 시유에 5% 접종하고, 병원성 미생물을 10^5 cfu/mL 수준으로 함께 접종한 다음 1, 2, 3, 6, 9, 12, 16, 20일째에 시료를 채취하여 pH와 일반세균수 및 병원성 미생물수를 측정하였다. 병원성 미생물로는 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894와 *Listeria monocytogenes* KFRI 799, 그리고 *Staphylococcus aureus* KFRI 188 균주를 사용하였다.

2. 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 세포독성 실험

케퍼 그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 암세포 억제능력 여부를 확인하고 그 중에 세포독성 활성이 뛰어난 케퍼 그레인을 선발하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 항균실험과 동일한 방법으로 6종류의 케퍼 그레인을 시유에 각각 5%씩 접종하고 24시간 배양한 다음 배양액을 24시간 냉장 숙성하였다. 이를 5 N NaOH 용액으로 pH 7.0으로 조정하였고, 충분히 교반 후 냉장에서 12시간 이상 숙성시킨 다음 5 ℃에서 8,000 rpm (7,080 g)으로 원심분리하였다. 회수된 상등액을 Whatman Filter paper No. 1으로 여과하였고, 여과된 용액을 끓는 물에 중탕으로 15분간 살균한 다음 2차 원심분리하여 응고물을 가라앉히고 회수된 상등액을 최종 시

료로 사용하였다. 대장암 세포주는 부착세포인 SNU-C4를 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 FBS 10% 가 함유된 RPMI 1640 배지로 3일에 한번씩 계대 배양하면서 3회 이상 반복한 후 실험에 사용하였다. 세포의 농도를 $1x10^4$/ mL 로 조정한 배지 180㎕와 단계별로 희석한 시료 20㎕을 96 well plate에 같이 분주하였으며, 37℃에서 3일간 CO_2 배양기에서 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO로 30분간 용해하였다. ELISA Reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 여기에서 배지에 시료만 첨가했을 때의 흡광도를 뺀 값을 시료의 흡광도로 산정하였다.

3. 케퍼 및 케퍼그레인의 항종양효과 분석을 위한 동물실험

가. 시료준비 및 실험군 : 본 실험에서는 케퍼발효액의 항종양효능을 시험하고자 케퍼발효액 H와 A를 중량기준으로 각각 15% 첨가군과 케퍼발효액 H 15% 첨가한 군에 추가로 동결건조한 케퍼그레인 H를 1% 첨가한 군으로 하여 펠렛식이를 제조하였다. 대조군중 陰性(negative) 群은 암세포주와 케퍼발효액을 주사하거나 투여하지 않은 순수대조군인 반면, 陽性(posititive) 群은 암세포주만 주사하고 케퍼발효액은 급여하지 않았다(Table 4).

나. 동물실험 : 평균체중이 30.0~31.0g된 마우스(BALB/c mouse)를 150수를 구입하여 한국식품개발연구원 동물실험실에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 마우스사료(AIN-diet)를 표준식이로 하여 식이와 물은 무제한(*ad libitum*) 급여하였고, 조명주기(light/dark cycle)는 12 시간으로 조절하였다. 마우스의 체중이 31.25±0.79g되었을 때 난괴법으로 처리군 당 30마리씩 배치하여 4주간 실험하였다. 시험기간 중 체중과 식이섭취량은 1주일에 한번씩 측정하였다.

Table 4. 실험용 쥐의 공시체중과 사료 처리내용

식이군(n)*	공시체중(g)	사료 처리내용
A (28)	31.38±4.23	케퍼발효액 H 15% 첨가
B (30)	30.67±4.42	케퍼발효액 A 15% 첨가
C (29)	31.25±3.97	케퍼발효액 H 15% + F.D 1% 첨가
D (29)	32.48±5.16	양성대조군**
E (28)	30.46±5.48	음성대조군***

* 실험배치 두수
** 암세포주(Sarcoma 180) 투여군
*** 암세포주 무투여 및 케퍼발효액 무첨가군(순수 대조군)
E군을 제외한 시험군은 암세포주(Sarcoma 180, $5x10^5/ml$, 200*ul*)를 鼠蹊部에 투여함

다. 조사항목 및 분석방법 : 성장률, 폐사율, 장기무게, 혈액학치와 혈청지질, 胎生癌腫抗原(CEA), 해부시 육안소견 등을 조사하였고, 혈액학치와 지질함량은 각각 혈구자동분석기와 효소킷(enzyme kit)을 이용하여 측정하였다. 혈청의 胎生癌腫抗原(CEA, carcinoembryonic antigen) 검사는 CEA kit(Bayer Co.)를 이용하여 ADVIA Cenaur(Model No. Cenaur, USA) 분석기로 측정하였다.

라. 통계처리 : 실험결과는 SAS package를 이용하여 실험군당 Mean±S.D.로 표시하였고, 실험군간 평균치의 통계적인 유의성은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

제 3 장 연구개발 결과 및 고찰

제 1 절 케퍼그레인의 특성 및 균총조사

1. 케퍼그레인의 형태학적 특성조사

국내 서울과 경기도 지역에서 수집한 케퍼 그레인들을 형태별로 분류하여 10종류로 나누었고, 이들 중 고유의 특징적인 형태를 보이는 시료 6개(A, B, F, H, I, J)를 선발하였다. 수집장소와 형태적인 특성은 Table 5 및 Fig. 1과 같았다. 수집된 케퍼 그레인은 포도송이같이 알갱이가 뭉쳐있는 모양도 있었고, 나뭇잎, 융털, 좁쌀, 또는 수건같이 납작한 모양도 있었다.

Table 5. Morphology of kefir grains collected from Korean domestic area

Kefir grain	Collected area	Shape of kefir grain
A	Bucheon, Gyeonggi-do	Villus shape
B	Toekyewon, Gyeonggi-do	Grape shape
C	Toekyewon, Gyeonggi-do	Large grain of B type
D	Toekyewon, Gyeonggi-do	Dish shape of B type
E	Mixture of A and F type	Villus shape + Leaf shape
F	Bundang, Gyeonggi-do	Leaf shape
G	Seoul	Villus shape
H	Seoul	Hulled millet shape
I	Purchased from K Company	Hulled millet shape
J	Uijeongbu, Gyeonggi-do	Towel shape

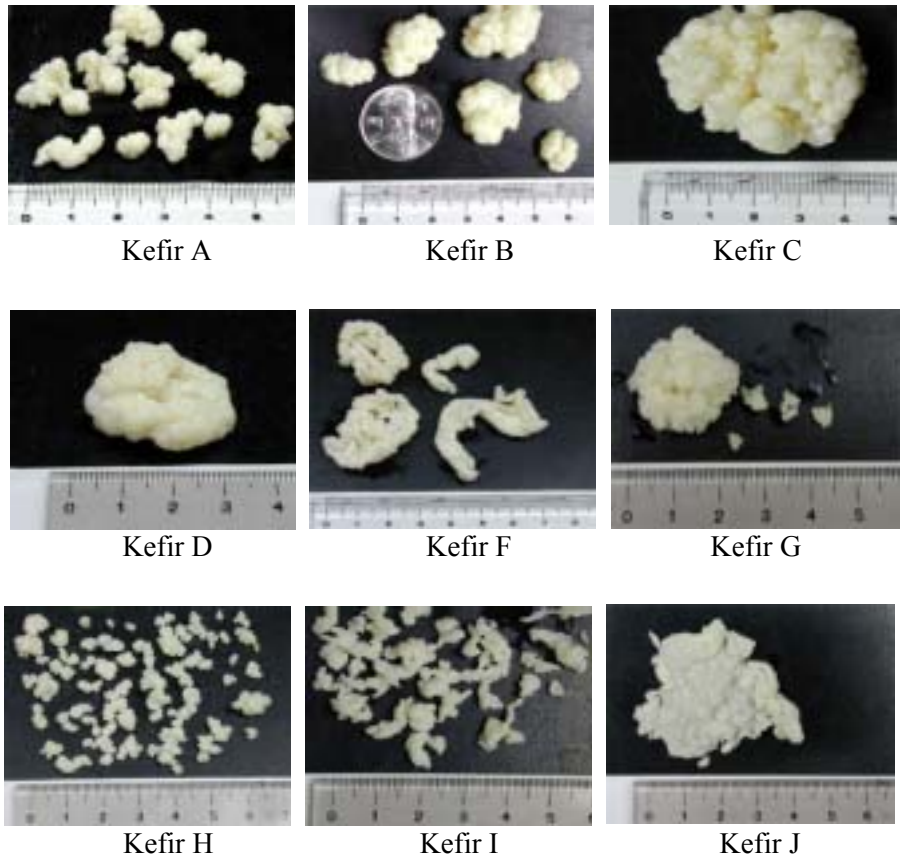


Fig. 1 Photographs of the collected Kefir grains in Korean domestic areas

수집한 케퍼 그레인의 크기는 대체적으로 5 mm 부터 40 mm 까지 다양하였고, 젤라틴 같이 끈끈한 점성을 갖고 있었으나 표면은 고무 같은 탄력이 있었다. 이들 케퍼 그레인을 시유에 첨가하여 매주 1~2회 상온에서 1일간 발효시킨 후 냉장고에 보존하면서 실험에 이용하였다. Fig. 1은 수집된 케퍼 그레인의 초기 형태를 보여주고 있으며, 계속적인 발효실험과 케퍼 그레인의 성장 조건을 찾는 실험과정을 거치면서 형태상의 변화를 가져왔는데, 6개월 후에는 그레인 고유의 형태적인 특성 차이가 점점 없어지는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

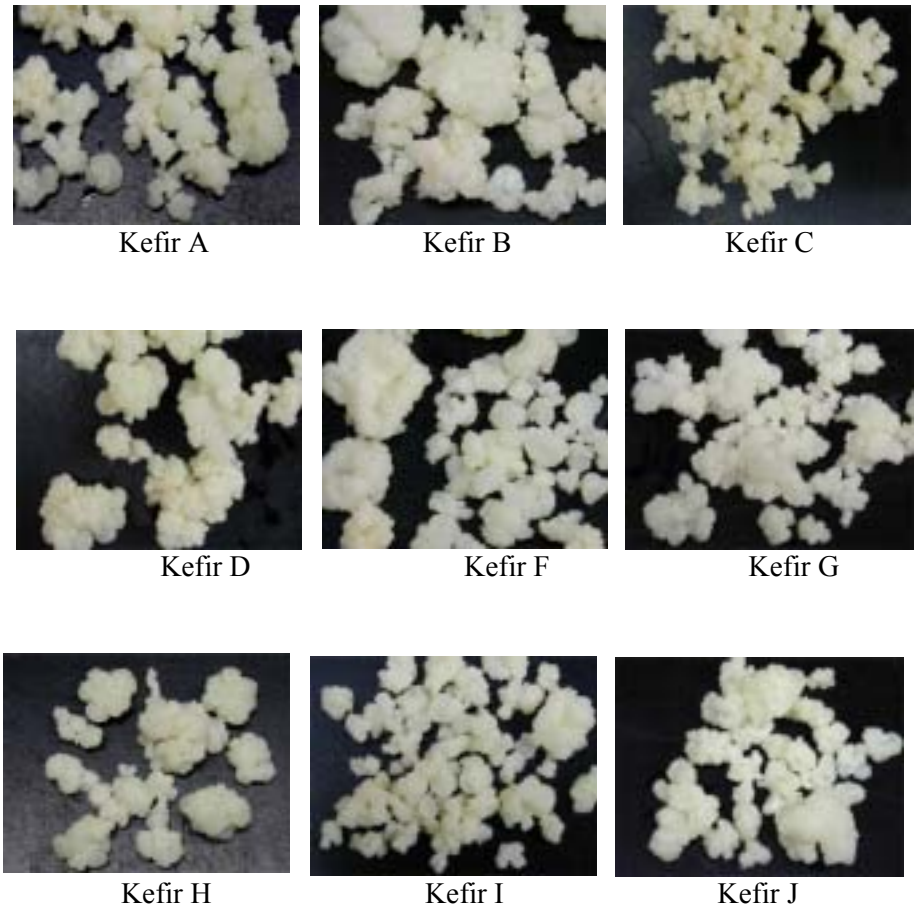


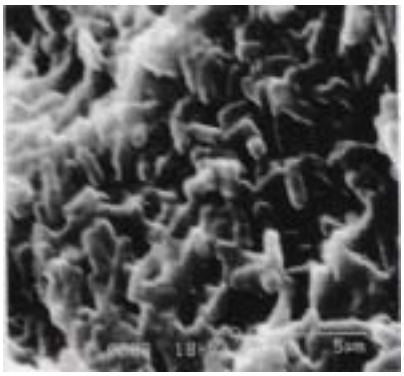
Fig. 2 Photographs of the collected Kefir grains in Korean domestic area after 6 month fermentation

Fig. 3은 케퍼그레인 A와 H의 전자현미경 사진을 보여주고 있다. 왼쪽의 사진에 보여주는 막대기 크기는 1 mm로서 주름잡힌 표면형상을 보여주고 있으며, 오른쪽의 사진은 더욱 크게 확대한 사진으로서 막대기의 크기는 5 μm로서 간균 모양의 세균이 분포되어 있는 것을 알 수 있다. 그러나 효모의 모양은 뚜렷하게 관찰되지 않았다.

가. 케퍼그레인 A 표면

나. 케퍼그레인 A 표면의 미생물

다. 케퍼그레인 H 표면



라. 케퍼그레인 H 표면의 미생물

Fig. 3. 케퍼그레인 A(가, 나) 와 H(다, 라)의 전자현미경 사진

2. 케퍼그레인의 미생물 균수의 측정

국내에서 수집된 케퍼 그레인을 균질화하여 5종류의 배지(SPC, MRS, M17, Rogosa, APT 한천배지)에 희석 도말하여 나타난 일반세균과 효모를 균락의 크기로 분별하여 계수한 결과는 Table 6과 같다. 일반세균은 전체적으로 10^8 cfu/mL 수준

이었고, 효모는 10^6~10^7 cfu/mL 수준이었다. Koroleva(1988)는 케퍼 그레인 starter 중 중온성 homo형 젖산구균의 농도가 10^8~10^9 cfu/mL 정도이고 고온성 젖산간균은 10^5 cfu/mL, hetero형 젖산구균이 10^7~10^8 cfu/mL, 그리고 효모와 초산균이 각각 10^5~10^6 cfu/mL의 농도로 들어있는 것이 케퍼 제조용으로 적합하다고 하였는데, 수집된 케퍼 그레인의 미생물 측정 결과는 젖산균의 농도는 이와 비교하여 낮은 편이었고, 효모는 다소 높은 것으로 나타났다.

Table 6. Viable cells of bacteria and yeast in Kefir grains on various media

Media \ Kefir Grains		A	B	F	H	I	J
Bacteria	SPC	2.0×10^8	1.1×10^8	1.4×10^8	1.9×10^8	9.8×10^7	9.8×10^7
	MRS	2.8×10^8	2.7×10^8	2.5×10^8	3.4×10^8	8.8×10^7	1.6×10^8
	M17	2.4×10^6	6.9×10^7	1.8×10^7	1.1×10^8	$< 10^4$	3.5×10^7
	Rogosa	3.6×10^8	9.6×10^7	2.7×10^8	2.9×10^8	9.0×10^7	2.0×10^8
	APT	2.2×10^7	8.8×10^7	1.4×10^7	1.8×10^8	2.8×10^7	3.7×10^7
	petrifilm[1)]	2.6×10^8	5.3×10^8	3.9×10^8	3.0×10^8	3.0×10^7	3.7×10^8
Yeast	SPC	5.8×10^6	5.1×10^7	5.0×10^5	3.4×10^6	2.1×10^6	3.9×10^6
	MRS	3.9×10^7	4.0×10^6	5.8×10^5	1.2×10^6	6.9×10^6	1.0×10^6
	M17	4.6×10^7	4.8×10^6	1.1×10^6	1.3×10^6	3.6×10^6	1.4×10^6
	Rogosa	8.1×10^6	3.9×10^6	6.5×10^5	2.2×10^6	9.1×10^7	1.6×10^6
	APT	5.9×10^6	4.2×10^6	1.1×10^5	1.7×10^6	3.7×10^6	3.4×10^6
	petrifilm[2)]	4.0×10^7	1.8×10^7	5.5×10^7	1.7×10^8	4.5×10^7	5.2×10^7

[1)] petrifilm for aerobic bacteria (3M, USA)
[2)] petrifilm for yeast & mold (3M, USA)

3. 케퍼그레인의 미생물 동정 및 균총 조사

케퍼그레인의 균수측정에 사용되었던 SPC 한천배지로부터 40-50개의 콜로니를 보인 평판의 모든 콜로니를 순수 분리하여 1차적으로 균주의 형태 관찰과 균락의 성상 관찰, Gram 염색, Catalase 검사, Oxidase 검사를 실시하여 미생물 동정을 실시하였고, 2차적으로 젖산균 미생물 동정 kit인 API 50 CHL(Biomerieux, France)을 이용하여 미생물 동정을 한 결과는 Table 7에서 보여주는 것과 같다. 6종류의 케퍼 그레인 모두 *Lactobacillus fermentum* 이 가장 우점종으로 확인되었으며, 그 분포는 41-88%를 점유하는 것으로 나타났다. 그리고 *Lactobacillus brevis*가 2-54%의 점유율을 보였다. 반면, *Leuconostoc* spp.와 *Lactococcus* spp.는 아주 소수만이 검출되었는데, 케퍼균총중 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 중온성 젖산균으로서 우점종이라고 발표한 Simova(2002)의 결과와는 다른 결과를 보였다.

Table 7. Percent(%) occurrence of microbial flora from Kefir grains

Type	**Identification of isolated bacteria**	No. of colonies	**%**
A (41)[1)]	*Lactobacillus fermentum*	17	41.4
	Lactobacillus brevis	22	53.7
	Unidentified bacteria	2	4.9
B (47)	*Lactobacillus fermentum*	31	66.0
	Leuconostoc lactis	1	2.1
	Lactococcus lactis subsp. *lactis*	1	2.1
	Unidentified bacteria	14	29.8
F (52)	*Lactobacillus fermentum*	28	53.9
	Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	3	5.8
	Lactobacillus brevis	1	1.9
	Unidentified bacteria	20	38.4
H (50)	*Lactobacillus fermentum*	40	80.0
	Lactobacillus brevis	6	12.0
	Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	3	6.0
	Unidentified bacteria	2	4.0
I (57)	*Lactobacillus fermentum*	50	87.7
	Leuconostoc lactis	1	1.8
	Lactobacillus brevis	2	3.5
	Lactococcus lactis subsp. *lactis*	1	1.8
	Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	1	1.7
	Unidentified bacteria	2	3.5
J (39)	*Lactobacillus fermentum*	25	64.1
	Labtobacillus brevis	4	10.3
	Unidentified bacteria	10	25.6

[1)] total number of the isolated colonies on SPC agar plates

제 2 절 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 자가제조 시스템 개발

1. 케퍼 자가제조 시스템 개발을 위한 케퍼그레인을 이용한 케퍼의 제조실험

케퍼 그레인을 이용한 케퍼의 자가제조 시스템을 개발하기 위하여 케퍼그레인 중에서 우선적으로 선발된 A, B, F. H. I. J 6가지의 케퍼그레인 접종량(5, 10, 15%)에 따라서 그리고 20, 25, 30℃의 3가지 발효온도에 있어서의 9가지 변수에 의한 케퍼 제조 실험을 한 결과는 표 8에서 표 25까지와 Fig. 4에서 Fig. 15까지 보여주는 것과 같다. 표 8에서 표 16까지는 3가지 케퍼 그레인 접종량(5, 10, 15%)별로 세가지 발효온도(20, 25, 30℃)에서 24시간 발효 시킨 후 10℃에서 48시간 숙성시켰을 때 pH 와 적정산도 값의 측정치를 보여주고 있다. 또한 표 17에서 표 25까지에서는 6가지 케퍼 그레인별로 접종량(5, 10, 15%)을 달리하여 그리고 세가지 발효온도(20, 25, 30℃)에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성 시켰을 때 발효와 숙성기간 중 젖산균수, 일반세균수 그리고 효모균수의 변화를 보여주고 있다. Fig. 4에서 Fig. 15까지에서는 모든 pH, 적정산도값, 젖산균수 그리고 효모균수의 변화를 그래프로 나타내주고 있다. Fig. 4, 6, 8, 10, 12, 14에서 보여 주는 것과 같이 실험에 사용된 모든 케퍼 그레인(A, B, F, H, I, J)의 접종량(5, 10, 15%)별로 값의 변화가 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉, 모든 케퍼그레인 종류에 있어서 15% 접종 하였을 때는 발효온도에 상관없이 12시간 이내에 pH가 4.5 이하로 떨어지고 적정산도 값이 1 가까이 되었다. 반면에 케퍼그레인을 10% 접종하였을 때는 pH가 4.5가 되기 위해서는 12-48 시간이 소요되고, 5% 접종 하였을 때는 12-72 시간이 소요됨을 그래프에서 알 수 있다. Fig. 5, 7, 9, 11, 13, 15에서 보여주고 있는 것같이 발효와 숙성기간 중 젖산균수와 효모균수의 측정에 있어서는 접종량별로 그리고 발효온도별로 뚜렷한 차이를 보여주지 않았다. 젖산균수와 효모균수 모두 24시간 발효기간 중에는 유도기(lag phase) 없이 바로 지수기(log phase)로 넘어가는 경우가 많았고 24시간 이내에 이미 정지기(stationary phase)를 거쳐 사멸기(death phase)로 접어드는 경우가 많았으며 이때에는 10℃ 숙성기간 중에는 더욱 급격한 균수의 하락을 보여주고 있었다.

Table 8. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 5%접종하여 20℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.48	0.45	6.37	0.41	6.42	0.43	6.58	0.49	6.27	0.43	6.39	0.36
3	6.0	0.50	5.99	0.49	5.96	0.45	6.12	0.49	5.87	0.45	6.02	0.45
6	5.58	0.54	5.81	0.52	5.50	0.47	5.81	0.52	5.64	0.49	5.76	0.42
9	5.20	0.59	5.47	0.54	5.49	0.58	5.65	0.49	5.56	0.50	5.51	0.50
12	5.26	0.67	5.54	0.58	5.40	0.59	5.09	0.63	5.26	0.54	5.41	0.52
24	5.15	0.85	4.80	0.88	5.02	0.63	5.28	0.65	4.70	0.90	4.99	0.68
48	4.47	0.90	4.52	0.92	4.58	0.63	4.49	0.68	4.32	0.96	4.56	0.76
72	4.0	0.94	3.91	0.94	4.36	0.70	3.70	0.76	3.85	1.03	4.20	0.81

Table 9. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 5%접종하여 25℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.46	0.43	6.40	0.23	6.74	0.18	6.41	0.22	6.38	0.16	6.30	0.22
3	5.98	0.50	6.07	0.29	6.24	0.23	6.05	0.29	6.12	0.25	6.23	0.31
6	5.44	0.54	5.80	0.38	5.78	0.32	5.57	0.36	5.82	0.32	5.91	0.29
9	5.39	0.50	5.26	0.45	5.48	0.45	5.13	0.45	5.42	0.41	5.49	0.40
12	5.10	0.65	5.05	0.49	5.28	0.50	4.88	0.52	5.10	0.49	5.29	0.43
24	4.78	0.76	4.58	0.54	4.67	0.77	4.38	0.58	4.16	0.65	4.52	0.61
48	4.33	1.05	4.26	0.88	4.34	0.90	4.11	0.90	4.0	0.99	4.10	0.97
72	4.01	1.14	4.00	1.01	4.11	1.13	4.06	1.06	3.93	1.10	4.0	1.05

Table 10. 케피그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 5%접종하여 30℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.20	0.32	6.12	0.32	6.22	0.29	6.22	0.27	6.33	0.36	6.24	0.27
3	5.96	0.38	5.98	0.32	5.95	0.34	5.94	0.32	5.91	-	5.95	-
6	5.75	0.40	5.83	0.36	5.78	0.36	5.35	0.54	5.28	0.63	5.30	0.54
9	5.27	0.47	5.28	0.47	5.30	0.49	4.74	0.54	4.9	0.63	5.27	-
12	4.49	0.81	4.83	0.61	4.56	0.65	4.48	0.63	4.87	0.63	5.03	0.63
24	4.34	0.92	4.53	0.86	4.33	0.96	4.12	0.72	4.13	0.45	4.36	0.81
48	4.10	0.94	4.15	0.90	4.00	0.97	3.97	0.90	3.87	0.90	4.03	0.99
72	4.04	0.96	4.09	0.99	3.98	0.97	3.90	0.99	3.83	1.26	3.98	0.99

Table 11. 케피그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 10%접종하여 20℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.0	0.32	5.8	0.27	5.99	0.29	6.01	0.23	5.89	0.34	6.12	0.27
3	5.83	0.36	5.76	0.36	5.77	0.34	5.73	0.36	5.75	0.38	5.87	0.36
6	5.43	0.49	5.67	0.41	5.69	0.43	5.65	0.40	5.70	0.43	5.69	0.43
9	5.36	0.50	5.37	0.49	5.48	0.45	5.39	0.56	5.30	0.58	5.21	0.56
12	4.97	0.74	4.91	0.58	4.81	0.67	4.78	0.72	4.74	0.63	4.65	0.72
24	4.26	0.94	4.26	0.79	4.32	0.86	4.26	0.8	4.37	0.68	4.24	0.83
48	4.0	1.14	3.98	0.96	3.93	1.06	4.0	1.05	4.21	1.14	4.09	1.03
72	3.85	1.26	3.84	1.08	3.89	1.15	3.87	1.15	3.92	1.14	3.86	1.10

Table12. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 10%접종하여 25℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.12	0.27	6.20	0.27	6.47	0.23	6.20	0.45	6.48	0.20	6.20	0.47
3	5.79	0.41	5.68	0.43	5.71	0.38	5.60	0.50	5.75	0.38	5.57	0.52
6	5.34	0.52	5.29	0.54	5.43	0.58	4.99	0.54	5.52	0.52	5.13	0.56
9	4.79	0.59	4.86	0.63	4.98	0.79	4.73	0.54	5.03	0.70	4.82	0.59
12	4.40	0.72	4.32	0.61	4.57	0.54	4.37	0.65	4.68	0.67	4.63	0.63
24	3.92	0.94	3.83	1.03	3.99	0.90	3.97	0.76	4.03	1.01	4.12	1.14
48	3.59	1.14	3.67	1.23	3.80	1.08	3.75	1.50	3.78	1.21	3.80	1.23
72	3.50	1.35	3.61	1.26	3.71	1.15	3.69	1.62	3.64	1.24	3.51	1.28

Table 13. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 10%접종하여 30℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.01	0.27	6.0	0.29	5.95	0.25	5.98	0.27	5.95	0.27	6.09	0.22
3	5.72	0.34	5.87	0.36	5.89	0.34	5.87	0.32	5.84	0.41	5.89	0.34
6	5.48	0.41	5.71	0.41	5.69	0.38	5.73	0.36	5.75	0.49	5.63	0.41
9	5.30	0.52	5.68	0.43	5.61	0.41	5.60	0.38	5.47	0.52	5.50	0.47
12	4.99	0.59	5.43	0.49	5.48	0.45	5.47	0.45	5.28	0.54	5.44	0.50
24	4.12	1.01	4.65	0.83	4.72	0.67	4.60	0.74	4.55	0.72	4.55	0.81
48	3.75	1.69	4.12	1.41	4.08	1.10	3.96	1.32	4.03	1.41	4.05	1.24
72	3.43	2.45	3.55	1.78	3.55	1.55	3.58	1.75	3.54	1.82	3.56	1.64

Table 14. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 15%접종하여 20℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

산도 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.13	0.29	6.12	0.32	6.0	0.31	6.15	0.31	6.1	0.29	6.1	0.31
3	5.67	0.36	5.74	0.38	5.66	0.38	5.42	0.34	5.41	0.38	5.69	0.41
6	4.88	0.45	4.71	0.47	5.0	0.52	4.96	0.50	4.85	0.47	5.0	0.50
9	4.43	0.70	4.62	0.58	4.48	0.65	4.47	0.63	4.39	0.54	4.87	0.81
12	4.13	0.83	4.0	0.81	4.19	0.83	4.32	0.77	4.02	0.63	4.34	1.06
24	3.95	0.90	3.74	1.06	3.90	1.03	3.99	0.88	3.86	0.85	4.25	1.23
48	3.67	1.24	3.67	1.59	3.83	1.44	3.81	1.41	3.73	1.14	3.92	1.77
72	3.5	1.57	3.58	1.93	3.62	1.78	3.70	1.55	3.52	1.57	3.67	2.38

Table 15. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 15%접종하여 25℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

균수 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	6.3	0.22	6.23	0.32	6.12	0.36	6.0	0.23	5.92		5.90	0.41
3	5.0	0.59	4.96	0.52	4.98	0.56	4.97	0.54	4.97	0.54	4.71	0.63
6	4.31	0.72	4.04	0.79	3.99	0.92	4.2	0.68	3.98	0.86	3.84	1.14
9	3.97	0.86	3.87	1.05	3.53	0.88	3.83	0.81	3.69	1.09	3.59	1.64
12	3.71	1.06	3.59	1.30	3.42	1.03	3.70	0.92	3.43	1.26	3.41	2.31
24	3.57	1.21	3.53	1.73	3.03	1.51	3.52	1.50	3.37	1.57	3.30	2.52
48	3.28	1.37	3.48	1.86	2.99	1.62	3.50	1.62	3.28	1.68	3.25	2.56
72	3.17	1.48	3.39	2.14	2.91	1.66	3.39	1.68	3.23	1.78	3.20	2.65

Table 16. 케피그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 15%접종하여 30℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 pH와 적정산도의 변화

균수 측정 / 발효 시간	A		B		F		H		I		J	
	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)	pH	적정산도 (%)
0	5.98	0.31	5.96	0.29	6.0	0.31	5.89	0.31	5.95	0.31	5.98	0.34
3	5.13	0.47	5.24	0.52	5.25	0.54	5.07	0.45	5.31	0.50	5.28	0.41
6	4.7	0.58	4.61	0.72	4.38	1.10	4.54	0.56	4.69	0.61	4.76	0.81
9	4.1	0.63	4.0	1.51	3.91	1.26	4.25	1.03	4.17	0.88	4.15	1.41
12	3.95	0.72	3.88	1.68	3.60	1.41	3.96	1.14	3.84	1.14	3.96	1.53
24	3.67	1.21	3.59	2.14	3.43	1.60	3.53	1.60	3.28	0.24	3.50	1.80
48	3.50	1.69	3.34	2.38	3.01	1.80	3.20	1.71	3.17	1.51	3.42	2.52
72	3.0	2.25	3.12	3.06	2.75	2.16	2.99	2.14	2.98	1.95	3.20	2.76

Table 17. 케피그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 5%접종하여 20℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^6	10^5	10^3	10^5	10^5	10^3	10^5	10^5	10^3	10^6	10^4	10^3	10^5	10^5	10^3	10^5	10^5	10^3
3	10^7	10^6	10^3	10^6	10^6	10^4	10^5	10^6	10^3	10^7	10^6	10^4	10^6	10^6	10^4	10^6	10^6	10^4
6	10^7	10^7	10^4	10^7	10^7	10^5	10^6	10^7	10^4	10^7	10^7	10^5	10^7	10^7	10^5	10^7	10^7	10^4
9	10^8	10^8	10^4	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^5	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6	10^8	10^8	10^5
12	10^9	10^9	10^5	10^9	10^9	10^7	10^8	10^8	10^5	10^8	10^9	10^7	10^8	10^9	10^7	10^9	10^9	10^6
24	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^9	10^9	10^6	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^7	10^9	10^{10}	10^7
48	10^8	10^{10}	10^7	10^7	10^8	10^5	10^8	10^8	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^8	10^{10}	10^6	10^8	10^9	10^6
72	10^7	10^9	10^5	10^7	10^7	10^5	10^7	10^8	10^5	10^8	10^9	10^5	10^8	10^9	10^5	10^7	10^8	10^6

Table 18. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 5%접종하여 25℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^4	10^4	10^3	10^4	10^3	10^3	10^4	10^5	10^4	10^6	10^4	10^4	10^4	10^4	10^3	10^4	10^3	10^3
3	10^5	10^5	10^3	10^5	10^3	10^4	10^4	10^5	10^5	10^7	10^7	10^6	10^5	10^5	10^3	10^5	10^4	10^3
6	10^6	10^6	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^6	10^5	10^8	10^8	10^6	10^6	105	10^4	10^5	10^4	10^4
9	10^7	10^7	10^5	10^6	10^4	10^4	10^5	10^7	10^5	10^8	10^9	10^6	10^6	107	10^5	10^7	10^5	10^4
12	10^8	10^8	10^6	10^6	10^4	10^5	10^6	10^8	10^6	10^8	10^9	10^7	10^7	107	10^5	10^7	10^6	10^4
24	10^9	10^9	10^7	10^9	10^7	10^6	10^8	10^9	10^6	10^9	10^8	10^7	10^9	109	10^6	10^9	10^9	10^6
48	10^8	10^8	10^6	10^8	10^9	10^6	10^7	10^8	10^7	10^{10}	10^8	10^7	10^9	109	10^7	10^9	10^9	10^8
72	10^7	10^8	10^5	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6	10^9	10^7	10^5	10^8	108	10^6	10^8	10^8	10^7

Table 19. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 5%접종하여 30℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^5	10^4	10^5	10^4	10^6	10^5	10^5	10^6	10^4
3	10^6	10^5	10^5	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^3	10^7	10^4	10^6	10^6	10^6	10^6	10^7	10^7	10^5
6	10^7	10^7	10^6	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^4	10^9	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^8	10^8	10^6
9	10^8	10^8	10^7	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8	10^5	10^9	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^8	10^8	10^6
12	10^8	10^9	10^7	10^8	10^9	10^7	10^8	10^9	10^6	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^7
24	10^9	10^9	10^6	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^7	10^9	10^9	10^7	10^8	10^9	10^7	10^9	10^9	10^7
48	10^8	10^8	10^5	10^7	10^7	10^6	10^7	10^7	10^7	10^8	10^9	10^7	10^8	10^8	10^7	10^9	10^8	10^7
72	10^7	10^8	10^5	10^7	10^7	10^5	10^6	10^7	10^6	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^6

Table 20. 케피그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 10%접종하여 20℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^5	10^5	10^3	10^5	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^4	10^4	10^4	10^5	10^4	10^4	10^5	10^3
3	10^6	10^6	10^4	10^6	10^6	10^3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^5	10^4	10^4	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4
6	10^7	10^7	10^5	10^7	10^7	10^4	10^6	10^7	10^5	10^6	10^6	10^5	10^5	10^7	10^5	10^6	10^7	10^4
9	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^4	10^7	10^8	10^6	10^6	10^6	10^5	10^6	10^8	10^6	10^7	10^8	10^5
12	10^8	10^9	10^6	10^9	10^9	10^5	10^8	10^9	10^7	10^7	10^7	10^6	10^7	10^9	10^7	10^8	10^9	10^6
24	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^6	10^9	10^9	10^6	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^6	10^9	10^9	10^7
48	10^7	10^8	10^7	10^8	10^8	10^7	10^8	10^8	10^6	10^9	10^9	10^7	10^9	10^8	10^5	10^7	10^8	10^5
72	10^7	10^7	10^5	10^6	10^6	10^5	10^8	107	10^5	10^8	10^8	10^6	10^7	10^7	10^5	10^7	10^7	10^5

Table 21. 케피그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 10%접종하여 25℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^4	10^3	10^3	10^5	10^3	10^3	10^5	10^4	10^3	10^5	10^4	10^4	10^5	10^3	10^3	10^5	10^4	10^3
3	10^5	10^4	10^4	10^5	10^4	10^4	10^5	10^4	10^4	10^6	10^6	10^5	10^5	10^4	103	10^6	10^4	10^3
6	10^6	10^6	10^5	10^5	10^4	10^4	10^5	10^5	10^4	10^6	10^6	10^5	10^5	10^4	10^4	10^7	10^5	10^4
9	10^7	10^7	10^5	10^6	10^4	10^4	10^6	10^6	10^4	10^7	10^7	10^5	10^6	10^5	10^4	10^7	10^6	10^5
12	10^8	10^8	10^6	10^6	10^5	10^5	10^7	10^7	10^6	10^7	10^8	10^6	10^7	10^7	10^5	10^7	10^7	10^6
24	10^9	10^9	10^7	10^7	10^6	10^5	10^8	10^8	10^6	10^8	10^9	10^7	10^7	10^7	10^6	10^8	10^7	10^7
48	10^{10}	10^{10}	10^6	10^8	10^8	10^7	10^7	10^8	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^8	10^7	10^6	10^9	10^6	10^6
72	10^9	10^9	10^5	10^7	10^7	10^6	10^7	10^7	10^6	10^8	10^8	10^5	10^8	10^7	10^6	10^8	10^5	10^5

Table 22. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 10%접종하여 30℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3
3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^5	10^3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^3
6	10^6	10^7	10^5	10^6	10^6	10^4	10^6	10^7	10^4	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^4
9	10^8	10^8	10^6	10^7	10^7	10^4	10^7	10^8	10^5	10^7	10^8	10^6	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^5
12	10^9	10^9	10^7	10^8	10^8	10^5	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^7	10^8	10^9	10^7	10^8	10^9	10^6
24	10^{10}	10^{10}	10^6	10^9	10^9	10^6	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7
48	10^9	10^9	10^6	10^9	10^9	10^7	10^{10}	10^{10}	10^6	10^9	10^9	10^6	10^9	10^9	10^6	10^{10}	10^9	10^7
72	10^8	10^8	10^5	10^8	10^8	10^6	10^9	10^9	10^5	10^8	10^8	10^5	10^8	10^8	10^6	10^9	10^8	10^5

Table 23. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 15%접종하여 20℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^6	10^3
3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^7	10^3
6	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^4	10^6	10^7	10^5	10^7	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^7	10^8	10^4
9	10^7	10^8	10^5	10^7	10^8	10^5	10^7	10^8	10^6	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6	10^8	10^9	10^5
12	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^7	10^9	10^{10}	10^6
24	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^6	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7
48	10^8	10^8	10^6	10^{10}	10^{10}	10^7	10^8	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6
72	10^7	10^8	10^5	10^8	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^7	10^9	10^6	10^8	10^8	10^5	10^7	10^8	10^5

Table 24. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 15%접종하여 25℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수, 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^4	10^4	10^3	10^4	10^4	10^3	10^4	10^4	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^4	10^3
3	10^5	10^5	10^4	10^5	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^5	10^4
6	10^6	10^6	10^4	10^6	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^7	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5
9	10^6	10^7	10^5	10^7	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6
12	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^5	10^8	10^8	10^6	10^9	10^9	10^6	10^9	10^9	10^6	10^8	10^9	10^7
24	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^6	10^9	10^9	10^7	10^8	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7
48	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^6	10^7	10^9	10^6	10^8	10^9	10^6	10^{10}	10^{10}	10^6
72	10^8	10^9	10^5	10^8	10^9	10^5	10^8	10^8	10^5	10^7	10^8	10^5	10^7	10^8	10^6	10^8	10^9	10^5

Table 25. 케퍼그레인 A, B, F, H, I, J type을 시유에 15%접종하여 30℃에서 24시간 발효시키고 10℃에서 48시간 숙성시키는 동안의 젖산균수, 일반세균수 및 효모균수의 변화

(LAB : Lactic acid bacteria, AB : Aerobic bacteria, Y : Yeast)

균수 측정 / 발효 시간	A			B			F			H			I			J		
	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y	LAB	AB	Y
0	10^5	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3	10^4	10^5	10^3
3	10^6	10^7	10^3	10^5	10^6	10^3	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^3
6	10^7	10^8	10^4	10^6	10^8	10^4	10^7	10^7	10^5	10^7	10^7	10^5	10^6	10^7	10^5	10^6	10^7	10^4
9	10^8	10^9	10^4	10^7	10^9	10^5	10^8	10^8	10^6	10^8	10^8	10^6	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8	10^5
12	10^9	10^9	10^5	10^8	10^{10}	10^5	10^9	10^9	10^7	10^9	10^9	10^7	10^8	10^9	10^7	10^8	10^9	10^6
24	10^9	10^{10}	10^6	10^9	10^{10}	10^6	10^{10}	10^{10}	10^7	10^9	10^{10}	10^7	10^9	10^9	10^7	10^9	10^{10}	10^7
48	10^8	10^9	10^7	10^9	10^9	10^7	10^9	10^{10}	10^6	10^8	10^{10}	10^6	10^{10}	10^{10}	10^6	10^9	10^9	10^7
72	10^7	10^7	10^5	10^7	10^8	10^6	10^8	10^9	10^6	10^7	10^8	10^5	10^9	10^9	10^5	10^8	10^9	10^6

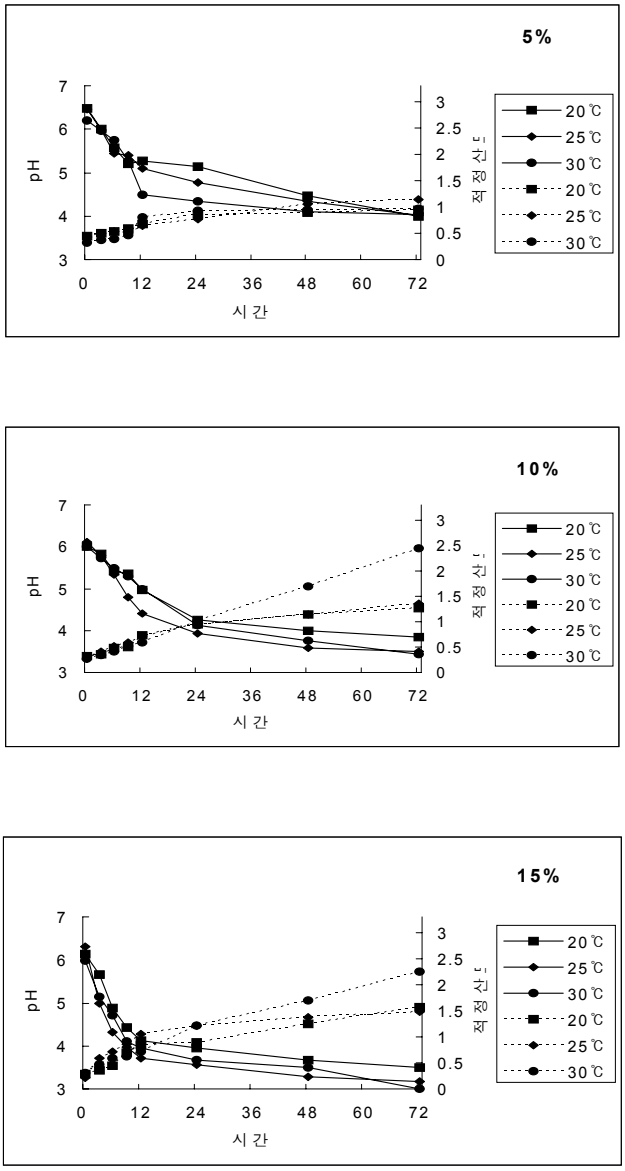


Fig. 4. 케퍼그레인 A type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 pH와 적정산도의 변화

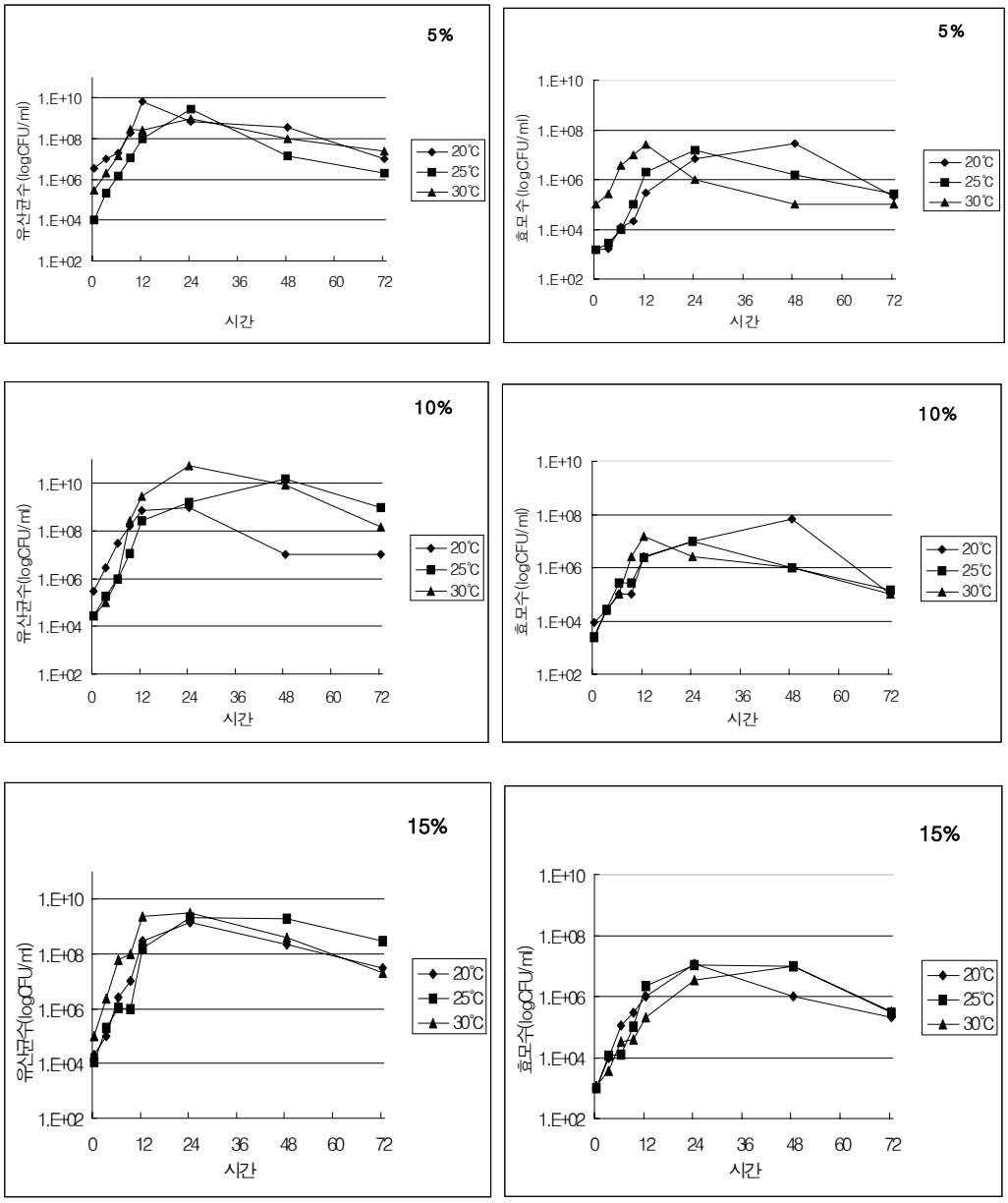


Fig. 5. 케퍼그레인 A type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 젖산균수와 효모균수의 변화

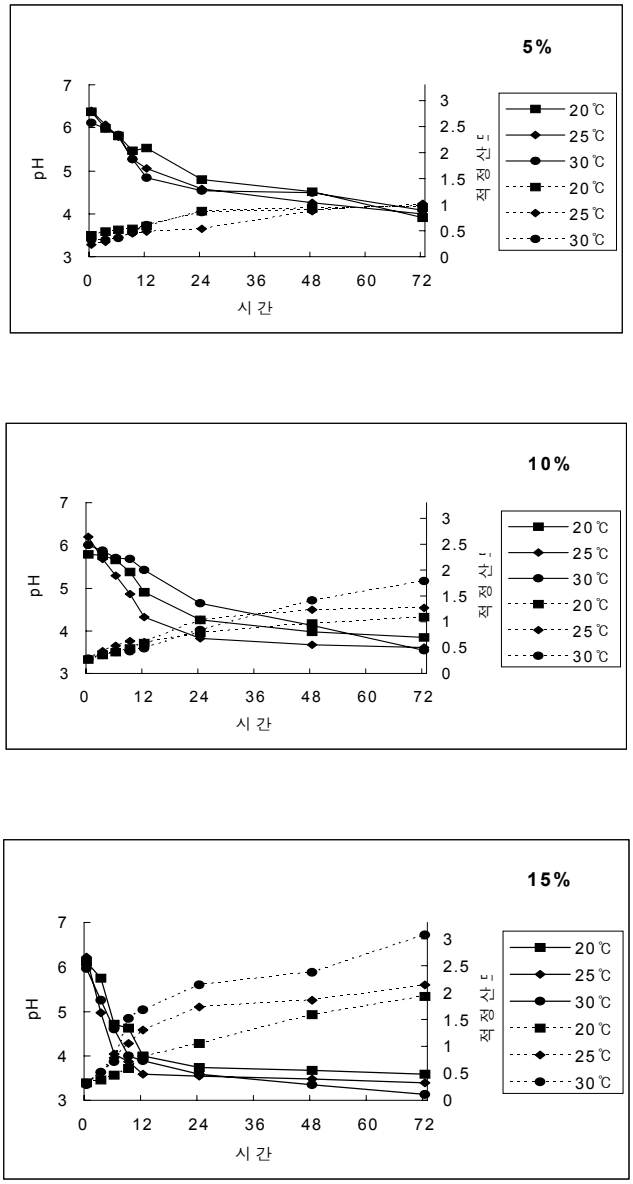


Fig. 6. 케퍼그레인 B type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 pH와 적정산도의 변화

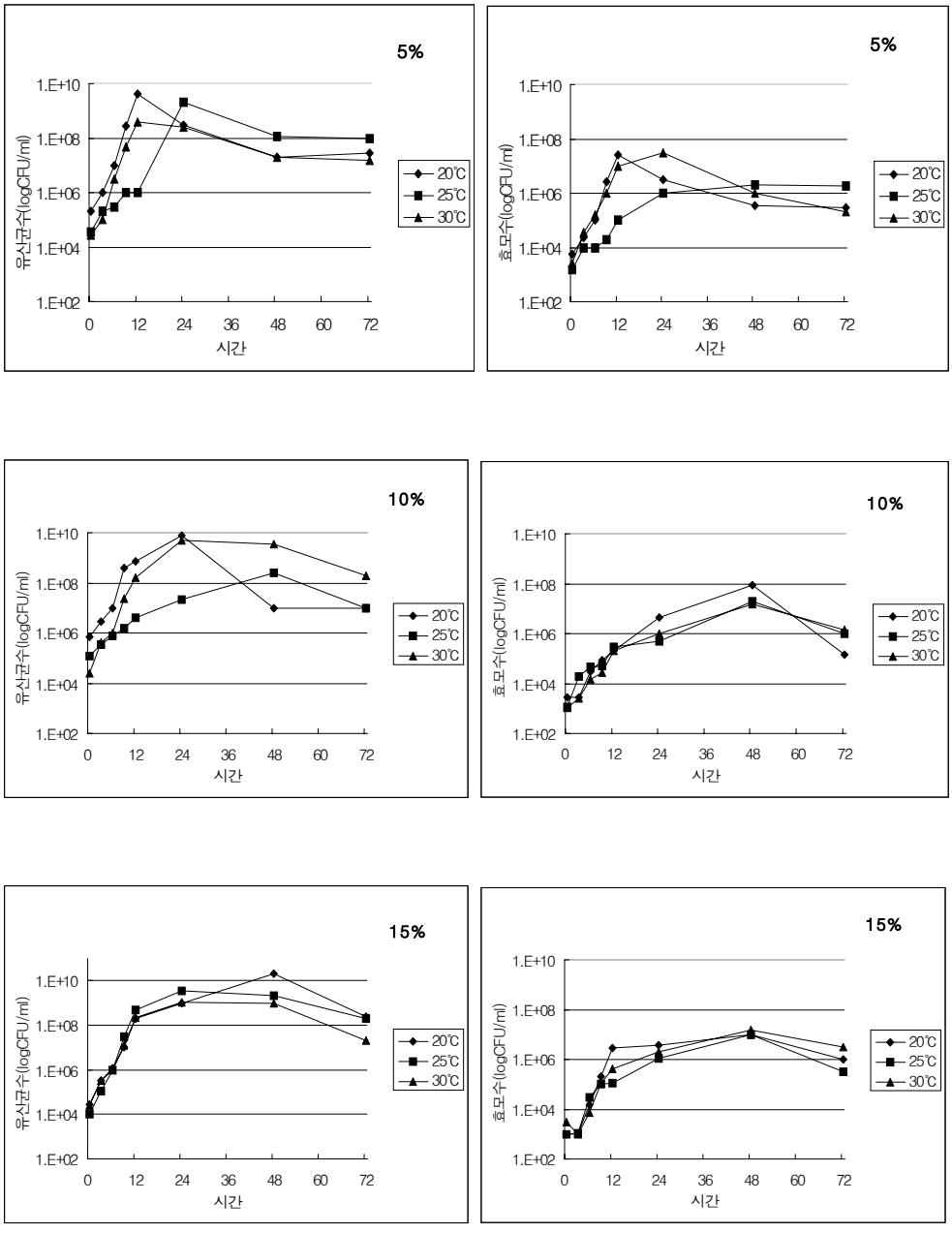


Fig. 7. 케퍼그레인 B type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 젖산균수와 효모균수의 변화

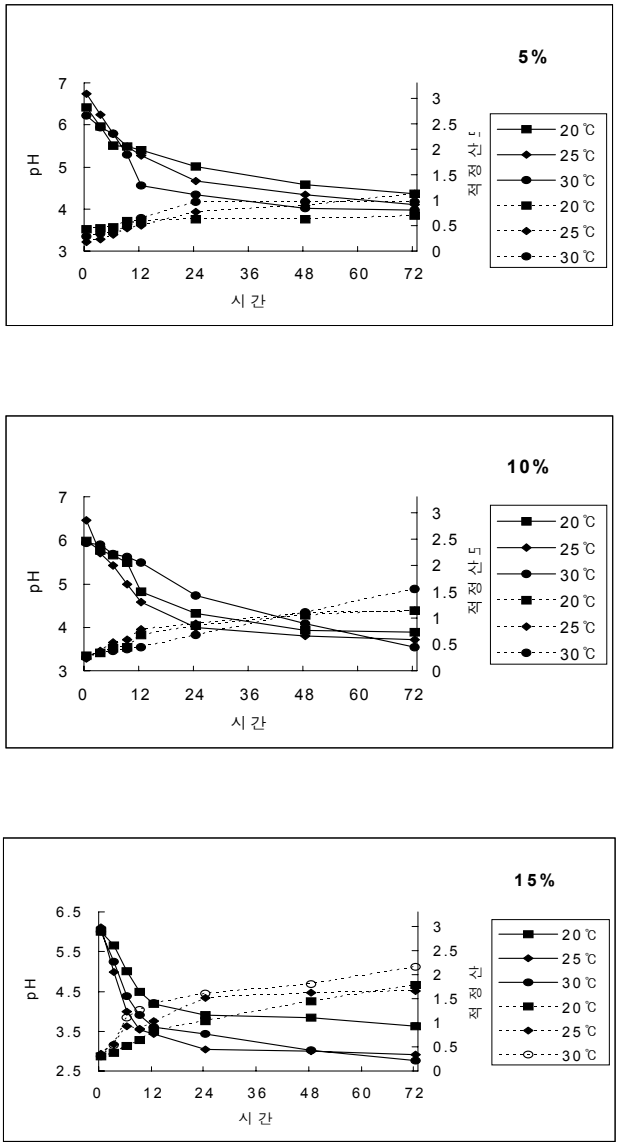


Fig. 8. 케퍼그레인 F type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 pH와 적정산도의 변화

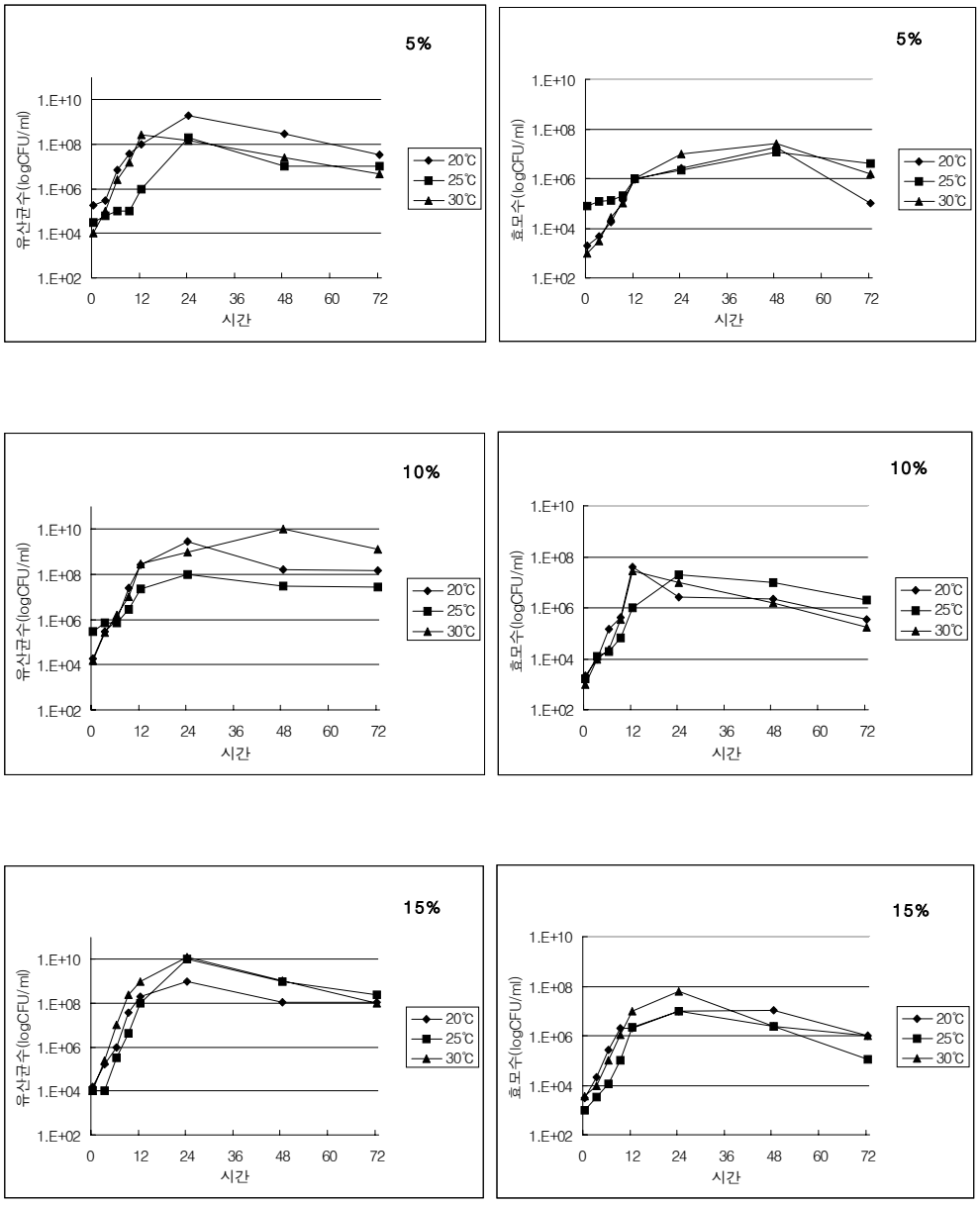


Fig. 9. 케퍼그레인 F type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 젖산균수와 효모균수의 변화

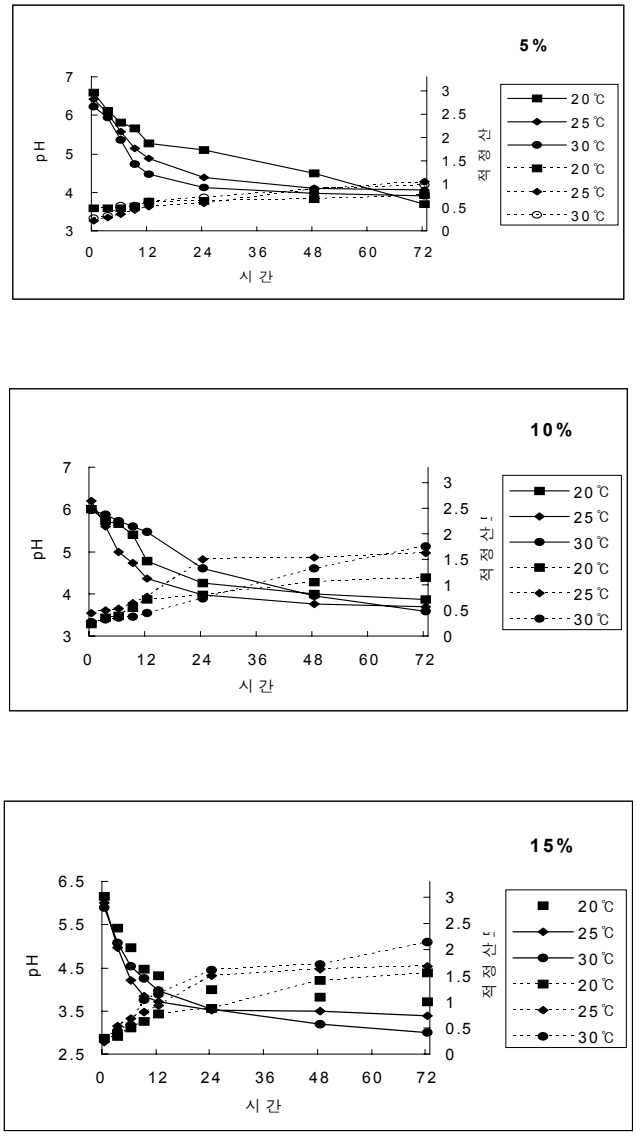


Fig. 10. 케퍼그레인 H type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 pH와 적정산도의 변화

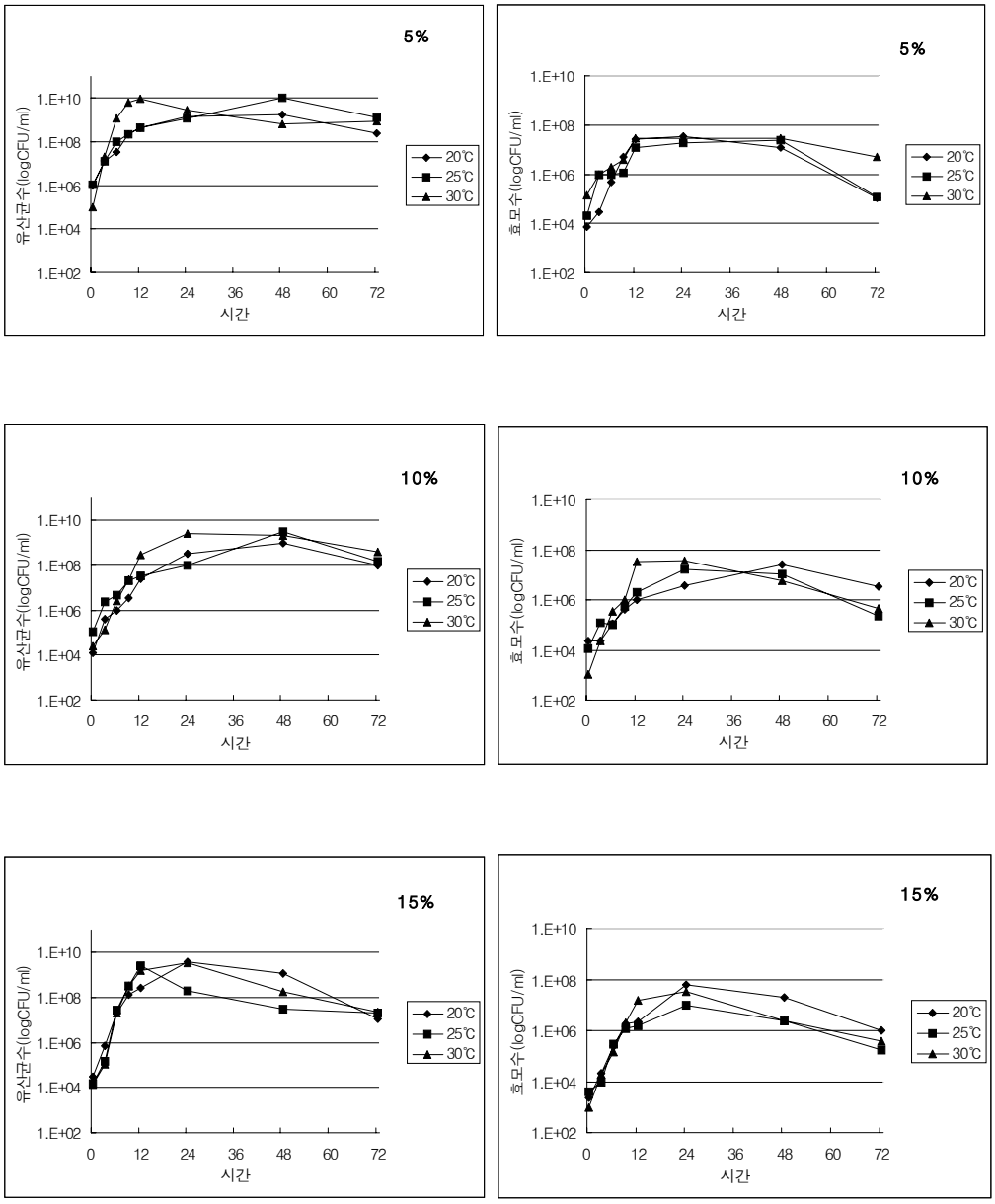


Fig. 11. 케퍼그레인 H type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 젖산균수와 효모균수의 변화

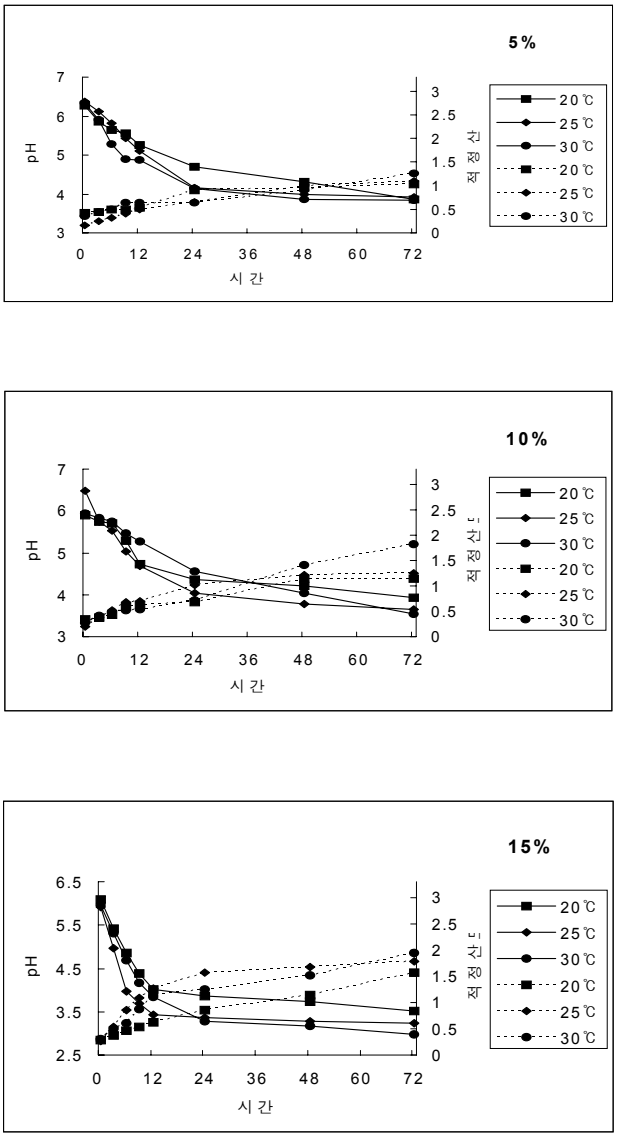


Fig. 12. 케퍼그레인 I type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 pH와 적정산도의 변화

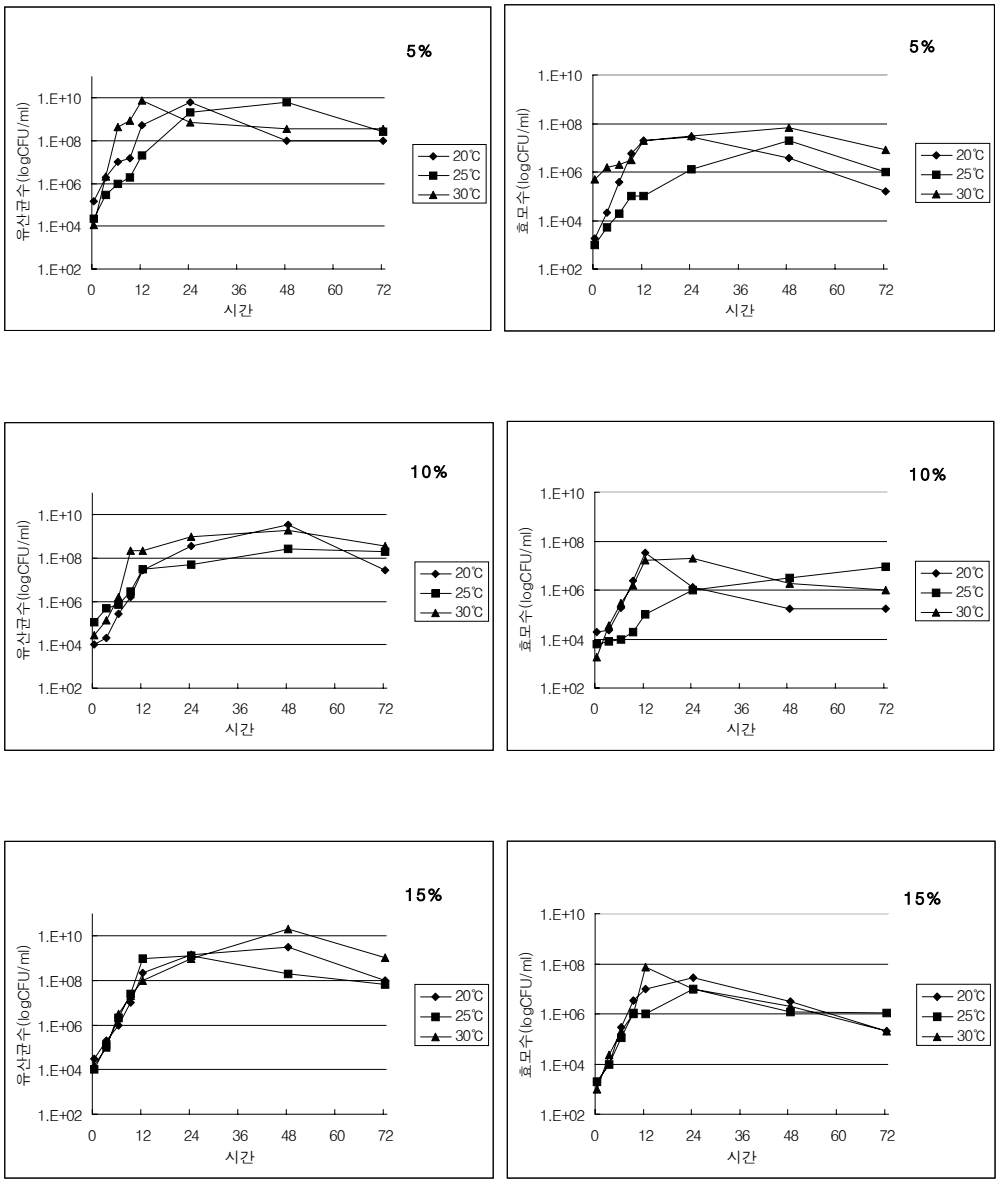


Fig. 13. 케퍼그레인 I type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 젖산균수와 효모균수의 변화

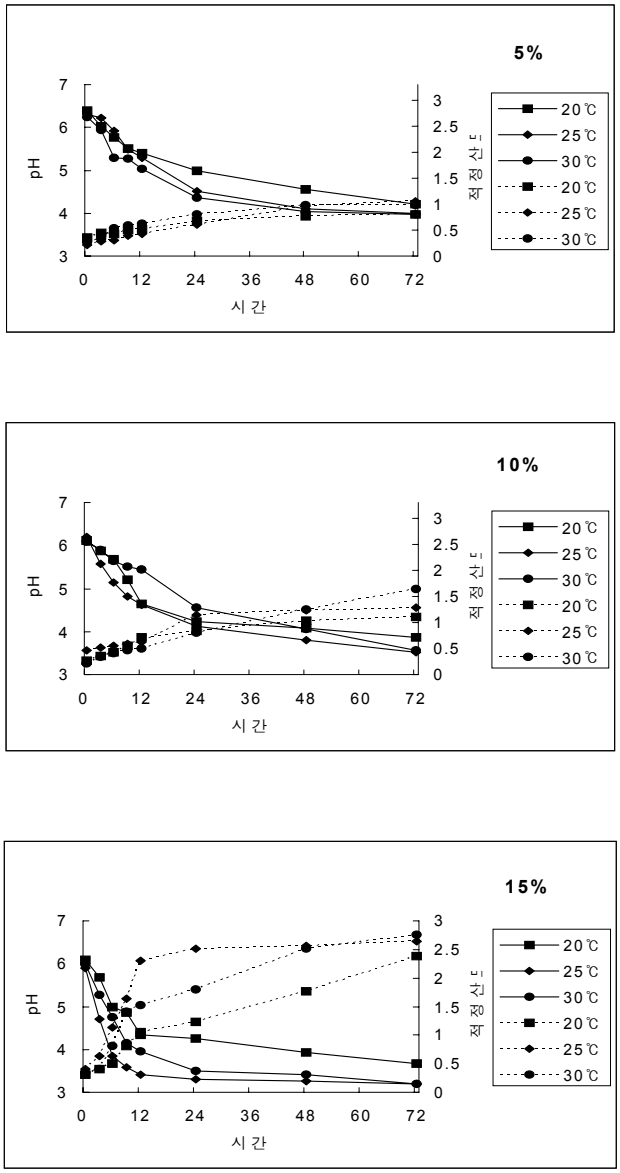


Fig. 14. 케퍼그레인 J type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 pH와 적정산도의 변화

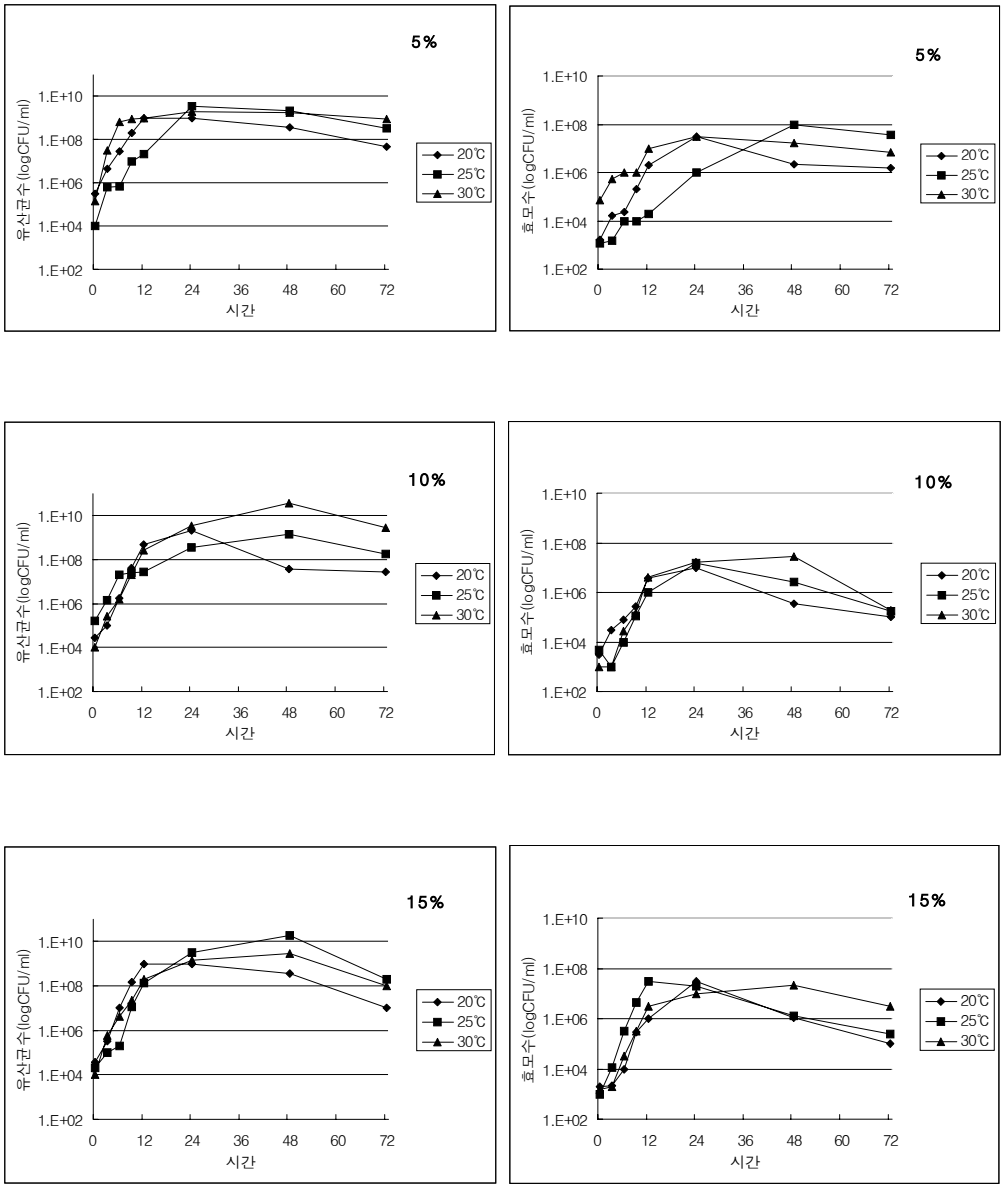


Fig. 15. 케퍼그레인 J type을 5, 10, 15% 접종량별로 20, 25, 30℃의 3가지 온도에서 24시간 발효시킨 후 10℃에서 48시간 숙성하였을 때의 젖산균수와 효모균수의 변화

2. 요구르트 신맛에 대한 기호도 조사

일반인들의 요구르트의 신맛에 대한 기호도를 알고 이를 제품화에 활용하고자 요구르트의 신맛에 대한 기호도를 조사하였다. 기호도 조사에는 남자 242명, 여자 184명 총 426명이 참가하였다. 설문에 응답한 일반인의 성별, 연령별, 최종학력별, 직업별 인원수 및 백분율은 표26에서 보여주는 것과 같다. 또한 각 질문에 대한 항목별 응답자의 인원수 및 전체에 대한 백분율은 표27에서 보여주는 것과 같다. 요구르트의 신맛에 대한 기호도 조사 결과는 요구르트에 대한 자신의 의견을 묻는 질문에는 보통 좋아한다가 136명(전체에 대한 백분율 31.9%)으로 가장 많았으며, 요구르트의 섭취빈도는 평균 일주일에 한 개 이상이 132명(전체에 대한 백분율 31.0%)으로 가장 많았다. 또한 요구르트의 신맛에 대한 의견은 보통 좋아한다가 127명(전체에 대한 백분율 29.8%)으로 나타났으며, 떠먹는 요구르트에 과일을 첨가한다면 어떤 과일을 첨가하는 것이 가장 좋다고 생각하는지에 대한 질문에서는 딸기가 129명(전체에 대한 백분율 30.3%)로 가장 높았고, 그 다음은 복숭아가 81명(전체에 대한 백분율 19.0%)으로 나타났다.

표 26. 요구르트에 대한 기호도 조사 설문에 응답한 성별, 연령별, 최종학력별, 직업별 인원수 및 백분율

질문에 응답한 사람들의 조건	항목별 응답-참여인원 명수 (전체인원에 대한 백분율)
성별	남-242(56.8) 여-184(43.2)
연령	19세 이하- 126(29.6) 29세 이하- 135(31.7) 39세 이하- 51(12.0) 49세 이하- 70(16.4) 59세 이하- 26(6.1) 60세 이상- 18(4.2)
최종학력	초등학교 졸업--- 99(23.3) 중학교 졸업----- 41(9.6) 고등학교 졸업--- 99(23.3) 대학 졸업------- 45(10.6) 대학교 졸업----- 41(9.6) 대학원 이상---- 100(23.5)
직업	공무원---------- 14(3.3) 자영업---------- 18(4.2) 학생---------- 208(48.8) 주부---------- 20(4.7) 회사원---------- 22(5.2) 연구원--------- 117(27.5) 기타---------- 27(6.3)

표 27. 각 질문에 대한 항목별 응답자의 인원수 및 전체에 대한 백분율

질문 항목	각 질문 항목별 응답 (응답자수, 괄호안은 백분율)
요구르트에 대한 귀하의 의견은?	대단히 좋아한다-------82(19.2) 아주 좋아한다---------88(20.7) 보통 좋아한다---------136(31.9) 약간 좋아한다---------54(12.7) 좋아하지도 싫어하지도 않는다-54(12.7) 약간 싫어한다---------8(1.9) 보통 싫어한다---------2(0.5) 아주 싫어한다---------1(0.2) 대단히 싫어한다-------1(0.2)
귀하의 요구르트 섭취 빈도는?	수시로 사 먹는다------89(20.9) 일주일에 세 개 이상---75(17.6) 일주일에 한 개 이상---132(31.0) 한달에 한 개 이상-----80(18.8) 거의 먹지 않는다------47(11.0) 먹지 않는다----------3(0.7)
요구르트의 신맛에 대한 귀하의 의견은?	대단히 좋아한다------48(11.3) 아주 좋아한다---------40(9.4) 보통 좋아한다-------127(29.8) 약간 좋아한다---------88(20.7) 좋아하지도 싫어하지도 않는다-59(13.8) 약간 싫어한다---------40(9.4) 보통 싫어한다---------11(2.6) 아주 싫어한다---------8(1.9) 대단히 싫어한다-------5(1.2)
떠먹는 요구르트에 과일을 첨가한다면 어떤 과일이 가장 좋다고 생각하는가?	사과------28(6.6) 포도------32(7.5) 오렌지----28(6.6) 망고------49(11.5) 복숭아----81(19.0) 귤---------18(4.2) 자두------7(1.6) 파인애플--37(8.7) 딸기-----129(30.3) 기타------17(4.0)

3. 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 관능검사

케퍼그레인을 시유에 5% 접종하여 25℃에서 24시간 배양하고 10℃에서 48시간 숙성하여 만든 케퍼를 가지고 한국식품개발연구원 관능검사실에서 실시한 관능검사의 결과는 표 28에서 보여주는 것과 같다. 실시된 1차 관능검사에는 모두 82명의 패널이 참가하였다. 관능검사 결과 냄새와 맛에 있어서는 케퍼그레인 A, H, I, J type이 같은 수준인 것으로 나타났으며, 조직에서는 케퍼그레인 A, B, H, I, J type이 같은 수준으로 나타났다. 결과적으로 종합적인 기호도는 케퍼그레인 A, H, I, J type이 같은 수준으로 나타났다.

표 28. 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 관능검사 결과

케퍼 그레인 / 관능검사	A	B	F	H	I	J
외관	5.45±1.66^{ab}	5.55±1.47^{ab}	5.23±1.76^{b}	5.83±1.46^{a}	5.57±1.38^{ab}	5.34±1.51^{ab}
냄새	5.60±1.71^{a}	5.05±1.46^{b}	5.01±1.72^{b}	5.43±1.60^{ab}	5.46±1.41^{ab}	5.40±1.64^{ab}
맛	5.17±1.89^{a}	3.82±1.74^{b}	3.39±1.84^{b}	4.90±1.75^{a}	5.00±1.69^{a}	4.68±1.83^{a}
조직	5.55±1.67^{a}	4.88±1.50^{bc}	4.51±1.48^{c}	5.59±1.45^{a}	5.22±1.36^{ab}	5.15±1.45^{ab}
종합	5.49±1.60^{a}	4.20±1.54^{c}	3.39±1.67^{c}	5.05±1.69^{ab}	5.10±1.54^{ab}	4.77±1.80^{b}

케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼를 스타터로 이용하는 케퍼의 제품화를 위한 케퍼의 관능도를 조사하기 위하여 2차 관능검사를 실시하였다. 케퍼그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 1차 관능검사에서는 케퍼그레인의 종류에 따른 케퍼의 일반적인 기호도는 볼 수 있었으나 케퍼의 맛과 향에 익숙하지 않은 패널들의 결과가 바람직하지 않은 판단으로 케퍼의 맛에 익숙한 패널 다섯명을 대상으로 2차 관능검사를 실시하였고, 2차 관능검사에서는 케퍼의 신맛이 너무 강하다는 1차 관능검사 때의 패널들의 의견을 수렴하였다. 케퍼의 제품화를 위한 당의 첨가 비율을 3, 4, 7%로 하여 관능검사를 실시한 결과, 백설탕의 첨가 비율이 3%인 것은 케퍼의 독특한

신맛이 강하여 당을 첨가한 것과 첨가하지 않은것의 차이가 없었으며, 7%의 비율로 당을 첨가한 것은 단맛이 너무 많이 나타나면서 신맛이 거의 느껴지지 않았으나 케퍼특유의 맛과 향이 소실되어 케퍼의 특징을 살리기는 어려웠다. 백설탕 4%를 첨가한 것이 케퍼특유의 향과 맛을 살리면서도 적절한 단맛을 내는 것으로 의견이 모아졌다. 결정된 당첨가 비율대로 백설탕을 4% 첨가하고 탈지분유를 2%첨가한 시유에 케퍼스타터를 접종하여 만든 케퍼의 관능검사 결과 케퍼그레인 B, F, J type은 조직이 거칠고 신맛이 매우 강하며 불쾌취가 있어 제품화에 좋지 않다고 판단되었다. 이러한 관능검사의 결과는 1차 관능검사 시 케퍼그레인 A, H, I, J type이 같은 수준으로 나타난 것과 유사한 결과였다. 따라서 케퍼그레인 A, H, I type을 이용하여 3차 기호도 관능검사를 하였다.

케퍼그레인 A, H, I type을 이용하여 제조된 케퍼스타터를 제조된 우유에 5%접종하여 만든 케퍼를 이용하여 3차 관능검사를 실시하였다. 3차 관능검사에서는 시중 유업회사에서 구입한 플레인 요구르트를 스타터로 사용하고 요구르트 제조기를 이용하여 제조한 요구르트를 대조군으로 사용하였다. 패널 31명을 대상으로 한국식품개발연구원 관능검사실에서 실시한 3차 관능검사의 결과는 표 29에서 보여주는 것과 같다. 표에서 볼 수 있는 것과 같이 케퍼그레인 I type이 외관이 좋지 않은 것으로 나타났고, 시중 유업회사에서 구입하여 대조군으로 사용한 요구르트가 외관의 품질은 가장 좋은 것으로 나타났다. 외관의 품질 이외에 냄새, 맛, 조직에서는 대조군 요구르트를 제외한 케퍼는 같은 수준으로 평가되었으며, 대조군으로 사용한 요구르트는 맛, 조직의 품질에서 케퍼와 비교하여 상대적으로 낮게 평가되었다. 위의 결과들을 종합적으로 평가해 볼 때 케퍼그레인 A, H type이 패널들의 기호도가 가장 높은 것으로 나타났다.

표 29. 케퍼스타터를 이용하여 제조한 케퍼의 3차 관능검사 결과

제품 / 관능검사	A	H	I	요구르트
외관	5.42±1.52^{b}	5.32±1.51^{b}	4.39±1.86^{c}	6.68±1.62^{a}
냄새	5.19±1.66^{a}	5.81±1.47^{a}	5.65±1.62^{a}	5.19±1.40^{a}
맛	5.35±1.72^{a}	5.87±1.84^{a}	5.65±2.03^{a}	3.45±1.73^{b}
조직	5.71±1.35^{a}	5.97±1.49^{a}	5.52±1.69^{a}	4.35±1.87^{b}
종합	5.39±1.75^{a}	6.16±1.51^{a}	5.77±1.56^{a}	3.97±1.68^{b}

제 3 절 케퍼그레인의 보급시스템 개발

1. 케퍼그레인 증체를 위한 조건 조사 실험

케퍼그레인은 새롭게 우유에 계대해 줌에 따라 계속적으로 증체를 하게된다. 케퍼그레인의 보급을 위해서는 최대한 빠른 속도로 케퍼그레인을 키워 줄 필요가 있다. 따라서 케퍼그레인의 증체를 위한 숙성, 비숙성에 따른 영향, 접종량에 따른 영향, 접종온도에 따른 영향 그리고 당첨가에 따른 영향 등 여러가지 조건을 조사하는 실험을 수행 하였다. 표 30은 케퍼 그레인 B와 F type을 이용하여 5, 10, 15%의 접종량별로 숙성 및 비숙성에 따른 케퍼그레인의 증체량을 비교한 실험결과를 보여주고 있다. 표 30에서 보여주는 것과 같이 발효 후 10℃에서의 숙성단계를 거치지 않은 비숙성의 경우 숙성단계를 거쳤을 때보다 사용한 우유의 양으로 비교하였을 때 더 빠른 증식을 보여주고 있음을 알 수 있다. 접종량별로 보았을 때는 접종량이 적을수록 더욱 빠른 증체를 보여주었다(표 30).

표 30. 케퍼그레인 접종량별로 케퍼그레인을 4회 계대배양 하였을 때 숙성과 비숙성에 따른 케퍼그레인의 증체량 비교

(Kefir grain 증체무게, g/우유ml)

케퍼그레인 종류 / 케퍼그레인 접종량	B		F	
	숙성	비숙성	숙성	비숙성
5 %	0.018	0.025	0.025	0.036
10 %	0.015	0.019	0.019	0.032
15 %	0.013	0.018	0.016	0.032

케퍼그레인의 접종량(5, 10, 15%)에 따른 케퍼그레인의 증체량에 미치는 영향을 좀 더 자세하게 알아보기 위하여 시유에 접종량별로 케퍼그레인을 접종하고 10

번 계대배양 하였을 때의 케퍼그레인의 무게를 측정한 측정치를 표 31에서 보여주고 있다. 케퍼그레인의 접종량이 5, 10, 15% 일때 케퍼그레인 B type은 증체율이 각각 189, 165, 142%이었고 F type은 증체율이 각각 264, 219, 169%로서 접종량 비율이 낮아짐에 따라 케퍼그레인 증체율이 높아짐을 확인할 수 있었다(표 31).

표 31. 케퍼그레인의 접종량 및 계대배양횟수에 따른 증체량 비교 실험 결과

(케퍼그레인의 무게, g)

케퍼그레인 접종량 / 계대배양 횟수	B			F		
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
0	5	10	15	5	10	15
1	5.43	10.47	15.51	5.58	11.21	16.32
2	5.61	10.81	16.45	5.94	11.89	17.28
3	5.86	11.26	16.88	6.41	12.86	18.19
4	6.25	11.81	17.51	6.76	13.34	18.57
5	6.46	12.15	17.96	7.44	14.70	19.8
6	6.96	13	18.73	8.38	16.1	20.8
7	7.47	13.86	19.5	9.32	17.47	21.88
8	8.12	14.72	20.07	10.57	18.88	22.96
9	8.77	15.58	20.67	11.82	20.30	24.11
10	9.47	16.48	21.24	13.21	21.88	25.31
케퍼그레인 증체율(%)	189	165	142	264	219	169

케퍼그레인의 증체에 미치는 배양온도의 영향을 알아보기 위한 실험결과는 표 32에서 보여주는 것과 같다. 모든 종류의 케퍼그레인에서 30℃까지는 온도가 높아질수록 증체량이 증가하는 경향을 보여 주었으나 35℃의 발효온도에서는 오히려

증체량이 감소된 것을 표에서 알 수가 있다(표 32).

표 32. 다양한 온도조건에서의 케퍼배양을 통한 그레인 증체량 비교

(케퍼그레인의 증체량, %)

발효 온도 / 케퍼그레인의 발효시간		20℃	25℃	30℃	35℃
A	0hr	100	100	100	100
	24hr	113	116	120	120
	48hr	108	112	113	114
	72hr	119	118	120	113
B	0hr	100	100	100	100
	24hr	108	108	112	110
	48hr	113	113	115	108
	72hr	117	119	119	107
F	0hr	100	100	100	100
	24hr	106	106	106	101
	48hr	116	117	115	111
	72hr	110	113	108	104
H	0hr	100	100	100	100
	24hr	107	109	111	125
	48hr	111	114	116	117
	72hr	113	120	118	115
I	0hr	100	100	100	100
	24hr	113	114	117	122
	48hr	112	113	117	124
	72hr	121	126	131	119
J	0hr	100	100	100	100
	24hr	111	111	121	120
	48hr	115	115	123	119
	72hr	118	123	128	113

당성분 첨가에 따른 케퍼그레인의 증체량 조사 실험결과는 표 33에서 보여주는 것과 같다. 실험에 사용된 모든 케퍼그레인 종류에서 약간의 당첨가 효과가 있음을 표에서 보여주고 있다(표 33).

표 33. 당성분 첨가에 따른 케퍼그레인의 증체량 조사 실험 결과

단위: 증체율(%)

Kefir grain / 당첨가	A	B	F	H	I	J
whole milk	102	105	110	116	117	118
skim milk	108	111	117	119	117	119
skim+lactose 3%	105	110	120	122	116	119
skim+sucrose 3%	107	115	118	122	119	126
skim+glucose 3%+galactose 3%	106	111	115	125	117	121

2. 케퍼그레인의 저장성 실험

케퍼그레인을 저장하기 위한 가장 효율적인 방법을 찾기 위하여 케퍼그레인의 냉장보관, 냉동보관 그리고 동결건조와 같은 보존방법에 따른 케퍼그레인의 보존상태를 조사하였다. 표 34는 케퍼그레인과 환원탈지유를 함께 넣고 동결건조한 케퍼그레인속의 균수를 측정한 결과를 보여주고 있다. 케퍼그레인의 종류에 따라 약간의 차이는 보였으나 일반세균수는 10^7 cfu/g 정도로 나타났으며 효모균은 10^5 cfu/g 정도로 나타났다. 또한 동결건조한 케퍼그레인을 시유에 접종할 경우 약 3일 후 케퍼가 만들어졌으며 이것은 동결건조 시키지 않은 케퍼그레인을 접종하였을 때 약 1일 후 케퍼가 만들어지는 것과는 활력의 차이를 보여주고 있다. 하지만 케퍼가 만들어지고 난 다음 2차 접종 후부터는 동결건조 시키지 않은 케퍼그레인과 비슷한 활력을 나타내어 활력이 2번의 계대배양으로 복귀됨을 알 수 있었다. 형대적으로 볼 때에는 동결건조 시킨 후에도 형태가 없어지지 않고 유지 되었으나, 동결건조 한 케퍼그레인은 동결건조 하지 않은 케퍼그레인에 비하여 색깔이 좀더 노랗고, 수분이 빠져나가 크기가 작고 딱딱하였으며 손이나 막대를 이용하여 쉽게 부스러뜨릴 수 있었다.

표 34. 동결건조한 케퍼그레인 속의 균수 측정(cfu/g)

균수측정 배지 / 케퍼그레인	SPC	Rogosa	Aerobic (3M Petrifilm)	Yeast (3M Petrifilm)
A	4.8×10^{7}	3.1×10^{7}	3.5×10^{7}	4.1×10^{5}
B	1.1×10^{7}	5.7×10^{8}	1.4×10^{7}	3.0×10^{5}
F	2.1×10^{8}	1.2×10^{8}	2.7×10^{8}	5.0×10^{6}
H	1.1×10^{7}	1.6×10^{7}	1.2×10^{6}	1.0×10^{6}
I	2.0×10^{7}	1.5×10^{7}	3.2×10^{6}	3.2×10^{5}
J	1.4×10^{6}	1.6×10^{7}	1.5×10^{6}	1.2×10^{4}

동결건조에 의한 미생물의 변화를 조사하기 위한 동결전과 동결후의 일반세균수를 측정결과는 Fig. 16에서 보여주는 것과 같다. 5종류의 배지로 일반세균 및 효모의 생균수를 측정한 결과 M17과 APT 배지에서는 다른 세가지 배지보다 생균수가 적었으며, 동결건조 후 10^{4} 희석시 전혀 검출되지 않는 것도 있었다. SPC나 MRS, Rogosa 배지는 젖산간균이 잘 검출되는 반면 M17과 APT배지는 젖산구균이 잘 검출되는 특성을 갖고 있는 점으로 미루어보면, 케퍼 그레인의 주요 균총이 젖산간균이라고 유추할 수 있다.

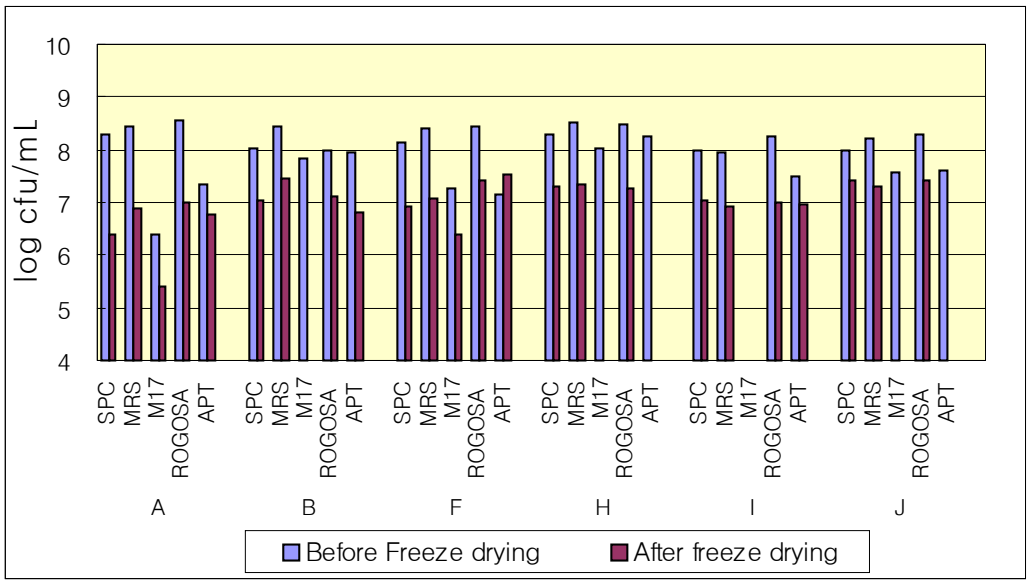


Fig. 16. Viable cells of bacteria in kefir grains on various media before and after freeze drying

Fig. 17은 케퍼그레인 A, H 그리고 I type의 세가지 케퍼 그레인을 6개월간 냉동보존한 것과, 환원탈지유와 혼합하여 3개월간 냉장보존 또는 6개월간 냉동보존한 것을 꺼내어 연속 계대 배양하면서 산생성 능력을 비교한 결과를 보여주고 있다. 3개월간 냉장보존한 것보다는 6개월간 냉동보존한 것이 산생성능력이 우수하였으나, 환원탈지유를 첨가한 것은 첨가하지 않은 것보다 예상과는 달리 오히려 산생성 능력이 떨어지는 결과를 보여서 이에 대한 추가적인 분석이 필요할 것으로 생각되었다. 3개월간 냉장보존한 케퍼 그레인은 조직이 물러졌으며, 첫번째 배양에 7일 이상이 소요되었고 15회 반복 계대배양 후에야 정상적인 산생성력을 회복하였다. 그러나, 케퍼 그레인 고유의 향미가 약해졌고 이미 이취가 발생되는 등 관능적으로 좋지 않았다. Kosikowski(1977)는 냉장보존에서 8~10일 후에는 미생물의 활력이 상실된다고 한 점으로 미루어볼 때 냉장에서 3개월간 보존하는 것은 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 그렇지만 -20℃에서 6개월간 냉동시킨 것은 첫번째 배양하는데

36시간 정도 소요되었으며, 두번째 계대 배양부터는 정상적인 산생성력을 회복하였다. 그러나 냉동시킨 케퍼 그레인으로 제조한 케퍼도 고유의 향미가 약해지고 이미 이취가 약간 발생하여 냉동보존전의 케퍼 그레인으로 제조한 맛보다는 좋지 않았다. 한편, 냉동건조한 후15개월 경과된 케퍼 그레인으로 배양한 것은 냉동건조 전과 동일한 산생성력을 나타내었고, 이미 이취도 거의 느낄 수 없어서 가장 좋은 보존 방법이라고 생각되었다(data not shown). Kosikowski(1977)도 동결건조한 케퍼 그레인은 12~18개월후에 사용해도 좋은 활력을 유지한다고 보고하여서 케퍼 그레인의 장기보존을 위해서는 동결건조가 적합한 방법이라고 사료된다.

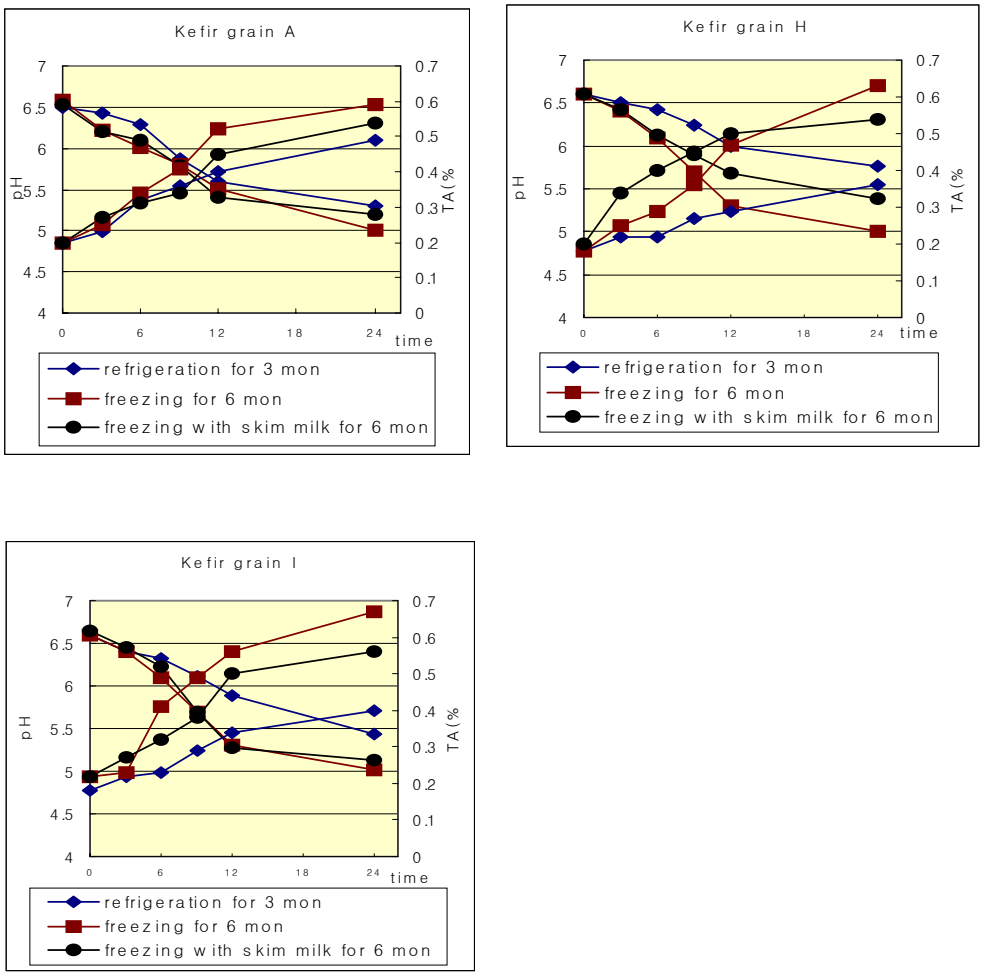


Fig. 17. Acid-producing activities of kefir grains according to preservation methods

3. 케퍼제조 기계의 개발

가정용 케퍼 제조 기계는 두 가지 크기로 제작 하였으며, 큰 기계(40 Liter)의 재원은 500(L) × 300(W) × 375(H) mm 이었고 작은 기계(5 Liter)의 재원은 170(L) × 280(W) × 250(H) mm 이었다. Fig. 18은 큰 기계의 설계도면을 보여주고 있다. 큰 기계 및 작은 기계의 작동원리는 동일하고 크기만 차이가 있었는데, 작동원리는 냉매를 사용하지 않고 특수 온도조절 반도체 기판에 의하여 온도조절이 가능하도록 제작되었다. Fig. 19는 제작된 케퍼제조 기계의 실제 모습을 보여주고 있다. Fig. 20은 40 Liter 용기의 케퍼제조기계를 가지고 1 Liter 우유팩 시유에 케퍼그레인을 접종하여 발효시키고 5 Liter 용기의 케퍼제조기계를 이용하여 200ml의 시유에 케퍼를 접종하여 발효온도 25℃를 9시간 유지하고, 숙성온도 10℃로 맞추어 주었을 때 케퍼 제조기계 내부온도와 케퍼제조용기의 온도변화를 보여주고 있다.

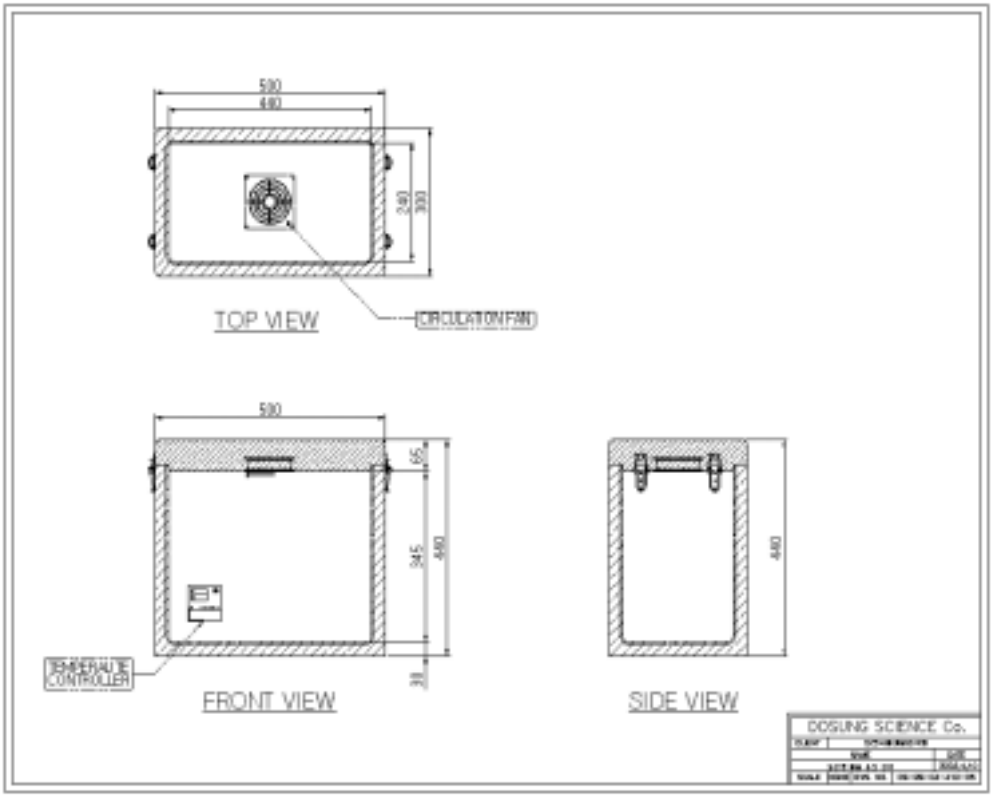


Fig. 18. 가정용 케퍼 제조기계(40 Liter)의 설계도면

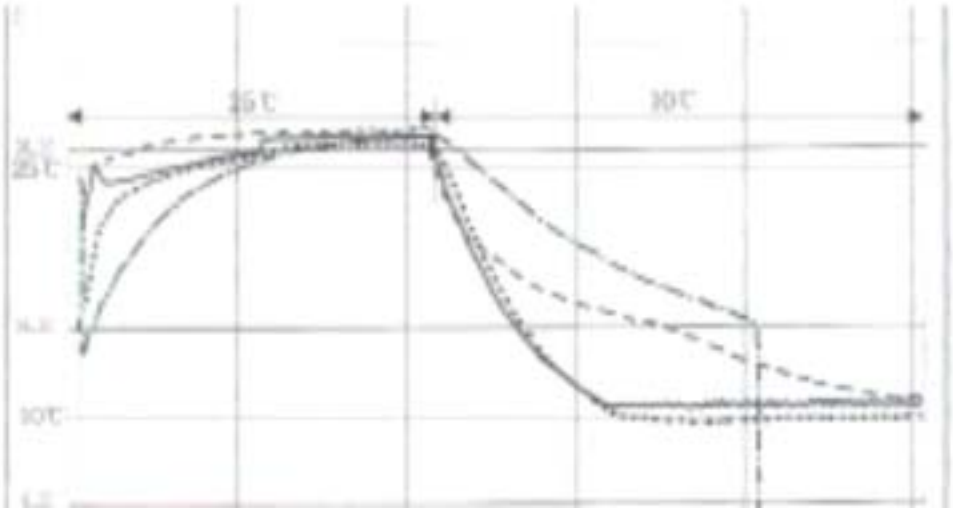
가. 케퍼제조기계(40L) 내부모습

나. 케퍼제조기계(40L)

다. 케퍼제조기계(5L)

라. 케퍼제조기계(5L) 내부모습

Fig. 19. 케퍼제조기계(40 Liter, 5 Liter)의 사진



---------- : 40L 케퍼제조기 안의 온도
-·-·-·-·- : 케퍼그레인을 접종한 우유(1 Liter)의 온도변화
(10% 접종, 40L 케퍼제조기 이용)
· · · · · · · · : 5L 케퍼제조기 안의 온도
———— : 케퍼그레인을 접종한 우유(200ml)의 온도변화
(10% 접종, 5L 케퍼제조기 이용)

Fig. 20. 발효온도 25℃를 9시간 유지하고, 숙성온도 10℃로 맞추어 주었을 때 케퍼 제조기계 내부온도와 케퍼제조용기의 온도변화

제 5 절 케퍼 및 케퍼미생물의 항균성 및 항종양 조사

1. 케퍼의 병원성균에 대한 항균성 조사

케퍼의 병원성균에 대한 항균성을 조사하기 위하여 케퍼그레인들을 시유에 접종하여 제조한 케퍼를 원심분리하여 얻은 상등액과, 상등액을 정밀여과한 액을 가지고 7가지 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 paper disc 방법으로 관찰한 결과는 Table 35에 보여주는 것과 같다. 항균실험 결과 *Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus*와 같은 병원균에서 저해환을 관찰할 수 있었으며, 이 외의 병원성 미생물에는 억제능을 보이지 않았다. 6가지 종류의 케퍼 중에서는 A와 H 종류가 가장 큰 저해환을 나타내어서 다른 종류보다도 항균 활성이 큰 것으로 평가되었다.

Table 35. Antimicrobial activity of kefirs against pathogenic microorganisms [1)]

Kefir grains / Microorganisms	**A**	**B**	**F**	**H**	**I**	**J**
E. coli O157:H7	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
S. aureus KFRI188	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(12)
Sal. typhimurium KFRI251	-(10.4)	-(9.45)	-(10.2)	11.3(11)	9.65(10)	9.7(9.2)
P. aeruginosa KFRI190	10[2)](12)[3)]	10.1(11.5)	8.95(-)	13(12.8)	10(10.7)	10.6(10.8)
B. cereus KFRI181	15.5(14.3)	13.2(11.4)	9.15(-)	18.4(14.6)	-(-)	9.4(-)
C. albicans KFRI432	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
L. monocytogenes KFRI799	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

1) diameter of paper disc : 8mm
2) antimicrobial activity of Group I (supernatant kefirs centrifuged at 3,500 rpm for 10 min)
3) antimicrobial activity of filtered Group I

케피 종류 중 paper disc방법에 의해 A와 H타입이 가장 항균효과가 큰 것으로 나타났기 때문에 이중에서 임의로 H타입을 선발하여 병원균과 함께 접종하여 배양하였다. 그 결과 20일간 배양 중 pH 변화는 대조군과 큰 차이가 없었으나(Fig. 21), 일반미생물의 수는 *E. coli* O157:H7을 첨가한 것이 20일간 배양시 특이하게 높은 생존률을 보였고(Fig. 22), 병원균은*Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus* 는 배양 3일까지는 증가하다가 그 후 감소되기 시작했으나 *E. coli* O157:H7는 저해현상을 전혀 관찰할 수 없었고 오히려 배양 9일까지 계속 증식하였다(Fig. 23). 배양6~9일 경과 후부터는 배양액의 pH가 4이하로 떨어졌는데도 불구하고 *E. coli* O157:H7가 높은 생존력을 나타낸 것은 pH에 대하여 매우 강하다는 것을 의미하는데, 이는 일반적으로 장내 유해미생물이 산성조건에서 잘 생육하지 못한다는 것과는 다른 결과를 보여주었다.

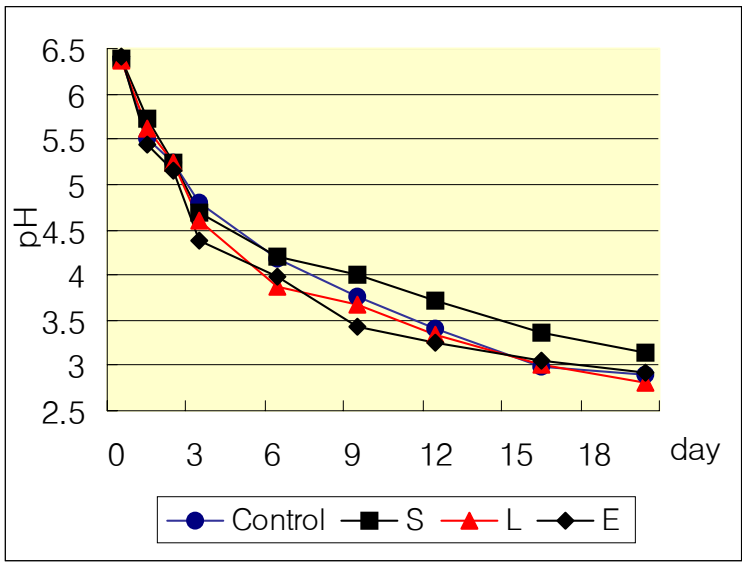


Fig. 21. 병원성 미생물을 접종한 케피의 발효과정 중 pH변화
S : Kefir cocultured with Kefir grain H and *Staphylococcus aureus*
L : Kefir cocultured with Kefir grain H and *Listeria monocytogenes*
E : Kefir cocultured with Kefir grain H and *E. coli* O157:H7

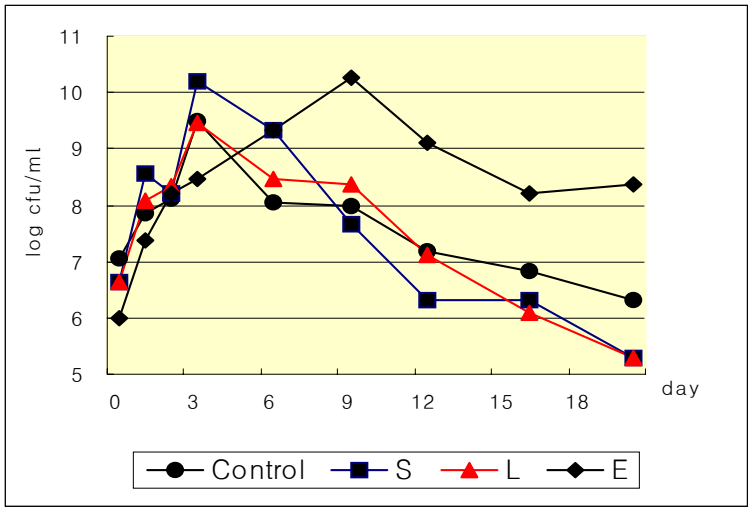


Fig. 18. 병원성 미생물을 접종한 케퍼의 발효과정 중 일반세균수의 변화

S : Kefir cocultured with Kefir grain H and *Staphylococcus aureus*
L : Kefir cocultured with Kefir grain H and *Listeria monocytogenes*
E : Kefir cocultured with Kefir grain H and *E. coli* O157:H7

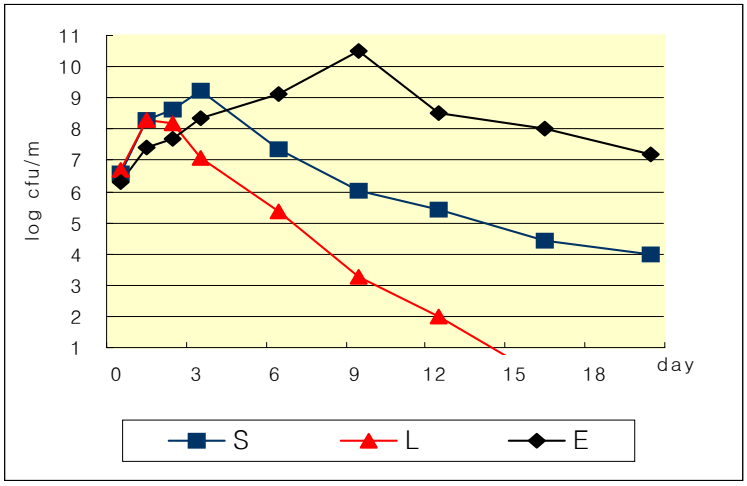


Fig. 19. 병원성 미생물을 접종한 케퍼의 발효 중 병원성 미생물수의 변화

S : Kefir cocultured with Kefir grain H and *Staphylococcus aureus*
L : Kefir cocultured with Kefir grain H and *Listeria monocytogenes*
E : Kefir cocultured with Kefir grain H and *E. coli* O157:H7

2. 케피그레인을 이용하여 제조한 케퍼의 세포독성 실험

대장암 세포주인 SNU-C4를 FBS 10%가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양한 다음 케퍼 중화액을 원심분리하여 얻은 상등액의 세포독성 정도를 MTT방법으로 관찰하여 다음 Fig. 20과 같은 결과를 얻었다. 케퍼 종류중 F타입이1,000 ㎍/mL 첨가시 72%의 대장암 세포 사멸률을 보여 가장 높았고, A, B, H, I 타입이 65~68%로서 비슷한 사멸률을 나타내었으며 J가 57% 로서 가장 낮은 수치를 나타내었으나, 전체적으로는 큰 차이는 없었다. 또 6종류의 케퍼를 300 ㎍/mL 첨가시 45~57% 의 사멸률을 나타내었는데, 이로 미루어 SNU-C4에 대한 6종류 케퍼의 IC_{50} 는 300 ㎍/mL 내외로 추정되었다.

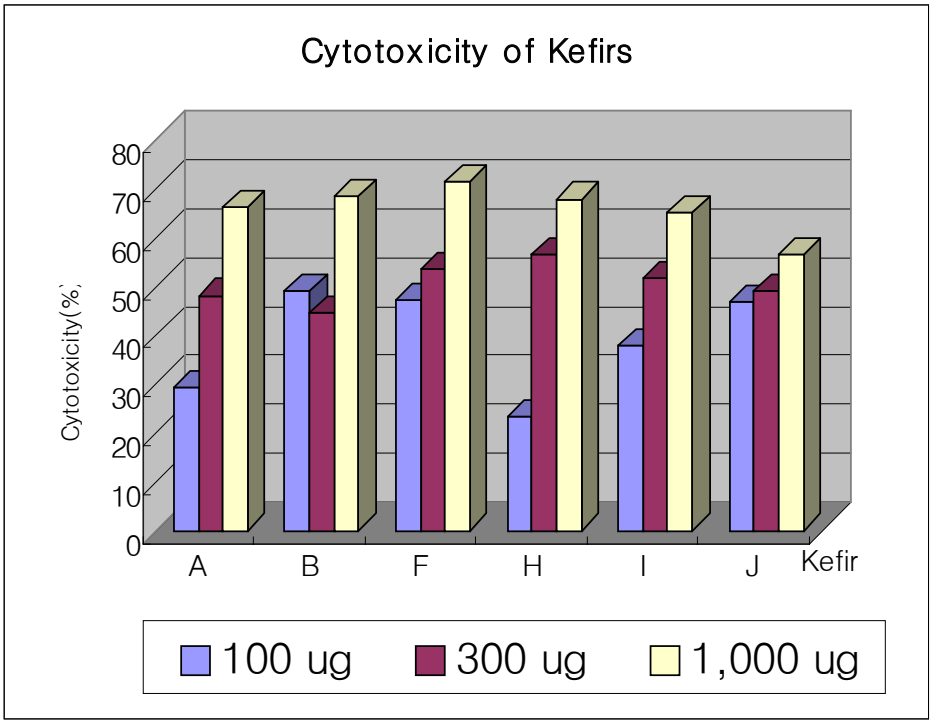


Fig. 20. Cytotoxicity test of Kefirs on the colon cancer cell line SNU-C4

3. 케피 및 케퍼그레인의 항종양효과 분석을 위한 동물실험 결과

가. 成長率(Growth rate)

케퍼발효액이 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 성장율에 미치는 영향은 Table 36에서 보여주는 것과 같다. 시험개시 체중은 29.41~31.98g으로 평균 30.91±1.05g이었으며 시험군간 차이가 없었다. 시험종료 체중은 음성대조군(E)이 32.00g으로 가장 낮았고, 암세포주를 투여한 시험군(A~D)에서는 33.84~44.74g으로 케퍼발효액중 A군과 B군이 가장 높거나 낮았다. 시험기간중(4주) 일일 평균 성장율은 식이군간에 통계적인 차이가 있었는데 A군이 0.588g으로 대조군(E)의 0.082g에 비해 훨씬 무거웠다($P<0.05$). 식이섭취량은 식이군간에 통계적인 차이가 있었는데 케퍼발효액중 C군이 7.75g, A군이 6.12g으로 많았고 E군이 4.25g으로 가장 적었다($P<0.05$).

Table 36. 케퍼발효액이 마우스의 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

(Mean±SD)

Group	공시체중 (g)	종료체중 (g)	성장율 (g/day)	식이섭취량 (g/day)
A(29)*	31.09±4.27	44.74±13.75	0.588±0.236^{a}	6.12±1.83^{b}
B(30)	29.41±4.64	33.84±7.53	0.228±0.227^{ab}	4.85±0.47^{bc}
C(29)	31.98±3.50	38.25±11.30	0.385±0.201^{ab}	7.75±0.68^{a}
D(29)	30.32±4.23	41.43±13.07	0.518±0.325^{a}	5.02±0.67^{bc}
E(29)	31.73±4.07	32.00±7.00	0.082±0.169^{b}	4.25±0.08^{c}

* 실험배치 두수
Values are mean±S.D.
동일한 문자는 5%수준에서 통계적으로 유의성이 없음($P<0.05$)
ns, not significant

나. 斃死率(Mortality rate)

케퍼발효액이 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 시험기간중 폐사

율에 미치는 영향은 Table 37과 같다. 해부당일의 폐사두수를 포함했을 때 케퍼발효액 처리군(A, B, C)과 양성 대조군(D)에서는 각각 9, 11, 12, 9마리로 31.0, 36.7, 41.4, 31.0 %로서 A군과 D군의 폐사율이 다소 낮았다. 음성 대조군(E군)에서는 시험 후 2주와 4주에 각각 1마리씩 폐사한 것으로 나타났다.

Table 37. 암세포주를 투여한 마우스에서 케퍼발효액이 시험기간중 폐사율에 미치는 영향

Group	폐사두수				합 계 (%)
	1주	2주	3주	4주	
A(29)*	-	-	2	5(2)**	9(31.0)
B(30)	-	-	1	8(2)	11(36.7)
C(29)	1	3	2	6	12(41.4)
D(29)	-	1	1	7	9(31.0)
E(29)	-	1	-	1	2(6.9)

* 실험배치 두수

** 해부당일 폐사두수

다. 臟器무게(Organ weights)

케퍼 발효액이 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 장기무게에 미치는 영향은 Table 38과 같다. 간장무게는 4.19~5.08g으로 식이군간에 통계적인 차이가 있었다($P<0.05$). 즉, 케퍼발효액중 B군이 가장 높았고 A와 C군이 가장 낮았다. 신장무게는 0.56~0.66g으로 음성대조군(E)이 가장 높았고 케퍼발효액중 A와 C군이 가장 낮았다($P<0.05$). 비장무게는 0.78~0.92g으로 식이군간에 통계적인 차이가 없었다. 정소무게는 0.29~0.36g으로 E군이 가장 높았고 케퍼발효액중 A군이 가장 낮았다($P<0.05$).

Table 38. 케퍼발효액이 암세포주를 투여한 마우스의 장기무게에 미치는 영향

Group	무 게(체중 100g당)			
	간 장	신 장	비 장	정 소
A(20)*	4.19±1.46^{b}	0.56±0.16^{b}	0.78±0.34^{ns}	0.31±0.10^{b}
B(19)	5.08±0.75^{a}	0.65±0.10^{ab}	0.92±0.40	0.33±0.09^{ab}
C(17)	4.38±0.75^{b}	0.58±0.13^{b}	0.83±0.30	0.32±0.07^{ab}
D(21)	4.35±1.32^{b}	0.58±0.14^{b}	0.88±0.42	0.29±0.09^{b}
E(27)	4.43±0.70^{ab}	0.66±0.08^{a}	0.88±0.44	0.36±0.08^{a}

* 해부두수
Values are mean±S.D.
동일한 문자는 5%수준에서 통계적으로 유의성이 없음(P<0.05)
ns, not significant

라. 血液生化學値(Haemochemical values)

케퍼발효액이 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 혈액학치에 미치는 영향은 Table 39와 같다. 적혈구(RBC)수는 입방미리당(mm^3) 암세포주 투여군중 A군이 7.218백만개로서 대조군(E)의 10.213백만개에 비해 유의하게 낮았고(P<0.05) 다른 세 식이군은 7.794~8.796백만개로 통계적인 차이가 없었다. 백혈구(WBC)수는 mm^3당 케퍼발효액 A군이 17.176천개로 E군의 6.218천개에 비해 통계적으로 유의하게 많았고, 다른 암세포주투여군(B, C, D)에서는 11.120~17.176천개로 통계적인 차이가 없었다. 혈구용적(Hct, PCV)은 케퍼발효액중 B와 C군은 각각 44.3, 38.2%로서 대조군(E)의 46.8%와 통계적으로 비슷하였고 A군은 각각 35.6%로 유의하게 낮았다(P<0.05). 혈색소(hemoglobin)함량은 케퍼발효액중 C군이 16.53 g/dL으로 A군의 10.21 g/dL에 비해 유의하게 높았고(P<0.05) 다른 세 식이군은 10.87~13.03 g/dL으

로차이가 없었다.

Table 39. 케퍼발효액이 암세포주를 투여한 마우스의 혈액학치에 미치는 영향

Group	혈액학치			
	RBC ($x10^6/mm^3$)	WBC ($x10^3/mm^3$)	Hct (%)	Hb (g/dL)
A(10)*	7.218± 1.861[b]	17.176± 12.402[a]	35.60± 8.88[b]	10.21± 2.33[b]
B(10)	8.796± 3.024[ab]	12.186± 7.350[ab]	44.30± 14.74[a]	12.77± 4.28[ab]
C(9)	7.969± 3.378[ab]	11.120± 8.765[ab]	38.22± 16.63[a]	16.53± 1.80[a]
D(10)	7.794± 2.853[ab]	11.971± 5.124[ab]	37.90± 13.91[ab]	10.87± 3.81[ab]
E(11)	10.213± 1.421[a]	6.218± 2.300[b]	46.82± 13.25[a]	13.03± 3.67[ab]

* 분석 대상 개체수
Values are mean±S.D.
동일한 문자는 5%수준에서 통계적으로 유의성이 없음(P<0.05)
ns, not significant
RBC : 적혈구 (red blood cell), WBC : 백혈구 (white blood cell)
Hct : 혈구용적 (hematocrit), Hb : 혈색소 (hemoglobin)

한편, 케퍼발효액이 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 혈청 지질농도에 미치는 영향은 Table 40과 같다. 총 콜레스테롤(TC) 농도는 91.4~122.3 mg/dL로 통계적인 차이는 없었고, 케퍼발효액중 B군과 C군이 가장 낮았다. 중성지방(TG)은 대조군이 38.8 mg/dL로 암세포주 투여군(A~D)의 43.4~57.6 mg/dL 과는 통계적인 차이가 있었다(P<0.05). HDL-콜레스테롤은 45.4~63.4 mg/dL으로 차이가 없었고, LDL-콜레스테롤은 대조군(E) 40.0 mg/dL, A군 18.2 mg/dL으로 통계적인 차이가

있었고(P<0.05) 다른 시험군은 25.4~32.9 mg/dL으로 비슷하였다.

Table 40. 케퍼발효액이 암세포주를 투여한 마우스의 혈청 지질농도에 미치는 영향

Group	농 도(mg/dL)			
	TC	TG	HDL	LDL
A(10)*	122.3±18.8^{ns}	57.6±28.4^{a}	62.2±10.5^{ns}	18.2±6.11^{b}
B(9)	91.4±12.5	61.8±19.0^{a}	49.7±10.7	25.4±12.3^{ab}
C(8)	95.6±14.4	43.4±17.6^{a}	45.4±18.7	32.9±12.2^{ab}
D(11)	105.9±15.7	56.8±12.9^{a}	53.7±9.04	30.6±14.5^{ab}
E(16)	123.3±16.9	38.8±7.72^{b}	63.4±10.9	40.0±17.1^{a}

* 분석 대상 개체수,
동일한 문자는 5%수준에서 통계적으로 유의성이 없음(P<0.05)
ns, not significant, Values are mean±S.D.
TC : total-cholesterol (총 콜레스테롤), TG : triglyceride (중성지방),
HDL : high-density lipoprotein cholesterol (고밀도지질단백-콜레스테롤)
LDL : low-density lipoprotein cholesterol (저밀도지질단백-콜레스테롤),

마. 肉眼的 所見(Gross observation)

케퍼 발효액과 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 해부시 나타난 육안적인 소견은 Table 41과 같다. 암세포주를 투여하지 않은 음성 대조군(E군)에서는 2마리가 腸(intestine)의 색깔이 흑색으로 나타난 것 외에는 특이한 육안적인 소견은 나타나지 않았다. 양성 대조군(D군)을 포함한 케퍼발효액 처리군(A, B, C군)에서는 腹水현상이 가장 많았고 그 외의 나타난 병변을 포함했을 때 실험군의 육안적인 소견율은 38.1~60.0%로 양성대조군이 오히려 다소 낮은 것으로 나타났다.

Table 41. 케퍼발효액이 암세포주를 투여한 마우스의 육안적 소견에 미치는 영향

Group	소 견				
	腹水	肝, 脾臟형태 이상, 癌腫	腸색깔, 협착	홍문종창 기타병변	**합 계** (%)
A(20)*	10	1	6	2	12(60.0)***
B(19)	6	2	6	1	8(42.1)
C(17)	5	2	1	2	7(41.2)
D(21)	6	-	1	2	8(38.1)
E(27)	-	-	2	-	2(7.4)

* 실험후 4주에 실시한 육안검사 대상 개체수

** 복수암을 포함한 서혜부 癌塊(腫)의 육안소견율

*** 육안소견율(동일 개체에서 다수의 소견이 나타난 경우 한 마리로 계수함)

A : 복수 10, 간 이상 1, 장색깔(black, yellow) 6, 횡격막 1, 늑막액 1 (12두)
B : 복수 6, 간 이상 및 암종(黑) 2, 장색깔(black, yellow) 6, 홍문피부종창 1 (8두)
C : 복수 5, 홍문피부종창 2, 간 암종(黑) 1, 비장이상 1, 장협착 1 (7두)
D : 복수 6, 장색깔(black) 3, 홍문피부종창 2, 장협착 1 (8두)
E : 장색깔(black) 2 (2두)

바. 胎生癌腫抗原濃度(CEA)

케퍼 발효액이 암세포주(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 혈청중 胎生癌腫抗原(carcinoembryonic antigen) 농도에 미치는 영향은 Table 42와 같다. CEA는 각종 악성종양(특히 대장암, 전이성 간암, 폐암, 유방암, 위암)에서 60% 이상의 양성율을 보이고, 각종 양성질환의 monitor로도 유용하게 이용된다. 본 시험에서 A~D군의 CEA농도는 각각 0.890, 1.885, 0.280, 1.085 ng/mL으로 케퍼발효액중 C군의 농도가 비록 통계적인 차이는 없었지만 다른 세 시험군에 비해 낮았고, 암세포주를 투여하지 않은 음성대조군(E)의 농도는 0.390 ng/mL으로 C군에 비해 오히려 다소 높았는데 이는 확실하지는 않지만 시료처리의 오류에 기인된 결과가 아닌가 사료된다.

Table 42. 케퍼발효액이 암세포주를 투여한 마우스의 CEA농도에 미치는 영향

(Mean±SD)

Group	CEA(ng/mL)
A(10)*	0.890±0.459 ns
B(9)	1.885±1.099
C(8)	0.280±0.112
D(11)	1.085±0.402
E(16)**	0.390±0.712

* 특이 육안소견을 나타내는 실험개체로서 CEA 분석대상 개체수
** 특이 육안소견이 없는 대조개체로서 CEA분석 개체수
Values are mean±S.D.
ns, not significant

이상의 결과를 요약하면 시험종료 체중은 대조군(E)이 가장 낮았고, 암세포주 투여군에서는 A군과 B군이 각각 가장 높거나 낮았다. 일일 평균 성장율은 식이군간에 차이가 있었다($P<0.05$). 식이섭취량은 케퍼발효액중 C군과 A군이 많았고 E군이 가장 적었다($P<0.05$). 시험기간중 폐사율은 케퍼발효액군(A, B, C)과 양성 대조군(D)이 각각 31.0, 36.7, 41.4, 31.0%로서 A군과 D군의 폐사율이 다소 낮았다. 장기무게는 비장을 제외하고 식이군간에 통계적인 차이가 있었다($P<0.05$). 간장은 케퍼발효액중 B군이 가장 높았고 A와 C군이 낮았다. 신장은 대조군(E)이 가장 높았고 A와 C군이 가장 낮았다. 정소는 E군이 가장 높았고 A군이 가장 낮았다. 혈액학치중 적혈구(RBC)수는 mm^3당 A군이 7.218백만개로 대조군(E)의 10.213백만개에 비해 유의하게 낮았고, 백혈구(WBC)수는 A군이 17.176천개로 E군의 6.218천개에 비해 통계적으로 유의하게 많았다($P<0.05$). 혈구용적(Hct)은 B와 C군 및 대조군(E)이 통계적으로 비슷하였고 A군은 가장 낮았다($P<0.05$). 혈색소(Hb)는 C군이 A군에 비해 유의하게 높았다($P<0.05$). 혈청 지질중 총 콜레스테롤(TC)은 식이군간 차이가 없었고, 중

성지방(TG)은 대조군과 암세포주 투여군(A~D)간에 통계적인 차이가 있었다 ($P<0.05$). HDL은 차이가 없었고, LDL은 대조군(E)과 A군간에 차이가 있었다 ($P<0.05$). 해부시 육안적인 소견에서 대조군(D)을 포함한 케퍼발효액군(A, B, C군)에서는 腹水현상이 가장 많았고 그 외의 병변을 포함했을 때 암세포주 투여군에서 나타난 육안적 소견율은 38.1~60.0%로 D군이 다소 낮았다. 혈청중 胎生癌腫抗原(CEA) 농도는 케퍼발효액중 C군의 농도가 비록 통계적인 차이는 없었지만 다른 암세포주 투여군과 특히 음성대조군(E)에 비해서 낮았다. 이러한 결과로 볼 때 케퍼발효액이 암세포(Sarcoma 180)를 투여한 마우스의 생체내 몇가지 측정지표에서 다소간 긍정적인 영향을 미치긴 하였으나 전체적으로 유의적인 차이는 없는 것으로 사료된다.

제 4 장 참고문헌

Angulo L., E. Lopez and C. Lema. 1993. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North West of Spain). J. Dairy Research. 60(2):263-267

Athanasiadis I., D. Boskou, M. Kanellaki and A.A. Koutinas. 1999. Low temperature alcoholic fermentation by delignified cellulosic material supported cells of kefir yeast. J. Agricul. and Food Chemistry. 47(10):4474-4477

Chin Wen Lin, Chen Hsiao Ling and Liu Je Ruei. 1999. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. Australian J. Dairy Techn. 54(1):14-18

Ching Yun Kuo and Lin Chin Wen. 1999. Taiwanese kefir grains : their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. Australian J. Dairy Techn.. 54(1):19-23

Farnworth E.R. 1999. Kefir: from folklore to regulatory approval. J. Nutraceuticals, Functional & Medical Foods. 1(4):57-68

Furukawa N. 1996. Stimulation of host immune response with kefir grain. Japanese J. Dairy and Food Science. 45(6):A131-A139

Furukawa N., A. Matsuoka and Y. Yamanaka. 1990. Effects of orally administered yoghurt and kefir on tumour growth in mice. J. Japanese Society of Nutrition and Food Science 43(6):450-453

Garrote G.L., A.G. Abraham and G.L. de Antoni. 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. J. Dariy Research. 65(1):149-154

Garrote G.L., A.G. Abraham and G.L. de Antoni. 2000. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. J. Food Prot. 63(3):364-369

Gorski D. 1994. Kefir : 21st century yogurt? Dairy Foods. 95(2):49

Guzel-Seydim Z., A.C. Seydim and A.K. Greene. 2000[a]. Organic acids and volatile flavor components evolved during refregerated storage of kefir. J. Dairy Science. 83(2):275-277

Guzel-Seydim Z., A.C. Seydim, A.K. Greene and A.B. Bodine. 2000[b]. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. J. Food Composition and Analysis 13(1):35-43

Itoh K., T. Toba, T. Itoh and S. Adachi. 1992. Properties of beta-galactosidase of *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 isolated from kefir grains. Letters in Appl. Microbiol. 15(5):232-234

Koroleva, N.S. 1988. Technology of kefir and kumys. IDF Bulletin 227:96-99

Kosikowski, F.V. 1977. Cheese and fermented milk foods (2nd Ed.). Edwards Brothers, Inc. P. 37-48.

Kroger M.K. 1993. Kefir. Cultured Dairy Products J. 28(2):26, 28-29

Kubo M., T. Odani, S. Nakamura, S. Tokumaru and H. Matsuda. 1992. Pharmacological study on kefir- a fermented milk product. I. Antitumour activity. J. the Pharmaceutical Society of Japan 112(7):489-495

Kwak H.S., S.K. Park and D.S. Kim. 1996. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. J. Dairy Science 79(6):937-942

Leori F. and M. Pidoux. 1993[a]. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus*isolated from sugar kefir grains. J. Appl. Bacteriol. 74(1):54-60

Leori F. and M. Pidoux. 1993[b]. Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. 74(1):48-53

Leori F. and P. Courcoux. 1996. Influence of pH, temperature and initial yeast: bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces*

florentinus isolated from sugary kefir grains. J. Appl. Bacteriol. 80(2):138-146

Libudzisz A. and A. Piatkiewicz. 1990. Kefir production in Poland. Dairy Industries International 55(7):31, 33

Mann E.J. 1989. Kefir and koumiss. Dairy Industries International 54(9):9-10

Micheli L., D. Uccelletti, C. Palleschi and V. Crescenzi. 1999. Isolation and characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. Appl. Microbiol. and Biotechn. 53(1):69-74

Morgan S.M., R. Hickey, R.P. Ross and C. Hill.2000. Efficient method for the detection of microbially produced antibacterial substances from food systems. J. Appl. Microbiol. 89(1):56-62

Motaghi M., M. Mazaheri, N. Moazami, A. Farkhondeh, M.H. Fooladi and E.M. Goltapeh. 1997. Kefir production in Iran. World J. Microbiol. & Biotechn. 13(5):579-581

Neve H. 1992. Analysis of kefir grain starter cultures by scanning electron microscopy. Milchwissenschaft 47(5):275-278

Ohara N., M. Suzuki, S. Okada, T. Uchimura, M. Kozaki and K. Komagata. 1997. Identification of lactic acid bacteria isolated from freeze dried kefir grains (Georgia, Russia). Japanese J. Food Microbiol. 13(4):165-171

Pintado M.E., J.A. Lopes da Silva, P.B. Fernandes, F.X. Malcata and T.A. Hogg. 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. Int. J. Food Sci. & Technol. 31(1):15-26

Rea M.C., T. Lennartsson, P. Dillon, F.D.Drinan, W.J. Reville, M. Heapes and T.M. Cogan. 1996. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. J. Appl. Bacteriol. 81(1):83-94

Seiler H. and M. Kuemmerle. 1997. The yeast flora of kefir.

Deutsche-Milchwirtschaft. 48(12):438-440

Shimizu H., T. Mizuguchi, E. Tanaka and S. Shioya. 1999. Nisin production by a mixed culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. Appl. and Environm. Microbiol. 65(7):3134-3141

Simova, E., Beshkova, D., Angellov, F., Hiritozova, Ts., Fregonova,G. and Z. Spasov. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in Kefir grains and Kefir made from them. J. Industrial Micrbiol. and Biotechnol. 28:1-6

Takahashi F. and H. Kawakami. 1999. Antibacterial action of kefir against *Escherichia coli* O157:H7. Japanese J. Food Microbiol. 16(4):245-247

Takizawa S., S. Kojima, S. Tamura, S. Fujinaga, Y. Benno and T. Nakase. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. Int. J. Syst. Bacteriol. 44(3):435-439

Takizawa S., S. Kojima, S. Tamura, S. Fujinaga, Y. Benno and T. Nakase. 1998. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. Syst. and Appl. Microbiol. 21(1):121-127

Tamai Y., N. Yoshimitsu, Y. Watanabe, Y. Kuwabara and S. Nagai. 1996. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. J. Ferment. and Bioeng. 81(2):181-182

Vujicic I.F., M. Vulic and T. Konyves. 1992. Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. Biotechnology-Letters 14(9):847-850

Wyder M.T. and Z. Puhan. 1997. A rapid method for identification of yeasts from Kefir at species level. Milchwissenschaft. 52(6):327-330

Wyder M.T., H. Spillmann and Z. Puhan. 1997. Investigation of the yeast flora in dairy products : a case study of kefir. Food Technol. and Biotechn. 35(4):299-304

Yoon Y.H., D.G. Kang, Y.J. Baek and C.S. Huh. 1998. Cholesterol assimilation

activity of *Lactobacillus* spp. from kefir and yoghurt and non-starter strain. Korean J. Dairy Science. 20(2):143-152

Yoon Y.H., J.K. Cho, Y.J. Baek and C.S. Huh. 1999. Antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains. Korean J. Animal Science. 41(1):39-44

Yoshida T. and K. Toyoshima. 1994. Lactic acid bacteria and yeast from kefir. J. Japanese Society of Nutrition and Food Sci. 47(1):55-59

Zhang Liebing,Wushen Yuan, Tao Cheng, Chengxiang Luo. 1998. Studies on the ultrastructure and microorganism distribution of kefir grains (KG) surface. China Dairy Industry 26(1):14-15

차성관, 구영조, 홍석산, 김왕준, 전형일. 1992. 발효식품제조를 위한 종균개발에 관한 연구. 한국식품개발연구원 연구보고서 E1174-0314

차성관, 윤여섭, 신해철. 1991. 발효유제품의 생산 및 품질개선에 관한 연구. 한국식품개발연구원 연구보고서 E2099-0167

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.