

***Eurotium* sp.를 활용한 고부가가치
Golden Flower Tea(금화차) 개발**

(Development of a Higher Value-added Golden Flower Tea
Using *Eurotium* sp.)

재단법인 하동녹차연구소

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고부가가치식품기술개발사업에 관한 연구” 과제(세부과제 "*Eurotium* sp.를 활용한 고부가가치 Golden Flower Tea(금화차) 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 11월 07일

주관연구기관명 : 재단법인 하동녹차연구소

주관연구책임자 : 김 종 철

주관기관연구원 : 김 종 철 외 5명

세부연구기관명 : 경상대학교 산학협력단

세부연구책임자 : 류 충 호

세부연구기관명 : 슬로푸드 영농조합법인

세부연구책임자 : 이 강 삼

요 약 문

I. 제 목

- *Eurotium* sp.를 활용한 고부가가치 Golden Flower Tea(금화차) 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

세부 연구개발의 목표	달성도(%)
· 금화균(<i>Eurotium</i> sp.)을 이용한 발효 공정 연구	100
· 모차에 금화균(<i>Eurotium</i> sp.) 정착을 위한 공정개발	100
· 고품질 Golden Flower Tea 개발	100
· 유해 미생물 안전성 연구	100
· 금화균 보급을 위한 상용 배양기술 연구	100
· 금화균의 종균화 기술개발	100
· Golden Flower Tea 종균의 제품화	100
· 고품질 금화차 개발을 위한 품질특성 연구	100
· 단계발효 접목을 통한 금화균 발효 조건 확립	100
· 배양 조건에 따른 단계 발효 및 금화균의 발효 특성	100
· Golden Flower Tea의 제품화	100
· Golden Flower Tea 의 대량생산화	100
· Golden Flower Tea 의 유통	100

III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 세계 차 산업 중 생산량과 소비량은 꾸준히 증가하고 있으며, 2009년 기준으로 10조원으로 추정하고 있고 홍차를 비롯한 발효차의 비율이 70% 정도이며, 녹차의 비율은 30% 비율로서 점점 증가하고 있는 실정이므로 발효차의 다양화, 고부가가치화를 통한 국제시장 공략이 필요하며, 특히 미국과 유럽의 고급 차 시장 활로 모색이 필요함
- 국내 침출 차 시장은 2006년, 1,70억에서 2009년 1,050억원으로 61% 감소하였고 2010년 시장도 700억원으로 감소하였음. 따라서 후발효차(미생물발효차), 가루차, 말차, 기능성차 등 다양한 형태의 시장접근이 필요한 시점임
- 국내산 녹차의 경우 가격과 품질적인 측면에서 어느 하나 크게 두드러진 면이 없으나, 일본의 경우 원전 사고가 악재요인으로 작용하여 일본식음료 전반에 걸쳐 경쟁력을 잃

어가는 추세임

- 한·중 FTA 타결로 인한 관세 철폐로 중국으로부터 무차별적인 발효차/녹차 수입이 예상되고 있으며 이는 국내 차 농가의 자멸로 귀결됨이 예상됨. 따라서 신제품 기술개발을 통한 비교우위를 선점할 필요성이 있음
- 미생물 발효차의 경우 대부분 중국에서 수입되고 있으며, 매우 높은 가격으로 유통되고 있고, 금화 현상이 발현된 미생물 발효차는 다른 발효차에 비해 월등히 높은 가격으로 유통되고 있음
- 기존의 미생물 발효차 특히 중국산 보이차나 복전차의 경우 생산지역에 자연적으로 존재하는 미생물에 유래하여 발효가 진행되는 가공공정으로 발효시 발생할 수 있는 문제점들을 원활히 제어할 수 없었으나 본 연구에서 발효에 유관된 미생물을 제어할 수 있는 가공공정 개발시 발생하는 문제점들을 원활히 해결할 수 있으며, 최종제품의 품질관리가 원활히 이뤄질 수 있음

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 금화균 발효속도 향상을 통한 Golden Flower Tea 제조공정 개발

- 금화균(*Eurotium sp.*)을 이용한 발효 공정 개발
- 재고차를 활용한 모차에 금화균(*Eurotium sp.*) 정착을 위한 공정 개발
- *Eurotium sp.*을 접종 균주로 사용한 Golden Flower Tea의 제다 공정 개발 및 산업화 공정 개발
- 금화균 발효 조건 설정 및 연계 제조공정 설정
- Golden Flower Tea 제조공정 설정 및 Golden Flower Tea 제품화
- 미생물 안전성 연구

2. 농가보급을 위한 금화균 대량 증식화 배양 및 종균화 기술개발

- 금화균 보급을 위한 상용 배양기술 개발
- 일반 제다기업을 위한 종균화 기술개발
- Golden Flower Tea 종균의 제품화

3. 고품질 Golden Flower Tea 개발을 위한 품질 특성 탐색

- 중국 미생물발효차와 금화균을 이용한 Golden Flower Tea의 이화학적 특성 비교 탐색
- 중국 미생물발효차와 금화균을 이용한 Golden Flower Tea의 품질특성 특성 비교 분석
- 중국 미생물발효차와 개발된 Golden Flower Tea의 품질 비교 평가

4. 발효미생물 이용 단계발효 접목을 통한 금화균 발효속도 향상 공정개발

- 발효미생물과 *Eurotium* 속을 융합한 단계적 1차 발효공정 개발
- 모차에 1차 발효미생물 정착을 위한 공정개발
- 녹차종자 및 곡물을 융합한 신속 미생물 발효공정 개발
- 1차 발효 미생물 제어 및 금화균(*Eurotium sp.*) 정착 공정 설정
- 미생물 발효 조건 설정 및 연계 제조공정 설정
- 미생물 증식 및 환경설정

5. 개발된 Golden Flower Tea의 대량생산 및 유통

- 개발된 Golden Flower Tea 제품의 대량생산 공정개발
- Golden Flower Tea의 Test marketing 및 소비자 선호도 조사
- Golden Flower Tea 제품의 유통채널 구축

V. 연구개발결과

1. 금화균 발효속도 향상을 통한 Golden Flower Tea 제조공정 개발

- 금화균의 균주 특허 등록을 완료하였으며, 금화균의 차엽 처리 및 발효 조건(시간, 온도, 습도 등)에 따른 생육 최적 조건을 설정 하였음. 또한, 금화균 동정과 관련된 내용을 국내 전문 학술지에 논문을 투고하였음
- 금화차(Golden Flower Tea) 제조공정 개발(모차 선정, 스팀처리, Cooling, 금화균 접종, 긴압, 발효, 건조, 숙성) 및 표준화를 통한 제품화를 완료하였으며, 제조방법의 특허 및 상표(금랑차)를 등록 하였음
- 재고차(녹차 및 황차)를 활용하여 표준화된 제조공정을 확립하였음
- 미생물 발효 유발독소(총 아플라톡신 외 4종) 분석 결과 푸모니신이 최소 검출한계의 1/100 수준으로 검출 되었으며, 나머지 4종의 독소는 불검출 되었으며, Pyrosequencing, 18S rRNA 분석 등을 통하여 98%이상 단일종의 미생물이 증식되었고, 유해 미생물 또한 기존의 수입산 미생물 발효차와 비교하여 현저히 낮은 수준임을 확인하였음. 이상의 결과를 통하여 안전성을 확보하였다고 판단하였고, 국내 전문 학술지에 논문을 투고하였음

2. 농가보급을 위한 금화균 대량 증식화 배양 및 종균화 기술개발

- 발효기 도입을 통하여 1회 배양으로 7 L의 배양액의 회수가 가능한 대량 증식화 배양 기술을 개발하였음
- 소량의 영양성분을 포함(금화균 생산가격 절감) 하며, 농가보급이 가능한 바인더를 개발 완료하였음
- 대량 증식된 금화균의 동결건조 및 2차 오염 방지를 위한 포장용기 선정을 통하여 장기간 보관이 가능하며, 균주 배양 및 금화균 접종에 관련된 매뉴얼을 개발하여 농가보급이 가능해졌음

3. 고품질 Golden Flower Tea 개발을 위한 품질 특성 탐색

- 중국 미생물발효차와 금화차의 이화학적 분석을 통하여 총 유리아미노산은 최대 8배, 총 카테킨 함량은 최대 5배, 테아플라빈은 최대 3배, 총 페놀 화합물은 최대 6배가 높게 분석되어 개발된 금화차의 우수성을 확인하였음
- 중국 미생물발효차와 금화차의 품질특성 연구 및 품질 비교평가(국내 소비자 및 중국 현지 전문가 등)를 통하여 금화차의 국내·외 시장 개척의 가능성을 확인하였음

4. 발효미생물 이용 단계발효 접목을 통한 금화균 발효속도 향상 공정개발

- 발효미생물과 *Eurotium* 속을 융합한 단계 발효 조건을 개발하였음
- 금화균의 증식 속도 향상을 위한 탄소원 및 환경을 설정하였음

- 1차 발효 미생물 제어 및 금화균(*Eurotium* sp.) 정착 공정을 설정하였음
- 미생물 발효 조건에 따른 연계 제조공정을 개발하였음

5. 개발된 Golden Flower Tea의 대량생산 및 유통

- 엽전 형태(제품명 : 금랑엽전차) 제품의 대량생산 체계를 구축하였으며, 이를 디자인 출원 하였음
- 박람회 참가 및 소비자 선호도 조사를 통하여 반영된 의견을 제품의 형태 및 포장 디자인 등에 반영하여 제품을 개선하였음
- on/off line 유통 채널을 구축하였으며, 12개 업체와 MOU를 체결하였음

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 중국복전차에 존재하는 금화균(*E. cristatum*)을 분리하고, 녹차나 황차를 모차로 사용하여 우리나라 실정에 맞는 금화차를 개발하여 '금랑차'로 명명하였음
- 발효 온도와 습도를 설정하여 금화차 발효공정을 확립하고 숙성 및 보관조건도 설정하였으며, 완성된 금화차의 성분분석과 안전성분석을 통하여 안전하고 신체에 유익한 차로써 소비자의 기호에 맞는 차를 개발하였음
- 또한 기존에 많이 사용되는 백국균 및 황국균을 활용한 단계발효공정을 설정하여 발효 효율을 높일 수 있는 방안을 모색하였음
- 국내·외 박람회 및 전시회를 통하여 금화차를 홍보하고 소비자선호도를 조사하여 마케팅 채널구축의 기반을 마련하였음
- 이 연구를 통하여 발생된 3건의 특허와 4편의 논문 등 지적재산권을 활용하여 향후 마케팅에 활용 할 계획임
- 기술이전을 통하여 기업에서 이 차를 활용하면 중국에 역으로 수출 할 수 있을 뿐만 아니라 재고 녹차를 소진 할 수 있기 때문에 기업 매출 증대와 산업화에 크게 기여 할 수 있으며, 이와 더불어 향후 금화차의 효능과 특이성분분석을 통하여 항암작용, 대사성질환 예방 등 인간에게 유익한 물질분리가 가능하고 기능성 식품개발도 기대됨

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

- Development of a Higher Value-added Golden Flower Tea Using *Eurotium sp.*

II. Purpose and necessity of project

- Korea tea industry is declining from 2007, on the contrary, the world wide tea industry is increasing.
- To overcome the depressed Korea tea industry, it is necessary to develop high value-added teas and diversity type of tea such as dark tea or microbial fermented tea.
- In China, there are many kind of dark teas developed, Pure-tea, Fuzhuan brick-tea etc.
- Therefore we isolated and characterized a useful fungus (*E. cristatum*) from Fuzhuan brick-tea, which calls 'golden flower tea' because of yellow colored fungi.
- In this study we developed fermentation processes for golden flowering teas using mother teas, green and yellow tea.
- Also we characterized the tea quality and developed a method for the fungi propagation to distribute widely.
- In addition we carried out a double-fermentation to increase fermentation efficiency.
- To launch tea markets, the test marketing was performed by attending tea fairs and expositions.

III. Contents and scope of the research and development

- Development of the golden flower tea manufacturing process
- Development of the *E. cristatum* culture and mass propagation methods
- Characterization of the golden flower tea qualities
- Development of a process for the fermentation speed-up using double fermentation
- Mass production of the teas and pioneer distribution channels

IV. Results

1. Development of the golden flower tea manufacturing process
 - Development of the golden flower tea through optimum fermentation conditions such as time, temp., and humidity.

- The isolated *E. cristatum* was patented and a paper was pressed.
- The manufacturing processes were developed and made a new product.
- The trade-mark(Geumrang-cha) is registered on the Korean Intellectual Property Office
- The products were surveyed microbial flora by pyrosequencing and 18S rRNA analyses and also confirmed food safety via toxins analyses.

2. Development of the *E. cristatum* culture and mass propagation methods

- *E. cristatum* mass propagation method was developed using 7 liter fermentor.
- The binders of the fungi propagation were developed to supply widely.
- The binders, ceramic ball and tea bags were used in this project.
- The fungi culture and inoculation manuals were confirmed and supplied to the farmers and industries.

3. Characterization of the golden flower tea qualities

- The physicochemical analyses of the well made teas carried out compared with China's dark teas. The results revealed that tea components such as free AAs, catechins, theaflavins, total polyphenols are higher than Chinese products.
- Through the Korean and Chinese consumer evaluation, we assured the possibility of national and international market entry.
- Development of a process for the fermentation speed-up using double fermentation
- Double-fermentation(or step-fermentation) method were developed using *Eurotium* and common fermentation microorganism such as *Aspergillus*.
- The carbon sources and fermentation environment were selected to increase fermentation speed.
- The primary fermentation procedure and *Eurotium* sp. settlement procedure were developed.

5. Mass production of the teas and pioneer distribution channels

- Yeopjeon-type golden flower teas were developed and mass production system were established. Then the design patent was submitted.
- On the basis of consumers preferences, the package and designs were improved.
- The marketing industry made a MOU with 12-industry and constructed marketing channels.

V. Outcomes and future applications

- A Korean-type golden flower tea which calls 'Keumrang-cha' was developed using green tea and yellow tea as a mother tea that inoculated isolated single fungus (*E. cristatum*).
- The fermentation process was selected through temperature and humidity control and

then the mature and storage conditions were also established.

- Analyses of tea components and safety revealed that the teas were good for human body and safe for foods.
- Also in order to increase fermentation efficiency, a double-fermentation process was developed combining *E. cristatum* with *Aspergillus* (*A. oryzae* or *A. kawachi*).
- Various marketing channels of nation and international were constructed via consumers promotion by attending exposition.
- The intellectual properties of 3-patent and 4-paper will be used to the future marketing and industrialization.
- Through industry technology transfer, the industry will get competition and contribute to the activation of regional economy.
- In the future, we expecting that the golden flower tea contribute to development of functional foods and act as anti-cancer and prevention of metabolic diseases through isolation of a material.

CONTENTS

Chapter 1	Overview of Research and Objectives	11
Section 1	Objectives of Research and Development	11
Section 2	Necessity and Scope of Research	11
Section 3	Results Versus Objectives	14
Chapter 2	R&D Status in Domestic and Abroad	16
Section 1	Overview of R&D Status	16
Section 2	Part of R&D Status	17
Chapter 3	Research Contents and Results	21
Section 1	Preceding Research	21
Section 2	Research Method	24
Section 3	Research Contents and Results	37
Chapter 4	Achievement and Contribution	113
Section 1	Achievement of Goals	113
Section 2	Contribution to Related Parts	114
Chapter 5	Plans for the Practical Use of Results	115
Section 1	Patents Results	115
Section 2	Paper and Presentation	116
Section 3	Media Public Relation	119
Section 4	Technology Transfer and Education	120
Section 5	Others	122
Chapter 6	International Science and Technology Information	124
Chapter 7	Facilities and Equipments	125
Chapter 8	Safety Management of Lab.	126
Chapter 9	References	130
Attachment	Analysis of Patent, Paper and Products	134

목 차

제1장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	11
1절	연구개발의 목적	11
2절	연구개발의 필요성 및 범위	11
3절	연구성과 목표 대비 실적	14
제2장	국내·외 기술개발 현황	16
1절	전체 기술개발 동향	16
2절	분야별 기술 동향	17
제3장	연구개발수행 내용 및 결과	21
1절	선행연구	21
2절	실험방법	24
3절	연구내용 및 결과	37
제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	113
1절	목표달성도	113
2절	관련분야에의 기여도	114
제5장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	115
1절	특허 출원 및 등록 성과	115
2절	논문 및 학술발표 성과	116
3절	언론홍보 성과	119
4절	기술이전 및 교육지도 성과	120
5절	기타 성과	122
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	124
제7장	연구시설·장비 현황	125
제8장	연구실 안전관리 이행실적	126
제9장	참고문헌	130
첨부	특허, 논문 및 시장분석 보고서	134

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

1절 연구개발의 목적

1. 금화균 발효속도 향상으로 Golden Flower Tea 제조공정 개발을 통한 Golden Flower Tea 제품 개발
2. 농가보급을 위한 금화균 대량 증식화 배양 및 종균화 기술개발을 통한 금화 종균 제품화
3. 고품질 Golden Flower Tea 개발을 위한 품질 특성 탐색
4. 발효미생물 이용 단계발효 접목을 통한 금화균 발효속도 향상 공정개발
5. 고품질 Golden Flower Tea 제품 개발 및 대량생산(유통)

2절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 산업적 필요성

- (1) 2000년부터 2009년 까지 세계 차 재배 면적과 생산량 변화추이를 살펴보면 최근 10년간 약 70% 가량의 성장세를 보이고 있음
- (2) 세계 차 산업 중 생산량과 소비량은 꾸준히 증가하고 있으며, 2009년 기준으로 10조 원으로 추정하고 있고 홍차를 비롯한 발효차의 비율이 70% 정도이며, 녹차의 비율은 30% 비율로서 점점 증가하고 있는 실정임
- (3) 따라서 발효차의 다양화, 고부가가치화를 통한 국제시장 공략이 필요한 시점이며, 특히 미국과 유럽의 고급 차 시장 활로 모색이 필요한 시점임
- (4) 국내 차 재배면적은 2009년 기준으로 3,616ha, 생산량은 3,266톤으로 2007년을 기점으로 재배면적과 생산량이 각각 5%, 16% 감소하였음. 이는 안전성에 대한 소비자 불신과 경기침체에 따른 소비감소가 원인임
- (5) 국내 침출 차 시장도 2016년, 1,70억에서 2009년 1,050억원으로 61% 감소하였고 2010년 시장도 700억원으로 감소하였음. 따라서 후발효차(미생물발효차), 가루차, 말차, 기능성차 등 다양한 형태의 시장접근이 필요한 시점임
- (6) 국내산 녹차의 경우 가격과 품질적인 측면에서 어느 하나 크게 두드러진 면이 없으나, 일본의 경우 원전 사고가 악재요인으로 작용하여 일본식음료 전반에 걸쳐 경쟁력을 잃어가는 추세임

나. 정책적 필요성

- (1) 2011년 3kg 미만 홍차 및 발효차 수출은 79만불(62톤)로 주로 일본, 중국에 수출하였고 수입량은 306톤(341,400 USD)으로 중국, 인도, 영국, 미국, 스리랑카 순으로 수입은 수출금액의 43배 이상으로 무역역조현상을 보이고 있음. 따라서 발효차 부분에서 무역 역조현상을 극복할 수 있는 고부가 신제품 개발이 절실함
- (2) 향후 한·중 FTA 타결로 인한 관세 철폐로 중국으로부터 무차별적인 발효차/녹차 수

입이 예상되고 있으며 이는 국내 차 농가의 자멸로 귀결됨이 예상된다. 따라서 신제품 기술개발을 통한 비교우위를 선점할 필요성이 있음

- (3) 현재 전 세계적으로 차 생산과 소비의 불균형으로 과잉 생산되고 있으며 이는 국내 차생산자들에게도 마찬가지로 현상임. 따라서 정책적인 지원을 통하여 잉여 농산물의 소비 활성화 방안을 마련해 주는 것이 급선무이며 이를 위해서는 고부가 차 제품개발이 필요함

다. 기술적 필요성

- (1) 흑차(dark green tea)란 미생물 발효차로서 주로 보이차(Pu'er), 흑모차(raw dark green), 복전차 (Fuzhuan brick-tea)등이 여기에 포함된다. 복전차로부터 발효균들을 분리하고 동정한 결과 *Eurotium*, *Debaryomyces*, *Aspergillus*속 등이 우점종으로 존재하였으며 염기서열 분석결과 *Eurotium cristatum*이 주요 금화균으로 밝혀짐. 또한 보이차 발효과정(50℃, 35일)중에 생성되는 미생물을 동정하고 분리한 결과 두종류의 *fungi*가 동정되었는데 *Aspergillus niger* 와 *Blastobotrys adeninivorans* 이었음
- (2) 금화(Golden Flower)란 이들 흑차에서 발견되는 금화균으로서 균총이 마치 노란색의 꽃이 핀 것같이 붙여진 이름으로서 장기간 숙성된 고급흑차에서 발견되어지며 금화가존재하는 차는 오래되고 귀한 차로 여겨져 시중에서 고가로 유통됨
- (3) 금화차의 일종인 복전차에서는 3종류의 새로운 triterpenoids를 분리하여 항균활성이 있음을 보고하였고 세포독성은 없는 결과를 보여 주었음. 이는 아마도 곰팡이에 의해 테르페노이드성분이 변화된 것으로 사료됨
- (4) 흑차(금화차)의 기능에 대해서 알려진 바는 많이 없으나 예로부터 이질/설사 등에 민간약으로 쓰였으며 혈중콜레스테롤의 감소나 비만, 고혈압 등에 효과가 있음이 보고되고 있음. 따라서 금화차 개발을 통한 성분분석과 비만등의 기능성 규명도 필요한 시점임
- (5) 기존의 미생물 발효차 특히 중국산 보이차나 복전차의 경우 생산지역에 자연적으로 존재하는 미생물에 유래하여 발효가 진행되는 가공공정으로 발효시 발생할 수 있는 문제점들을 원활히 제어할 수 없음
- (6) 발효에 관련된 미생물을 제어할 수 있으면 가공공정시 발생하는 문제점들을 원활히 해결할 수 있으며, 최종제품의 품질관리가 원활히 이뤄질 수 있음
- (7) 발효차 유관 미생물을 제어하기 위해서는 1차적으로 미생물의 종균화가 수반되어야 하며, 이를 제다기업에 보급하기 위해서는 종균의 대량생산이 이뤄져야함
- (8) 미생물 발효차의 경우 대부분 중국에서 수입되고 있으며, 매우 높은 가격으로 유통되고 있음
- (9) 금화 현상이 발현된 미생물 발효차는 다른 발효차에 비해 월등히 높은 가격으로 유통되고 있음
- (10) 금화 현상 발현에 유관된 미생물을 분리하고 이를 이용한 미생물 발효차 제조공정 개발을 통해 국내 차 산업의 부가가치를 향상시키고, 수입에 의존하던 미생물 발효차 시장을 국산화시키는 과정이 반드시 필요함
- (11) 금화차 가공공정의 산업화를 위해서는 종균의 민간보급이 필수적이며, 보급된 종균을 원활히 이용할 수 있는 방안 모색이 필요함
- (12) 미생물의 경우 영양배지 환경에서 일반 환경으로 전환되었을 때 신속한 활성이 어려우며, 활성을 위한 소요시간이 길고, 배양조건 제어가 어려움
- (13) 금화 유발 미생물의 신속한 활성을 위해 미생물을 반활성 상태로 보존할 수 있는 영양원이

함유된 바인더를 탐색하고, 이를 적용하는 가공기술이 필요함

2. 연구개발의 내용 및 범위

가. 금화균 발효속도 향상을 통한 Golden Flower Tea 제조공정 개발

- (1) 금화균(*Eurotium* sp.)을 이용한 발효 공정 개발
- (2) 재고차를 활용한 모차에 금화균(*Eurotium* sp.) 정착을 위한 공정 개발
- (3) *Eurotium* sp.을 접종 균주로 사용한 Golden Flower Tea의 제다 공정 개발 및 산업화 공정 개발
- (4) 금화균 발효 조건 설정 및 연계 제조공정 설정
- (5) Golden Flower Tea 제조공정 설정 및 Golden Flower Tea 제품화
- (6) 미생물 안전성 연구

나. 농가보급을 위한 금화균 대량 증식화 배양 및 종균화 기술개발

- (1) 금화균 보급을 위한 상용 배양기술 개발
- (2) 일반 제다기업을 위한 종균화 기술개발
- (3) Golden Flower Tea 종균의 제품화

다. 고품질 Golden Flower Tea 개발을 위한 품질 특성 탐색

- (1) 중국 미생물발효차와 금화균을 이용한 Golden Flower Tea의 이화학적 특성 비교 탐색
- (2) 중국 미생물발효차와 금화균을 이용한 Golden Flower Tea의 품질특성 특성 비교 분석
- (3) 중국 미생물발효차와 개발된 Golden Flower Tea의 품질 비교 평가

라. 발효미생물 이용 단계발효 접목을 통한 금화균 발효속도 향상 공정개발

- (1) 발효미생물과 *Eurotium* 속을 융합한 단계적 1차 발효공정 개발
- (2) 모차에 1차 발효미생물 정착을 위한 공정개발
- (3) 녹차종자 및 곡물을 융합한 신속 미생물 발효공정 개발
- (4) 1차 발효 미생물 제어 및 금화균(*Eurotium* sp.) 정착 공정 설정
- (5) 미생물 발효 조건 설정 및 연계 제조공정 설정
- (6) 미생물 증식 및 환경설정

마. 개발된 Golden Flower Tea의 대량생산 및 유통

- (1) 개발된 Golden Flower Tea 제품의 대량생산 공정개발
- (2) Golden Flower Tea의 Test marketing 및 소비자 선호도 조사
- (3) Golden Flower Tea 제품의 유통채널 구축

3절 연구성과 목표 대비 실적

1. 정량적 성과 목표 및 달성도

구분		특허		논문		기타(상표)
		출원	등록	SCI	비SCI	
1차 년도	목표	1				
	달성	1	1			
2차 년도	목표	1			2	
	달성	1			1	1
3차 년도	목표	1	1		2	
	달성	1	1		3	1
계	목표	3	1		4	
	달성	3	2		4	2

2. 정량적 성과 활용 목표 및 달성도

구분		기술실시(이전)	상품화	교육지도	언론홍보
활용건수	목표	2	2	2	3
	달성	3	2	2	5

3. 정성적 연구 성과

가. 금화균 발효속도 향상을 통한 Golden Flower Tea 제조공정 개발

- (1) 금화균의 균주 특허 등록을 완료하였으며, 금화균의 차엽 처리 및 발효 조건(시간, 온도, 습도 등)에 따른 생육 최적 조건을 설정 하였음. 또한, 금화균 동정과 관련된 내용을 국내 전문 학술지에 논문을 투고하였음
- (2) 금화차(Golden Flower Tea) 제조공정 개발(모차 선정, 스팀처리, Cooling, 금화균 접종, 긴압, 발효, 건조, 숙성) 및 표준화를 통한 제품화를 완료하였으며, 제조방법의 특허 및 상표(금랑차)를 등록 하였음
- (3) 재고차(녹차 및 황차)를 활용하여 표준화된 제조공정을 확립하였음
- (4) 미생물 발효 유발독소(총 아플라톡신 외 4종) 분석 결과 푸모니신이 최소 검출한계의 1/100 수준으로 검출 되었으며, 나머지 4종의 독소는 불검출 되었으며, Pyrosequencing, 18S rRNA 분석 등을 통하여 98%이상 단일종의 미생물이 증식되었고, 유해 미생물 또한 기존의 수입산 미생물 발효차와 비교하여 현저히 낮은 수준임을 확인하였음. 이상의 결과를 통하여 안전성을 확보하였다고 판단하였고, 국내 전문 학술지에 논문을 투고하였음

나. 농가보급을 위한 금화균 대량 증식화 배양 및 종균화 기술개발

- (1) 발효기 도입을 통하여 1회 배양으로 7 L의 배양액의 회수가 가능한 대량 증식화 배

양 기술을 개발하였음

- (2) 소량의 영양성분을 포함(금화균 생산가격 절감) 하며, 농가보급이 가능한 바인더를 개발 완료하였음
- (3) 대량 증식된 금화균의 동결건조 및 2차 오염 방지를 위한 포장용기 선정을 통하여 장기간 보관이 가능하며, 균주 배양 및 금화균 접종에 관련된 매뉴얼을 개발하여 농가보급이 가능해졌음

다. 고품질 Golden Flower Tea 개발을 위한 품질 특성 탐색

- (1) 중국 미생물발효차와 금화차의 이화학적 분석을 통하여 총 유리아미노산은 최대 8배, 총 카테킨 함량은 최대 5배, 테아플라빈은 최대 3배, 총 페놀 화합물은 최대 6배가 높게 분석되어 개발된 금화차의 우수성을 확인하였음
- (2) 중국 미생물발효차와 금화차의 품질특성 연구 및 품질 비교평가(국내 소비자 및 중국 현지 전문가 등)를 통하여 금화차의 국내·외 시장 개척의 가능성을 확인하였음

라. 발효미생물 이용 단계발효 접목을 통한 금화균 발효속도 향상 공정개발

- (1) 발효미생물과 *Eurotium* 속을 융합한 단계 발효 조건을 개발하였음
- (2) 금화균의 증식 속도 향상을 위한 탄소원 및 환경을 설정하였음
- (3) 1차 발효 미생물 제어 및 금화균(*Eurotium* sp.) 정착 공정을 설정하였음
- (4) 미생물 발효 조건에 따른 연계 제조공정을 개발하였음

마. 개발된 Golden Flower Tea의 대량생산 및 유통

- (1) 엽전 형태(제품명 : 금량엽전차) 제품의 대량생산 체계를 구축하였으며, 이를 디자인 출원 하였음
- (2) 박람회 참가 및 소비자 선호도 조사를 통하여 반영된 의견을 제품의 형태 및 포장 디자인 등에 반영하여 제품을 개선하였음
- (3) on/off line 유통 채널을 구축하였으며, 12개 업체와 MOU를 체결하였음

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1절 전체 특허 동향

1. 국가별 출원 동향

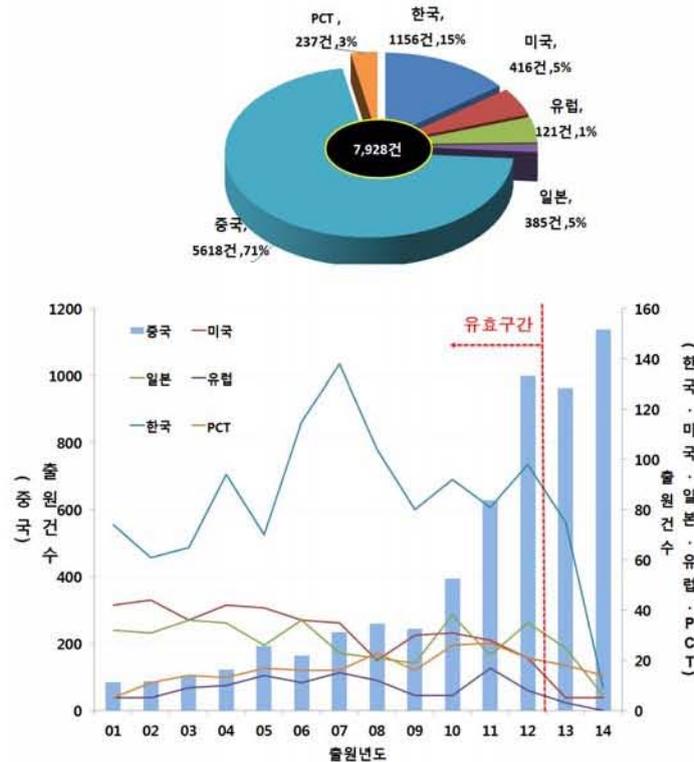


그림 1. 국가별 출원동향

- 가. 차 산업 기술에 대한 특허 7,928건을 국가별로 살펴보면, 중국특허 71%로 높은 비중을 차지하고 있고, 이어 한국특허 15%, 미국특허 5%, 일본특허 5%, PCT특허 3%, 유럽특허 1%의 순임
- 나. 국가별 연도별 특허출원동향에 따르면 중국특허는 2009년 이후 출원건수가 급격히 증가하였고, 한국특허는 일정치 않은 패턴으로 증감을 반복하고 있으며, 일본과 PCT 특허는 꾸준한 출원을 보임
- 다. 구체적으로, 한국의 특허출원은 2005년 이후 증가세를 보이나, 2007년 녹차 농약 파문 후 특허수가 감소하는 추세를 보임. 이 후 2009년부터 특허출원이 증가했으나, 2012년 108건 특허수를 기록하고 난 이후에는 급감하였음
- 라. 미국은 2000년대 초반에는 비교적 높은 특허 출원을 보였으나, 2007년부터 다소 감소하는 경향을 보임. 2009년에는 특허수가 증가하였으나, 최근 3년간 낮은 출원율을 보임
- 마. 일본은 2001년도부터 2013년까지 차 산업 기술에 대한 꾸준한 활동을 보이고 있었으나, 2007년과 2009년 사이는 특허출원 건수가 다소 낮아졌으며, 2014년(6건) 특허출원

수가 2013년(25건)에 비해 급격히 감소함

- 바. 유럽특허는 다른 국가에 비해 출원수가 많지 않은 편이며 2001년도부터 서서히 증가해 왔음. 2005년에서 2009년 사이의 출원건수는 평균 12.4로 비교적 높은 편이었음. 2009(6건)년과 2010(6건)년 특허건수가 낮아졌으나, 2011년 17건으로 급격히 출원수가 증가됨
- 사. 빠르게 성장하고 있는 중국 차 산업시장 동향을 반영하듯, 전반적으로 특허 출원수가 큰 폭으로 증가하는 추세를 보임. 2012년 특허출원수는 1,000건으로 전년대비 약 16% 증가함

2. 기술발전도 분석

- 가. 전체적인 그래프 형상으로 보아 차(Tea) 산업 기술은 출원인수와 특허건수가 증가하는 발전기로 분석됨
- 나. 구체적으로, 한국특허는 2001년부터 2009년까지 꾸준한 성장을 해왔고, 2007년~2009년 구간이 성숙기에 달하는 것으로 보였으나, 2010년~2012년에 출원인수가 증가하는 것으로 보아 발전기로 분석됨
- 다. 미국특허는 2001년도에 가장 높은 출원건수와 출원인수를 보였으나 지속적으로 그 수가 감소하는 양상을 보임. 2001년부터 특별한 발전 없이 쇠퇴하는 성향을 관찰되므로 퇴조기로 분석됨
- 라. 일본특허는 2001년부터 2009년까지 꾸준히 감소하였으며, 2010년~2012년에는 출원건수가 출원인수가 증가하는 것으로 보아 부활기로 분석됨
- 마. 유럽특허는 2001년~2006년 까지 증가하는 경향을 보였고, 이후 특허수가 줄어드는 경향을 보임. 따라서 성숙기에서 퇴조기로 진입하는 초입에 해당하는 발전도를 보임
- 바. 중국특허는 전체 포트폴리오 모델과 유사하며 2001년부터 2012년까지 꾸준히 특허건수와 출원인수가 증가하고 있음. 2007년~2009년 구간보다 2010년~2012년 구간에서 단시간에 비약적인 발전을 이룸. 활발하게 특허 활동에 참여하는 발전기로 분석됨
- 사. PCT특허는 2001년부터 2009년 까지 특허건수와 출원인수가 증가하는 발전기에 해당하는 것으로 보임. 2010년~2012년 구간은 출원건수가 증가하는 것으로 보아 성숙기로 진입하는 초입이라 볼 수 있음

2절 분야별 기술 동향

1. 기술분야별 출원 동향

- 가. 기술 분야별로 점유율을 살펴보면, 혼합차 분야가 64.1%로 높은 비중을 차지하고 있고, 이어서 기타 14.2%, 단일차 13.8%, 기능성제품 8%의 비중을 차지하고 있음
- 나. 구체적으로, 혼합차는 전체 7,928건 중 5,111건(64.1%)이고, 기타 1,130건(14.2%), 단일차 1,096건(13.8%), 기능성제품 627건(8%) 순임
- 다. 기술 분야별로 연도별 출원 동향을 살펴보면, 혼합차는 중국의 영향으로 출원건수가 매우 높고 증가하는 추세를 보임. 다기, 포장, 재배, 가공 소분류를 포함하는 기타부분은 2009년도에 급격히 증가함. 단일차는 지속적인 특허출원이 이루어짐. 기능성제품은

2011년부터 2013년도까지 특허출원 수가 상승세를 보임

- 라. 구체적으로 살펴보면, 혼합차 특허는 지속적이고 큰 폭으로 출원건수가 증가하고 있음. 2012년도 특허출원수는 836건으로 전년대비(532건) 큰 폭으로 상승함. 2001년도 혼합차 특허건수가 110건에 해당하는데 반해 2014년도에는 935건으로 9배 이상으로 특허수가 증가함
- 마. 중분류 기타에 해당하는 다기, 포장, 재배, 가공의 특허 출원건수를 살펴보면, 전반적으로 꾸준한 상승세를 보임. 2005년부터 2008년도 까지 한차례 특허수가 증가한 후 2009년도에 다소 감소하는 경향을 보임. 2010년도부터 2012년도까지는 매우 가파른 성장곡선을 그림
- 바. 단일차는 평균 78.29 특허출원수를 보이며 2001년부터 2014년도 까지 큰 변동 없이 안정적인 그래프를 보임. 2003년도와 2009년도에는 각각 59건, 57건으로 낮은 출원건수를 보였고, 2012년도(101건)와 2013년(112건)에 가장 높은 특허건수를 기록함
- 사. 기능성제품은 녹차를 및 홍차를 포함한 기능성 음료와 제품을 포함하는 중분류로, 특허수는 일정한 패턴 없이 증감을 반복하면서 평균 44.71 특허출원 수를 보임. 2001년과 2002년에는 26건의 낮은 출원수를 보였고, 2013년에는 93건으로 가장 높은 특허출원수를 보임

2. 국가별 역점기술 및 공백기술



그림 2. 국가별 역점기술 및 공백기술

- 가. 세부기술별로 국가별 역점기술과 공백기술을 살펴보면, 한국은 혼합차의 특허가 가장 많으나 중국과 비교했을 때 다소 부진함. 그러나 중국의 특허출원수가 너무 방대하기 때문에 질적 평가가 필요함
- 나. 또한, 단일차 부분을 살펴보면 한국, 미국, 일본, 중국이 꾸준히 특허출원을 활동을 하고 있는 것으로 보임. 기능성제품의 특허는 한국, 일본, 중국이 강세를 보이며 기타부분에서는 중국, 한국, 미국이 높은 역점을 보임
- 다. 다른 분야에서는 활발한 특허를 보임에도 불구하고, 미국은 기능성제품에 대한 공백

- 라. 또한, 특허점유율은 낮지만 특허증가율이 높은 것은 미래에 유망한 기술로 볼 수 있는데, 한국특허에서는 가공 기술이, 미국특허에서는 녹홍 혼합차와 홍차 기술이, 일본 특허에서는 홍차, 재배, 기타 기술이, 중국특허에서는 홍차, 재배, 식품, 기타 기술이, PCT 특허에서는 기타, 홍차, 다기 기술이 미래에 유망한 것으로 분석됨
- 마. 또한, 특허점유율과 특허증가율이 모두 평균 이하인 것은 아직까지 해당 기술에 대한 시장이 크게 형성되지 않았거나 연구개발 속도가 미흡한 것으로 볼 수 있는데, 한국과 중국을 비롯하여 전체적으로 버섯류와 음료 기술이 여기에 속하는 것으로 분석됨

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 선행연구

1. 중국 복전차(Fuzhuan)로부터 Golden flower(금화) 발효균의 분리 및 동정

가. 국내에서 구입한 중국 호남성 악양다창 복전차로부터 금화균을 단일클론으로 분리하였음

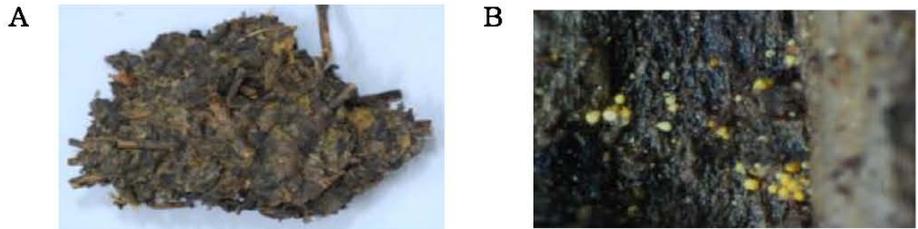


그림 4. 금화현상이 발현된 중국 복전차.

A: 중국 호남성 복전차 (금화균 분리재료) B: 금화현상이 발현된 복전차

나. 금화현상이 발현된 복전차 일부분을 0.85% 생리식염수와 혼합하여 균질화

다. 진균류와 효모의 배양에 사용되는 PDA(Potato Dextrose Agar) 평판배지에 균질화된 용액을 1 mL씩 분주 : 10개의 평판배지에 접종

라. 25℃에서 배양 : 24시간 간격으로 생육상태 확인

마. 72시간이 지나면 평판배지에 노란색 또는 황색의 포자가 형성되며 이를 금화균(*E. cristatum*)으로 판단하였음

바. 금화균으로 판단된 포자를 1백금이 채취하여 다시 PDA 평판배지에 스트리킹한 후 25℃에서 배양 : 10개의 평판배지에 접종

사. 이와 같은 방법을 72시간 간격으로 반복하고, 금화균으로 판단되는 노란색 또는 황색의 포자가 형성된 배지를 1-2개씩 분리하여 냉장보관

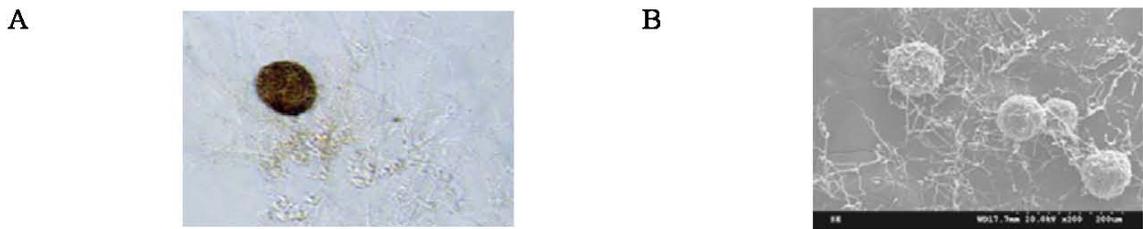


그림 5. 중국 복전차(Fuzhuan)로부터 분리한 금화(Golden Flower)균의 폐쇄자낭과 현미경 관찰.

A: 도립현미경으로 관찰한 폐쇄자낭과(cleistothecium) B: 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 금화균

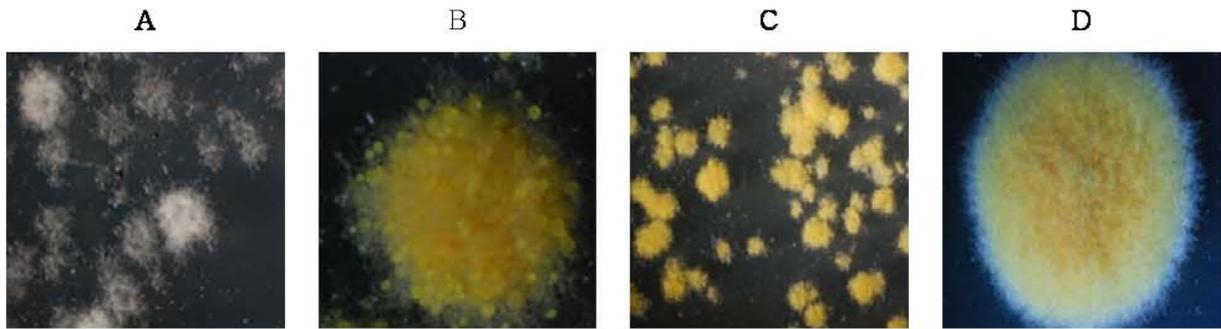


그림 6. 중국 복전차(Fuzhuan)로부터 분리한 금화(Golden Flower)균.
A: 48hr 배양 B: 72hr 배양-1 C: 72hr 배양-2 D: 120hr 배양

2. 중국 복전차(Fuzhuan)로부터 분리한 금화균의 유전자 증폭 및 염기서열분석

가. 분리한 단일 균체로부터 genomic DNA를 분리하여 β -Tubulin gene 과 RNA Polymerase β gene을 PCR(Polymerase Chain Reaction)방법을 사용하여 증폭하고 클로닝한 후 염기서열분석 (sequencing)을 수행하였음

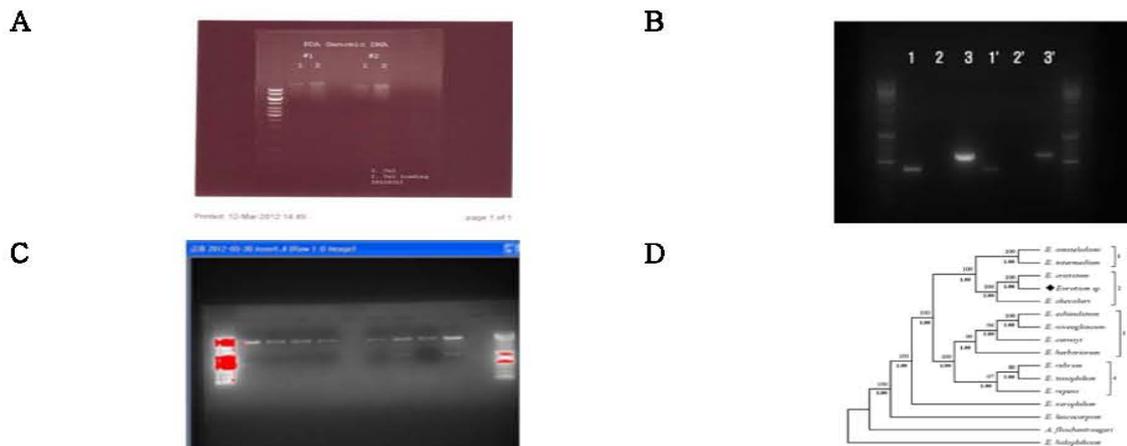


그림 7. 중국 복전차(Fuzhuan)차로부터 분리한 금화균의 유전자 증폭 및 염기서열 분석.
A: 분리된 금화균 genomic DNA B: 금화균의 β -Tubulin, RNA PolII β 유전자증폭
C: 금화균의 Sequencing을 위한 유전자클로닝 D: *Eurotium* sp. 의 유전 계통도

3. 염기서열 분석 및 유전계통도 분석

가. PCR로 증폭된 DNA 절편을 T/A 클로닝 벡터(pGEM Teasy vector)에 클로닝하여 DNA 전기영동 결과 β -Tubulin 유전자와 RNA Polymerase β 유전자의 크기는 각각 400 bp, 600 bp로 확인됨 (그림 8-A, B, C)

나. 클로닝된 β -Tubulin 유전자와 RNA polymerase β 유전자의 유사성을 확인하기 위하여 결정된 염기서열을 유전자 Data base에서 blast 분석한 결과 *E. cristatum*과 가장 높은 상동성을 보임

다. β -tubulin의 경우 *E. cristatum*과는 1개(1 bp)의 염기서열이 상이하였으며, RNA Polymerase β 의 경우에는 3개(3 bp)의 염기서열이 다를 수 있었음

KACC93171P	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	65	KACC93171P	TTTGGTTATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	258
EF651885	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	65	EF651885	TTTGTACATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	255
EF651892	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	65	EF651892	TTTGGTTATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	251
EF651911	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	65	EF651911	TTTGGTTATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	258
EF651914	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	65	EF651914	TTTGGTTATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	258
HQ148162	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	65	HQ148162	TTTGGTTATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	258
KF499570	CGGATTTCGGATATACTAACAGTATCAAGGGCAGACTA	75	KF499570	TTTGGTTATTCCTTGCTGTCTTGGGAAACAGTCTTG	265
Consensus	cgatttcggatatactaacagtatcaaggcagacta		Consensus	tttggttattccttggctgtcttgggaaacagtcttg	
KACC93171P	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	105	KACC93171P	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	297
EF651885	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	105	EF651885	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	294
EF651892	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	105	EF651892	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	290
EF651911	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	105	EF651911	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	297
EF651914	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	105	EF651914	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	297
HQ148162	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	105	HQ148162	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	297
KF499570	TCCTCCGGCAGCAGGCTCTCGACGGCTCTGGTGTAAAGT	115	KF499570	ACAGTGAAGGGCTCCACACAAATAATGTCCCCTGGC	304
Consensus	tcctccggcagcaggctctcgacggctctggtgtaaagt		Consensus	acagtgaaggctccacacaaataatgtcccctggc	
KACC93171P	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	138	KACC93171P	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	337
EF651885	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	137	EF651885	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	334
EF651892	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	137	EF651892	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	330
EF651911	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	138	EF651911	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	337
EF651914	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	138	EF651914	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	337
HQ148162	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	138	HQ148162	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	337
KF499570	ACAG.....TCGGGTCTCCGGATGGAACGGTATCCGA	147	KF499570	CGTCTCGTGCACCTTGAAGCCGGTACCATGGAAGCCGTC	344
Consensus	ac.....tcgggtctccggatggaacggtatccga		Consensus	cgctccgctgcaccttgaagccggtaccatggaagccgctc	
KACC93171P	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	178	KACC93171P	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	377
EF651885	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	177	EF651885	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	374
EF651892	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	177	EF651892	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	370
EF651911	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	178	EF651911	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	377
EF651914	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	178	EF651914	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	377
HQ148162	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	178	HQ148162	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	377
KF499570	TATGATATCTTAAGGAATCAGCTACAAAGGTCCTC	187	KF499570	CGTGGGGTCCCTTCGGCAGCTCTCCGCGCAAACT	384
Consensus	g.....aaagaatcagctacaaaggctcctc		Consensus	cgctggggctcccttcggcagctctccgcgcaact	
KACC93171P	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	218	KACC93171P	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	412
EF651885	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	217	EF651885	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	409
EF651892	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	217	EF651892	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	405
EF651911	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	218	EF651911	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	412
EF651914	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	218	EF651914	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	412
HQ148162	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	218	HQ148162	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	412
KF499570	GACTCTCAATTGGAGCGTATGAACGTTACTTCAACGAGG	227	KF499570	TCGTTTCGGCAGTCCGCTGCGGAAACACTGG.....	424
Consensus	gactctcaattggagcgtatgaacgttacttcaacgagg		Consensus	tcgtttcggcagctccgctgcggaacactggcaaa	

그림 8. 다중염기서열정렬을 통한 KACC93171P(this study)와 *Eurotium* sp. 의 DNA 비교 분석.

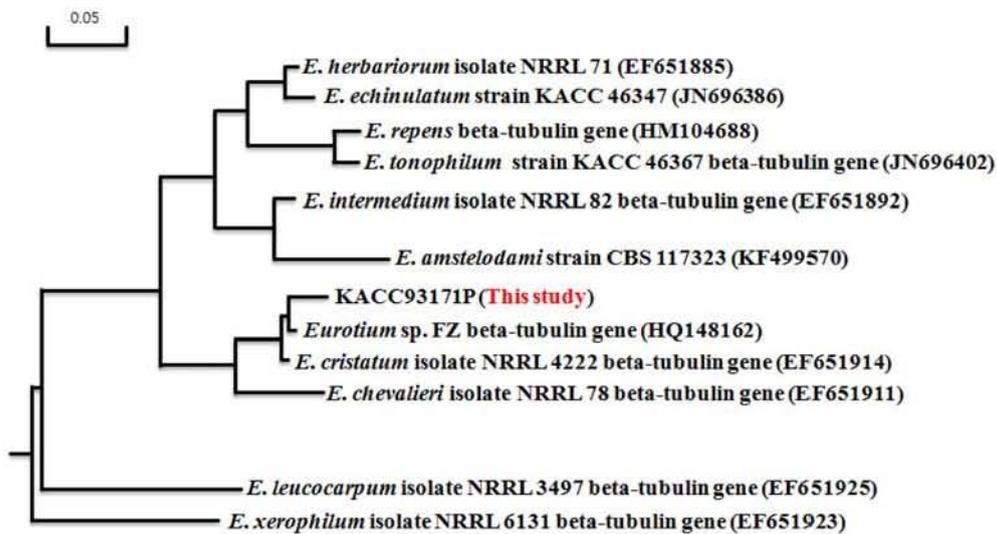


그림 9. KACC93171P(this study)의 계통발생학적 유연관계 분석

라. 염기서열 분석된 *E. cristatum*의 β -Tubulin 유전자 염기서열이 기존에 알려진 *Eurotium* sp.의 β -Tubulin 유전자와 얼마나 상이한지 조사하기 위해서 다중염기서열정렬 (Multiple sequence alignment) 및 UPGMA(Unweighted pair group method using arithmetic algorithm, 비가중산술결합법)을 사용하여 유전계통도를 작성한 결과, 본 연구에서 분리된 KACC93171P는 NRRL 4222로부터 분리된 *Eurotium cristatum*의 β -Tubulin 유전자(EF651914)와 가장 높은 상동성을 나타냄(그림 8)

마. 본 연구에서 분리한 KACC93171P 균주는 *Eurotium* sp. 중에서도 *E. cristatum*과 가장 유사하였으며, *E. cristatum*의 아종(Subspecies)인 *E. cristatum* sp. 로 사료됨(그림 9)

2절 실험방법

1. 금화균(*Eurotium* sp.)을 이용한 발효 공정 연구

가. 금화균의 차엽처리 생육조건 탐색(시간, 온도, 습도)

- (1) 금화균의 시간별, 온도별, 습도별 생육조건을 탐색하기 위하여 모차에 스팀처리 후 금화균을 접종하고 발효 20일, 숙성 7일 동안의 금화균의 증식 상태 및 온도, 습도를 관찰하였음. 또한, 최적 배양 조건 탐색을 위하여 MEA plate에서 3일에서 7일간 배양 하며 최적 배양 시간을 탐색하였음
- (2) 기 구축된 하동녹차연구소의 발효 시스템 및 숙성 시스템을 활용하여 습도 및 온도를 조절하며 최적의 발효/숙성 조건을 탐색하였음

나. 금화균을 활용한 금화차 제조공정 탐색 및 설정

- (1) 금화차 제조공정 탐색을 위하여 모차로는 녹차(세작급), 황차, 발효차를 사용하였으며, 200 g 단위로 긴압을 하여 금화차를 제작하였음. 제작된 금화차는 5일에서 10일까지 배양한 후 금화균의 증식 정도를 현미경 및 육안으로 관찰하여 제조공정을 탐색하였음

다. 소비자 기호에 맞는 고품질 금화차 개발

- (1) 소비자 기호에 맞는 고품질 금화차 개발을 위하여 일반 소비자 및 전문가 패널들의 관능검사를 실시하였음. 일반 소비자는 차(茶)를 전공하고 있는 학생들을 대상으로 하였으며, 전문가 패널은 차 관련 업종에 종사자들을 대상으로 실시하였음
- (2) 관능검사용 sample로는 금화차(녹차원료), 금화차(황차원료), 중국 고급 복전차로 하였으며, 평가항목은 음료의 맛, 향 및 전체적인 기호도 등의 항목에 대해 7점 채점법으로 아주 나쁘다(1점), 나쁘다(2점), 조금 나쁘다(3점), 보통이다(4점), 조금 좋다(5점), 좋다(6점), 아주 좋다(7점)로 실시하였음

2. 모차에 금화균(*Eurotium* sp.) 정착을 위한 공정개발

- (1) 미생물발효차를 만들기 위하여 사용한 모차는 녹차, 황차, 발효차 등이 있다. 분리된 *Eurotium cristatum* sp.을 액체나 고체배지에서 접종한 후 72시간 이상 배양하고, 이를 종균으로 사용하여 99℃에서 1분간 스팀 처리된 시료(모차) 차 잎에 처리하였음
- (2) 금화균이 접종된 모차를 천에 넣어서 2,000 psi로 긴압(緊壓)하고, 제조된 금화차(Golden Flower Tea)는 습도 80%, 온도 25℃ 조건으로 발효하였음

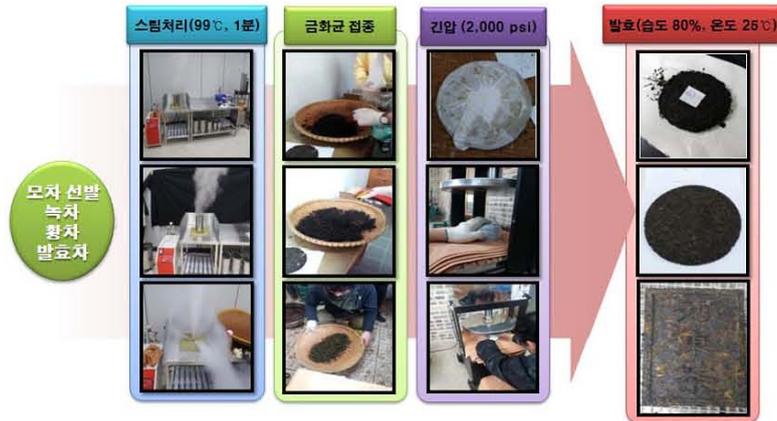


그림 10. Process of golden flower tea manufacturing.

3. 유해 미생물 안전성 연구

가. 금화균의 미생물 발효 유발독소(mycotoxin) 분석

- (1) 제조된 금화차의 미생물 발효 독소(mycotoxin) 검사는 녹차1, 녹차2, 황차를 모차로 제작된 금화차로 발효과정을 거치고 숙성과정 (약 2개월) 중의 sample을 대상으로 실시하였음
- (2) 각각의 시료 400 g을 한국식품연구소 부산지소에 의뢰하였으며, 시험 항목은 총 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합), 제랄레논, 데옥시니발레놀, 오크라톡신A, 푸모니신(F1, F2의 합)으로 대표적인 위험 물질들로 하였음

나. Pyrosequencing 분석을 통한 유해미생물 탐색

- (1) 제조된 금화차의 미생물 동정을 위하여 NGS(Next Generation Sequencing)방법을 통한 Pyrosequencing을 진행하였음

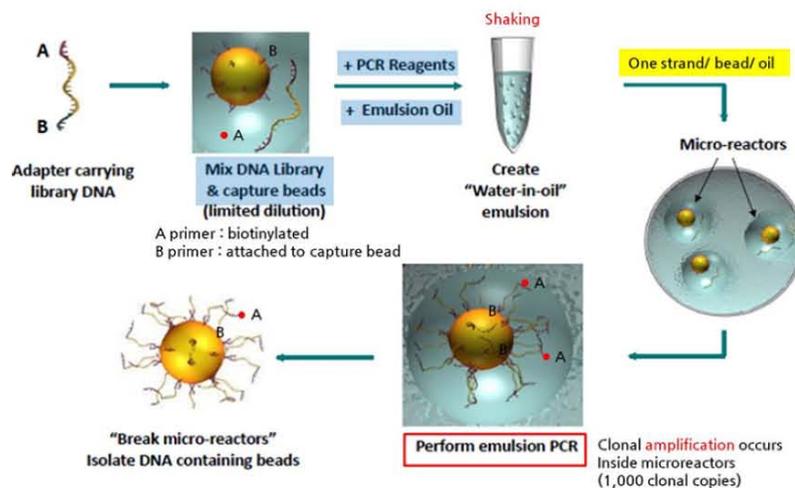


그림 11. Emulsion PCR 진행 방법

- (2) Pyrosequencing을 위한 금화차 8종의 DNA 추출 결과 8종 모두 순도(A260/A280) 1.8 ~ 1.9로 추출 되었으며, 추출된 DNA 총량은 34.14 ug ~ 1.42 ug 으로 확인되어

다음 실험을 진행하였음

- (3) 제조된 금화차 8종 sample 모두 1% agarose gel loading 결과 DNA 가 정상적으로 추출된 것을 확인하였음

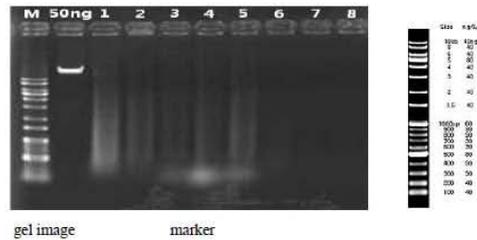


그림 12. 제조된 금화차 8종의 DNA Agarose gel loading 사진

- (4) Sequencing 후 Data Processing 과정을 통하여 Data를 가공하고 Blast, Global alignment 등의 Analysis 과정을 진행 하였음

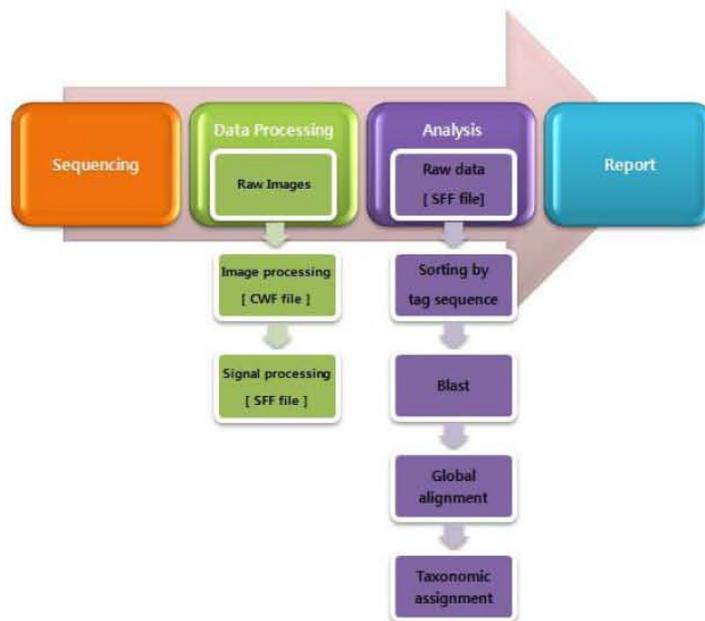


그림 13. Description of Workflow

다. 16S 및 18S rRNA 분석을 통한 유해미생물 탐색

- (1) 제작된 금화차의 유해미생물을 탐색하기 위하여 분리된 균주 및 금화차 회석액을 대상으로 16S 및 18S rRNA 분석을 진행하였으며, 염기서열 분석은 Macrogen에 의뢰하였음
- (2) Bacteria의 경우 16S rRNA gene을 27F, 1492R primer를 이용하여 PCR을 진행 뒤, inter-primer인 785F, 907R primer를 이용하여 1,300bp 이상의 염기서열을 분석하였음
- (3) Fungi의 경우 18S rDNA region의 염기서열을 분석하고 ITS region의 염기서열을 분석하였음

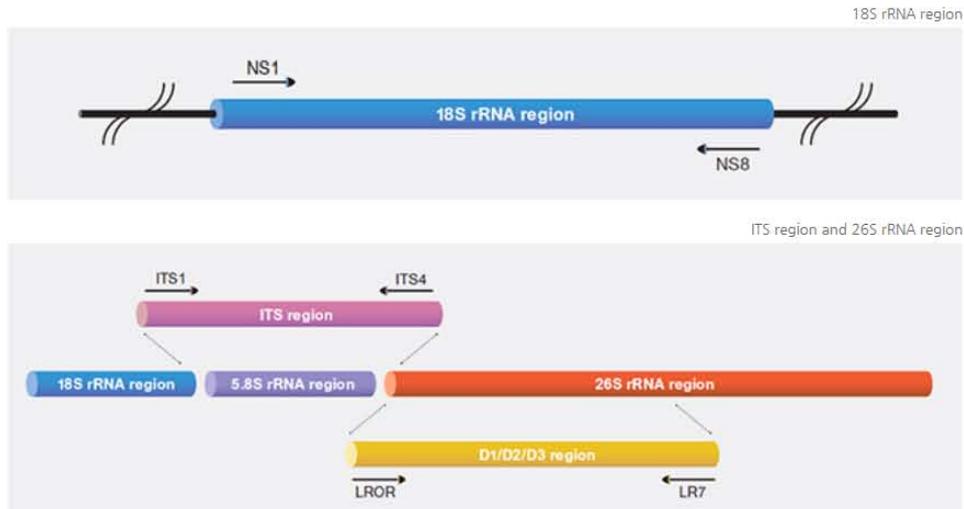


그림 14. Fungi의 18S rDNA region 분석 및 ITS region 분석

(4) Contig align 분석 및 BlastN search(NCBI)를 통하여 염기서열을 분석하였음

4. 금화균의 종균화 기술개발

가. 바인더 탐색 및 적용

- (1) 121℃에서 15분간 멸균시킨 전쌀과 세라믹 beads, 녹차 티백원료를 대상으로 금화균 바인더를 탐색하였음
- (2) 전쌀의 경우 멸균 후 표면을 30~60 분간 말린 후 사용하였으며, 티백 원료의 경우 금화차 제조 공정과 동일한 방법으로 실시하였음
- (3) 세라믹 beads 또한 121℃에서 15분간 멸균 후 사용하였음. 균주의 접종은 고체 배지에서 배양된 균주를 멸균증류수에 희석하여 바인더에 접종 후 3~4일간 25℃ 인큐베이터에서 배양하였음

5. Golden Flower Tea 종균의 제품화

가. 포장기술 탐색 및 적용

- (1) 금화균의 포장기술 탐색을 위하여 고체 및 액체에서 배양된 금화균을 동결건조하여 분말화 하였으며, 이를 후보 포장재에 동일량을 넣어 밀봉 후 Deep freezer에 보관하였음. 30일 후 보관된 금화균을 MEA plate에 각각 배양하여 생균수를 측정하였음

나. 매뉴얼 개발

- (1) 동결건조 상태의 금화균이 들어있는 포장재에 일정량의 멸균수를 취하고 이를 다시 MEA plate 또는 금화차 제조에 바로 사용되는 내용이 포함된 매뉴얼을 개발하였음

다. 상용 배양기술 개발

- (1) 금화균 보급을 위한 상용 배양기술 개발을 위하여 본 연구소에서는 1회 액체 배양 기준으로 최대 7 L 배양이 가능한 Fermentor 장비를 구축하였음. 기존의 배양 방법

보다 약 일주일의 시간이 단축되었으며, 금화균 접종 후 5일 후 성숙된 금화균을 회수할 수 있었음

(2) 균주 접종시 오염상의 문제가 발생할 수 있다는 단점이 있으나, 한번에 기존 배양방법에 비하여 약 10배 이상의 균체를 회수할 수 있었음

6. 고품질 금화차 개발을 위한 품질특성 연구

가. 유리아미노산 분석

(1) 제조된 금화차 시료 0.1 g에 증류수 10 ml을 첨가하여 추출한 후 여과하였다. 여과액에 5-Sulfosalicylic acid dihydrate를 1 ml 가한 후 4℃ 냉장고에서 24시간 동안 방치하여 단백질을 침전시키고, 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 40℃ 이하에서 감압농축기(Rotary evaporator, EYELA N-1100V-W, JAPAN)를 이용하여 농축시킨 후 0.2 M의 Lithium citrate loading buffer(pH 2.2)를 5 ml 첨가하여 용해하였음

(2) 0.2 Membrane filter로 여과하여 130 µl를 아미노산분석기(Sykam S7130 Aminoacid reagent organiger, Germany)로 분석하였음

표 1. Gradient pump conditions

Time(min)	Flow(mL/min)	Buffer A ¹⁾ (%)	Buffer B ²⁾ (%)	Buffer C ³⁾ (%)	Buffer D ⁴⁾ (%)
0	0.45	100	0	0	0
14	0.45	100	0	0	0
16	0.45	79	21	0	0
37	0.45	79	21	0	0
47	0.45	52	48	0	0
66	0.45	0	100	0	0
72	0.45	0	0	100	0
80	0.45	0	0	100	0
85	0.45	0	0	79	21
105	0.45	0	0	77	23
105-1	0.45	0	0	0	100
109-1	0.45	0	0	0	100
109-2	0.45	100	0	0	0
131-2	0.45	100	0	0	0

1) Li-Citrate buffer A-1(for physiological program : sykam catalog No.60-02-006)

2) Li-Citrate buffer B-1(for physiological program : sykam catalog No.60-02-007)

3) Li-Citrate buffer C-1(for physiological program : sykam catalog No.60-02-013)

4) Regeneration Solution(for Hydrolysate program : Sykam Catalog No. 60-02-006)

표 2. Amino module conditions

Time(min)	Flow(mL/min)	Valve	Column Temp(°C)
0	0.25	Water	36
0.1	0.25	Ninhydrin	36
40	0.25	Ninhydrin	36
70	0.25	Ninhydrin	60
85	0.25	Ninhydrin	60
90	0.25	Ninhydrin	74
110	0.25	Water	74
125	0.25	Water	36
155	0.25	Water	36
275	0.25	Water	36

Item	Method
Instrument	Sykam S-433, Germany
Column dimension	4.6 * 150 mm (Peak)
Reactor temp.	120°C
Detector	UV/VIS detector 440 nm (1.00 AU), 570 nm(1.00 AU)

나. 향기성분 분석

- (1) 건조된 금화차 1 g을 20 ml의 Headspace Sampler용 Vial에 넣고 증류수 1 ml을 첨가하였음. 이를 Turbomatrix Headspace Sampler(Perkinelmer, CA, USA)를 이용하여 Headspace oven 120°C에서 20분간 Heating한 후 Headspace 500 µl을 침전 600 gc(Perkinelmer, CA, USA) 및 MSD (Perkinelmer, CA, USA)로 분석하였음
- (2) 포집된 향기성분은 GC/MSD를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 DB-5MS(30m * 0.25 mm i.d., 0.25 µm, HP Agilent, USA)으로 40°C에서 220°C까지 승온하여 분석하였음. Injector는 250°C에서 Split ratio 비율을 5대1로 하였으며, 운반기체는 헬륨으로 1분에 0.8 ml의 유속으로 사용하였음
- (3) 시료의 이온화는 EI (Electron impact Ionization) Mode, ionization voltage는 70 eV, Mass range는 50~300으로 진행하였음. MS의 온도는 Interface 230°C, Ion source는 200°C로 하였음. 각 성분은 NIST library를 사용하여 확인하였음

표 3. GC conditions for analysis of aroma compounds

Items	Conditions
Headspace	Turbomatrix Headspace Sampler(Perkinelmer, CA, USA)
Instrument	Clarus 600(Perkinelmer, CA, USA)
Column	DB-5MS(30 m × 0.25 mm I.d, 0.25 μm, HP Agilent, USA)
Detector	Clarus 600 T(Perkinelmer, CA, USA)
Injection temp.	230 °C
Ion source temp.	200 °C
Carrier gas	Helium
Split ratio	1 : 5

다. 카테킨/카페인 및 테아플라빈 함량 분석

- (1) 금화차의 Catechin-Caffeine 함량을 HPLC Chromatogram으로 분석하였음. 차 시료 0.1 g 에 증류수 50 ml을 희석하여 80 °C로 고정된 환류냉각 추출기에서 1시간 동안 증탕추출 한 다음 Whatman® No.2 여과지에 여과시킴
- (2) 여과된 액에 에틸아세테이트 50 ml를 가하여 분액여두로 혼합한 다음 상층액을 회수 하였음. 회수된 상층액을 감압농축 한 후 농축물을 메틸알콜 5 ml로 용해시킨 후 0.45 μm 주사기로 필터링한 후 10 μl를 HPLC에 주입시켜 분석하였음(표 4)

표 4. HPLC analysis conditions of comparison Catechin-Caffeine content

HPLC Operation Conditions			
Item	Condition		
Column	TOSHO	ODS-80Tm (4.6 * 150 mm)	
Wave length	280 nm		
Flow rate	1 ml/min		
Injection volume	10 μl		
	Solvent A : 0.2% H ₃ PO ₄	Solvent B : 100% Acetonitrile	
	Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
Mobile phase	0	85	15
	7	85	15
	15	0	100
	15.05	85	15
	20	85	15

- (1) 미생물 발효차 추출물 1 ml를 취하여 e-tube에 담고, 7,000 rpm, 25 °C에서 5분간 원심 분리하였음. 원심 분리한 상층액을 조심스럽게 0.45 um membrane filter로 여과한 후 이를 분석 시료로 사용하였음
- (2) 테아플라빈류의 함량 측정은 각각의 추출물을 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, Ultimate 3000, Dionex Co. Ltd., USA) 장비를 이용하여 분석하였음. 이때 HPLC 이동상 조건은 표 5과 같으며 분석조건은 표 6에 나타낸 바와 같음

표 5. Solvent gradient condition for analysis of theaflavins

Time	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
Initial	1.0	85	15
2.0	1.0	85	15
40	1.0	70	30
42	1.0	0	100
44	1.0	85	15
47	1.0	85	15

표 6. HPLC condition for analysis of theaflavin in fermented tea extract

Item	Method
Column	TOSOH TSK-GEL [®] ODS-80T _M C18 5 μm, 4.6 mm × 25.0 cm
Mobile phase	A : 0.2% H ₃ PO ₄ in water B : Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Column oven temp.	40°C
Detector	UV 205 nm
Analytical time	42 min

라. 항산화 활성 분석

- (1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성은 Blois의 방법에 따라 DPPH에 대한 전자공여활성으로 나타내었음. 즉, 0.01% DPPH-methanol 용액에 동량의 시료 추출물을 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였음. DPPH 라디칼 소거활성은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비(%)로 나타내었음
- (2) Fe⁺² 킬레이팅 활성은 시료추출액 0.15 ml에 0.5 mM FeCl₂ · 4H₂O용액 0.01 ml를 넣어 실온에서 5분간 반응시키고 562 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 다시 1.25 mM ferrozine 용액 0.02 ml를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 562 nm에서 흡광도를 측정하였음. 추출물의 Fe⁺² 킬레이팅 활성은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비로 나타내었음
- (3) FRAP (ferric-reducing antioxidant potential)법에 의한 환원 활성은 Benzie와 Strain

의 방법에 의해 측정하였음. 먼저, 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 용액 및 20 mM FeCl₃ · 6H₂O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 사용 직전에 혼합하여 만든 기질용액을 37°C에서 가온하여 실험에 사용하였음. 96 well plate에 시료액 40 ul, FRAP 기질용액 100 ul 및 증류수 40 ul를 차례로 가하여 37°C에서 4분간 반응시켜 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며, FeSO₄ · 7H₂O를 표준물질로 하여 얻은 표준 검량선으로부터 계산하였음

- (4) 반복 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 분산분석하여 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 분석결과에 대한 유의성 검정은 분산분석을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였음

마. 총 페놀 화합물 분석

- (1) 미생물 발효차 건조시료 2 g을 에탄올 50 ml에 넣고 2시간 동안 교반하여 추출한 다음 여과지로 여과 후 추출물 500 ul에 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent 2.5 ml을 넣고 5분간 실온에서 반응하였음
- (2) Sodium carbonate (Na₂CO₃) 2 ml을 첨가하여 2시간 동안 상온에서 반응 한 후 UV/Visible Spectrophotometer를 이용하여 765 nm에서 측정하였음

바. 플라보노이드류 함량 분석

- (1) 시료에 함유되어 있는 Flavonol류를 분석하기 위하여 시료 0.5 ml에 증류수 2 ml을 취한 후 15% NaNO₂ 150 ul를 첨가하고 6분간 반응하였음
- (2) 반응액에 10% AlCl₃ 150 ul를 첨가한 후 6분간 반응하였으며, 이 반응액에 4% NaOH solution 2 ml을 첨가한 후 혼합하고 최종 볼륨 5 ml이 되도록 증류수를 첨가하고 혼합하였음. 15분간 반응 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였음

7. 금화차 개발을 위한 1차 발효미생물 탐색

가. 최근 발효차는 성질이 찬 녹차에 비해 누구나 부담없이 섭취할 수 있고, 다양한 맛에 대한 소비자의 요구도가 증가하면서 발효차에 대한 관심이 증가하고 있음. 그러나 기존의 미생물 발효차 특히 중국산 보이차나 복전차의 경우 생산지역에 자연적으로 존재하는 미생물에 유래하여 발효가 진행되는 가공공정으로 발효시 발생할 수 있는 문제점들을 원활히 제어할 수 없음

나. 발효에 관련된 미생물을 제어할 수 있으면 가공공정시 발생하는 문제점들을 원활히 해결할 수 있으며, 최종제품의 품질관리가 원활히 이뤄질 수 있을 것임. 발효차 유해 미생물을 제어하기 위해서는 1차적으로 미생물의 종균화가 수반되어야 하며, 이를 제다기업에 보급하기 위해서는 종균의 대량생산이 이뤄져야할 것임

다. 차엽의 경우 금화균이 신속하게 활용할 수 있는 탄소원이 부족하기 때문에 초기 발효시 타미생물을 이용하여 차엽의 고분자 물질을 분해하고, 이용하기 쉬운 탄소원으로 전환시킬 필요가 있음. 따라서 단백질 및 전분질 분해효소와 각종영양소를 함유한 각종 유용 미생물 선발군 중 우수한 미생물 선발하고 고분자 탄수화물을 분해하는 효소

를 생성하는 미생물을 선택하여 1차 발효를 통해 저분자 탄소원을 확보하는 공정을 개발함으로써 금화차 개발을 위한 기초연구를 제공할 수 있을 것임

- 라. 본 실험에 사용한 녹차 시료는 경남 하동군 소재의 햇차원으로 부터 2012년산 대작을 제공받아 사용하였음
- 마. 1차 발효공정에 사용할 미생물인 유산균은 *Lactococcus lactis* NBRC 12007을 분양받아 사용하였으며, 고초균은 경상대학교 류충호 교수팀에서 분리하여 보관중인 효소역가가 높고 발효능이 우수한 *Bacillus subtilis* KCCM 11266P를 사용하였음. 황국균과 백국균은 충무발효에서 구매하여 사용하였음
- 바. 건조되어 보관 중인 녹차에는 발효균이 생육하기 어려우므로 적절한 수분을 공급하기 위하여 건조 녹차 1 kg 당 멸균수 500 ml를 분무기로 공급한 후 30℃에서 30분간 보관하여 충분히 활성화 시켰음. 선발된 발효 미생물인 유산균, 고초균, 황국균, 백국균을 녹차 1 g당 10^6 CFU가 되도록 접종하였음. 접종 후 적정 온도에서 발효하면서 12 시간 간격으로 샘플을 채취하여 품질을 조사하였음

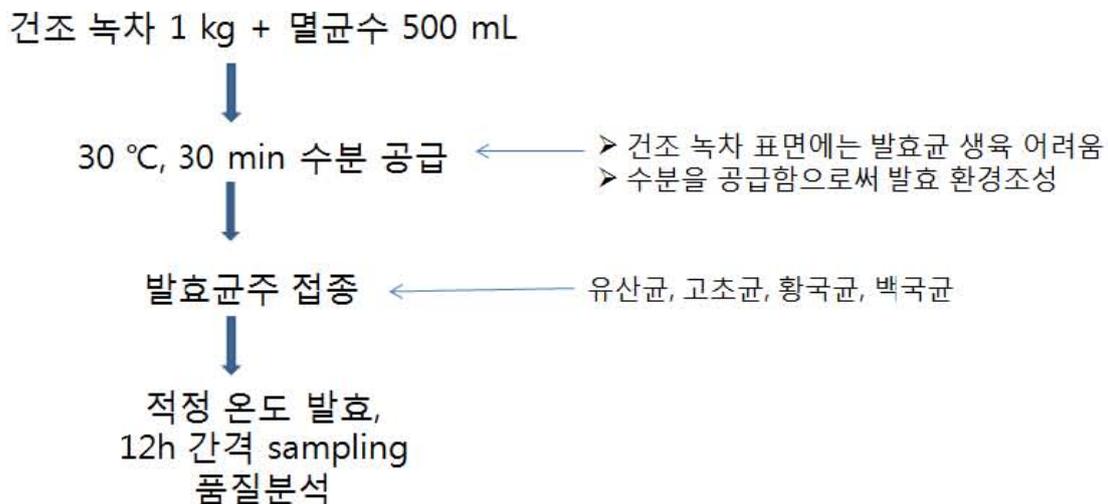


그림 15. 녹차의 1차 발효 공정

8. 단계발효 접목을 통한 금화균 발효 조건 확립

- 가. 식품가공용 미생물인 효모, 곰팡이, 박테리아가 증식 혹은 분열하기 위해서는 온도, 수분, pH 및 영양원 등의 환경조건이 잘 갖추어져야 한함
- 나. 유산균, 황국균과 고초균은 옛 부터 발효식품 제조에 사용된 식용 가능한 미생물로서 발효 후 잔존 미생물은 생균제로 이용되고 있음. 발효물에 분비된 균체 유래의 효소나 다당류 등은 동물의 장관 내 미생물 집합체를 정상으로 유지하고 면역력을 강화시켜 질병저항성을 향상시키는 역할을 함

- 다. 발효차 제조에 활용해도 동일한 작용을 기대할 수 있을 것으로 생각됨. 유산균은 생육 중 젖산을 분비하고 pH를 저하시키므로 발효 산물을 산성화시키는 특징이 있음. 그러나 효소학적인 문제인지 영양분 자화상의 문제인지는 알 수 없으나 식물성 단백질 분해 효소 역가와 전분 자화성이 아주 약한 단점과 유사종의 미생물 포자의 발아나 생육을 근본적으로 억제하는 천연 항균성 물질을 생산하여 자신에게 유리하게 환경을 선점하는 장점이 있음
- 라. 황국균은 전분이나 단백질 분해효소의 활성과 난분해성 물질인 피틴산 분해력도 강하여 곡물발효에 널리 사용되고 있는 미생물이지만 고초균의 증식에 의해 생육이 저해되는 단점이 있음
- 마. 고초균은 일부 유산균의 박테리오신 작용에 의해 아포의 발아는 물론 증식이 치명적으로 억제되는 단점이 있으나 자연계에 널리 분포하여 식물성 자원의 분해와 식품의 부패에도 관여하는 등 장점과 단점을 모두 가진 미생물로서 세제용 효소생산은 물론 기능성 점질물인 감마폴리글루타민산 생산에 활용되는 등 인간의 생활과 밀접한 관계를 가지고 있음
- 바. 차 잎 성분의 유해 미생물 증식을 억제 효과는 녹차의 대표적인 기능적 특성으로 알려져 있으며, 차 잎 속의 폴리페놀옥시다아제란 효소를 가열처리로 억제시켜 가공한 녹차와 상기 효소반응을 진행시켜 분해 및 갈변반응을 유도하여 제조한 발효차를 비교하면 탄닌 조성, 수용성 물질의 함량, 항산화작용 그리고 항균력에 차이가 난다고 알려져 있음
- 사. 녹차를 복수의 미생물로 단계적 발효를 시키기 위해서 우선 1차 년도에 실시한 연구 결과 사용 가능한 균주 후보인 황국균, 유산균, 백국균, 고초균과 중국의 고급 발효차에서 Golden flower를 생성하는 금화균 사이의 상승 혹은 길항 특성을 미리 파악할 필요가 있음

9. 배양조건에 따른 단계 발효 미생물의 발효 특성

가. 발효 온도에 따른 녹차의 발효

- (1) 유산균, 황국균, 백국균은 24, 30℃, 고초균은 37, 43℃에서 온도별로 발효하면서 12시간 간격으로 샘플을 채취하여 실험에 이용하였음

나. 녹차의 생균수 측정

- (1) 녹차 1 g을 단계 희석한 후 유산균은 MRS (DeMan, Rogosa, Sharpe agar) 평판배지에 도말하여 30℃, 고초균은 TSA (Tryptic Soy Agar) 평판배지에서 37℃, 황국균과 백국균은 PDA (Potato-dextrose agar) 평판배지에 도말하여 30℃에서 18~24시간 배양시킨 후 나타난 colony를 계수하여 생균수를 측정하였음

다. 녹차의 pH 측정

(1) pH는 시료 5g을 증류수 95 ml에 현탁시켜 pH meter(Orion model 420A; USA)로 측정하였음

라. 녹차의 산도 측정

(1) 산도는 0.1N NaOH 용액으로 중화적정하여 초산으로 환산하였음

마. 녹차의 아미노태 질소 측정

(1) 녹차의 아미노태 질소(AN : Amino type nitrogen) 함량 측정은 A.O.A.C.법(1)에 따라 균일하게 분쇄한 시료 5 g을 250 ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 100 ml 까지 정용함

(2) 이 중 50 ml을 취하여 100 ml beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화함. 여기에 중성포르말린 20 ml을 가하고 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 적정함. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용함

바. 녹차의 항산화능 측정

(1) 녹차의 항산화능은 DPPH 자유라디칼 소거활성 측정(2)을 통하여 확인하였다. 시료 1 ml에 0.2 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 2 ml 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유라디칼 소거 활성은 다음과 같이 계산하였다.

▶ Saving activity (%) - $(1-A1/A0) \times 100$

A1 : 시료 처리군의 흡광도

A0 : 시료 대조군의 흡광도

사. 녹차의 총당 측정

(1) 녹차의 총당 함량은 Phenol-H₂SO₄법에 따라 시료 1ml에 5% phenol 1ml와 H₂SO₄ 5ml를 가한 후 상온에서 30분간 반응 후 460 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 glucose (merck, Germany)를 사용함

아. 녹차의 환원당 측정

(1) 환원당은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법을 사용하여 시료 1 ml에 0.75% DNS 용액 1 ml에 0.75% DNS 용액 1 ml을 첨가하고 100℃에서 5분간 반응시킨 다음 증류수 8 ml을 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정함

자. 녹차의 폴리페놀 함량 측정

(1) 녹차 시료 중 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법으로 측정하였다. 20배로 희석한 시료 5 ml에 Folin 시약 5 ml를 가하고 3분간 정치한 다음 10% Na₂CO₃ 용액을 5 ml 가하여 1시간 동안 반응 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 garlic acid (Sigma, USA)을 사용함

차. 녹차의 α -amylase 역가 측정

- (1) 녹차의 α -amylase 활성 측정은 Bernfeld의 방법으로 측정함. 시료 5 g에 증류수 95 ml를 가하여 100 ml로 정용한 후 밀 메주를 으갠 뒤 160 rpm으로 1시간 동안 추출한 후 여과(Whatman No.2)시킨 여액 0.5 ml, 1% NaCl 1 ml, 0.2 M acetate buffer 2 ml과 5% soluble starch 5 ml을 첨가한 후 65°C에서 30분간 반응시킴
- (2) 반응액 1 ml을 취하여 DNS 3 ml을 넣고 100°C에서 5분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정함. 효소 활성 단위는 1분간 maltose 1 μ mol을 생성하는 효소량을 1 unit로 함

카. 녹차의 카테킨 함량 분석

- (1) 녹차의 카테킨 함량 분석을 위해 시료 0.1 g에 증류수 50 ml을 희석하여 80°C로 고정된 환류냉각 추출기에서 1시간 동안 중탕추출 한 다음 Whatman® No.2 여과지에 여과시킴
- (2) 여과된 액에 에틸아세테이트 50 ml를 가하여 분액여두로 혼합한 다음 상층액을 회수함. 회수된 상층액을 감압농축 한 후 농축물을 메틸알콜 5 ml로 용해시킨 후 0.45 μ m 주사기로 필터링한 후 10 μ l를 HPLC에 주입시켜 분석함. 분석을 위한 조건을 표 8에 나타냄

표 7. 카테킨·테아플라빈 동시분석을 위한 기기분석 조건

Item	Method
Column	TOSOH TSK-GEL® ODS-80TM C18 5 μ m, 4.6 mm × 25.0 cm
Mobile phase	Time 2 min 40 min 42 min 44~47 min
(v/v) : gradient	0.2% H ₃ PO ₄ in water 85% 70% 0% 85%
	Acetonitrile 15% 30% 100% 15%
Flow rate	1.0 ml/min
Column oven temp.	40°C
Detector	UV 205 nm
Analytical time	42 min

3절 연구내용 및 결과

1. 중국 복전차로부터 금화균 분리/배양 및 염기서열 분석

가. 중국 복전차로부터 금화균 분리 및 배양

- (1) 국내에서 구입한 중국 호남성 익양 차창 복전차로부터 금화균 (*Eurotium cristatum*)을 분리하였음(그림 16)(수탁번호 : KACC93171P). 분리된 금화균(*Eurotium cristatum*)의 폐쇄자낭과(Cleistothecium)를 도립현미경과 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였음

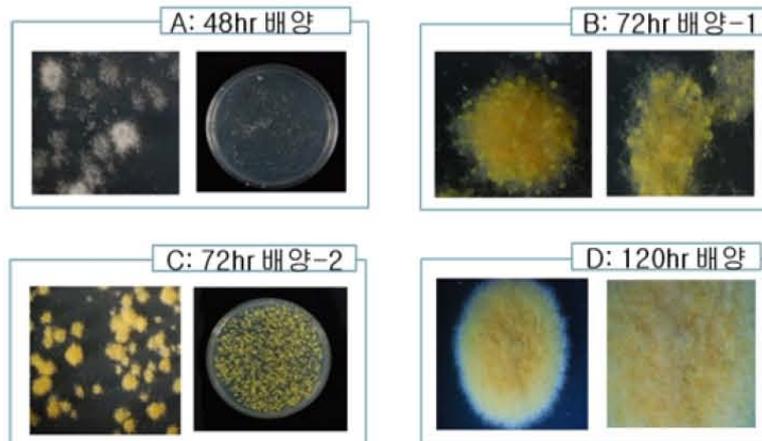


그림 16. Golden flower fungi isolated from chinese Fuzhuan-tea.

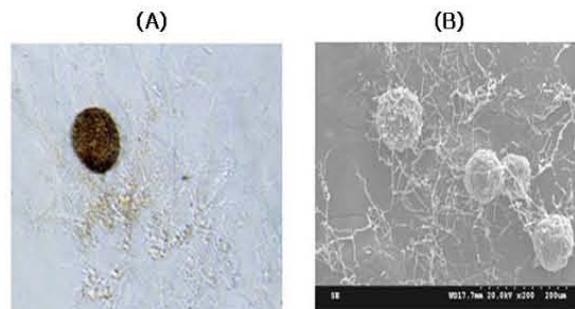


그림 17. Cleistothecium(A) and Photomicrograph(B) of Golden flower fungi isolated from chinese Fuzhuan-tea.

나. 분리 균주의 동정을 위한 염기서열 분석

- (1) PCR로 증폭된 DNA는 전기영동을 하여 확인하였음. 확인된 PCR DNA 절편을 T/A 클로닝벡터(pGEM Teasy vector)에 클로닝하여 DNA 염기서열을 분석한 결과 β -Tubulin 유전자와 RNA Polymerase β 유전자의 크기는 각각 400 bp, 600 bp 이었음
- (2) 상기 유전자들의 유사성을 확인하기 위해 결정된 염기서열을 유전자 Data base에서 blast 분석을 수행한 결과 유로티움 크리스타툼 (*Eurotium cristatum*)과 가장 유사성이 높음을 알 수 있었음
- (3) β -Tubulin의 경우 유로티움 크리스타툼 (*Eurotium cristatum*)과는 1개의 염기서열(1 bp)가 상이하였으며, RNA Polymerase β 의 경우에는 3개의 염기서열(3 bp)이 다를 수 있었음

- (4) 이렇게 분석된 금화균 *β-Tubulin* 유전자 염기서열이 기존에 알려진 유로티움 속의 *β-Tubulin* 유전자와 얼마나 상이한지 조사하기 위해서 다중염기서열정렬 (Multiple sequence alignment) 및 비가중산술결합법 (Unweighted pair group method using arithmetic algorithm)을 사용하여 유전계통도를 작성하였음
- (5) 그 결과, 본 연구에서 분리한 금화균은 유로티움 속 (*Eurotium sp.*)중에서도 유로티움 크리스타툼 (*Eurotium cristatum*)과 가장 유사하였으며, 유로티움 크리스타툼 (*Eurotium cristatum*)의 아종 (Subspecies, *E. cristatum sp.*)으로 사료되었음
- (6) 위와 같이 동정된 결과를 토대로 특허 출원을 하였음. 출원된 특허의 주요 내용은 “중국 복전차로부터 분리된 금화균인 유로티움 크리스타툼(*Eurotium cristatum sp.*) 균주(KACC93171P)에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 복전차로부터 분리되고 발효차의 종균으로 사용되는 신균주 유로티움 크리스타툼(*Eurotium cristatum sp.*) 균주(KACC93171P)에 관한 것임
- (7) 미생물 발효균의 일종인 금화균을 복전차로부터 단일클론으로 분리하고, Genomic DNA로부터 유전자를 PCR 증폭하여 염기서열 분석함으로써 새로운 유전자 서열을 가진 금화균이라는 것을 확인하였고, 이를 종균으로 사용하여 온도, 습도 조절하에서 미생물 발효차인 금화차(Golden Flower Tea)를 개발할 수 있다”이며, 특허미생물은 국립농업과학원에 수탁하였음

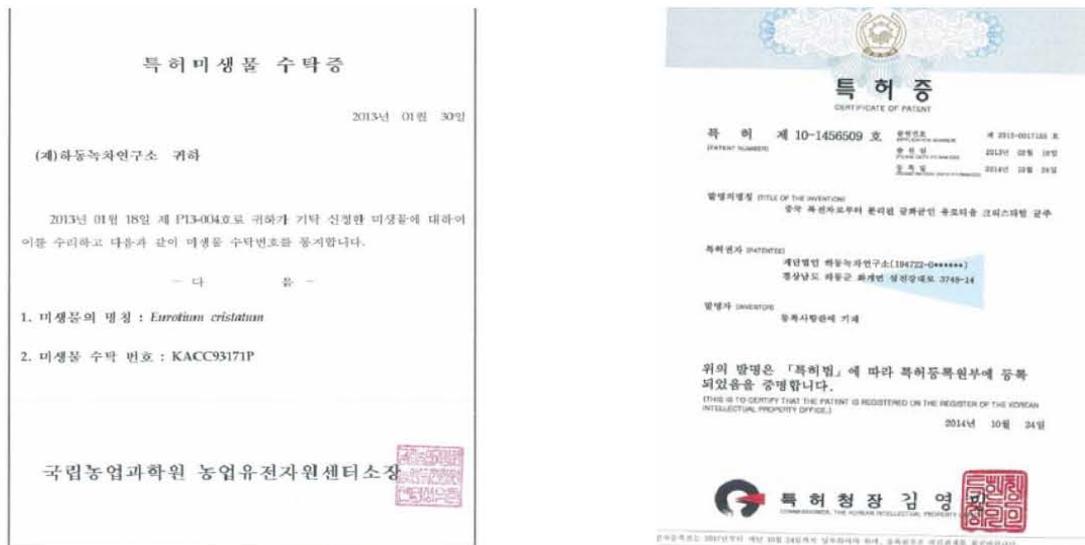


그림 18. 금화균의 미생물 수탁증 및 특허증

2. 금화균(*Eurotium sp.*)을 이용한 발효 공정 연구

가. 금화균의 차엽처리 생육조건 탐색(시간, 온도, 습도)

- (1) 제조된 금화차의 발효시간별 수분함량 변화를 관찰한 결과 발효 1일째 수분함량이 급격히 감소되었으며, 13일과 20일에 다시 소폭 증가하였음
- (2) 금화균의 경우 고체 배지에서 3일간 배양하면 금화균이 잘 번식한다. 녹차에 금화균을 접종한 경우 7일, 황차의 경우 4일 정도면 금화균이 정상적으로 정착된 것을 확인할 수 있었음

- (3) 온도의 경우 발효 온도는 25~28℃에서 80% 이상의 습도를 공급하는 조건이 적당하였으며, 발효 후 건조 과정은 30℃에서 수분을 공급하지 않은 조건으로 실시하였음
- (4) 특히 발효 0일제는 금화차 표면의 수분 변화가 많으므로 천을 덮어서 수분 변화를 줄여주는 것이 필요했음

표 8. Measure the changes in the moisture content of the golden flower tea

	녹차1	녹차2	황차1	황차2	발효차1	발효차2
발효 0일	50	43	47	48	47.9	47.8
발효 1일	13.5	13.4	13.6	13.4	13	13.1
발효 2일	13	13.5	13.4	13.5	13.6	13.3
발효 3일	13	13	13.2	13.1	13.3	13.2
발효 7일	13	13	13.4	13.1	12.5	12.4
발효 8일	13.1	12.9	12.9	12.3	12.3	12.4
발효 10일	13	13.1	13.5	13.4	13.5	13.6
발효 13일	20.1	18.1	15.1	15.5	14.6	13.2
발효 20일	17.6	17.4	13.4	12.8	16.3	16.8
숙성 7일	7.7	10.5	10.2	9.8	10.8	10.5

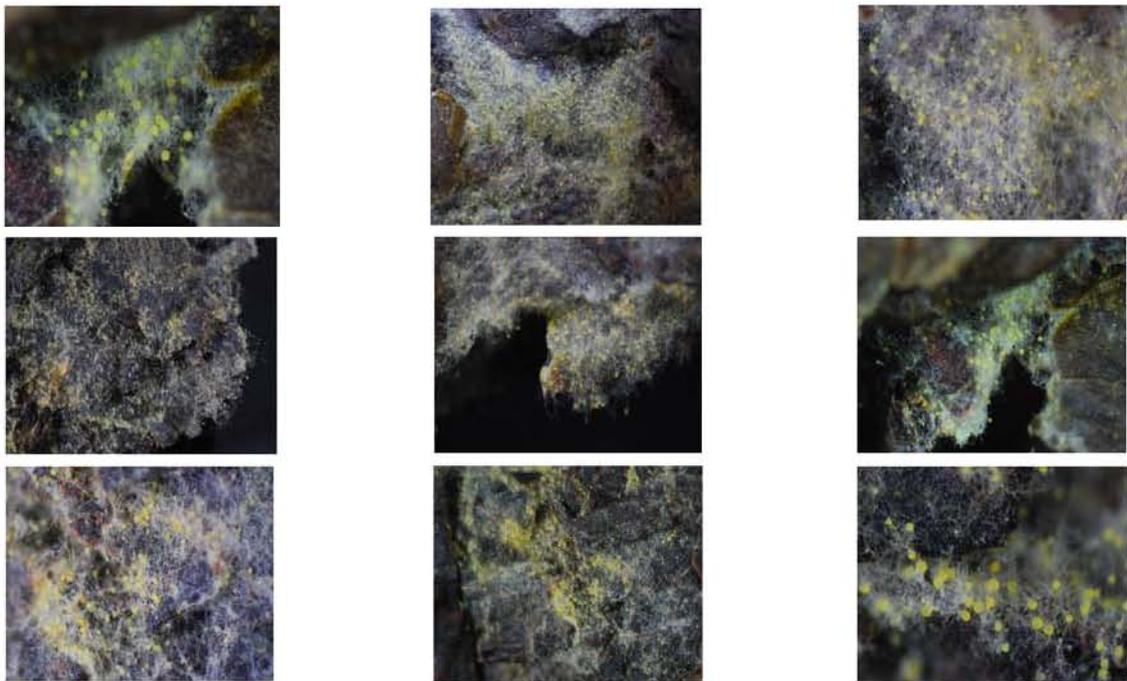


그림 19. Observe the microscope of produced golden flower tea.

나. 금화균을 활용한 금화차 제조공정 탐색 및 설정

- (1) 금화균을 활용한 금화차 제조공정 탐색을 6가지 조건으로 실시하였음. 모차는 발효차, 녹차, 황차를 사용하였으며, 고체 배지에서 배양된 금화균을 그대로 접종하는 형

태와 멸균 증류수에 풀어서 사용하는 2가지 조건으로 제조공정을 탐색하였음
 (2) 모차에서는 황차를 사용하였을 때 금화균의 정착이 가장 효과적이었으며, 증류수에
 희석된 금화균을 사용하였을 때 금화균의 정착이 잘 이루어지는 것을 확인하였음

1번 시료 200g 에 98℃ 5분간 스팀

스팀 후 바로 균 접종 후 천에 넣어서 2,000psi 로 긴압 후 습도 40%,
 발효(온도 25℃, 습도 80%)



스팀 5분



고체배양 금화균 접종



긴압 사이즈 15cm

2번 시료 200g 에 15분간 스팀

스팀 후 바로 균 접종 후 천에 넣어서 2,000psi 로 긴압 후 습도 40%,
 발효(온도 25℃, 습도 80%)



스팀 5분



고체배양 금화균 접종



긴압 사이즈 15cm

3번 시료 200g 에 5분간 스팀

스팀 후 바로 균 접종 후 천에 넣어서 2,000psi 로 긴압 후 습도 40%,
 발효(온도 25℃, 습도 80%)



스팀 5분



고체배양 금화균 접종



긴압 사이즈 15cm

4번 시료 200g 에 5분간 스팀
 스팀 후 바로 균 접종 후 천에 넣어서 2,000psi 로 긴압 후 습도 40%,
 발효(온도 25℃, 습도 80%)



스팀 5분



액체배양 금화균 접종



긴압 사이즈 15cm

5번 시료 200g 에 5분간 스팀
 스팀 후 바로 균 접종 후 천에 넣어서 2,000psi 로 긴압 후 습도 40%,
 발효(온도 25℃, 습도 80%)



스팀 5분



액체배양 금화균 접종



긴압 사이즈 15cm

6번 시료 200g 에 5분간 스팀 후 다시 섞은 다음 다시 5분간 스팀
 스팀 후 바로 균 접종 후 천에 넣어서 2,000psi 로 긴압 후 습도 40%,
 발효(온도 25℃, 습도 80%)



스팀 5분 후 mix 후 스팀 5분



액체배양 금화균 접종



긴압 사이즈 15cm

그림 20. 금화차 제다공정 탐색

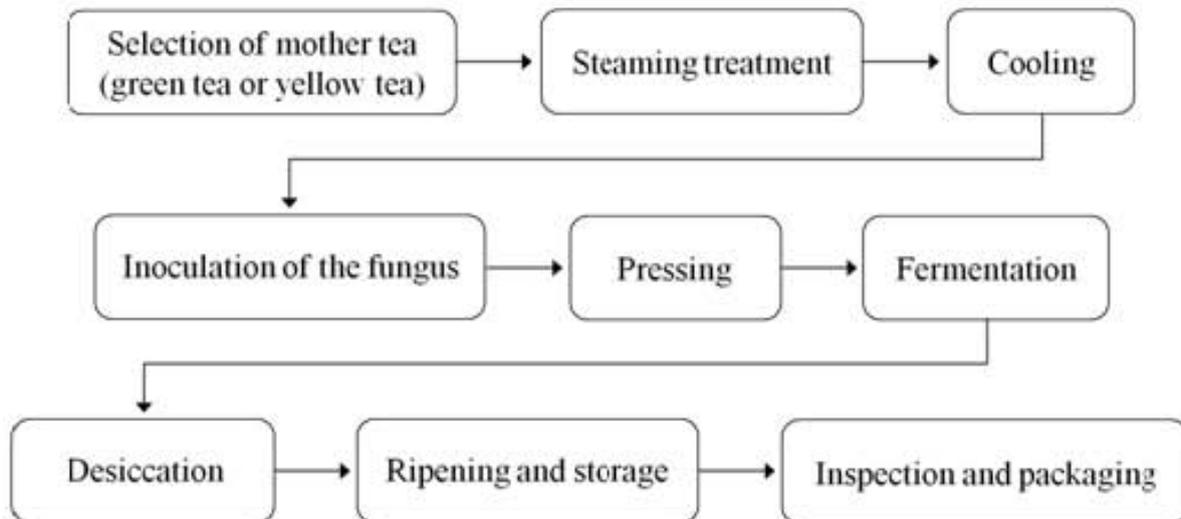
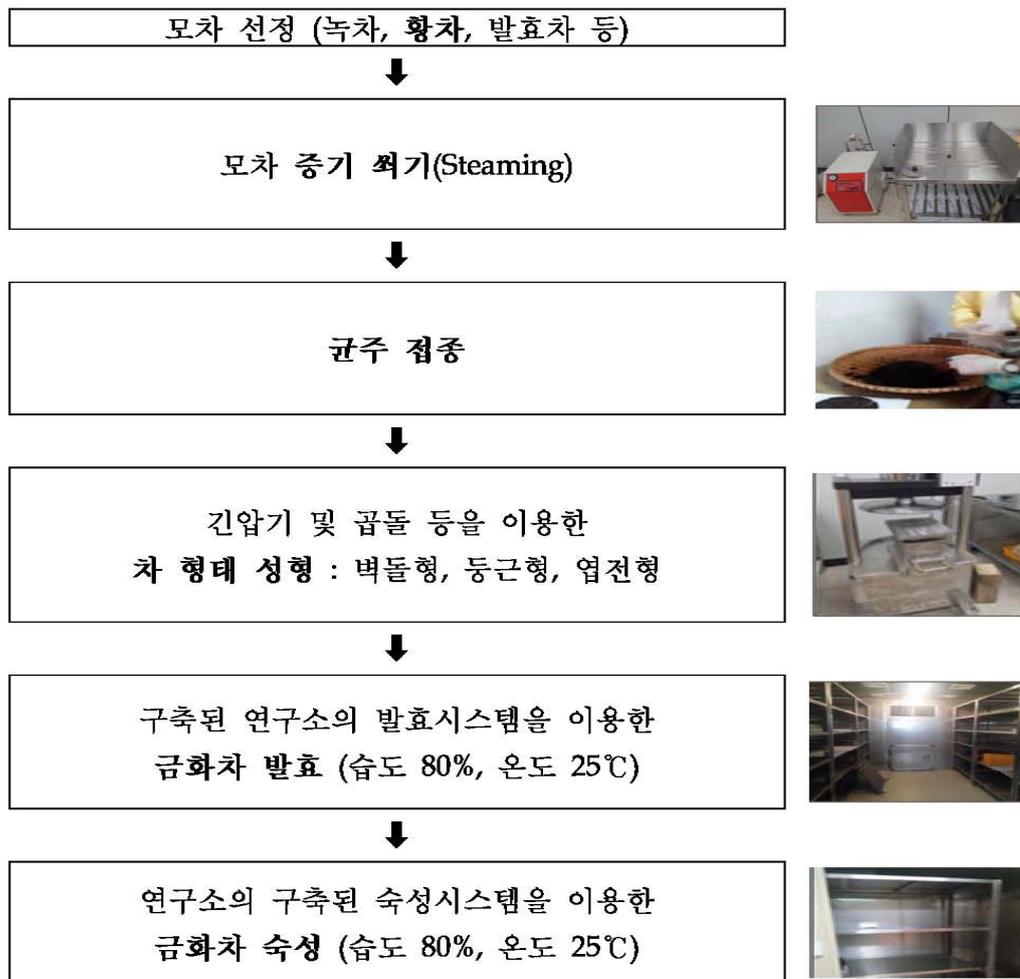


그림 21. 최종 금화차 제다공정

3. 모차에 금화균(*Eurotium* sp.) 정착을 위한 공정개발

- (1) 고품질 금화차 개발을 위한 금화차 제조방법은 총 6단계로 설정 하였으며, 이 방법에 대하여 특허출원(출원번호 : 10-2014-0010502, 특허명 : 금화균을 이용한 미생물 발효차 제조 방법)을 완료하였음
- (2) 미생물 발효차인 금화차를 만들기 위한 모차로 녹차와 황차를 사용하며, 녹차 종에서는 세작과 대작을 사용하고, 찻잎을 99℃에서 30 - 60 초 스팀처리 함
- (3) 금화균이 *Eurotium cristatum*을 액체 또는 고체 배지에 접종하고 72시간이상 배양된 균주를 스팀처리된 모차 200 - 300 g에 40 - 80 mg을 접종하였음. 균이 접종된 찻잎의 종류별로 구분하여 각각 천 또는 금형틀에 넣어 250 ~ 2,000 psi로 벽돌형, 둥근형 또는 엽편형으로 긴압하여 차 형태를 성형하였음
- (4) 금화균이 접종된 찻잎을 습도 80%, 온도 25℃ 조건으로 녹차 6 ~ 10일, 황차는 10일간 발효시켰음. 발효 시간별 수분함량 변화를 확인한 결과, 발효 1일째 수분함량이 급격히 감소되었으며, 이후 13 ~ 15%로 큰 변화가 없었음
- (5) 발효 시작과 동시에 수분함량이 감소하지 않으면 내·외부에 금화균 이외의 미생물들이 증식할 수 있는 여건을 만들어 주기 때문에 이와 같은 오염을 방지하기 위하여 균주 접종시 40% 이상이면 수분함량을 20% 이하로 감소시키는 것은 중요하다고 판단됨
- (6) 발효과정을 거친 찻잎을 습도 45 ~ 50%, 온도 45℃ 조건으로 5일 ~ 10일간 건조시켜 제품의 수분 함량을 10% 이하로 감소시켰음. 수분함량이 5% 이하로 낮아질 경우 영양성분 또는 향기성분 등의 변형이 있으므로 8 ~ 10%를 유지하도록 하였으며, 건조 과정을 거친 찻잎을 습도 50%, 온도 25℃ 조건으로 최소 6개월간 숙성시킨 후 시제품으로 판매가 가능함



- (7) 고품질 금화차 개발을 위한 일반 소비자를 대상으로 실시한 관능평가에서 기존 중국의 고급 복전차(중국차)는 맛(130 점), 향(134 점), 기호도(127 점) 으로 집계 되었으며, 금화차(GFT-Y)는 맛(121 점), 향(121 점), 기호도(121 점), 금화차(GFT-G)는 맛(105 점), 향(119 점), 기호도(105 점)으로 집계되었음 (그림 26)
- (8) 이상의 결과로 숙성기간이 5년 이상된 고급 보이차는 단맛과 깊은 맛을 내는 반면 아직 숙성기간이 3개월 정도된 금화차의 경우 맛, 향, 기호도 측면에서 상대적으로 낮은 점수를 받았음. 그러나 금화균 정착이 가장 우수했던 황차로 만들어진 금화차에서 평균 121 점을 받아 앞으로의 전망이 밝음을 예측할 수 있었음
- (9) 또한, 녹차로 만들어진 금화차의 경우는 금화균 정착에 필요한 발효 시간이 오래 걸리기 때문에 더 숙성된 맛을 못냈지만, 기존의 녹차가 가지는 구수한 향 때문에 평가항목 중 향 부분에서는 119 점 이라는 비교적 높은 점수를 받은 것으로 추정되었음

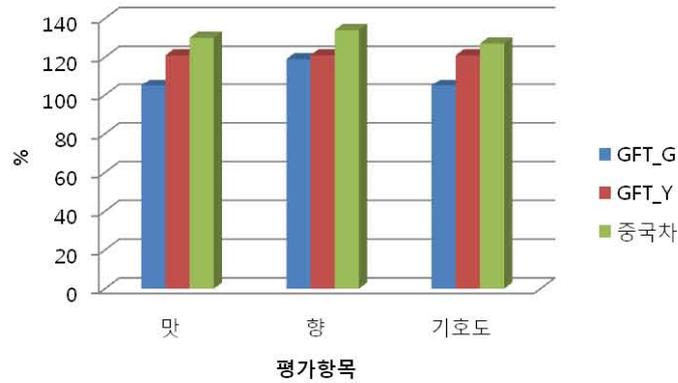


그림 22. 일반 소비자층을 대상으로 한 금화차 및 중국 복전차의 관능평가 결과

(10) 일반 소비자 대상 관능평가 항목과 동일한 항목 및 sample을 차 관련 업종에 종사하는 전문가 집단 17명을 대상으로 관능평가를 실시하였음. 그 결과 일반 소비자 관능평가와 반대되는 결과를 얻을 수 있었으며, 녹차를 이용하여 만들어진 금화차가 가장 높은 점수를 받았고, 금화차(황차), 복전차 순으로 집계되었음 (그림 27)

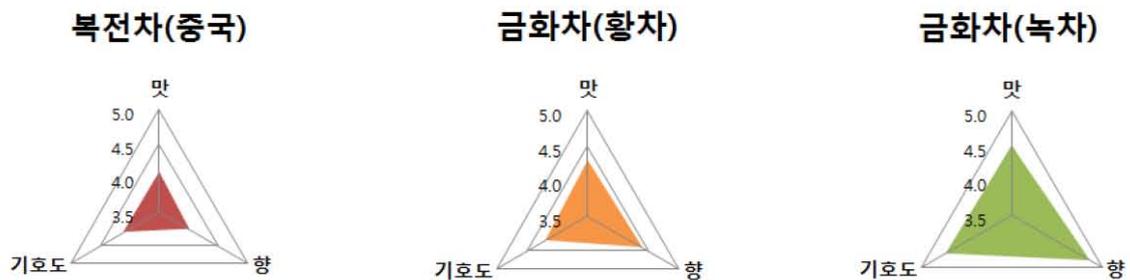


그림 23. 제조된 금화차 및 중국 복전차의 전문가 패널 관능평가 결과

4. 유해 미생물 안전성 연구

가. 금화균의 미생물 발효 유발독소(mycotoxin) 분석

(1) 1차년도에 제조된 금화차의 안전성 연구를 위하여 한국식품연구소 부산지소에 총아플라톡신 외 4종의 분석을 의뢰한 결과 총아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합)과 데옥시니발레논은 불검출 되었으며, 식품공전 기준 영아용 조제식 20 이하로 정하고 있는 제랄레논은 0.2, 식품공전 기준 볶음커피 5 ug/kg이하로 정하고 있는 오크라톡신A는 4 ug/kg, 식품공전 기준 옥수수 4이하로 정하고 있는 푸모니신은 1 mg/kg으로 확인 됨

(2) 2차년도에 제조된 금화차의 미생물 발효 독소(mycotoxin) 검사는 녹차1, 녹차2, 황차를 모차로 제작된 금화차로 발효과정을 거치고 숙성과정 (약 2개월) 중의 sample을 대상으로 실시함. 한국식품연구소 부산지소에 의뢰한 시험 항목은 총아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합), 제랄레논, 데옥시니발레논, 오크라톡신A, 푸모니신(F1, F2의 합)으로 대표적인 위험 물질들로 함. 실험 결과 3가지 금화차 sample 모두 총아플라톡신, 제랄레논, 데옥시니발레논, 오크라톡신A 는 불검출 되었으며, 푸모니신의 경우 녹차 1은 0.08 mg/kg, 녹차 2는 0.09 mg/kg, 황차는 0.04 mg/kg으로 세가지

sample 모두 식품공전에서 정하고 있는 식품 중 푸모니신 함량에 100분의 1 수준 이하로 확인 됨

- (3) 또한, 1차년도에 제작된 미생물 발효차의 경우와 비교해본 결과 10.2 였던 제랄레논의 함량은 불검출이었으며, 4 ug/kg 이었던 오크라톡신 A 또한 불검출이었음. 0.1 mg/kg 이었던 푸모니신의 경우 10~ 50% 정도의 독소가 덜 검출된 것으로 확인됨. 이상의 결과로 보아 기존의 중국 복전차와는 달리 악퇴과정이 없고, 단기간의 발효과정과 위생적인 제다 과정을 통하여 제조된 금화차의 미생물 발효 독소(mycotoxin)에 대한 안전성은 확보된 것으로 확인되었으며, 추후 단계적 미생물 발효 독소 검사를 통하여 더욱더 안전한 금화차 생산이 기대됨



그림 24. 개발된 미생물 발효차의 단계별 미생물 발효독소 분석

나. Pyrosequencing 분석을 통한 유해미생물 탐색

- (1) Pyrosequencing 결과 전체 sequence read는 162,848 개, Total base는 84,673,905, 평균 read 길이는 519.957로 확인됨

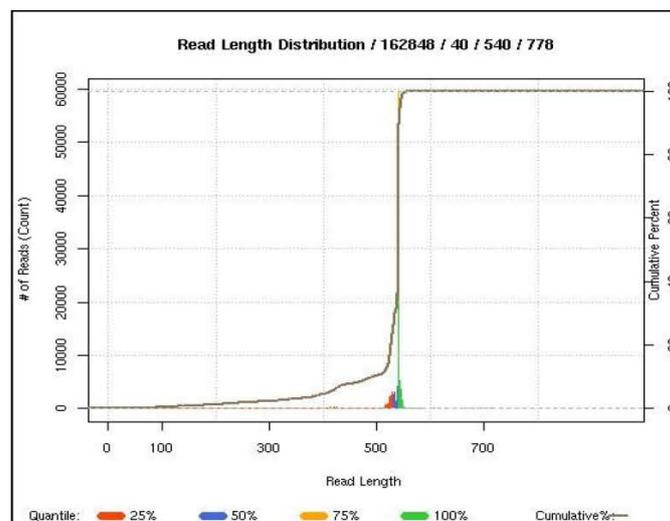


그림 25. Read length distribution

- (2) Sorted data 분석 결과 정렬된 reads는 147,773개, bases 수는 72,615,928개, read 길이의 평균은 491.402 로 확인되었으며, NA의 reads 수는 15,075개, bases 수는 7,329,151, read 길이의 평균은 486.18로 확인 되어 전체 sample 중 91% 가 sorted 된 것으로 확인됨
- (3) Superkingdom 수준의 taxonomic assignment 비율은 Eukaryota 99.9% 이상을 차지하고 있었으며, Unknown의 비율이 0.01 ~ 0.02 %로 확인됨
- (4) Phylum 수준의 taxonomic assignment 비율은 Ascomycota 99.8% 이상을 차지하고 있었으며, Unknown의 비율이 0.03 ~ 0.06 %, Annelida의 비율이 0.03 ~ 0.04%, Chlorophyta의 비율이 0.01 ~ 0.03 % 등의 비율로 분포됨을 확인됨
- (5) Class 수준의 taxonomic assignment 비율은 Eurotiomycetes가 99.8% 이상을 차지하고 있었으며, Unknown의 비율이 0.03 ~ 0.06 %, Dothideomycetes의 비율이 0.03 ~ 0.04%, Polychatea의 비율이 0.01 ~ 0.03 % 등의 비율로 분포됨을 확인됨
- (6) Order 수준의 taxonomic assignment 비율은 Eurotiomycetes가 99.6 ~ 99.8% 이상을 차지하고 있었으며, Unknown의 비율이 0.03 ~ 0.07 %, Phyllodocida의 비율이 0.02 ~ 0.04%, Ctenocladales의 비율이 0.01 ~ 0.03 % 등의 비율로 분포됨을 확인됨
- (7) Family 수준의 taxonomic assignment 비율은 Trichocomaceae가 99.6 ~ 99.8% 이상을 차지하고 있었으며, Ctenocladales의 비율이 0.009 ~ 0.03 %, Aphroditidae의 비율이 0.02 ~ 0.04% 등의 비율로 분포됨을 확인 됨
- (8) Genus 수준의 taxonomic assignment 비율은 Aspergillus가 96.5 ~ 97.9% 이상을 차지하고 있었으며, Penicillium의 비율이 1.8 ~ 5.3%, Aphrodita의 비율이 0.02 ~ 0.04% 등의 비율로 분포됨을 확인됨

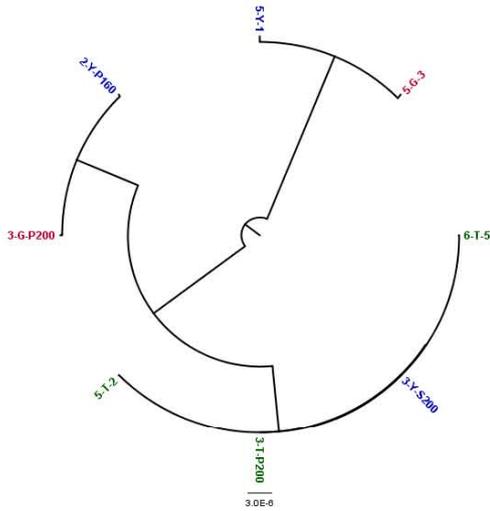


그림 26. Polar of Similarity 97

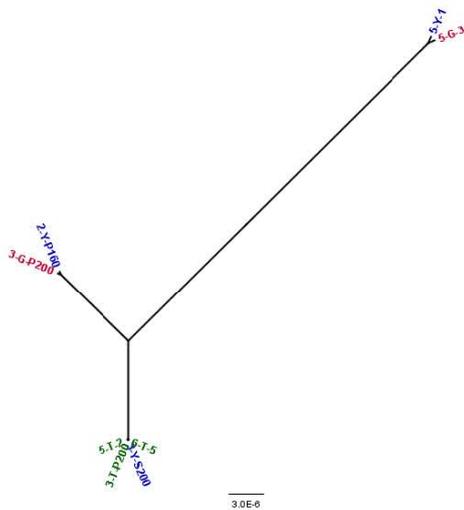


그림 27. Radial of Similarity 97

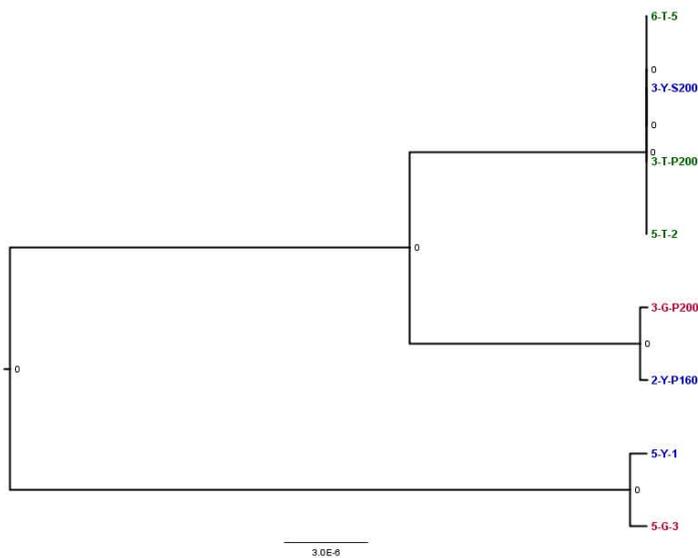


그림 28. Rectangular of Similarity 97

(9) Sample 간의 유사도를 분석한 결과 속성 기간이 비슷한 금화황차5-1과 금화녹차5-3 번이 유사한 결과를 보였으며, 금화균의 접종량이 비슷한 금화황차2와 금화녹차2번이 유사한 결과를 보임. 또한, 모차의 성질이 비슷한 금화티백과 일부 금화황차가 3

번째 그룹을 이름

- (10) Rarefaction 결과를 보면 sequencing 결과에 대한 신뢰도를 볼 수 있는데, 금화녹차 3-P200을 제외한 7종의 sample에서 1.5 OTUs 이상, 10,000 Reads 이상의 신뢰도를 보임
- (11) Community diversity data 결과를 보면 shannon의 경우 금화티백3번, 5번, 6번, 금화황차3번에서 낮게 측정되어 다양도 지수가 나머지 4개의 sample에 비하여 낮은 것을 알 수 있음. 또한, simpson의 경우 금화녹차5번, 금화황차5번에서 낮게 측정되었으며, 이는 우정도가 낮기 때문에 한가지 균주가 이 sample의 대부분을 차지하고 있다는 것을 보여줌
- (12) OTU 분석 중 Taxonomic Assignment 분석 결과 Superkingdom, Phylum, Class, Order, Family 레벨에서 8종 sample 모두 100% Eukaryota, Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae 로 확인 되었으며, Genus 레벨에서 99.79 ~ 100% Aspergillus, 0 ~ 0.2 % Penicillium 으로 확인됨

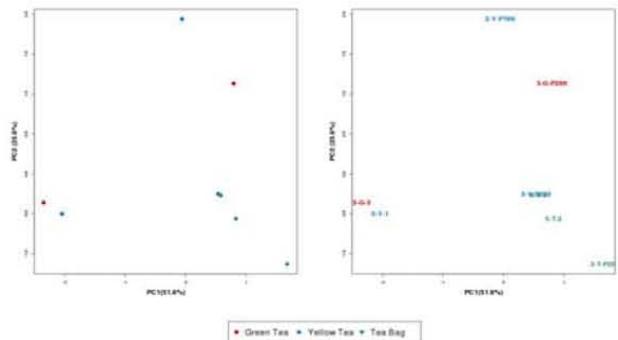
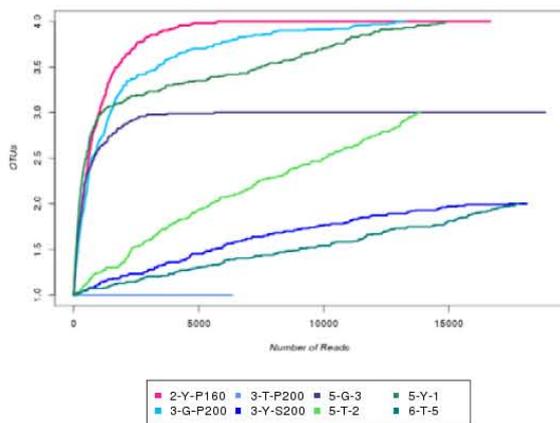


그림 29. Rarefaction curve of Similarity 97

그림 30. PCA data of Similarity 97

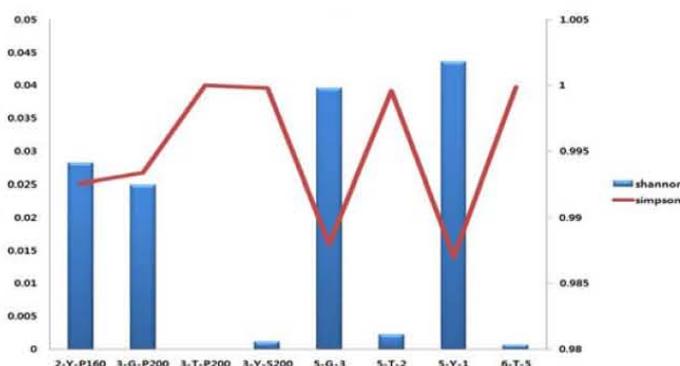


그림 31. Community diversity of Similarity 97

다. 16S, 18S rRNA 분석을 통한 유해미생물 탐색

- (1) 제작된 금화차에 존재하는 미생물 동정을 위하여 16S rRNA sequencing을 진행한 결과 금화녹차1의 경우 1,492 bp, 금화황차의 경우 1,473 bp, 금화녹차2의 경우 1,477 bp의 염기서열을 BlastN으로 검색함. 금화녹차1, 금화황차, 금화녹차2 모두

Burkholderia sp. T-34 gene의 16S rRNA sequence와 99%의 가장 높은 상동성을 보인 (2) 제작된 금화녹차 및 중국 복전차에 존재하는 곰팡이류의 동정을 위하여 18S rRNA sequencing을 진행한 결과 금화녹차의 경우 1,720 bp, 중국 복전차의 경우 1,640 bp, 금화균의 경우 2,304 bp의 염기서열을 BlastN으로 검색함

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
3	1479	Burkholderia sp. T-34 gene for 16S rRNA, partial sequence	AB480713.1	1493	14	1488	2704	1464	0.0	1474	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Burkholderia sp. 383, complete sequence	CP000152.1	3587082	380360	381834	2704	1464	0.0	1474	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Burkholderia sp. 383 chromosome 1, complete sequence	CP000151.1	3694126	293361	294835	2704	1464	0.0	1474	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Burkholderia arboris strain NKD-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ768336.1	1519	7	1481	2699	1461	0.0	1473	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Uncultured beta proteobacterium clone SHAL010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM108590.1	1499	22	1496	2699	1461	0.0	1473	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Uncultured beta proteobacterium clone SHAI021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM108380.1	1492	15	1489	2699	1461	0.0	1473	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Burkholderia sp. 2xiao7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ606689.1	1520	8	1482	2699	1461	0.0	1473	1478	99	Plus/Plus
3	1479	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11168 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU567048.1	1525	15	1489	2699	1461	0.0	1473	1478	99	Plus/Plus

그림 32. 금화녹차1

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	1471	Burkholderia sp. T-34 gene for 16S rRNA, partial sequence	AB480713.1	1493	12	1482	2689	1456	0.0	1468	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Burkholderia sp. 383, complete sequence	CP000152.1	3587082	380358	381828	2689	1456	0.0	1468	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Burkholderia sp. 383 chromosome 1, complete sequence	CP000151.1	3694126	293359	294829	2689	1456	0.0	1468	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Burkholderia arboris strain NKD-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ768336.1	1519	5	1475	2684	1453	0.0	1467	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Uncultured beta proteobacterium clone SHAL010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM108590.1	1499	20	1490	2684	1453	0.0	1467	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Uncultured beta proteobacterium clone SHAI021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM108380.1	1492	13	1483	2684	1453	0.0	1467	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Burkholderia sp. 2xiao7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ606689.1	1520	6	1476	2684	1453	0.0	1467	1473	99	Plus/Plus
1	1471	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11168 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU567048.1	1525	13	1483	2684	1453	0.0	1467	1473	99	Plus/Plus

그림 33. 금화황차

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
2	1477	Burkholderia sp. T-34 gene for 16S rRNA, partial sequence	AB480713.1	1493	11	1475	2643	1431	0.0	1464	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Burkholderia sp. 383, complete sequence	CP000152.1	3587082	380357	381821	2643	1431	0.0	1464	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Burkholderia sp. 383 chromosome 1, complete sequence	CP000151.1	3694126	293358	294822	2643	1431	0.0	1464	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Burkholderia arboris strain NKD-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ768336.1	1519	4	1468	2638	1428	0.0	1463	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Uncultured beta proteobacterium clone SHAL010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM108590.1	1499	19	1483	2638	1428	0.0	1463	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Uncultured beta proteobacterium clone SHAI021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM108380.1	1492	12	1476	2638	1428	0.0	1463	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Burkholderia sp. 2xiao7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ606689.1	1520	5	1469	2638	1428	0.0	1463	1477	99	Plus/Plus
2	1477	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11168 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU567048.1	1525	12	1476	2638	1428	0.0	1463	1477	99	Plus/Plus

그림 34. 금화녹차2

(3) 금화녹차는 *Aspergillus niger* strain P1AL1b의 28S rRNA sequence와 90%, 복전차와 금화균의 경우 *Eurotium* sp. SGE1의 18S rRNA sequence와 98% 상동성을 나타냄. 제작된 금화차에서 금화균(*Eurotium cristatum*)의 존재를 확인하기 위하여 Pyrosequencing을 추후 진행함

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
601	1523	<i>Aspergillus niger</i> strain P1AL1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JN672584.1	938	7	935	1197	648	0.0	860	953	90	Plus/Plus
564	1158	<i>Aspergillus niger</i> strain EIM-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ040211.1	632	29	625	1085	587	0.0	594	597	99	Plus/Plus
564	1152	<i>Aspergillus</i> sp. WZ002 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ670919.1	598	7	596	1083	586	0.0	589	590	99	Plus/Plus
564	1152	<i>Aspergillus niger</i> strain 91718 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JN565296.1	635	33	622	1083	586	0.0	589	590	99	Plus/Plus

그림 35. 금화녹차

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
442	1003	<i>Eurotium</i> sp. SGE1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JN157799.1	569	1	569	972	526	0.0	556	569	98	Plus/Plus
484	1037	<i>Eurotium chevalieri</i> isolate UPM A11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM152566.1	559	1	559	955	517	0.0	548	561	98	Plus/Plus
465	1017	<i>Eurotium rubrum</i> isolate UPM A14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM152565.1	561	4	561	953	516	0.0	546	559	98	Plus/Plus

그림 36. 중국 미생물 발효차(복전차)

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
453	1019	<i>Eurotium</i> sp. SGE1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JN157799.1	569	1	569	994	538	0.0	560	570	98	Plus/Plus
476	1033	<i>Eurotium rubrum</i> isolate UPM A14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM152565.1	561	4	561	970	525	0.0	549	560	98	Plus/Plus

그림 37. 금화균(*Eurotium cristatum*)

5. 금화균의 종균화 기술개발

가. 바인더 탐색 및 적용

- (1) 금화균 종균 생산에 필요한 바인더 개발을 위하여 티백 원료를 사용하여 실험을 진행함. 티백원료의 경우 금화균의 정착이 5일 이내에 이루어지기 때문에 바인더로서 중요한 역할을 할 것으로 판단됨. 티백 원료의 경우 금화균이 자라는 환경은 좋지만 시제품 제작에 필요한 성형에 많은 어려움이 있어 이를 바인더로 활용함



그림 38. 금화균 바인더용 금화티백 제조



그림 39. 금화균 바인더로 사용된 beads



그림 40. 바인더(beads)를 포함한 액체 배지에 금화균의 증식

- (2) 금화균 종균의 바인더로 지름 0.1 cm의 스텐과 세라믹 비드를 선택함. 금화균이 잘 자랄 수 있도록 바인더에는 Malt Extract 액체 배지와 30% Sucrose를 첨가하여 3일간 배양함. 배양 중 수시로 금화균의 포자를 터트리기 위하여 흔들어 주는 과정을 진행함. 바인더에 정착된 금화균은 금화차 제조에 바로 사용될 수 있으며, 소량의 영양성분만을 요구하기 때문에 생산 가격 또한 절감하는 효과를 가져올 수 있음
- (3) 찌쌀의 경우 바인더 탐색 실험 시 금화균 이외의 미생물들이 더 빠르고 많이 증식되어 바인더로 적절하지 못하다고 판단됨

나. 금화균 종균의 대량생산 시스템 구축

- (1) 금화균의 대량생산 체계를 구축하기 위하여 한일과학에서 판매하고 있는 Autoclavable Fermenton(Biotron GX Type II)를 본 연구소 자체비용으로 구입하였으며, 기존 1개의 flask 당 200 ml의 배양이 가능하던 system을 1회 배양으로 7 L의 배양

이 가능한 system으로 개선함. 또한, 온도 및 pH 등의 조절이 가능하기 때문에 기존의 system에 비하여 배양 시간을 2일 단축시킬 수 있었으며, 대량의 금화균을 생산이 가능함

6. Golden Flower Tea 종균의 제품화

가. 포장기술 탐색 및 적용

- (1) Golden Flower Tea 종균의 제품화를 위하여 금화균 1 mg을 MEA plate에 접종하여 25℃에서 72시간 배양함. 배양된 균체를 200 ml ME 액체 배지에 접종하여 25℃에서 7일간 배양 후 4,000 rpm으로 원심분리하여 균체를 회수함
- (2) 회수한 금화균을 -48℃에서 동결건조 함. 동결건조된 금화차 종균을 막자사발을 이용하여 곱게 분쇄하여 보관용 vial, 뚜껑 일체형 vial, 저온냉동고 전용 vial 등에 보관 함
- (3) 보관된 종균의 2차 오염을 방지하기 위한 모니터링으로 고체배지 및 액체배지, 생장 곡선 등을 측정함. OD_{600 nm}에서 0.801로 측정되었을 때 8.6×10^5 cfu/ml의 생균수가 확인됨



그림 41. 배양된 금화균의 제품화를 위한 공정



종균의 2차 오염 방지를 위한 모니터링
(고체 /액체 배양 및 성장 측정)

그림 42. 종균의 2차 오염 방지를 위한 포장기술

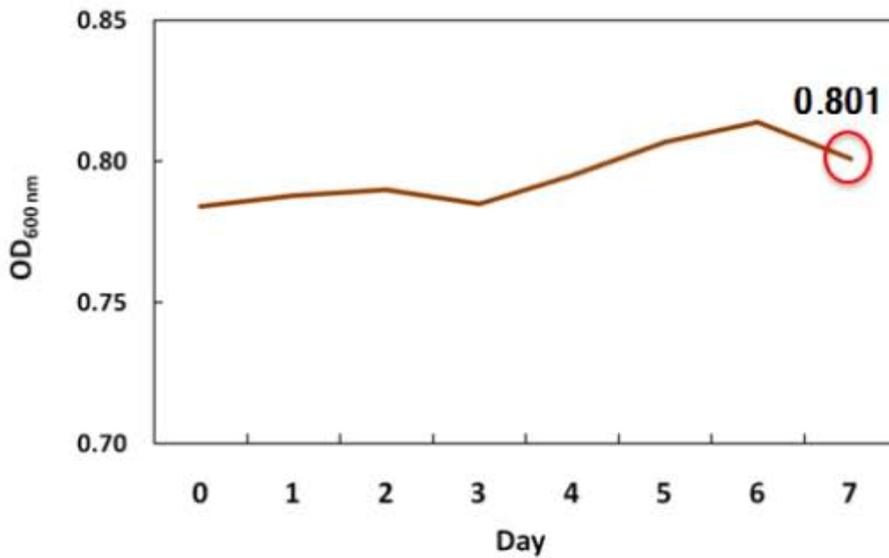


그림 43. 성장곡선 측정을 통한 종균의 2차 오염 방지 모니터링

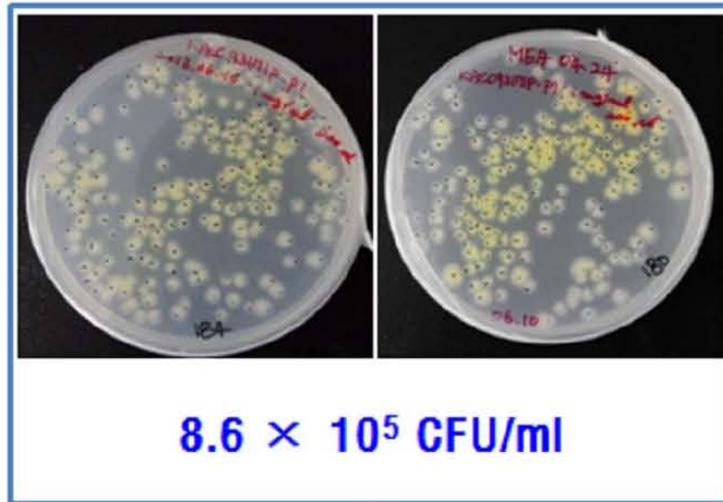


그림 44. 생균수 측정을 통한 종균의 2차 오염 방지 모니터링

나. 매뉴얼 개발

- (1) 금화균 종균의 활성화를 위해서 멸균 증류수 1 ml을 종균 0.1 g이 들어있는 바이알에 넣고 잘 혼합해 준다. 그 후 준비된 MEA plate에 50 ul 씩 도말하여 25℃에서 72시간 동안 배양함

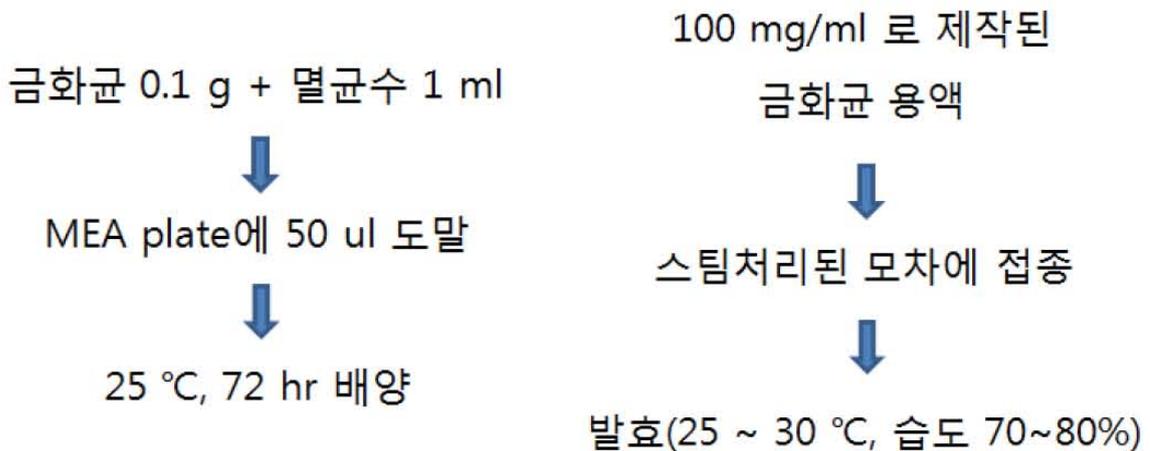


그림 45. 금화균 종균 활성화 매뉴얼

- (2) 금화균 종균을 바로 모차에 적용하는 실험 결과 배양된 금화균 용액을 접종했을 때 보다 금화균 증식 속도가 현저히 느림. 따라서 금화균 종균이 아닌 금화균이 100 mg/ml 로 존재하는 금화균 용액을 제작하고, 냉동 또는 냉장 상태로 제품화를 시키는 방향을 고안함. 100 mg/ml의 금화균 용액을 스팀 처리된 모차 100 g 당 10 ~ 20 mg 씩 접종하고 발효실에서 모차의 특성에 따라 7 ~ 15일간 발효시킴

다. 금화균 보급을 위한 상용 배양기술 개발

- (1) 10 L 발효기를 이용하여 최적 배양조건인 25℃, 200 rpm으로 금화균을 배양함. 배양 시간에 따른 금화균의 OD 값 측정 결과 0.254에서 성장을 시작한 금화균은 배양일

3일째부터 증가하기 시작하여 6일에 0.731의 최대 OD 값을 확인하였고, 7일째 0.728로 감소함

- (2) 최대 OD 값을 보인 6일째 금화균을 회수 함. 또한, 배양 시간에 따른 배양액의 pH 변화율 측정된 결과 1일째 pH 값은 4.0 ~ 5.0 사이로 확인되었으며, 배양 6일째 pH가 소량 감소하는 경향을 보임

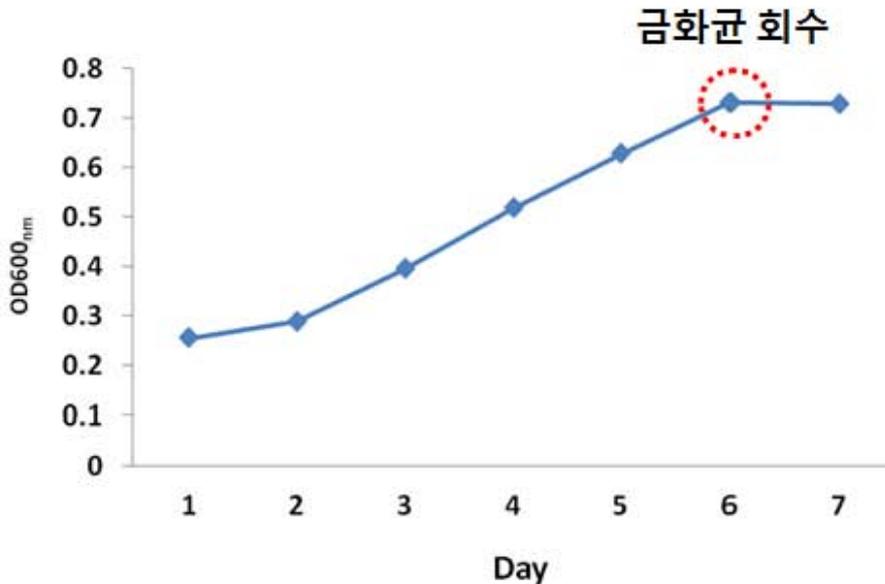


그림 46. 발효기를 이용한 배양시간에 따른 금화균의 OD 값 변화

7. 고품질 금화차 개발을 위한 품질특성 연구

가. 유리아미노산 분석

- (1) 아미노산분석기를 이용한 유리아미노산 분석 결과 제조된 금화차에서 중국 익양 복전차에 비하여 Urea가 높게 측정 되었으며, 쓴맛을 내는 아미노산(Arginine 등)이 낮게 측정됨
- (2) 또한, 단맛을 내는 아미노산(Aspartic acid, Threonine, Serine, Asparagine, Alanine 등) 및 감칠맛을 내는 Glutamic acid 가 제조된 금화차에서 높게 측정되는 것을 확인함
- (3) 이를 토대로 제조된 금화차는 Control에 비하여 좀더 부드러운 맛을 내며, 중국 익양 복전차에 비하여 부드럽고 단맛 및 감칠맛을 낸다는 것으로 추정할 수 있음

Name	발효차 Control		금화발효차		황차 Control		금화황차		의양 복전차		비고
	Absolute (mg/ml)	Weight (%)									
Phosphoserine	0.009	0.010	0.014	0.013	0.010	0.010	0.017	0.020	0.021	0.020	
Taurine	0	0	0	0	0.001	0	0.001	0	0.001	0	삼콤한 맛
Pho	0.001	0	0.001	0	0.001	0	0	0	0	0	
Urea	0.373	0.373	0.224	0.223	0.365	0.365	0.274	0.277	0.175	0.177	암모니아향
Aspartic Acid	0.056	0.057	0.032	0.033	0.096	0.095	0.083	0.087	0.036	0.037	신맛, 감칠맛
Hydroxyproline	0.025	0.027	0	0	0	0	0	0	0	0	
Threonine	0.014	0.017	0.005	0.007	0.022	0.020	0.017	0.020	0.005	0	단맛
Serine	0.032	0.030	0.011	0.010	0.031	0.030	0.037	0.037	0.009	0.010	단맛
Asparagine	0.058	0.057	0.008	0.010	0	0	0.020	0.020	0	0	단맛, 지미
Glutamic Acid	0.059	0.057	0.032	0.033	0.058	0.055	0.087	0.087	0.052	0.050	신맛, 감칠맛
Theanine	0.280	0.283	0.179	0.180	0.544	0.545	0.460	0.460	0.491	0.487	단맛, 감칠맛
a-Amino adipic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Proline	0.021	0.023	0.011	0.010	0.018	0.020	0.011	0.010	0	0	단맛, 쓴맛
Glycine	0.001	0	0.001	0	0.003	0	0.003	0	0.002	0	단맛
Alanine	0.026	0.027	0.013	0.010	0.037	0.040	0.024	0.027	0.009	0.010	단맛
Citrulline	0	0	0	0	0.001	0	0.001	0	0	0	
a-Amino-butyril	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Valine	0.028	0.030	0.013	0.010	0.024	0.020	0.021	0.020	0.010	0.010	단맛, 쓴맛
Cystine	0.009	0.010	0.005	0.010	0.004	0	0.003	0	0.003	0	단맛, 고소한 맛
Methionine	0.001	0	0.001	0	0.001	0	0.001	0	0.001	0	쓴맛
Isoleucine	0.019	0.020	0.010	0.010	0.014	0.010	0.013	0.010	0.004	0	쓴맛
Leucine	0.018	0.020	0.005	0.007	0.018	0.020	0.012	0.010	0.004	0	쓴맛
Tyrosine	0.037	0.037	0.020	0.020	0.017	0.020	0.017	0.020	0.007	0.010	쓴맛
Phenylalanine	0.023	0.023	0.013	0.010	0.016	0.020	0.015	0.017	0.006	0.010	쓴맛
b-Alanine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B-Amino isobut	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GABA	0.019	0.020	0.007	0.010	0.056	0.060	0.036	0.037	0.003	0	
Histidine	0.002	0	0.002	0	0.006	0.010	0.006	0.010	0.002	0	쓴맛
1-Methylhistid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2-Methy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tryptophan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	쓴맛
Carnosine	0.009	0.010	0.012	0.010	0.022	0.020	0.024	0.023	0.012	0.010	
Ornithine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lysine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	쓴맛
Ammonia	0.003	0	0.002	0	0.004	0	0.005	0	0.002	0	쓴맛
Arginine	0.054	0.057	0.044	0.043	0.026	0.025	0.032	0.030	0.125	0.127	쓴맛
Totals:	1.178	1.187	0.663	0.660	1.392	1.385	1.218	1.220	0.979	0.957	

- (4) 유리아미노산 분석 결과 total 유리아미노산 함량의 경우 금화차 제조에 사용된 모차의 특성에 따라 그 함량의 차이가 크게 나타남. 사용된 모차들의 경우 중국과 익양복전차의 경우 고차수 잎을 사용하였고, 황차, 황차(민항), 녹차, 티백 등은 제다과정과 차의 채엽 시기에 따른 유리아미노산 함량 차이가 크다고 판단됨. total 유리아미노산의 함량은 중국과 익양복전차가 가장 낮은 1.2 ~ 1.8 mg/ml을 보였고, 황차류를 모차로 사용한 금화차에서 15 mg/ml 이상의 높은 함량을 보임
- (5) Phosphoserine의 경우 익양복전차에서 0.268 mg/ml, 금화황차1에서 0.232 mg/ml, 금화녹차1에서 0.164 순으로 측정됨. 전체적인 sample들의 경향을 분석한 결과 발효 및 숙성과정의 진행될수록 phosphoserine의 함량이 증가함을 알 수 있음. 상큼한 맛을 내는 것으로 알려진 Taurine의 경우 제조된 금화황차(민항)2에서 0.061 mg/ml, 금화녹차2에서 0.051 mg/ml, 금화티백2에서 0.054 mg/ml 로 측정되었으며, 복전차들에서는 0.005 mg/ml 이하로 측정됨
- (6) 이 결과로 보아 발효과정을 거치고 나면 Taurine의 함량이 50% 이상 증가하며, 숙성과정을 진행하며 그함량이 더 증가되는 것으로 확인됨. 신맛과, 감칠맛을 내는 Aspartic Acid의 경우 금화황차(민항)에서 1.764 mg/ml로 가장 높게 측정되었으며, 금화녹차에서 1.29 mg/ml, 금화티백에서 0.728 mg/ml 순으로 측정됨
- (7) 제다과정이 비슷하다는 공통점을 가진 복전차와 황차에서 Aspartic Acid 성분이 낮게 측정됨. 단맛을 내는 L-Threonine과 L-Serine의 경우 모차 제다시 민항 과정을 거치는 차류에서 높게 측정되었으며, 복전차들에서 0.1 mg/ml 이하로 가장 낮게 측정되었다. 또한, 발효 및 숙성과정이 지속됨에 따라 그 함량이 줄어드는 경향을 보임
- (8) 단맛을 내는 L-Asparagine의 경우 금화황차(민항)2에서 1.556 mg/ml로 가장 높게 측정되었으며, 발효과정 중 함량이 줄어들었다가 숙성과정의 진행으로 다시 함량이 소량 증가함을 알 수 있음. 또한, 복전차들에서는 극소량 검출됨. 신맛과 감칠맛을 내는 L-Glutamic Acid의 경우 복전차류와, 황차류에서 낮게 측정되었으며, 금화황차(민항)에서 2.53 mg/ml로 가장 높게 측정됨. L-Glutamic 함량은 금화균의 접종 후 발효과정 중 그 함량이 줄어든다는 것을 알 수 있음
- (9) 단맛과 감칠맛을 내는 Theanine의 경우 복전차류에서 소량 검출되었으며, 발효 및 숙성과정을 거치면서 그 함량이 감소하는 경향을 보임. 쓴맛을 내는 Ammonium Chloride의 경우 익양복전차에서 1.09 mg/ml, 중국복전차에서 0.698 mg/ml, 금화녹차1에서 1.179 mg/ml 로 높게 측정됨. 이 외에도 발효 후 숙성과정이 1개월 정도된 sample에서 함량이 높게 측정되었고, 숙성과정 중 함량이 줄어드는 것을 확인할 수 있음
- (10) 이상의 결과로 보아 3년 ~ 5년 이상된 복전차의 경우 Ammonium Chloride 이외의 아미노산 함량이 전체적으로 낮게 측정되었으며, 이는 중국복전차의 제조 과정에 사용된 모차의 특성(고차수 및 제다과정)이 분석결과 확인된 것으로 추정됨
- (11) 또한 발효과정 중에 생기는 기호성이 좋지 않은 몇몇 유리아미노산 성분들은 숙성과정의 진행으로 그 함량이 줄어드는 경향을 보임. 또한, 금화황차의 경우 기존 중국복전차와 유리아미노산 분석 패턴이 유사한 경향을 보였으며, 기존복전차에 비하여 악취 과정이 없고, 단기간에 발효와 숙성과정이 진행된 금화차는 아미노산 성분이 상당량 차에 남아있는 것으로 판단됨

Totals

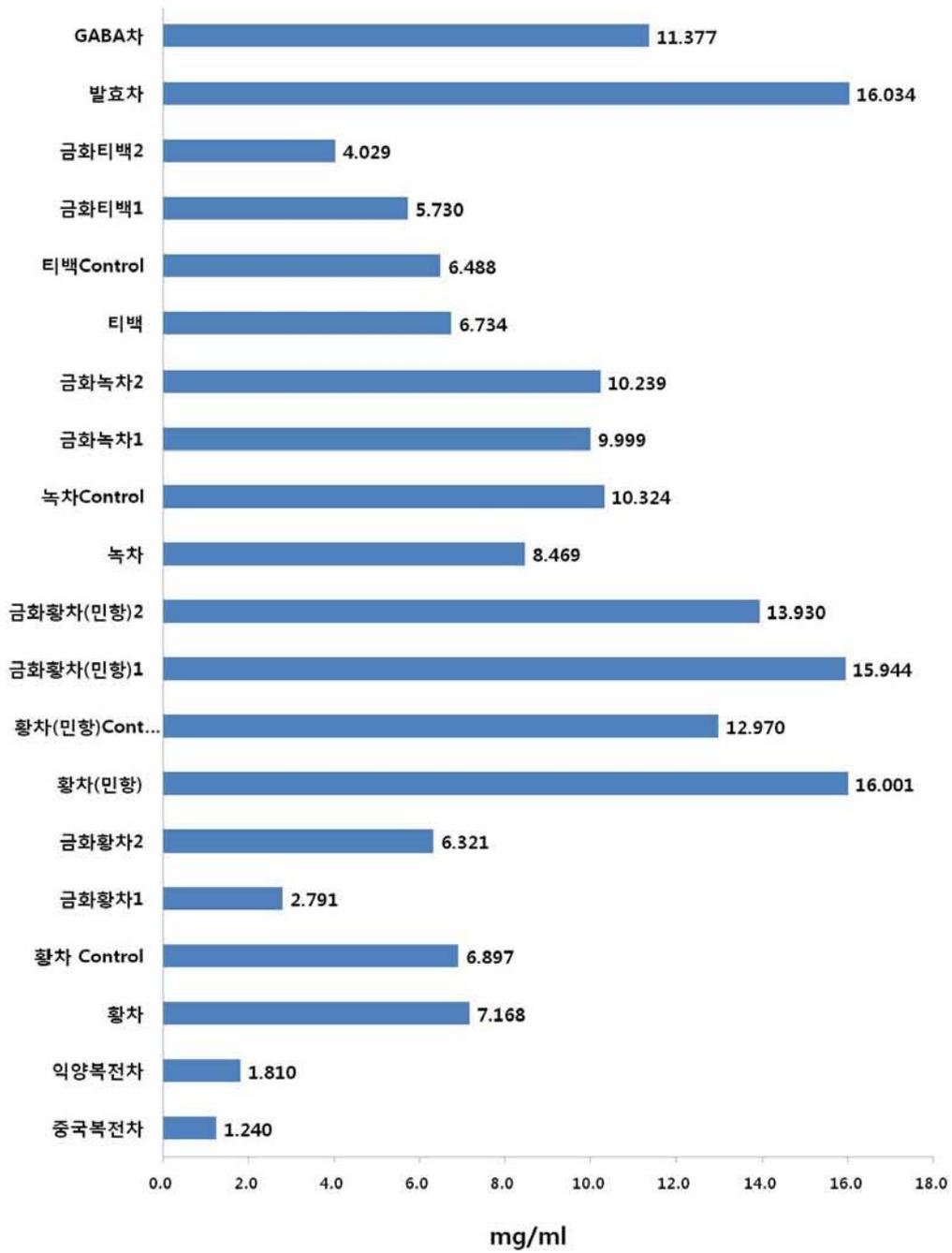


그림 47. Total 유리아미노산 비교 분석 결과

나. 향기성분 분석

- (1) GC/MS를 이용한 제조된 금화차(발효차 및 황차)의 향기성분 분석 결과 대조군에 비하여 Octane, 1-Pentanol, 1,3-Cyclopentadiene, 5,5-Dimethyl- 2-Ethyl 등이 증가하였으며, Decanal, Heptane, 5-Ethyl-2, 2,3-Trimethyl등은 감소하는 경향을 보임
- (2) 제조된 금화차(발효차)의 경우 더 다양한 향기성분이 검출된 것으로 보아 금화균이 처리된 금화차(발효차)가 더 풍부한 향을 낸다고 판단됨
- (3) 기존 중국 미생물 발효차와 금화차의 향기성분 분석 결과 5가지 sample 모두의 주요 향기성분으로 2-Ethyl-Furan, Valproic Acid, Benzyl mandelate 등으로 확인됨
- (4) 중국 미생물발효차에서 특징적으로 Hexanoic acid 성분이 검출되었으며, 금화차의 경우 3-Hexen-1-ol, Benzeneacetaldehyde, Methyl salicylate, 3-Carene 성분이 특징적으로 검출 되었다. 이는 모차의 특성에 따른 영향으로 추정됨
- (5) 금화황차(GFT-Y)와 금화황차(민향)(GFT-Y(M)) sample이 중국 미생물 발효차와 향기 성분 패턴이 비슷한 것으로 확인되었으며, 향기성분의 분포를 살펴보면 금화차의 경우 많은 area를 차지하는 향기성분 몇가지가 있지만 그 편차가 크지 않지만, 중국 미생물 발효차의 경우 Furan, 2-Ethyl- 과 Valproic Acid가 다른 향기성분에 비하여 상당히 큰 area를 차지하고 있음. 이 두가지 성분은 금화차에도 존재 하는데 이는 발효과정 중에 생기는 향기성분으로 추정됨

9. Analysis of aroma compounds

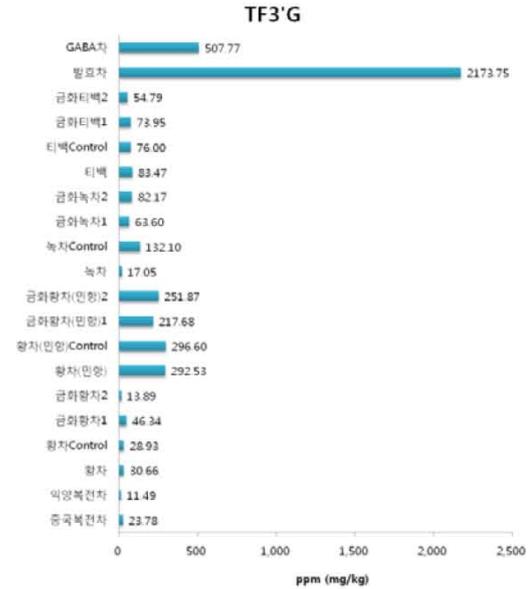
#	Name	Note	RT	CHA_FBT	IKYANG_FBT	GFT_Y	GFT_Y(M)	GFT_G
				Area (%)	Area (%)	Area (%)	Area (%)	Area (%)
1	Furan, 2-Ethyl-		3.299	11.732	10.307	5.500	6.024	4.610
2	1-Octanol	nutty, Fruity	4.200	0.645	1.360	-	0.640	
3	1-Pentanol		4.633	1.750	3.610	1.706	2.734	1.572
4	Valproic Acid		5.293	18.675	18.471	2.313	2.237	3.120
5	Benzyl mandelate		6.367	1.228	1.339	3.473	3.116	1.043
6	3-Hexen-1-ol	Grassy	6.827	-	-	2.547		2.029
7	2-Pentanol	Green, Fatty	7.747	1.626	2.864	0.535		0.623
8	Heptanal	Woody, Nutty, Fruity	8.107	1.747	1.429	-	1.041	
9	Benzaldehyde	Cherry, Medicinal	9.955	1.568	1.447	1.260	1.06	1.234
10	5-Hepten-2-one, 6-methyl-		10.661	2.613	2.827	1.375	1.106	0.852
11	Furan, 2-Pentyl-	Roasted, Nutty	10.788	3.608	3.113	1.376	1.068	0.991
12	Hexanoic acid		10.962	1.420	2.642	-		
13	Benzeneacetaldehyde		12.495				1.685	0.969
14	cis-Linaloloxide	Refreshing, Floral	13.342	1.705	1.864	1.919	0.639	
15	3-Carene	Sweet, Fine, Cedar, Woodsy	14.216	-	-	4.302	1.573	3.638
16	Glycerol 1-myristate		14.349	1.976	1.547	0.873		0.630
17	Methyl salicylate		16.943	-	-	2.068		
18	Butylated hydroxytoluene		23.258	1.956	1.653	5.771	8.359	4.087
19	2-Octanol	Soapy	25.759	1.510	-	0.735	0.990	0.676

다. 카테킨/카페인 및 테아폴라텐 함량 분석

- (1) 제조된 금화차 (Golden Flower Tea)의 Catechin-Caffeine 함량을 HPLC Chromatogram으로 분석한 결과, Total Catechin의 함량은 금화황차는 13,204.5 ppm, 금화발효차는 1,522.5 ppm 낮게 나타남을 확인 할 수 있음
- (2) 그러나 중국 익양 복전차에 비하여 9,663.6 ppm 높게 확인됨. 이는 금화균이 특이적으로 발효 및 숙성 과정을 거치는 동안 일반 차와 비교하여 Catechin의 함량을 감소하는 것으로 사료됨. Caffeine 함량은 대조군에 비하여 금화황차와 금화발효차는 각각 507.7 ppm, 461.6 ppm 증가하였고, 중국 익양 복전차와는 큰 차이를 보이지 않음
- (3) 테아폴라텐 함량은 대조군에 비하여 소폭 감소하였으나 중국 익양 복전차와 비교한 결과 금화황차와 금화발효차는 각각 3.1배, 4.3배 높게 나타나는 것으로 확인함



그림 48. Total Catechin 함량 비교 분석



- (4) 금화차의 카테킨/카페인 분석 결과 Total 카테킨 함량은 모차를 금화차로 성형 및 발효하는 과정에서 30 ~ 40% 정도 감소하는 경향을 보였고, 기존 중국 복전차에 비하여 약 3 ~ 4배 금화차에서 높게 측정됨
- (5) Total 카테킨 중 Epigallocatechin 함량은 금화녹차 2에서 949.37 ppm 으로 가장 높게 측정되었으며, Epicatechin 함량은 금화황차(민항)2에서 2569.17 ppm 으로 측정됨. Epigallocatechin gallate 또한 금화황차(민항)2에서 가장 높게 측정되었으며, 금화녹차 2에서도 23559.55 ppm 으로 측정됨
- (6) Caffeine 함량은 전체 sample들이 비슷한 수준으로 측정되었으며, 성형 및 발효/숙성과정을 거치면서 줄어드는 경향성은 보이지 않음

- (7) 항산화 물질 중 Theaflavin, 3-gallate 함량은 금화황차(민항)에서 200 ppm 이상으로 가장 높게 측정되었으며, Theaflavin 함량 또한 금화황차(민항)2에서 121.09 ppm 으로 높게 측정됨
- (8) Theaflavin-3,3'-gallate, Theaflavin-3'-gallate 모두 금화황차(민항) sample에서 가장 높게 측정되었으며, 기존의 중국 미생물 발효차(복전차) 와 비교 결과 전체적으로 테아 플라빈류 물질이 대부분의 금화차에서 5배 이상 검출됨을 확인함. 그러나 금화황차(민항)의 경우 금화균 정착에 다소 오랜 시간이 걸린다는 단점이 있기 때문에 이를 보완할 추가 실험이 필요함

라. 항산화 활성 분석

- (1) 각 시료를 50, 100, 200 및 500 ug/ml 농도로 조정하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 표 11과 같음. 대부분의 시료 첨가구에서 시료의 첨가농도에 따라 소거활성이 유의적으로 증가함. 금화차 시료의 경우 최대 58.08%, 금량엽전차 시료는 66.47%, 모차(세작급) 시료는 68.71%로 측정되었으며, 익양복전차 시료는 40.21%, 중국복전차 시료는 57.90%로 측정됨. DPPH 라디칼 소거 활성은 인체의 질병 예방 및 노화 지연에 중요한 역할을 하므로 기능성 물질의 평가에 활용됨. 따라서 DPPH 라디칼 소거활성이 높은 금화차와 금량엽전차가 기존의 미생물발효차에 비하여 인체의 질병 예방 및 노화 지연에 더 효과적이라고 판단됨
- (2) 5개의 시료 각각의 열수 추출물에서 FRAP 활성을 $FeSO_4$ 당량으로 나타낸 결과는 표 11과 같음. 모든 시료에서 첨가농도의 증가에 따라 유의적으로 활성이 증가됨. 금화차 시료는 100.30%, 금량엽전차 시료는 110.66%, 모차(세작급) 시료는 117.87%, 익양복전차 시료는 106.57%, 중국복전차 시료는 84.00%로 측정됨. 녹차를 비롯한 차류는 낮은 추출수율 임에도 불구하고 높은 수준의 항산화 활성을 나타내는 이유로 이들이 함유하고 있는 총 페놀성 화합물, 비타민 C 등의 항산화성 물질에서 찾을 수 있음. 특히 차류에 함유된 카테킨류 중 EGCG는 비타민 E보다 25배, 비타민 C보다 100배 정도 큰 항산화 활성을 내는 것으로 알려져 있음. 상대적으로 총 페놀 함량과 EGCG 함량이 높은 금화차와 금량엽전차 시료에서 FRAP 활성이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있음
- (3) Fe^{+2} 킬레이팅 활성 측정을 비교한 결과는 표 11과 같으며, 첨가농도의 증가에 따라 유의적으로 활성이 증가됨. 금화차 시료는 86.41%, 금량엽전차 시료는 86.54%, 모차(세작급) 시료는 85.95%, 익양복전차 시료는 84.00%, 중국복전차 시료는 79.31%로 측정됨. EGCG 함량과 Fe^{+2} 킬레이팅 활성과 상관관계가 있다는 보고와 시료의 특성에 따라 유효물질의 조성이 다르기 때문에 Fe^{+2} 킬레이팅 활성은 시료에 함유된 페놀성 물질의 함량과 상관관계가 낮다는 기존의 보고가 있음. 실험 결과 금화차 및 금량엽전차 시료에서 Fe^{+2} 킬레이팅 활성과 EGCG 함량의 증가는 유의성이 없는 것으로 확인됨

표 10. DPPH radical scavenging activity and reducing power by FRAP and Fe⁺² chelating activity in different tea cultivars

(%)

Samples Name	Concentration of extracts (ug/ml)				
	50	100	200	500	
DPPH radical scavenging activity	S1	38.28±0.27 ^{aC}	52.07±0.57 ^{bD}	56.18±0.71 ^{cD}	58.08±0.52 ^{dC}
	S2	55.13±0.15 ^{aE}	56.89±1.96 ^{abE}	58.21±1.62 ^{bDE}	66.47±1.70 ^{cD}
	S3	53.34±1.38 ^{aE}	58.20±2.18 ^{bE}	60.72±0.69 ^{bE}	68.71±1.12 ^{cD}
	S4	25.77±1.80 ^{ab}	33.28±0.20 ^{bb}	38.63±0.34 ^{cb}	40.21±0.65 ^b
	S5	40.94±1.18 ^{aD}	46.10±0.83 ^{bc}	52.02±3.64 ^{cC}	57.90±1.79 ^{cC}
Reducing power by FRAP	S1	4.24±0.11 ^{ab}	17.48±0.73 ^{bb}	42.25±0.12 ^{cb}	100.30±0.24 ^{db}
	S2	10.46±0.11 ^{aD}	28.35±0.34 ^{bD}	61.42±0.40 ^{cD}	110.66±0.65 ^{dE}
	S3	13.07±0.19 ^{aE}	31.72±0.48 ^{bE}	67.34±1.16 ^{cE}	117.87±0.34 ^{dF}
	S4	4.95±1.28 ^{ab}	17.16±0.39 ^{bb}	43.32±0.44 ^{cb}	106.57±0.50 ^{dD}
	S5	0.92±0.41 ^{aA}	9.91±0.86 ^{bA}	29.92±0.38 ^{cA}	84.00±0.32 ^{dA}
Fe ⁺² chelating activity	S1	10.76±2.53 ^{aA}	31.26±2.39 ^{bb}	67.89±2.38 ^{cC}	86.41±1.46 ^{dB}
	S2	10.68±2.37 ^{aA}	25.68±3.68 ^{baB}	61.79±3.76 ^{cC}	86.54±3.09 ^{dB}
	S3	10.59±0.91 ^{aA}	25.02±4.57 ^{ba}	53.42±3.93 ^{cb}	85.95±1.17 ^{dB}
	S4	14.31±2.84 ^{aAB}	37.94±2.19 ^{bc}	62.11±3.39 ^{cC}	84.00±0.68 ^{dB}
	S5	16.91±0.32 ^{ab}	29.28±3.34 ^{baB}	45.22±2.40 ^{cA}	79.31±1.08 ^{dA}

All values are mean±SD (n=5)

^{A-D}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

^{a-d}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

마. 총 페놀 화합물 분석

- (1) 제조된 금화차와 중국 미생물 발효차(복전차) 2종 및 모차 Control 등을 대상으로 총 페놀량을 비교 분석한 결과 티백을 원료로한 금화차를 제외하고 황차, 황차(민황), 녹차를 모차로한 금화차에서는 모두 숙성기간이 3개월 이상된 2번 sample에서 총 페놀량이 높게 측정되었다. 금화균이 접종되지 않은 모차(산차)와 비교하면 40% 정도의 총 페놀량이 감소하는 경향이 있음
- (2) 그러나 하동 인근에서 구매한 발효차와 비교한 결과 금화황차의 경우 약 6배, 금화황차(민황)의 경우 약 4.5배, 금화녹차의 경우 약 5배, 금화티백의 경우 약 6.2배의 높은 페놀량이 확인됨. 또한, 제조된 금화차와 기존 중국 복전차들 과의 총 페놀량 비교 분석 결과, 중국 상해 차시장에서 구매한 복전차에서는 26.6 mg/g로 약 4.5배 낮게 측정되었고, 익양에서 구매한 고급 복전차에서는 15.4 mg/g로 약 8배 낮은 총 페놀량이 측정됨
- (3) 이상의 결과로 보아 모차를 금화차로 만드는 일련의 과정을 거치며 총 페놀량이 감

소하는 경향성을 보였으나, 발효 후 숙성과정에서 진행될수록 총 페놀 함량이 증가한다는 것을 알 수 있음. 또한, 기존 중국 복전차 2종에 비하여 4.5배, 8배 높은 총 페놀 함량이 측정됨으로서 기존 중국 복전차와의 차별성을 확인할 수 있음

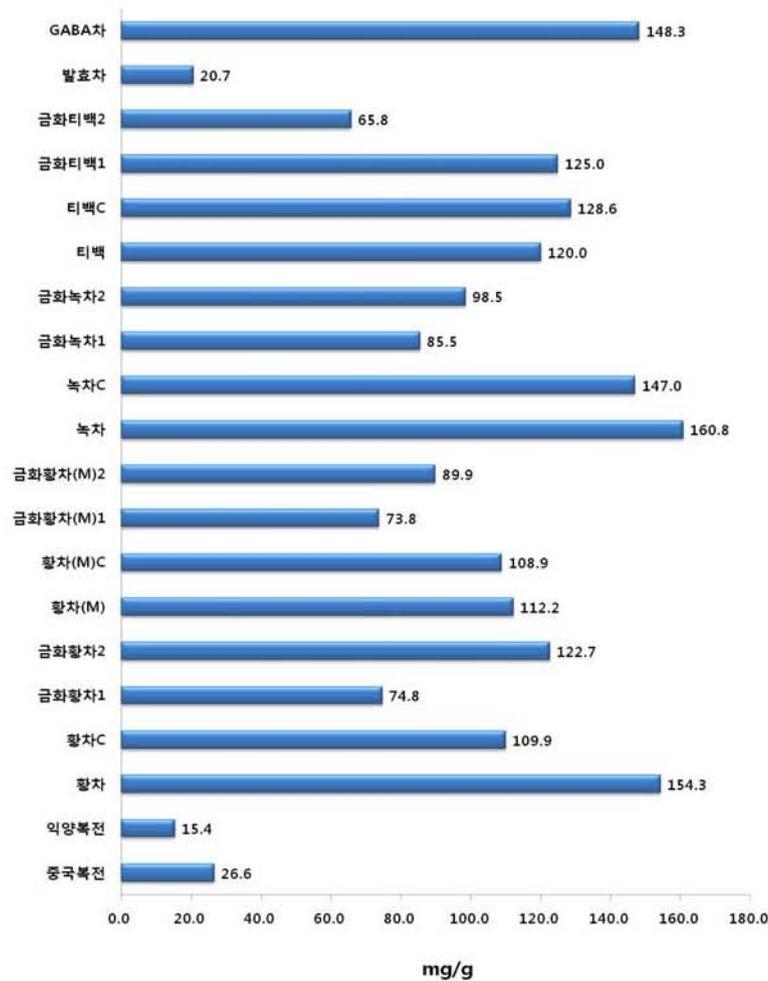


그림 49. 제조된 금화차와 중국 미생물 발효차 및 기존 차들과의 총 페놀량 비교 분석

바. 플라보노이드 함량 분석

(1) 플라보노이드 함량은 금화차 10.68 ± 0.66 , 금랑엽전차 7.90 ± 1.00 , 모차(세작급) 10.49 ± 1.39 , 익양복전 2.16 ± 1.14 , 중국복전 6.47 ± 1.55 로 측정됨. 가공 및 숙성과정 중 총 페놀 함량 및 플라보노이드 함량이 감소되었으며, 원료(모차)의 종류에 따라서 함량에 차이가 있는 것으로 확인됨

표 11. Comparison in total phenol and flavonoid of different tea cultivars

Samples Name	금화차	금랑엽전차	모차(세작급)	익양복전	중국복전
Flavonoid(mg/g)	10.68 ± 0.66^C	7.90 ± 1.00^B	10.49 ± 1.39^C	2.16 ± 1.14^A	6.47 ± 1.55^B

All values are mean±SD (n=3)

^{A-E}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

사. 영양성분 분석

- (1) 제조된 금화차(숙성기간 3개월 이상된 금화차)의 영양성분 분석결과 열량은 350 kcal/100 g, 탄수화물 54.5 g/100 g, 당류 1.4 g/100 g, 단백질 32.1 g/100 g, 지방 0.4 g/100 g, 나트륨 9.5 mg/100 g 으로 측정 되었으며, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤은 검출되지 않음
- (2) 일반적인 차류에 비하여 단백질 함량이 높게 측정되었으며, 이는 미생물에 의한 작용이 있을 것으로 추정되었다. 수분은 6.9 g/100 g, 회분 6.1 g/100 g으로 측정됨

검 사 성 적 서

발급번호 : 2014 - 02		접수번호 : 2014-38	
제 품 명	금화차	식 품 류 명	차류
업 체 명	(재)창녕양파장류연구소	검 수년월일	2014-04-14
주 소	경남 창녕군 화계면 성진강대로 3749-14	제 조 일 자	-
우편번호	667-822	전 화 번 호	055-880-2883
이 비 인	조 규 형	검 사 목 적	광고용
		유 용 기 한	-
		검사완료일	2014-04-18
시험 항목 및 결과			
시험항목		결과	
열량 (kcal/100 g)		350.0	
탄수화물 (g/100 g)		54.5	
당류 (g/100 g)		1.4	
단백질 (g/100 g)		32.1	
지방 (g/100 g)		0.4	
포화지방 (g/100 g)		0.0	
트랜스지방 (g/100 g)		0.0	
콜레스테롤 (mg/100 g)		0.0	
나트륨 (mg/100 g)		9.5	
수분 (g/100 g)		6.9	
회분 (g/100 g)		6.1	
<p>비고 : 이 시험성적서는 제시된 검체에 한하며 검사목적 이외의 용도로는 사용할 수 없습니다.</p> <p>※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함</p>			
(재)창녕양파장류연구소			2014년 4월 21일

그림 50. 시제품 금화차의 영양성분 분석 결과

8. 금화차 개발을 위한 1차 발효미생물 탐색

가. 우수한 1차 발효미생물 선발

- (1) 녹차의 경우 금화균이 신속하게 활용할 수 있는 탄소원이 부족하기 때문에 초기 발효시 다른 미생물을 이용하여 녹차에 존재하는 고분자 물질을 분해하고, 금화균이 이용하기 쉬운 탄소원으로 전환시킬 필요가 있음
- (2) 고분자 탄수화물을 분해하는 효소를 생성하는 미생물을 선택하여 1차 발효를 통해 저분자 탄소원으로 분해하는 발효공정을 개발해야 함
- (3) 단백질 및 전분질 분해효소를 다량 생산하고 균체에 각종 영양소가 함유되어 있다고 기존에 보고된 유용 미생물을 1차 발효용 우수 균주로 선발하였으며, 그 균주를 표 13에 나타내었음
- (4) 그 결과 유산균, 고초균, 황국균, 백국균이 녹차의 1차 발효용 미생물로 선발되었음.

당초 계획인 발효 미생물중 하나인 효모는 녹차에 발효를 시도한 예비실험 결과 지속적인 오염 발생으로 발효가 어려운 점이 있어 백국균으로 대체하여 실험하였음

표 12. 차 발효공정을 위한 우수 미생물 선발

미생물 선택균	특징
유산균 (<i>Lactobacillus</i> sp.)	유기산을 생성하여 유해균 증식을 억제시키며 유해독소를 중화하고 비타민 B군 생성
고초균 (<i>Bacillus</i> sp.)	전분, 단백질 분해효소 비타민(B,K) 등 대사산물 생성
황국균 (<i>Aspergillus oryzae</i>)	전분 당화력과 단백질 분해력이 강함 A. <i>oryzae</i> 는 안전식품 목록으로 인정되고 있는 전분가수분해효소, 지방가수분해효소, 단백질 가수분해효소를 생성
백국균 (<i>Aspergillus kawauchii</i>)	흑국균저장중 발견된 변이주 흑국균에 비해 발효율이 우수하고 α -amylase 다량 생산 유기산, 구연산, 글루콘산 등을 생산

나. 녹차의 발효균주에 따른 발효 성상

- (1) 우수한 금화차 제조를 위하여 금화균이 차엽에 효율적으로 생육 할 수 있도록 차엽의 고분자 물질을 분해하고 금화균이 이용하기 쉬운 탄소원으로 전환시키기 위하여 차엽의 1차 발효공정을 개발하였음
- (2) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 발효 형태를 관찰하여 그림 71~78에 나타내었음
- (3) 먼저 그림 51과 52에 나타난 바와 같이 유산균을 차엽에 접종하여 각각 24, 30℃에서 발효하였을 때, 온도에 큰 영향 없이 발효시간이 경과함에 따라 약간 색상이 짙어지는 경향을 나타내었으며 부패나 오염 없이 발효가 진행되었음
- (4) 그림 53과 54에 나타난 바와 같이 고초균을 차엽에 접종하여 각각 37, 43℃에서 발효하였을 때, 발효 36시간째부터 색상이 짙어지기 시작하여 발효 72시간째에는 발효가 상당히 진행되어 차엽이 검은 빛을 띠었음
- (5) 그림 55와 56에 나타난 바와 같이 황국균을 차엽에 접종하여 각각 24, 30℃에서 발효하였을 때, 24℃에서는 발효 24시간부터 색상이 짙어지기 시작하여 발효가 서서히 시작되어 황국균이 생육하기 시작하였으나 백국균에 비해 발효 속도가 느렸으며, 30℃에서 발효하였을 때도 거의 유사한 발효성상을 나타내었음
- (6) 그림 57과 58에 나타난 바와 같이 백국균을 차엽에 접종하여 각각 24, 30℃에서 발효하였을 때, 24℃에서는 발효가 서서히 시작되어 발효 48시간부터 균사가 덮이기 시작하여 72시간째에는 대부분 백국균의 하얀 균사가 덮였으며, 30℃에서는 36시간부터 균사가 퍼지기 시작하여 발효 속도가 빠르게 나타났음
- (7) 이후 실험에서 각 발효시간에 따른 발효차들의 품질특성을 비교함으로써 금화균 생육을 위한 1차 발효미생물로써의 적합성을 조사하기로 하였음

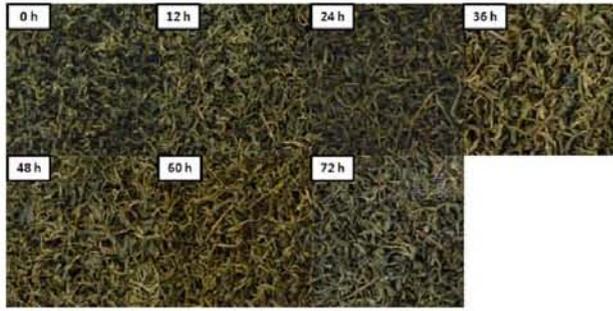


그림 51. 24°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 유산균 발효 형태

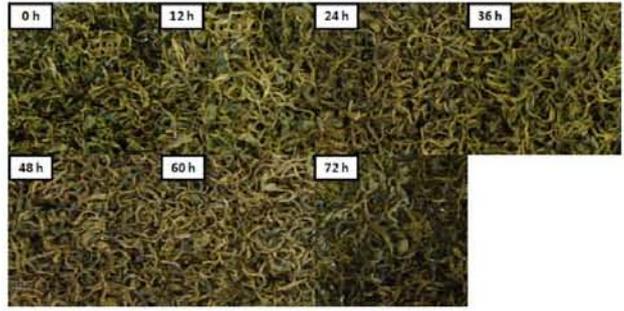


그림 52. 30°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 유산균 발효 형태

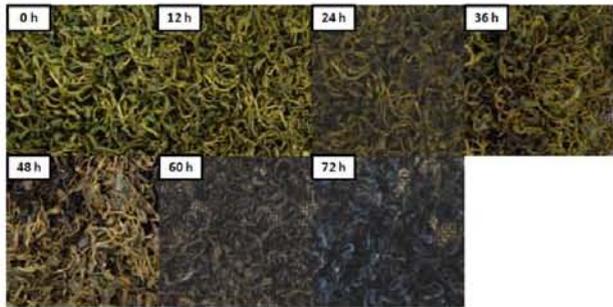


그림 53. 37°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 고초균 발효 형태

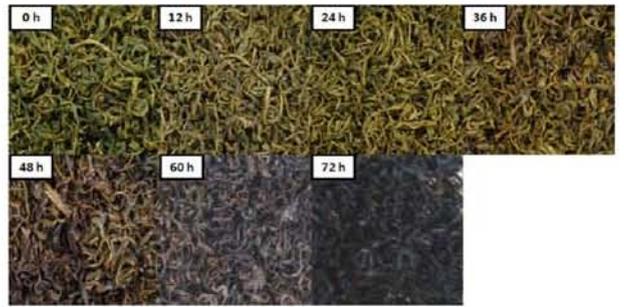


그림 54. 43°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 고초균 발효 형태



그림 55. 24°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 황국균 발효 형태

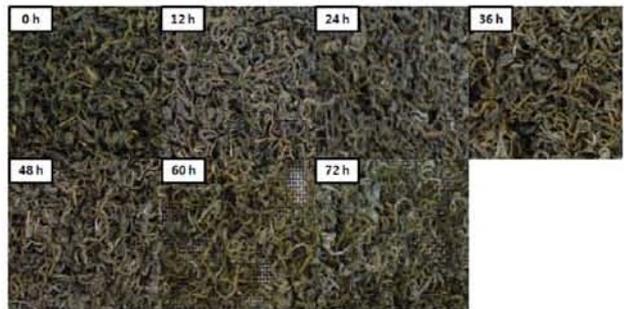


그림 56. 30°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 황국균 발효 형태



그림 57. 24°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 백국균 발효 형태



그림 58. 30°C에서 발효 시간에 따른 녹차의 백국균 발효 형태

다. 발효시간에 따른 생균수 변화

- (1) 찻잎에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 생균수를 측정하여 발효정도를 관찰하였으며 그 결과를 그림 59에 나타내었음
- (2) 유산균 발효구의 경우 발효 24시간째부터 균수가 증가하기 시작하여 24℃ 발효구의 경우 72시간째에 약 4.5×10^6 CFU/g에 도달한 반면, 30℃에서 발효하였을 때는 48시간째에 균수가 급속히 증가하기 시작하여 발효 72시간째에는 5.3×10^6 CFU/g의 생균수에 도달하였음
- (3) 고초균 발효시 37℃에서 발효구의 경우 발효 24시간째에 균수가 증가하기 시작하여 발효 72시간째에는 2.5×10^8 CFU/g에 도달한 반면 43℃ 발효구는 생육이 현저히 지연됨을 확인하였음
- (4) 황국균과 백국균의 경우 발효온도에 상관없이 발효가 진행되어 발효 12시간째부터 생균수가 기하급수적으로 증가하기 시작하였으며 발효 완료 시 9.1×10^8 CFU/g에 도달하였음
- (5) 따라서 선별된 균주들은 발효속도의 차이는 있으나 효율적으로 발효가 진행되었음을 확인할 수 있음

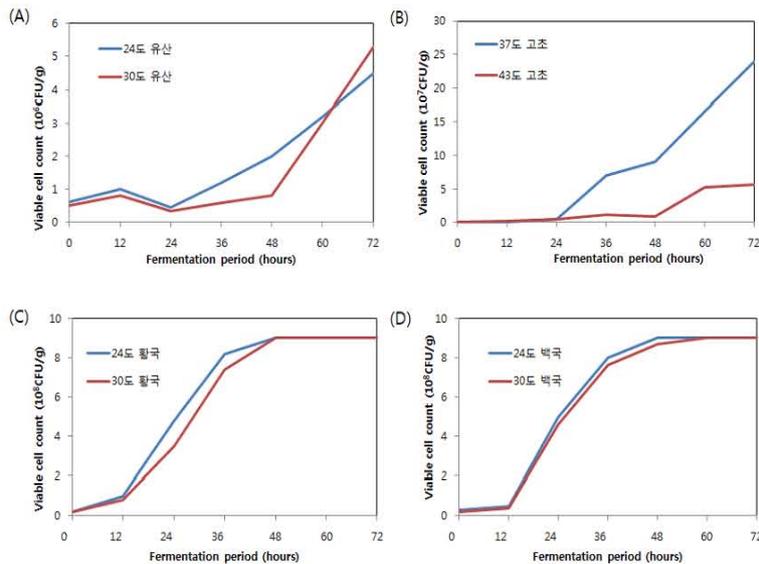


그림 59. 발효시간에 따른 녹차의 생균수 변화

(A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

라. 발효시간에 따른 pH 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 pH를 측정된 결과를 그림 60에 나타내었음
- (2) 유산균 발효구의 경우 발효 48 시간 후 pH가 감소하는 것을 확인하였는데 이는 유산균이 생산하는 유기산에 의하여 pH가 감소되는 것으로 사료됨.
- (3) 또한 30℃ 발효구에서 pH 감소속도가 더 빠르게 나타나 초기 pH 6에서 발효완료시

5.6에 도달하였음

- (4) 본 연구에서 선발된 유산균은 생육시 pH에 거의 변화를 주지않아 품질에 큰 영향을 미치지 않는 균주를 선발한 것으로써, 최종 pH는 큰 변화가 없는 것으로 나타났음
- (5) 고초균 발효의 경우 37℃ 발효구에서 발효 24시간째부터 pH가 서서히 상승하기 시작하기 시작하여 초기 pH 6.1에서 발효 완료시 약 6.7에 도달하였으며, 43℃ 발효구는 발효 60시간째부터 pH 변화를 나타내었음
- (6) 황국균으로 발효한 녹차는 발효온도에 큰 차이 없이 발효 초기 pH 6에서 pH가 서서히 감소하기 시작하여 36시간째에 최종 pH에 도달하여 약 4.5를 나타내었음
- (7) 백국균의 경우도 유사하게 발효온도에 큰 차이없이 초기 pH 5.5에서 발효완료시 4.5에 도달하는 경향을 나타내었음

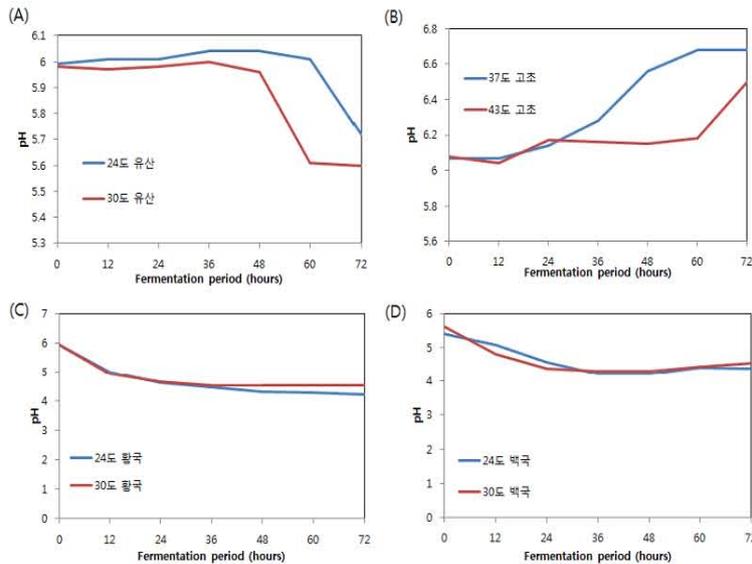


그림 60. 발효시간에 따른 녹차의 pH 변화

(A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

마. 발효시간에 따른 산도 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 산도의 변화를 측정된 결과를 그림 61에 나타내었음
- (2) 유산균 발효구의 경우 발효가 진행됨에 따라 산도가 지속적으로 증가하기 시작하여 초기산도 0.28%에서 최종산도 0.6%에 도달하였으며 pH의 결과와 유사하게 30℃ 발효구에서 변화가 약간 빠르게 진행됨을 확인하였음
- (3) 고초균 발효구의 경우 발효온도와 상관없이 발효가 진행되어도 산도 0.19%를 유지하여 산도의 변화가 크게 관찰되지 않았음
- (4) 황국균 발효구의 경우 초기 산도 0.25%에서 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가되어 발효완료시 0.45%에 도달하였으며 발효온도는 큰 영향을 미치지 않았음
- (5) 백국균 발효구의 경우 발효가 진행됨에 따라 산도가 서서히 증가하여 30℃ 발효구의 경우 약 0.53%에 도달하였으나 24℃ 발효구는 발효 24시간째에 최고 산도 0.45%에 도달하여 이후 서서히 감소하는 경향을 나타내었음

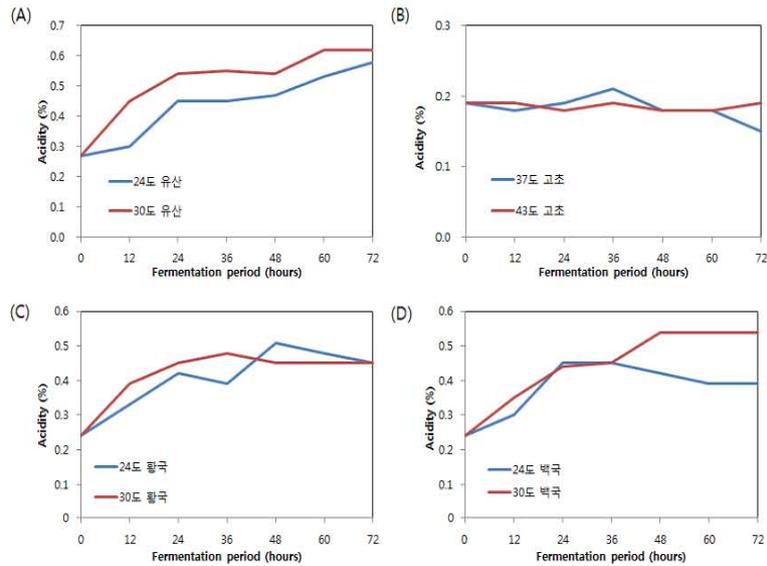


그림 61. 발효시간에 따른 녹차의 산도 변화
 (A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

바. 발효시간에 따른 아미노태질소 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 아미노태질소의 변화를 측정하여 그림 62에 나타내었음
- (2) 유산균으로 발효한 녹차의 경우 발효시간이 경과하여도 아미노태질소의 함량의 변화가 관찰되지 않아, 유산균은 단백질 분해효소를 거의 분비하지 않는 것으로 사료됨
- (3) 반면 고초균 발효구는 발효가 진행됨에 따라 아미노태질소함량이 증가하여 37°C 발효구는 724 mg%, 43°C 발효구는 606 mg/%에 도달하여 37°C 발효시 단백질이 조금도 효율적으로 아미노 타입으로 전환되는 것을 관찰할 수 있음
- (4) 황국균의 경우 24°C 발효구에서 발효가 효율적으로 진행되어 발효 72시간에 아미노태질소 766 mg%에 도달하였으나 30°C에서는 약간 지연되어 551mg%로 검출됨
- (5) 백국균 발효구는 30°C 발효구에서 더욱 효율적으로 발효가 진행되어 발효 72시간에 843 mg%에 도달하였으나 24°C 발효구는 490 mg%로 검출됨
- (6) 고초균, 황국균, 백국균은 단백질분해효소 활성이 높다고 알려져 있는 우수한 발효균주이며, 이들 균주는 녹차에 생육하는 속도는 약간 차이가 있었지만 대부분 효율적으로 발효가 진행됨을 확인하였음

사. 발효시간에 따른 항산화능 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 DPPH 자유라디칼 소거활성을 측정하여 항산화능의 변화를 측정하여 그림 83에 나타내었음
- (2) 유산균 발효구의 경우 발효가 진행됨에 따라 DPPH 소거활성이 서서히 증가하였으며 특히 30°C 발효구에서 60시간에 채취된 시료는 73%의 활성을 보임

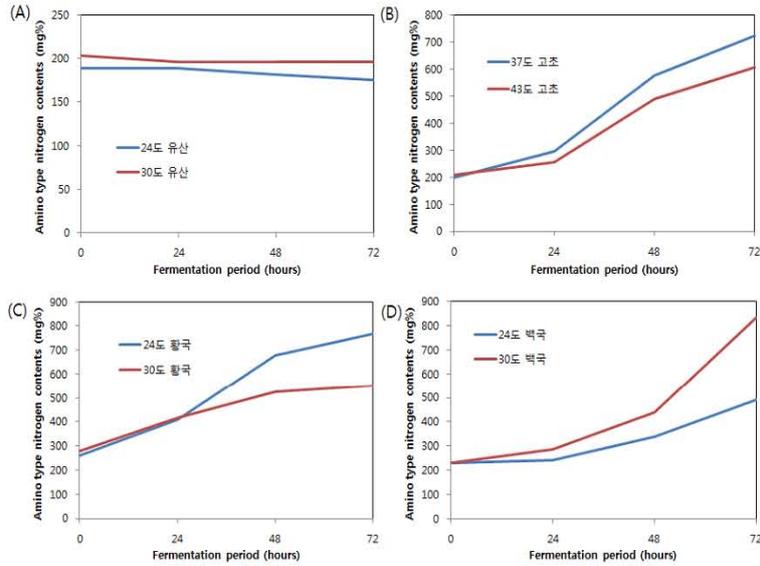


그림 62. 발효시간에 따른 녹차의 아미노태질소 변화
 (A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

- (3) 반면 고초균 발효구의 경우는 발효가 진행되어도 큰 변화를 나타내지 않았으며, 황국균 발효구의 경우 발효 24시간째에 최고 활성에 도달하여 73%의 활성을 보였으며 발효 온도의 영향은 크게 나타나지 않았음
- (4) 백국균의 경우 발효 12시간째에 77%의 높은 활성에 도달하여 효과적으로 나타났으며 발효 온도의 영향은 크게 관찰되지 않았음

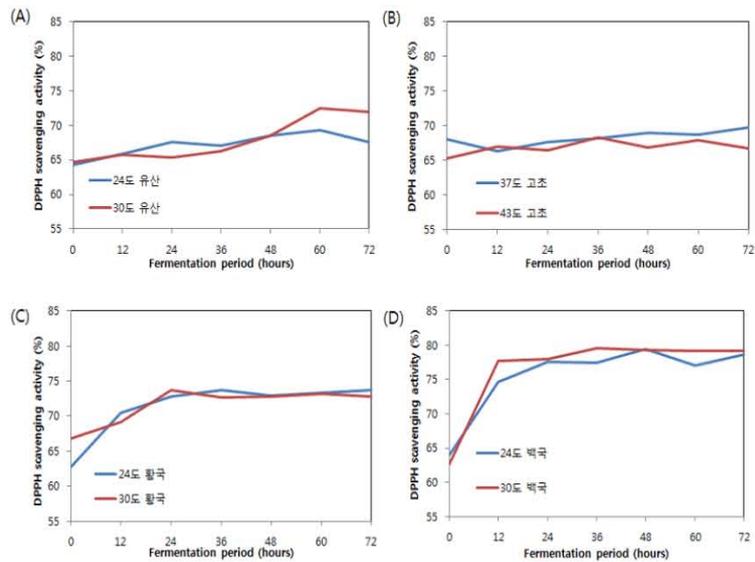


그림 63. 발효시간에 따른 녹차의 항산화능 변화
 (A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

아. 발효시간에 따른 총당 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 총당의 변화를 측정된 결과를 그림 64에 나타냄
- (2) 유산균을 발효한 구에서는 발효가 진행됨에 따라 초기 총당 함량과 조금 높거나 거의 일정하게 유지되었으며, 고초균을 37℃로 발효한 구에서는 발효 24 시간부터 10 mg/ml에서 8 mg/ml로 총당의 함량이 점차 낮아졌으며, 고초균을 43℃로 발효한 구에서는 발효가 완료 될 때까지 총당의 함량이 11 mg/ml로 거의 일정하게 유지됨
- (3) 또한, 황국균을 발효한 구에서는 발효초기 총당의 함량이 높아지다가 24℃로 발효한 구에서는 발효 24 시간째, 30℃로 발효한 구에서는 발효 48 시간부터 총당의 함량이 낮아져 최종 총당의 함량이 24~25 mg/ml으로 나타남
- (4) 백국균을 발효한 구에서는 발효 24 시간째 총당의 함량이 급격하게 증가 하였다가 발효함에 따라 점차 감소하거나 변화가 없음

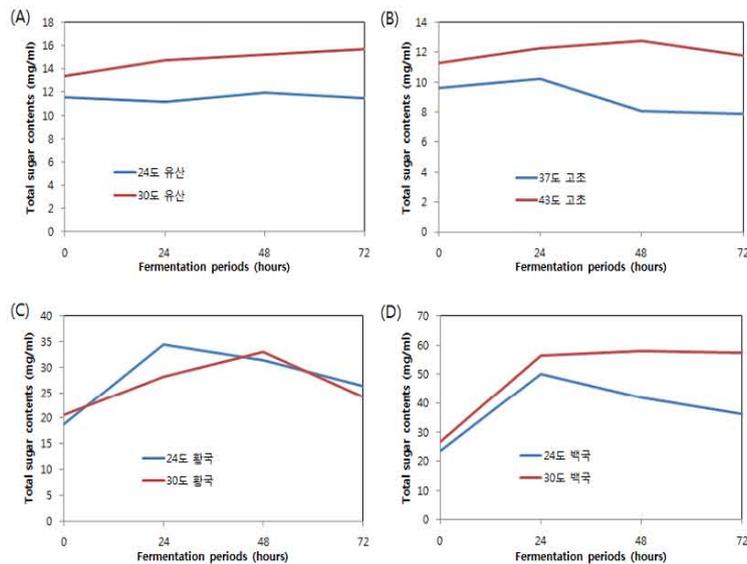


그림 64. 발효시간에 따른 녹차의 총당 변화

(A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

자. 발효시간에 따른 환원당 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 환원당의 변화를 측정된 결과를 그림 85에 나타냄
- (2) 유산균으로 발효한 구에서 환원당의 함량은 발효 초기 거의 변함이 없었지만 발효 48시간 이후 감소 하였으며, 고초균으로 발효한 구에서는 발효가 진행됨에 따라 24 시간째부터 점차 환원당의 함량이 감소하여 발효가 완료된 72 시간째에는 37℃와 43℃로 발효한 구 모두 4 mg/ml로 비슷한 함량을 나타남
- (3) 황국균으로 발효한 구에서는 발효 24 시간째에 환원당의 함량이 증가 하였다가 24℃로 발효한 구에서는 환원당의 함량이 발효함에 따라 점차 낮아져 발효 72시간째에 9

mg/ml로 가장 낮게 나타났으며, 30℃로 발효한 구 또한 발효함에 따라 점차 감소하여 11 mg/ml로 나타남

- (4) 백국균을 30℃로 발효한 구에서의 초기 환원당 함량은 7 mg/ml에서 발효 24 시간째 급격히 증가 하였다가 최종 환원당의 함량이 17 mg/ml로 나타났으며, 24℃로 발효한 구 또한 발효 24 시간째 급격히 증가하였다가 그 후 발효함에 따라 점차 환원당의 함량이 낮아져 최종 환원당의 함량은 10 mg/ml로 나타남

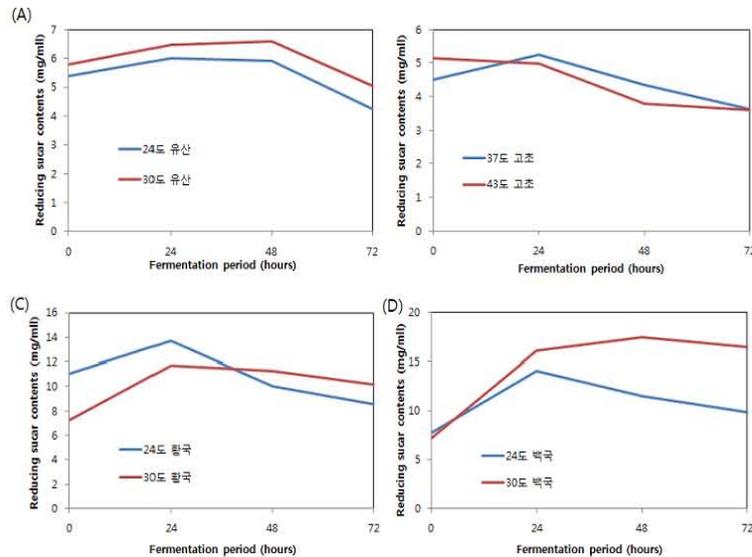


그림 65. 발효시간에 따른 녹차의 환원당 변화

(A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

차. 발효시간에 따른 폴리페놀 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 폴리페놀 함량의 변화를 측정 한 결과를 그림 66에 나타냄
- (2) 폴리페놀 성분은 플라보노이드, 카데킨, 안토시아닌 등의 물질을 종합적으로 부르는 명칭으로 체내에서 항산화 작용을 통하여 노화방지, 동맹경화예방, 항암효과 등을 가짐
- (3) 유산균으로 발효한 구의 폴리페놀의 함량은 30℃로 발효한 구에서는 3 mg/L로 발효함에 따라 거의 일정한 값을 보였으며, 24℃로 발효한 구에서는 점차 낮아지다가 약간 증가하는 것으로 나타남
- (4) 고초균을 43℃로 발효한 구에서는 일정한 값을 보이다가 발효 48 시간 이후 점차 낮아져 발효가 완료되는 72 시간째에 급격히 낮아져 폴리페놀 함량이 1.5 mg/L로 나타났으며, 37℃로 발효한 구에서는 발효 24 시간째부터 점차 낮아지다가 발효 48 시간 이후에는 1.6 mg/ml로 일정한 값을 유지 하였음
- (5) 황국균으로 발효한 구에서는 폴리페놀의 함량이 발효 24 시간째에 6 mg/L로 급격히 증가 하였다가 발효가 진행됨에 따라 다시 감소하는 경향을 보임
- (6) 백국균을 24℃로 발효한 구에서는 발효 24 시간째 폴리페놀의 함량이 증가 하였다가 다시 감소하여 초기 폴리페놀 함량과 비슷한 3.5 mg/L로 나타났으며, 30℃로 발효

한 구에서는 발효 24 시간 이후 폴리페놀의 함량이 점차 증가하여 최종 폴리페놀 함량은 5.5 mg/L로 나타남

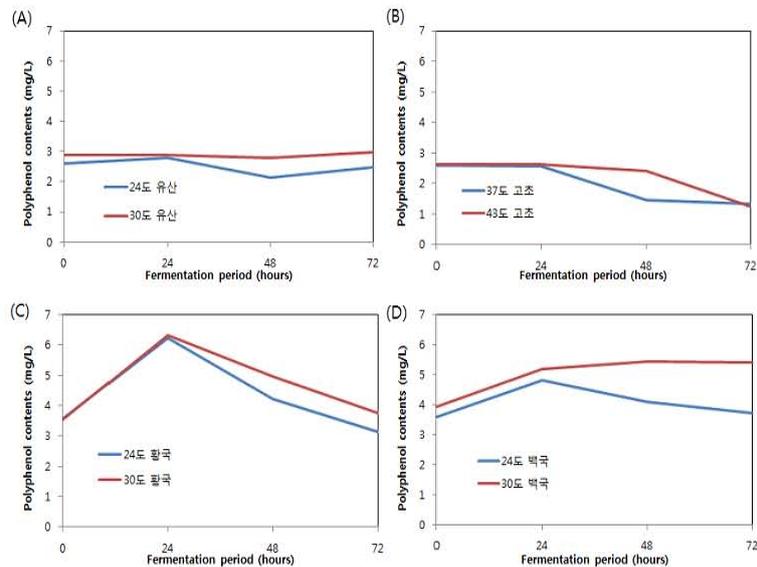


그림 66. 발효시간에 따른 녹차의 폴리페놀 변화
(A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

카. 발효시간에 따른 α -amylase 활성 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 24시간 간격으로 시료를 채취한 후 α -amylase 활성의 변화를 측정한 결과를 그림 67에 나타냄
- (2) 유산균으로 발효한 구에서의 α -amylase 활성은 발효 48 시간째에 감소하였다가 발효 72시간째에 다시 증가하여 24°C로 발효한 구는 4 U/g, 30도로 발효한 구는 3 U/g로 최종 α -amylase 활성이 나타남
- (3) 고초균으로 발효한 구에서의 α -amylase 활성은 발효 24시간째 약간 감소하였다가 발효 시간에 따라 점차 증가 하여 72 시간째에 37 도로 발효한 구에서는 16.5 U/g, 43°C로 발효한 구에서는 17 U/g로 가장 높은 활성을 나타냄
- (4) 황국균으로 발효한 구에서는 발효 24 시간째 α -amylase 활성이 증가 하였다가 발효함에 따라 약간 감소하여 24°C, 30°C로 발효한 구 모두 22 U/g 으로 나타남
- (5) 백국균으로 24°C로 발효한 구에서는 발효 24 시간째 α -amylase 활성이 22 U/g으로 급격히 증가하였다가 발효함에 따라 점차 증가하여 최종 α -amylase 활성은 27 U/g으로 나타났으며, 30 °C로 발효한 구 역시 발효 24 시간째 급격히 증가하였으며, 발효함에 따라 점차 증가하여 발효 72 시간째 20 U/g으로 최대 활성을 나타냄

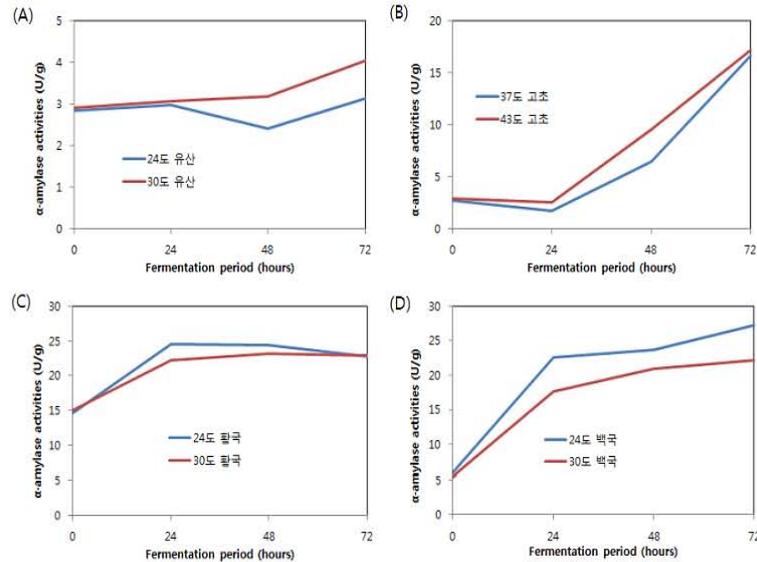


그림 67. 발효시간에 따른 녹차의 α-amylase 활성 변화
 (A) 유산균 발효 (B) 고초균 발효 (C) 황국균 발효 (D) 백국균 발효

타. 발효시간에 따른 카테킨 함량 변화

- (1) 차엽에 유산균, 고초균, 백국균, 황국균을 각각 접종하고 최적 발효온도에서 발효를 진행하여 발효 완료 후 카테킨 함량을 측정된 결과를 표 14에 나타냄
- (2) 유산균 발효구는 30°C 발효시 전체 카테킨 함량이 5,086.8 %로 24°C 발효시 보다 5 배이상 높게 검출됨
- (3) 고초균 발효구도 43°C 발효시 2,783.5 ppm으로 37°C 발효시 보다 2배 높게 나타났으며 황국균 발효구도 24°C 보다 30°C 발효시 카테킨 함량이 2배 이상 높게 검출됨
- (4) 백국균은 발효 온도의 영향이 크지 않았으나 전체 카테킨 함량이 11,569~15,177 ppm 으로 다른 미생물 발효구보다 현저히 높게 나타남
- (5) 이상의 결과를 종합하였을 때 백국균으로 발효한 녹차구가 아미노태질소, 항산화능, α-amylase 역가, 카테킨 함량 등 대부분의 실험결과가 우수하게 나타나, 금화차 개발 연구 진행 시 녹차에 금화균의 생육을 촉진시켜줄 1차 발효 미생물로 백국균이 가장 적합한 것으로 사료되며, 차후 연구에서는 1차 미생물의 생육을 촉진시킬 모차 선발, seed 영양원 탐색 등의 연구가 진행되어야 할 것임
- (6) 특히 백국균은 구연산 생성능이 강하므로 산미가 생성된다면 고초균을 이용한 중화 과정을 거치거나 아니면 그 자체를 특성으로 부각시키는 방안을 신중히 검토 후 2 차년도 연구를 진행해야 할 것으로 판단됨

표 13. 발효시간에 따른 녹차의 카테킨 함량 변화 (단위 : ppm)

	유산균 (24℃)	유산균 (30℃)	고초균 (37℃)	고초균 (43℃)	백국균 (24℃)	백국균 (30℃)	황국균 (24℃)	황국균 (30℃)
C	9.9	2797.4	11.0	19.2	8246.9	9147.4	666.0	1957.3
EGC	172.9	555.5	185.2	285.1	274.2	521.9	246.2	605.6
Caffeine	4581.5	3845.7	5800.8	7341.3	5530.8	7704.5	5798.0	5961.4
EC	171.7	1613.5	316.3	268.4	2945.4	5133.4	1344.1	2597.9
EGCG	2.1	59.2	10.9	499.6	26.5	11.1	8.8	12.4
ECG	780.7	61.2	708.9	1711.2	76.1	363.7	64.9	88.8
Total Catechin	1137.3	5086.8	1232.4	2783.5	11569.1	15177.6	2330.0	5262.0

파. 유산균 종균의 특성

- (1) 본 연구에 사용한 유산균(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IFO 12007)은 *Bacillus*속, 유산균(*Lactococcus lactis* spp)은 물론 인간에게 위해를 일으킬 수 있는 오염성 미생물의 증식을 억제함
- (2) 이 균은 천연항균성 항균 물질인 나이신(nisin)을 생산하고 발효 후에도 젖산에 의한 급격한 pH 감소를 일으키지 않으며 이미 국제적으로 안전성이 입증되어 발효식품 제조에 다양하게 응용되고 있는 균주임
- (3) 광대역 항생물질인 nisin은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 속 유산균 중의 극 소수가 대수증식기에 생산하는 단백질성 물질이며 분자량은 약 3,500 Da 인 항균물질임
- (4) Nisin은 미생물의 peptidoglycan의 생산을 저해함으로써 *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* 등의 Gram 양성균의 생육을 효과적으로 억제 또는 사멸시키나 Gram 음성균에는 활성이 약하거나 거의 없는 것으로 알려져 있음
- (5) Nisin의 활성은 trypsin, carboxypeptidase A, pepsin, elastase, erepsin 등에 영향을 받지 않고 인체 내에서는 단백질분해효소에 의해 분해됨으로 인체에 무해한 식품보존제로서 미국을 포함한 50여개 이상의 나라에서 치즈, 통조림, 우유, 마요네즈 등에 사용이 허가 되어 있음
- (6) 유산균은 미리 M17G(1% Glucose 첨가 pH 6.9)배지에 접종 후 30℃, 48시간 정치배양한 액을 사용했고 M17배지 조성은 아래 표 16과 같음

표 14. 유산균 배양용 M17 배지 조성

Component	Concentration (g/L)
Pancreatic digested casein	5.0
Soy peptone	5.0
Beef extract	5.0
Yeast extract	2.5
Ascorbic acid	0.5
Magnesium sulfate	0.25
Disodium-β-glycerophosphate	19.0
Glucose	10.0
Agar	15.0

하. 황·백국균 및 금화균의 특성

- (1) 두 번째 발효에 관여하는 황국균(*Aspergillus oryzae*)은 강력한 발효력의 근원인 전분 질분해효소, 단백질분해효소 등의 생산능이 강하고 최종 제품의 풍미나 기호도를 상승시키는 작용이 있어 식물성 식품을 주로 섭취하는 동양인이 즐기는 고체 발효 식품의 제조에 없어서는 안 될 중요한 역할을 함
- (2) 황국균은 유산균이 생산하는 천연항균성 물질인 nisin의 항균 혹은 정균 작용의 영향을 거의 받지 않을 뿐만 아니라 오히려 nisin을 분해 할 수 있는 단백질 분해 효소를 생산함
- (3) 황국균이 순조롭게 발육 및 증식하며 중성·산성 pH 영역에서 최적 반응을 일으키는 효소를 생성하고 고분자 물질의 저분자화는 더욱 효율적으로 이루어질 것임
- (4) 백국균(*Asp. kawachii*)는 기온이 높아 정상적인 국균 발효가 어려운 일본의 남부 지역인 큐슈나 오키나와현에서 전통적 방법으로 소주제조 시 사용되어온 곰팡이균으로써 신맛 성분인 구연산, 젖산 등의 유기산 생성능이 우수한 균주임
- (5) 당을 첨가하여 발효 시 신맛이 생성되므로 전형적인 무맛의 발효차를 발효시키기엔 적합하지 않겠지만 중국 남부나 일부 동남아시아의 해안가에서 식수 중의 염분으로 인한 음용 회피 현상을 완화시킬 목적으로 제조되는 흑차 발효용 균주로 사용은 가능할 것으로 예상됨
- (6) 금화균은 *Aspergillus* 속 특유의 분생자를 가지며, 무성세대는 *Aspergillus* 속이지만 유성생식을 하며 자낭과를 형성하므로 *Eurotium* 속으로 분류되며 자낭과 속에는 자낭포자가 든 주머니(자낭)이 들어있음
- (7) 사상균의 증식에 사용되는 보편적인 진균용 배지인 PDA(Potato dextrose agar)배지에는 거의 발육하지 않고 수분활성이 낮은 환경, 즉 매우 건조한 조건에서 오히려

더욱 잘 증식하는 특성을 가진 호건성 미생물임

- (8) 수분활성이 낮을수록 잘 자라므로 만두, 찜, 꿀 등의 저 수분 식품이나 실내의 습도가 낮은 장소에 방치한 천, 가방 등의 표면에서 빈번하게 검출되는 균종이며, 중국 발효차 제조의 마지막 공정인 2차 발효 및 건조 단계에 집중적으로 발육하는 대표적인 국균의 일종임

아. 고초균의 특성

- (1) 3 번째 고초균(*Bacillus subtilis* GSK3580, 제 2세부 연구기관 기탁균주)은 유산균과 곰팡이에 의해 분해되지 않고 남은 물질이나 대사되지 않는 일부 난분해성 물질까지 효율적으로 분해할 수 있고 증식 중 품온을 50℃ 이상으로 상승시켜 저온성 미생물의 증식 방지는 물론 살균 작용도 동시에 수행할 수 있어 발효 효율을 상승시킬 수 있음
- (2) 알칼리성 미생물인 고초균은 단백질을 과잉 발효시키면 심한 암모니아 냄새를 생성할 수 있고, 균주의 변이가 빈번하여 관리가 어렵고, 균주간 경쟁 및 오염 위험이 높아 단일 균만을 선택적으로 배양하여 종균으로 사용하기가 어려운 단점은 있지만 발효 시간이나 조건 등을 안정적으로 잘 관리하면 황국균 이상의 우수한 특성 즉 효소 생성능이 우수하여 고온 발효 및 갈색색소 발현을 촉진하는 등의 이점이 있음
- (3) 그러나 고초균을 사용한 예비 실험결과 탄닌 성분에 민감하여 녹차에 탄소원을 첨가해도 증식이 어려워 무미, 무취의 발효차 색상 강화 목적으로 사용해도 이익이 될 것으로 추측됨
- (4) 고초균이 먼저 증식하면 영양원의 우선적 소비, 강력한 단백질 및 전분분해효소를 다량 생성하고 발효 후 pH를 알칼리성으로 변환시키고 항균성 물질을 생성하므로 잡균의 증식 억제를 기대할 수 있음
- (5) 고초균은 그렘양성의 구균으로 내열성 아포를 생성하며 영양세포 증식을 위해서 산소가 필요하므로 주로 식품의 표면을 선호해서 증식함

표 15. 고초균의 생화학적 특성-1

1. Morphological characteristics		2. Cultural characteristics	
Form	: rod	Growth pH	: 6.0 ~ 9.5
Mobility	: +	Growth temperature	: 20 ~ 55℃
Gram stain	: +	Aerobic growth	: +
Spores	: +	Growth NaCl	: 0 ~ 12%

표 16. 고초균의 생화학적 특성-2

1. Physiological characteristics		2. Carbon utilization	
Starch	: +(slowly)	Glucose	: +
Casein	: +(quickly)	Cellobiose	: +
Gelatin	: +(quickly)	Fructose	: +
Pectin	: +(quickly)	Lactose	: -
Pullulan	: -	Sallicin	: +
Catalase	: +	Inositol	: -
Oxidase	: +	Sorbitol	: +
Citrate	: +	Sucrose	: +
Nitrate reduction	: -	Melibiose	: -
Urease	: +	Amygdalin	: +
Acetoin	: +	Xylose	: -
Indol	: -	Arabinose	: +
Lysine decarboxylase	: +	Rhamnose	: -
Arginine decarboxylase	: +	Mannitol	: -
Ornithine decarboxylase	: +		
H ₂ S	: -		

9. 단계발효 접목을 통한 곰팡균 발효 조건 확립

가. 선발된 1차 발효미생물을 활용한 발효조건 탐색

- (1) 식품가공용 미생물인 효모, 곰팡이, 박테리아가 증식 혹은 분열하기 위해서는 온도, 수분, pH 및 영양원 등의 환경조건이 잘 갖추어져야 함
- (2) 유산균, 황국균과 고초균은 옛 부터 발효식품 제조에 사용된 식용 가능한 미생물로서 발효 후 잔존 미생물은 생균제로 이용되고 있으며, 발효물에 분비된 균체 유래의 효소나 다당류 등은 동물의 장관 내 미생물 집합체를 정상으로 유지하고 면역력을 강화시켜 질병저항성을 향상시키는 역할을 함
- (3) 발효차 제조에 활용해도 동일한 작용을 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 유산균은 생육 중 젖산을 분비하고 pH를 저하시키므로 발효 산물을 산성화시키는 특징이 있음
- (4) 그러나 효소학적인 문제인지 영양분 자화상의 문제인지는 알 수 없으나 식물성 단백질 분해 효소 역가와 전분 자화성이 아주 약한 단점과 유사종의 미생물 포자의 발아나 생육을 근본적으로 억제하는 천연 항균성 물질을 생산하여 자신에게 유리하게 환경을 선점하는 장점이 있음
- (5) 황국균은 전분이나 단백질 분해효소의 활성과 난분해성 물질인 피틴산 분해력도 강하여 곡물발효에 널리 사용되고 있는 미생물이지만 고초균의 증식에 의해 생육이 저해되는 단점이 있음
- (6) 고초균은 일부 유산균의 박테리오신 작용에 의해 아포의 발아는 물론 증식이 치명적으로 억제되는 단점이 있으나 자연계에 널리 분포하여 식물성 자원의 분해와 식품

의 부패에도 관여하는 등 장점과 단점을 모두 가진 미생물로써 세계용 효소생산은 물론 기능성 첨질물인 감마폴리글루타민산 생산에 활용되는 등 인간의 생활과 밀접한 관계를 가지고 있음

- (7) 차 잎 성분의 유해 미생물 증식을 억제 효과는 녹차의 대표적인 기능적 특성으로 알려져 있으며, 차 잎 속의 폴리페놀옥시다아제란 효소를 가열처리로 억제시켜 가공한 녹차와 상기 효소반응을 진행시켜 분해 및 갈변반응을 유도하여 제조한 발효차를 비교하면 탄닌 조성, 수용성 물질의 함량, 항산화작용 그리고 항균력에 차이가 난다고 알려져 있음
- (8) 녹차를 복수의 미생물로 단계적 발효를 시키기 위해서 우선 1차 년도에 실시한 연구 결과 사용 가능한 균주 후보인 황국균, 유산균, 백국균, 고초균과 중국의 고급 발효차에서 Golden flower를 생성하는 금화균 사이의 상승 혹은 길항 특성을 미리 파악할 필요가 있음
- (9) 3종의 곰팡이와 고초균을 사용해서 두 가지 온도 영역에서 72시간 동안 발효차를 제조하는 과정 중 균사 생성 시기, 향기 감지 시기, 갈색색소 및 흑색색소 관찰시기를 측정된 결과 발효시킨 차잎의 표면에 흰색 균사 생성이 관찰되고 발효로 인한 색상 변화를 감지할 수 있는 시기가 24℃보다는 30℃에서 금화균(대조구와 동일하여 사진 생략)이나 황국균보다는 백국균이 더 빨랐음
- (10) 백국균은 녹차에 접종해서 발효시키면 약 24℃(36시간), 30℃(20시간) 후에는 균사가 관찰되었지만 황국균은 24℃와 30℃ 모두 48시간 경과 후에야 균사의 증식이 관찰되었음. 금화균은 수분의 함량이 아주 낮은 상황에서만 증식하므로 이상의 실험구에서는 증식을 관찰 할 수 없었다. 이러한 상황으로 미루어 장기 저장하여 유통기한 지난 녹차로 발효차 제조 시 증식능이 가장 우수한 균주는 백국균이었음
- (11) 고초균 발효차도 40℃의 고온에서 색상이 더욱 짙어지는 경향이 있었지만 이 현상은 균체 유래의 효소작용이나 온도의 영향이 클 것이지 탄닌에 민감한 고초균의 증식으로 일어난 현상은 아니라고 생각됨

표 17. 4종의 종균 이용 발효차 제조 중 향기 및 색상 변화

		12h	24h	36h	48h	60h	72h
황국균	24℃	-	-	-	+, F	++	++, Br
	30℃	-	-	-	+, F	++	++, Br
백국균	24℃	-	-	±, F	+	++	++, Br
	30℃	-	±	++, F	++	++, Br	++, Br
금화균	24℃	-	-	-	-	-	-
	30℃	-	-	-	-	-	-
고초균	37℃	-	-	-	-	-, Br	-, Bl
	40℃	-	-	-	-, Br	-	-, Bl

+:균사 관찰, F:향기 감지, Br: 갈색 색소 관찰, Bl:흑색 변화



황국균 24h



황국균 36h



백국균 24h



백국균 36h

그림 68. 녹차를 유산균-황국균과 유산균-백국균으로 발효(30℃)시킨 발효차

나. 3단 발효

- (1) 한 가지 미생물로 식품성분을 분해시키는 일반적인 발효방법은 분해되지 않은 기질 즉 난분해성 물질이 발효 후에도 잔존하다가 나중에 다른 미생물의 증식에 필요한 조건이 갖춰지면 2차 발효를 일으킬 수도 있음
- (2) 이러한 단점을 극복하기 위해서는 유사한 균종이 속이 다른 2가지 이상의 서로 다른 미생물을 연속적으로 접종해서 분해율을 높일 필요가 있음
- (3) 콩 성분 분해를 위해 최초로 개발된 3 가지 균을 이용한 3단 발효법에서는 유산균으로 1단 발효 후 황국균을 접종해서 2단 발효하고 고초균으로 세 번에 걸쳐 분해시키는 3단 발효법을 사용하였으나 최근에는 1차 발효용 유산균을 미리 액체 배양하여 향균성 물질을 생산시킨 배양액을 2차 발효용 종균과 같이 혼합하여 접종하는 간단한 방법으로 업그레이드해서 실용화하고 있음
- (4) 총 발효기간 단축, 발효물의 개방에 따른 오염 방지, 에너지 절약, 인건비 절약 차원에서 속성 3단 발효법을 사용하고 있음

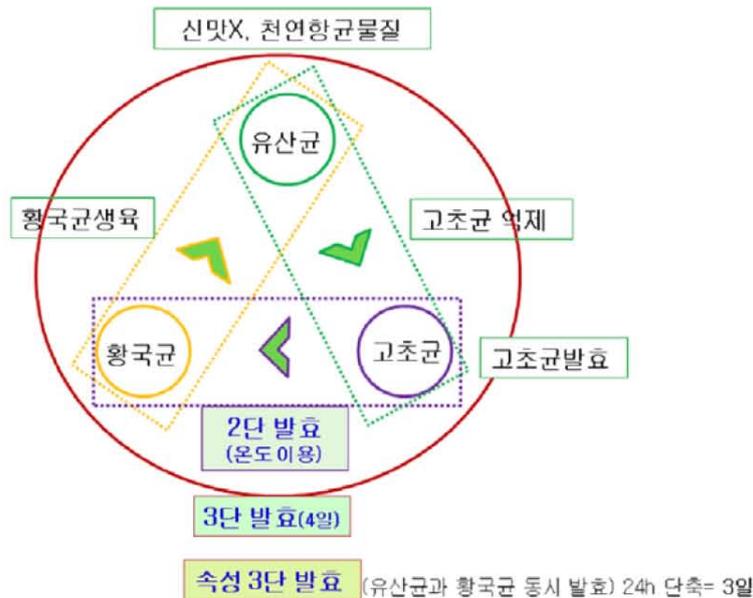


그림 69. 3단 발효 모식도

- (5) 본 연구진이 개발한 다단식 발효법인 3단 발효 공정은 아래의 조건을 만족시켜야 함
 - (가) 다양한 균주 유래 효소작용으로 풍미가 개선될 것

- (나) 앞 공정 미생물과 금화균의 선호 영양원이나 기질 분해 특성이 다를 것
 - (다) 금화균의 증식을 억제하는 물질이 원료나 발효산물에 적거나 없을 것
 - (라) 최종 발효물에 이미, 이취가 없고 유해물질도 생성되지 않을 것
 - (마) 저장 및 유통 중 품질 열화가 없을 것 등이다.
- (6) 유산균과 황국균을 동시에 접종해서 배양하면 황국균의 증식이 미약하게 억제되지만 황국균이 증식하므로 발효는 진행되지만 대부분의 그램 음성균의 증식은 억제된됨
 - (7) 그러나 황국균과 고초균을 동시에 접종해서 배양할 경우 온도나 분해시킬 소재에 따라서 다르지만 37℃ 이상에서는 고초균이 우세하게 증식하고 반대로 30℃ 이하에서는 황국균이 우점균으로 발육할 수도 있음
 - (8) 만약 고초균이 우점적으로 증식된 환경에 황국균을 첨가하여 생육을 유도하더라도 증식하지 못하는 경우가 많으며, 유산균과 고초균 사이에도 앞서 설명한 “황국균과 고초균”을 같이 접종했던 상황처럼 온도에 따라 발효 패턴은 달라지지만 유산균이 증식한 후에는 고초균의 증식이 일어나지 않는다. 그러므로 유산균-국균-고초균의 순서를 지키며 종균을 접종해야 효율적인 발효가 일어날 것으로 판단됨

바. 금화균 증식 최적 조건 및 환경 설정

- (1) 대부분의 곰팡이는 습도 70~80%의 환경을 선호하여 증식하므로 육안 관찰도 가능하다. 습도가 낮은 (60%이하) 실내에서는 보통의 곰팡이는 수분 부족으로 건조되어 사멸에 이르게 됨. 그러나 건조된 환경을 선호하는 호건성 진균은 건조 환경에서도 견디는 성질이 강하여 살아남는다. 주택에서 발견되는 실내 먼지나 발효차 속의 진균을 분석하면 호건성 곰팡이가 일반 곰팡이보다 더 많이 검출됨
- (2) Eurotum 속 미생물은 저습 환경에서도 대량의 포자를 생성하며 그 포자는 공기 중에 잘 비산되는 특징이 있음
- (3) 금화균의 최적 생육 조건은
 - (가) pH 5.5 ~ 6.5(액체 배양)에서 잘 증식
 - (나) 수분: 16 ~ 20%(상대 습도 약 60%)
 - (다) 증식 온도: 25 ~ 30℃
 - (라) 포자 직경: 0.06 ~ 0.07mm
 - (마) 녹차 원료로 발효차 제조하면 7일/30℃ 후에 콜로니 관찰 가능하고 황차 원료인 경우 10일/30℃ 후에 콜로니 관찰이 가능함
- (4) 금화균 증식 배지로는 기존의 곰팡이용 배지인 PDA(B), Czapek-Dox Agar(C)와 Czapek-Dox agar를 기본으로 최종 sucrose 농도를 40%로 조정한 M40Y 배지가 수분이 적은 척박한 환경에서 증식하는 곰팡이 분리 및 배양용으로 사용되고 있음
- (5) M40Y 배지는 맥아와 효모추출물을 동시에 첨가한 조성(1)과 Czapek-Dox 배지에 한천과 설탕을 첨가한 조성(2)의 2종류가 알려져 있으나 금화균은 거의 영양분이 함유되지 않은 차 앞에서 증식해야 하고 맥아추출물과 효모추출물의 가격이 고가인 점을 고려하여 미네랄용액에 설탕을 첨가한 M40Y(2), 즉 (C)를 사용하였음

M40Y_(1)	
Sucrose	400 g
Malt extract	20 g
Yeast extract	5 g
Agar	15 ~ 20 g
D.W	1 L

M40Y_(2) (pH 6.0)	
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Sucrose	500 g
Agar	15 ~ 20 g
D.W.	1 L

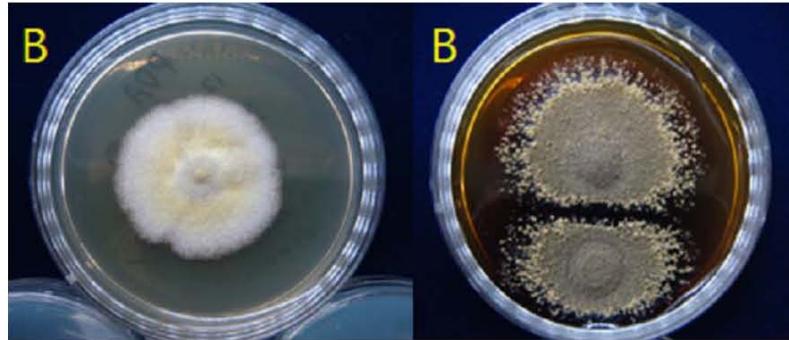
Potato dextrose agar (PDA) (pH 6.0)	
Potato starch (Sliced washed unpeeled 200 g)	4 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
D.W.	1 L

CD(Czapek-Dox) agar (pH 6.0)	
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Sucrose	30 g
Agar	15 ~ 20 g
D.W.	1 L

- (6) 금화균을 직경 60 mm 샐레 안의 PDA배지에 7일 배양한 왼쪽 사진과 14일 배양 후 실온에서 장기간 저장하며 충분히 증식시킨 오른쪽 사진 상의 콜로니 모양이나 크기

의 비교가 가능함

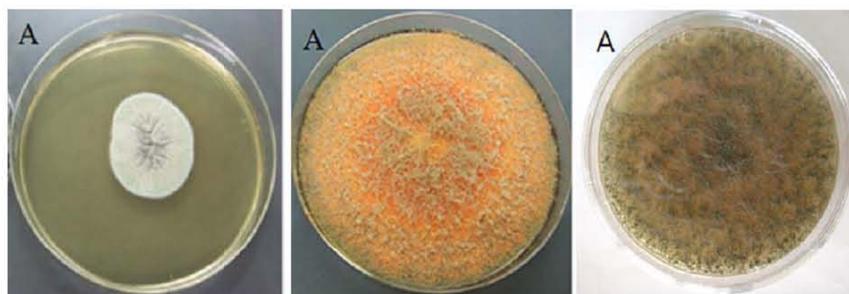
- (7) 과 발육시킨 PDA 배지 상의 금화균 콜로니는 30~35mm로 작아 발육이 나쁨을 알 수 있었음



PDA 27°C, 7일 PDA 27°C, 14+20일

그림 70. 금화균 콜로니(PDA 한천 배지 27°C, 60mm 샬레)

- (8) M40Y 배지는 곰팡이용 Czapa-Dox agar에 설탕을 첨가하여 최종농도 40%로 조정함으로써 배지 중의 수분함량 즉 수분활성을 인위적으로 낮춘 한천평판배지이며, 금화균과 같은 호건성 곰팡이는 수분 함량이 높은 환경에서 증식이 억제되므로 곰팡이가 이용 가능한 수분의 양을 낮게 하여 건조 상황을 선호하는 진균의 증식을 촉진시킬 수 있음
- (9) 배양 3일이 지나면 아주 가늘고 얇은 군사가 배지의 표면에 직경 10 mm이하의 원형으로 퍼지며 자라고 2주일이 지나면 90 mm 샬레의 85 mm 이상을 덮게됨
- (10) 고체 배양하여 포자 회수를 목적으로 한다면 M40Y 한천평판배지에 접종하여 25 ~ 30°C 항온기에 배양하는 것이 효율적인 방법으로 판단됨



M40Y 27°C, 6일

M40Y 27°C, 14일

M40Y 27°C, 14일

그림 71. 금화균 콜로니(M40Y 한천 배지 27°C, 90 mm 샬레)

사. 발효조건 설정 및 연계 발효단계 설정 시험(미생물 발효 조건 설정 및 연계발효 단계)

- (1) 대부분의 곰팡이는 70~80%의 습도가 높은 환경을 선호하므로 주로 비가 많은 여름에 증식하며 육안으로 관찰도 가능함
- (2) 습도가 낮은 (60%이하) 실내에서 대부분의 곰팡이는 수분의 부족으로 생체 내 수분 공급의 차질이 생겨 사멸하게 되며, 건조된 환경을 선호하는 건조에 내성이 강한 곰

- 팡이인 호건성 진균은 건조된 환경에서 살아남는 성향이 강함
- (3) 주택의 실내에서 자주 발견되는 먼지나 발효차 속의 미생물을 분석하면 호건성 곰팡이가 검출될 확률이 높으며, Eurotium 속 미생물의 최적 생육 조건은 아래와 같음
 - (4) 액체 배양 시 pH 5.5 ~ 6.5에서 잘 증식하고, 수분이 매우 낮은 16 ~ 20%, 상대 습도는 약 60%에서 증식 가능하며, 증식 온도는 대부분의 곰팡이와 유사한 25 ~ 30°C이며, 포자 직경의 직경은 0.06 ~ 0.07 mm 정도 이며, 녹차 원료로 발효차를 제조할 경우 30°C 배양 시 5일 이상 배양해야 콜로니 관찰이 가능함

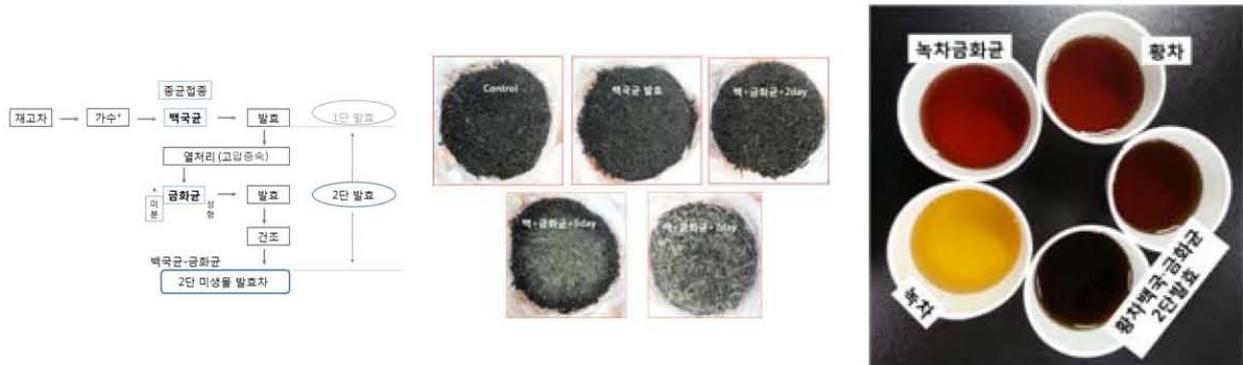


그림 72. 곰화균의 최적 증식조건 설정

아. 단계발효 접목 된 곰화균의 발효 특성 연구

- (1) 녹차를 백국균과 곰화균으로 다단계발효 시키기 위해서 고려해야 할 사항으로는 녹차 발효에 사용 가능한 후보 균종의 생육 특성과 균종 서로 간의 경쟁 관계를 고려하여 균의 투입 순서나 종균첨가량의 결정, 실온·품온 결정, 최저·최대 증식 온도 범위 설정, 각 단계별 발효 종료 시기 결정 등을 구체적으로 파악할 필요가 있음
- (2) 균주가 최적 상태에서 발육 및 증식해야만 발효 효율이 증대되는 것은 당연한 일이지만 각 단계에 투입되는 균종의 순서가 바뀌면 발효가 일어나지 못할 뿐만 아니라 균상의 혼란이 가속화 된 틈을 타서 원하지 않는 오염균의 증식으로 부패나 변패가 진행되어 악취가 생성될 수도 있음
- (3) 일반적으로 종균 첨가량은 발효시킬 소재의 오염된 정도 즉 잡균의 수가 많으면 높이고 상대적으로 오염 정도가 낮으면 첨가할 종균의 수도 낮추지만 자연발효의 경우에는 원료 1g 당 백만 즉 10^6 cfu(균이 증식해서 눈에 보이는 크기의 콜로니를 형성한 수)/g 이 되도록 영양균체나 포자를 첨가하는 것이 일반적임
- (4) 발효 대상인 식품소재에 오염미생물의 수가 많아 접종한 균주의 정상적인 증식이 불가능하다고 판단될 경우에는 초기 균수를 줄이기 위해 인위적으로 살균(물리적, 화학적) 조작을 실시하는 경우도 있음
- (5) 단 가열처리에 의해 쉽게 분해되는 식품소재나 가열 자체가 불가능할 경우에는 pH 조절제를 사용할 수도 있지만 첨가물의 사용이 허락되지 않는 다류의 특성을 살려 가공하기 위해서는 미생물의 능력에 의존할 수밖에 없음
- (6) 녹차는 저장성 증대를 위해 수분을 최소로 줄인 건조식품이지만 발효차 제조를 위해

서 미생물 증식에 필요한 습도를 유지해야 하므로 많게는 녹차 시료 무게의 50%까지 증류수를 첨가하여 수분함량을 조절할 필요가 있음. 단일 균주로 발효차 제조시 배양 온도 및 최종 평균 첨가량(균수)은 다음과 같음

	1차 백국균	2차 금화균
동시발효		백국균우세 금화균억제
습도관리일수	1일	3~4일
차의 종류 (녹/반발효차)		
수분(차g 대비%)	33~50	20~30
발효(열처리)온도	28~35	>28
시간	3~4일	7일 이상
건조온도시기	50	
평균첨가량	0.1%(10 ⁵⁻⁶)	0.1%(10 ⁴)
	비가열발효	멸균발효

- (가) 금화균 배양법 : M40Y 한천평판배지의 중심에 포자를 천자 접종하여 28°C, 7~10 일 배양하면 금화균의 콜로니가 직경 8~9 cm으로 확산되고 충분히 포자 형성
- (나) 곰팡이 수 측정 : 희석 평판법을 응용하여 25 g 차 시료에 225 ml 0.1% 펩톤수와 유리구슬을 넣어 실온에서 20 분간 균질화 시키고 0.1% 펩톤수로 단계(10 배씩) 희석하여 100 ul를 PDA평판 배지에 도말한 후 생성된 콜로니를 계수하였음
- (다) 금화균 포자 현탁액 제조법 : 0.05% Tween(=polysorbate, Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate, polyoxyethylenesorbitan monooleat) 80(or 20) 함유 생리식염수(PBS, pH 7.4에 현탁-여과·원심분리-계수-1X10⁶⁻⁸ cfu/mL의 포자현탁액)-금화차용 종균을 제조하고 차잎에 최종농도 10³cfu/mL 되도록 접종함
- (라) 모차를 열처리 하지 않고 백국균 혹은 금화균으로 배양: 생차의 0.1% 종균 첨가, 121, 15분 가열처리 후 종균 첨가할 경우: 생차 무게의 0.01% 금화균을 1000~10000/g 접종
- (마) 금화균의 저장법 : PDA 혹은 M40Y agar 사면 배지에 접종 후 28~30°C 약 1~2주 (7~10일) 배양 후 실온 저장 혹은 포자 상태를 회수하여 냉장이나 냉동
- (바) 재고차를 백국균으로 발효 후 금화균으로 2단 발효할 경우 가수해도 접촉되지 않으므로 5% 팽화미분수용액을 제조하여 100°C, 3분 이상 가온용해 및 살균조작을 실시하고 금화균 포자를 균일하게 현탁해서 1단 발효된 백국균 발효차(수분 5% 이하) 무게의 20% 무게를 첨가하여 균일하게 혼합 후 압착하면 성형이 가능



그림 73. M40Y 한천 평판배지 상의 금화균 콜로니 (7일 배양 균주 및 장기 보관 균주)

(7) 좌측은 황금색을 나타내는 금화균 특유의 포자색이며 우측은 장기 보관 후 황갈색으로 변화된 상태의 사진으로 저장 기간 중 금화균의 포자 색상이 짙어짐을 알 수 있음

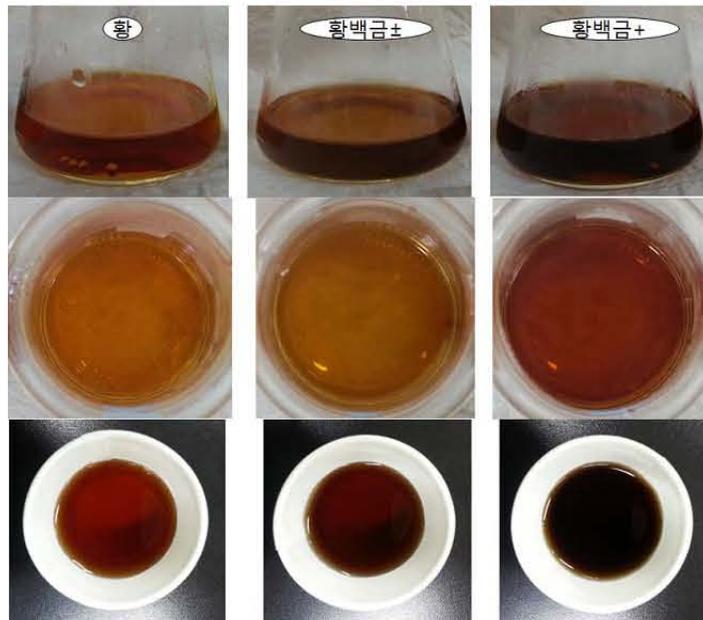


그림 74. 황차를 모차로 활용한 2단(백국·금화균)발효차의 차색 비교

(8) 재고 황차(황, 좌측), 백국·금화균 2단 약 발효(중간, 황백금) 및 백국·금화균 2단 완전 발효(황백금+)시킨 차를 열수로 추출 후 차의 색상을 비교함

(9) 황차 본래의 색상보다 중간, 우측의 완전발효로 발효가 진행될수록 색상은 진해져서 거의 중국산 보이차 이상의 짙은 흑색의 찻물로 갈변이 진행됨을 알 수 있음

(10) 산도 측정 결과

(가) 표 12에 산도 측정 결과를 나타내었음. 황국균과 백국균으로 발효 시킨 차의 성상을 비교하면 산도는 백국균 발효 구가 1.0정도 높고 pH는 0.1정도 낮았으며 생균수는 백국균 발효차가 100배 이상 높았음

(나) 황차를 모차로 사용해서 미생물 발효차를 제조하면 발효 과정 중 산도 약간 감소하는 경향이 나타났으며, 특히 금화균으로 약하게 발효시키는 것 보다는 충분히 발효 후 산도는 0.6정도로 크게 감소되었음

표 18. 황차 1단(금화균) 발효 조건에 따른 산도

sample	시료(mL)	NaOH(mL)	산도(%)
①	10	0.42	1.89
②	10	0.41	1.85
③	10	0.41	1.85
④	10	0.365	1.64
⑤	10	0.235	1.06
⑥	10	0.33	1.49
⑦	10	0.475	2.14

- ① 금화균 첨가 없이 황차에 물만 넣고 병차로 성형 후 바로 건조시킨 대조구
- ② 금화균을 첨가하여 배양하지 않고 건조시킨 그룹
- ③ 금화균을 첨가하여 2일간 배양한 시험구
- ④ 금화균을 첨가하여 5일간 배양한 시험구
- ⑤ 금화균을 첨가하여 7일 이상 충분히 배양한 실험구
- ⑥ 백국균을 첨가하여 3일간 1단 발효 후 건조시킨 차
- ⑦ 황국균으로 4일 이상 1단 발효시켰으나 외관상 균사의 증식이 관찰되지 않았지만 건조시킨 차

(11) 색도 측정 결과

표 19. 황차 1단(금화균) 발효 조건에 따른 색도

sample	L	a	b	dE
①	70.92	8.45	62.55	94.94
②	72.9	6.32	59.57	94.35
③	65.28	14.06	69.05	96.05
④	61.74	16.54	70.3	95.01
⑤	49.59	23.78	70	89.02
⑥	70.77	7.99	58.88	92.41
⑦	69.54	10.42	65.16	95.86

(12) 유리아미노산 분석 결과

- (가) 아미노산함량은 Asparagine은 발효가 진행됨에 따라 1/9로 감소되고 금화균 발효가 종료된 후에는 전혀 검출되지 않았으나 Aspartic Acid은 발효 2일째 두 배로 증가하였다가 금화균 발효 종료 후에는 처음 정도로 감소되는 경향을 나타내었음. 이러한 경향은 발효차 제조 중 산성 아미노산이 증가하다가 감소한다는 보고와 일치하였음
- (나) 발효 전보다 발효 후의 함량이 O-Phospho-L-serine은 두 배, 염화암모늄은 약 1.5 배로 증가되어 금화균의 발효에 대한 더욱 상세한 효소화적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각됨. 총 아미노산의 함량은 금화균 발효 후 전체적으로 50% 이하로 감소되었음

표 20. 황차 1단(금화균) 발효 조건에 따른 유리아미노산 측정

Name	ppm(mg/kg)							Note
	1	2	3	4	5	6	7	
O-Phospho-L-serine	258.98	199.36	213.91	305.84	524.83	609.08	384.04	
Taurine	44.52	59.83	72.80	85.49	75.16	90.50	87.47	상큼한맛
O-Phosphoethanolamine	101.30	142.11	116.61	126.01	118.16	89.74	94.85	
Urea	6875.21	5945.29	5504.43	3397.40	1405.17	2419.93	4252.13	암모니아
L-Aspartic Acid	819.47	526.28	999.64	1701.72	984.85	841.77	755.27	감칠맛
L-Threonine	508.29	510.09	473.13	349.03	160.17	625.95	587.22	단맛
L-Serine	921.67	925.77	813.73	602.05	250.58	1057.40	912.70	단맛
L-Asparagine	3428.95	3751.67	2924.29	493.52	0.00	3355.43	3620.23	단맛,지미
L-Glutamic Acid	630.40	591.18	592.98	544.68	352.55	1744.28	896.04	감칠맛
Theanine	11301.36	10224.64	10183.61	9588.87	5845.70	10504.81	11195.37	감칠맛
Glycine	71.75	67.68	68.42	74.15	57.28	115.77	85.47	단맛
L-Alanine	900.93	919.39	751.34	522.68	268.21	1203.96	905.07	
L-Valine	1155.30	1191.16	1060.74	849.33	316.31	1204.19	1193.14	고소한맛
L-Cystine	142.26	136.10	130.29	145.74	107.76	153.47	142.55	쓴맛
L-Isoleucine	728.25	718.34	668.72	496.58	145.44	700.29	777.15	쓴맛
L-Leucine	911.44	913.24	835.31	638.73	158.05	864.40	964.36	쓴맛
L-Tyrosine	648.44	596.63	601.67	561.22	320.60	807.70	691.95	쓴맛
L-Phenylalanine	938.92	878.92	856.61	669.00	274.51	936.09	955.36	
b-Alanine	82.17	109.43	66.20	50.77	35.10	63.62	53.56	
D,L-β-Aminoisobutyric acid	104.58	67.47	70.68	31.74	58.49	64.20	54.86	
4-Amino-n-butyric acid	1200.52	1260.68	1011.42	583.61	241.93	983.16	1197.00	쓴맛
L-Histidine	105.17	108.18	107.83	81.59	42.24	146.06	116.92	
L-Carnosine	317.44	328.78	317.56	335.36	152.74	352.57	306.22	
L-Ornithine-monohydrochloride	36.12	36.88	31.96	34.02	16.53	81.44	46.65	쓴맛
L-Lysine	792.08	788.22	746.37	589.97	303.12	857.33	877.94	쓴맛
Ammonium Chloride	2038.18	1891.76	1965.20	2678.72	3336.21	2525.52	2300.00	쓴맛
L-Arginine	3529.38	3455.49	3318.11	2231.24	1075.77	2356.00	3499.94	

(13) 카테킨, 카페인 및 테아플라빈 함량 측정

표 21. 황차 1단(금화균) 발효 조건에 따른 카테킨·테아플라빈 분석

	1	2	3	4	5	6	7
C	122	170	129	191	95	135	141
표준편차	2	7	34	0	3	11	26
EGC	487	468	472	450	215	323	267
표준편차	75	43	2	13	2	3	10
Caffeine	12986	12666	12137	13337	12562	11841	11596
표준편차	995	493	890	485	163	376	209
EC	6	10	29	107	84	201	364
표준편차	4	10	2	5	1	2	51
EGCG	318	271	293	382	99	22	23
표준편차	4	10	59	108	14	4	1
ECG	951	1034	1036	853	267	432	401
표준편차	88	6	97	35	4	1	14
TF3G	65	99	73	84	75	119	125
표준편차	4	15	14	13	2	4	14
TF	118	105	99	94	48	88	75
표준편차	4	14	6	0	1	3	4
TF3'G	59	62	54	59	38	46	36
표준편차	10	10	1	1	1	2	2
TF3,3'G	566	565	577	529	278	458	408
표준편차	51	70	32	6	2	1	10
Total Catechins	1863.9	1953.8	2097.3	2046.4	755.5	1097.6	1193.9
Total theaflavins	737.1	830.8	803.4	768.5	437.8	711.0	644.8

(가) 카테킨, 카페인 및 테아플라빈 함량 측정 결과 EC(epicatechin)은 ①~③에서는 거의 나타나지 않았으며 금화균이 약하게 증식된 ④번 시험구가 100 ppm 이상으로 나타났고 백국균과 황국균으로 1단 발효 시킨 ⑥~⑦번에서는 더 높게 수치를 나타냈음

(나) EGCG(epigallocatechin gallate)(그림 42)는 EC와 비교했을 때 균이 증식되지 않은 ①~③번 구와 금화균이 약하게 증식된 ④번 시험구에서 높게 나타났으며 금화균이 충분히 증식된 ⑤번 실험구와 ⑥~⑦번에서는 100 ppm 이하로 거의 나타나지 않음

(다) 이러한 결과는 발효 중 생성된 gallic acid가 카테킨 생성을 저해했기 때문으로 보이며, Total Catechins은 균이 증식되지 않거나 약하게 증식된 ①~④번 구에서 1,500 ppm 이상을 보였으나 충분히 배양되어 균의 증식이 잘 된 ⑤~⑦번 구는

Total Catechins의 함량이 비교적 낮게 나타남

- (라) Caffeine 함량은 모든 구에서 1,200 ppm 전후로 비슷한 수치를 나타냈으며, EGC(epigallocatechin)은 ①~④번 구 모두 비슷한 수치를 나타냈지만 ⑤번과 ⑥번 구는 비교적 낮은 함량을 나타냄
- (마) Total theaflavins의 결과는 약 400 ppm을 나타내는 ⑤번 시험구를 제외하고 나머지 구에서는 700 ppm을 전후로 높게 나타남. 마찬가지로 C(catechin)의 함량도 ⑤번 시험구가 나머지 구에 비하여 낮은 수치를 나타냄

자. 1차 발효 미생물 제어 및 금화균 정착 공정 개발

(1) 단계 발효 시 금화균의 발효 특성 조사

- (가) 녹차를 복수의 균으로 다단 발효시키기 위해서 고려해야 할 사항으로는 녹차 발효에 사용 가능한 후보 균종의 생육 특성과 균종 서로 간의 경쟁 관계를 고려하여 균의 투입 순서나 종균첨가량의 결정, 실온·끓은 결정, 최저·최대 증식 온도 범위 설정, 각 단계별 발효 종료 시기 결정 등을 구체적으로 파악할 필요가 있음. 균주가 최적 상태에서 발육 및 증식해야만 발효 효율이 증대되는 것은 당연한 일이지만 각 단계에 투입되는 균종의 순서가 바뀌면 발효가 일어나지 못할 뿐만 아니라 균상의 혼란이 가속화 된 틈을 타서 원하지 않는 오염균의 증식으로 부패나 변패가 진행되어 악취가 생성될 수도 있음
- (나) 일반적으로 종균 첨가량은 발효시킬 소재의 오염된 정도 즉 잡균의 수가 많으면 높이고 상대적으로 오염 정도가 낮으면 첨가할 종균의 수도 낮추지만 자연발효의 경우에는 원료 1g 당 백만 즉 10^6 cfu(균이 증식해서 눈에 보이는 크기의 콜로니를 형성한 수)/g 이 되도록 영양균체나 포자를 첨가하는 것이 일반적임
- (다) 발효 대상인 식품소재에 오염미생물의 수가 많아 접종한 균주의 정상적인 증식이 불가능하다고 판단될 경우에는 초기 균수를 줄이기 위해 인위적으로 살균(물리적, 화학적) 조작을 실시하는 경우도 있음. 단 가열처리에 의해 쉽게 분해되는 식품소재나 가열 자체가 불가능할 경우에는 pH 조절제를 사용할 수도 있지만 첨가물의 사용이 허락되지 않는 다류의 특성을 살려 가공하기 위해서는 미생물의 능력에 의존할 수밖에 없음
- (라) 녹차는 저장성 증대를 위해 수분을 최소로 줄인 건조식품이지만 발효차 제조를 위해서 미생물 증식에 필요한 습도를 유지해야 하므로 많게는 녹차 시료 무게의 50%까지 증류수를 첨가하여 수분함량을 조절할 필요가 있음. 단일 균주로 발효차 제조시 배양 온도 및 최종 종균 첨가량(균수)은 다음과 같음
 - ① 유산균(IFO 12007 균주, 30℃, 3×10^6 cfu/ml)
 - ② 황국 및 백국균(충무발효, 30℃, 10^{6-7} cfu/g)
 - ③ 금화균(액체 배양한 균사체 현탁액), 30℃, 3×10^6 cfu/ml)
 - ④ 고초균(자체 분리균을 균주 등록, 40℃, 3×10^6 cfu/ml)을 사용
- (마) 탄소원 첨가 다단발효 과정은 녹차 70g + 물 35ml + 백국균(황국균) + 탄소원(맥아당, 설탕)은 맥아당(maltose), 설탕(sucrose)과 0.5%, 1%, 2%, 4%(w/w)를 물에 녹이고 각 종균과 유산균액을 혼합하여 탄소원-유산균(1차 발효 미생물)-국균(금화균 혹은 고초균, 2차 발효 미생물)을 멸균 증류수에 섞은 혼합액을 제조

(바) 건조된 상태의 녹차 70g씩 봉지에 넣고 혼합액을 스프레이로 균일하게 산포하고 잘 섞어줌. 이 때 분상의 종국을 사용하는 황국 및 백국균 발효구는 산수하고 혼합하여 용기에 담고 30℃ 항온기에서 발효시키며 24h, 48h 시료를 채취하여 수분 함량, 산도, pH, 생균수를 측정함

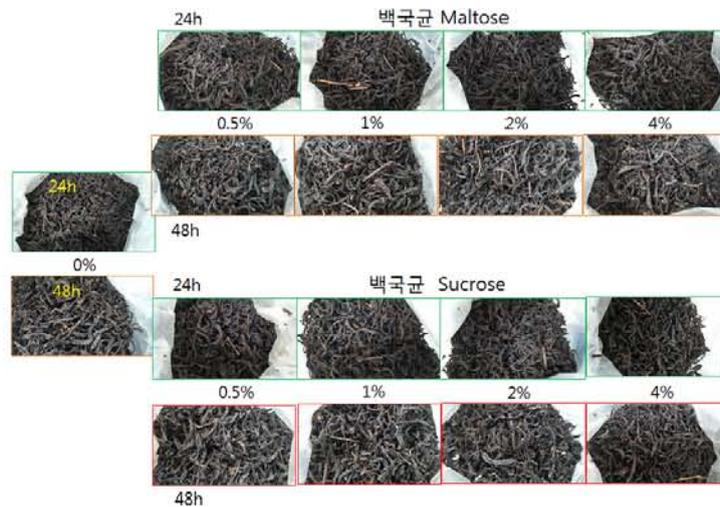


그림 75. 백국균을 이용한 다단 발효차 제조

- (사) 발효차 제조 시 종균의 증식 패턴을 파악할 할 목적으로 0~4%(w/w)까지 맥아당 과 설탕을 탄소원으로 첨가하여 발효시켰지만 발효 1, 2일 후에도 현저한 변화는 관찰되지 않았음
- (아) 수분 함량은 발효 전 30.6~36.7%, 발효 후 32.4~36.0%로 약간의 차이가 있었지만 수확된 차잎의 크기나 두께가 불균일하고 잎에 붙은 짧은 가지 부분이 함유되어 있어 시료 간 수분 함량 차이가 나는 것으로 추측됨

표 22. 탄소원(맥아당, 설탕) 첨가 유산균-백국균 발효 시 수분 변화

백국균	24h	48h
0%	34.7	35.3
Maltose 0.5%	36.7	32.4
Maltose 1.0%	31.3	36.0
Maltose 2.0%	31.1	35.7
Maltose 4.0%	30.0	35.0
Sucrose 0.5%	32.7	35.5
Sucrose 1.0%	33.6	35.0
Sucrose 2.0%	33.0	33.0
Sucrose 4.0%	30.6	34.7

(자) 유산균-백국균 다단 발효차 제조시 대조구의 pH는 발효 24시간 5.51, 48시간 5.48 이었으나 맥아당 첨가구에서 48시간의 pH가 24시간 발효 시의 pH보다 0.12~0.18 낮았고 설탕첨가 다단 발효 시료의 경우 48시간 후의 pH가 24시간 후의 pH보다 0.17~0.27로 더 많은 차이가 난 것으로 미루어 백국균의 증식에 의한 구연산이 생

성이 발효차 제조 1일 후에 일어나는 것으로 추측됨(표 8). 그러나 0.5~4.0% 맥아 당이나 설탕을 첨가해서 다단 발효시키더라도 48시간 까지는 산도에 영향을 미치지 않음

표 23. 탄소원 첨가 유산균-백국균 발효 중 pH 변화

백국균	24h	48h	pH(24-48)h
0%	5.51	5.48	0.03
Maltose 0.5%	5.35	5.22	0.13
Maltose 1.0%	5.31	5.19	0.12
Maltose 2.0%	5.31	5.18	0.13
Maltose 4.0%	5.33	5.15	0.18
Sucrose 0.5%	5.44	5.27	0.17
Sucrose 1.0%	5.35	5.12	0.23
Sucrose 2.0%	5.35	5.19	0.26
Sucrose 4.0%	5.34	5.17	0.27

표 24. 탄소원 첨가 유산균-백국균 발효 중 산도 변화

백국균	24h	48h
0%	0.06	0.06
Maltose 0.5%	0.06	0.06
Maltose 1.0%	0.06	0.06
Maltose 2.0%	0.06	0.06
Maltose 4.0%	0.06	0.06
Sucrose 0.5%	0.06	0.06
Sucrose 1.0%	0.06	0.06
Sucrose 2.0%	0.06	0.06
Sucrose 4.0%	0.06	0.06

(차) 황국균, 금화균의 발효구는 백국균과 달리 24시간과 48시간 발효구에서 수분 29.4~36.1%, pH는 2일 발효한 것이 1일 발효구보다 0.07~0.10 정도 낮았고, 산도는 두 발효구 모두 0.2~0.3%, 생균수는 발효 기간 중 큰 변화가 없었음(결과 생략). 그러나 발효차를 숙성시킨 후 성분 분석을 실시하면 수용성 물질, 탄닌 함량, 향과 맛 등에 차이가 날 것으로 예상됨

(카) 오염성 Bacilli의 증식을 억제하기 위해서 nisin을 함유한 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IFO 12007의 배양액을 첨가함. 유산균의 영양형 세포가 제거된 배양 상징액을 사용하거나 48시간 배양한 유산균액을 회석하여 최종 농도도 (10^6 CFU/g)되도록 접종함

(타) 발효차 속에 곰팡이가 과잉 증식하면 균사, 포자, 분해된 차 잎 유래의 저분자 물질, 발효 숙성 과정 중 새롭게 항균성 물질, 향기나 맛을 내는 화합물 특히 백국균

에 의해 유기산이 생성되어 산미가 감지되면 발효차 고유의 품질특성을 변화시킬 가능성도 있으므로 다단 발효 시에는 세심한 주의를 기울여야 할 것으로 생각됨

(과) 총 발효시간은 1단계+2단계 발효에 48시간 소요되었다. 2단계 발효를 마친 후 자연 건조 혹은 65℃의 열풍으로 충분히 건조시킴

(하) 유산균과 동시에 황국균(1), 백국균(2)과 금화균(3)은 유사한 국균 계통의 균주이므로 이들 3 균주가 생산 혹은 분비하는 효소의 종류와 그 효소의 최적 활성 유지에 필요한 조건이 거의 유사할 것이므로 이들 3가지 균주를 조합하여 발효시킬 때는 세심한 주의가 필요할 것으로 예상됨. 고초균은 알칼리성 세균이므로 백국균의 증식으로 유기산이 분비된 상태의 차잎에서는 증식할 수 없으므로 3단 발효가 불가능함. 그러나 유산균-황국균-고초균으로 3단 발효시킨 차의 경우 글루타민산의 함량이 황국균의 4% 까지 첨가해도 변하지 않았으나 백국균 첨가구의 경우 총 유리 아미노산 함량과 글루타민산의 함량이 대조구 보다 0.5% ~ 2% 까지 증감 첨가량에 따라 증가하였고, 4% 이상에서는 오히려 감소되는 경향을 나타내었지만 대조구나 0.5% 첨가구보다 높았음. 이 결과로 미루어 황국균보다는 백국균이 차잎의 발효에 더 효과적임을 판단할 수 있으나, 유산균-황국균 발효 후에 다시 고초균으로 3단 발효를 시키면 고초균 1% 첨가구는 글루타민산과 총유리아미노산함량이 증가하는 경향을 나타냄. 유산균과 금화균으로 2단 발효시키는 방법은 지속적인 실험의 실패로 인하여 결과를 도출하지 못하였으나 최근 수분함량을 극도로 낮춘 상태에서만 금화균이 증식한다는 독특한 성상에 착안하여 3차년도에는 발효는 물론 아미노산 분석 등을 실시하고 제1세부 기관과 협력하여 품평회를 실시할 계획임

(재)남해마늘연구소
 경남 남해군 마천면 남해대로 2465-8
 Tel : 055-860-8941 Fax : 055-860-8960

접수번호 : 14-12
 페이지 : 2 / 총 4 /

남해마늘연구소

표 1. 황국균 첨가농도별 유리아미노산 분석 (mg/100 g)

Free amino acids	0	0.5	1	2	4
L-Phenylalanine	4.874578	5.232478	4.274578	4.481178	16.754578
L-Aspartic Acid	67.294184	54.804184	67.994184	67.294184	64.841184
L-Threonine	27.984184	28.434184	26.984184	25.744184	25.124184
L-Serine	34.904184	30.434184	31.744184	31.134184	30.844184
L-Asparagine	43.334179	38.714184	44.842178	43.044184	44.841184
L-Glutamic acid	36.874184	42.974184	36.974184	38.974184	41.841184
Sarcosine	122.034179	120.841184	121.942184	120.141184	121.942184
Glycine	4.814184	4.814184	4.814184	4.814184	4.274184
L-Alanine	20.454184	24.814184	20.454184	20.454184	19.241184
L-Cysteine	4.944184	4.944184	4.944184	4.944184	4.944184
L-Valine	27.264184	23.044184	24.744184	23.044184	23.841184
L-Proline	1.944184	2.264184	1.944184	1.944184	1.944184
Cystathionine-2	43.824184	44.294184	44.294184	44.294184	44.294184
L-Isoleucine	17.284184	17.284184	17.284184	17.284184	17.284184
L-Leucine	38.344184	37.324184	38.344184	37.324184	37.324184
L-Tyrosine	40.814184	40.814184	40.814184	40.814184	40.814184
β-Alanine	12.254184	12.254184	12.254184	12.254184	12.254184
L-Homocysteine	12.844184	12.844184	12.844184	12.844184	12.844184
γ-Amino-butyric acid	22.084184	22.084184	22.084184	22.084184	22.084184
Oxothreonine	22.074184	22.074184	22.074184	22.074184	22.074184
L-Methionine	11.534184	11.534184	11.534184	11.534184	11.534184
L-Histidine	25.394184	25.394184	25.394184	25.394184	25.394184
L-Arginine	44.424184	44.424184	44.424184	44.424184	44.424184
Total	282.744184	289.714184	289.714184	272.454184	279.594184

(재)남해마늘연구소
 경남 남해군 마천면 남해대로 2465-8
 Tel : 055-860-8941 Fax : 055-860-8960

접수번호 : 14-12
 페이지 : 3 / 총 4 /

남해마늘연구소

표 2. 백국균 첨가농도별 유리아미노산 분석 (mg/100 g)

Free amino acids	0	0.5	1	2	4
L-Phenylalanine	4.864184	4.864184	4.864184	4.864184	4.864184
L-Aspartic Acid	61.034184	62.474184	61.034184	61.034184	61.034184
L-Threonine	27.814184	27.814184	27.814184	27.814184	27.814184
L-Serine	32.464184	31.464184	32.464184	32.464184	32.464184
L-Asparagine	42.264184	40.714184	42.264184	42.264184	42.264184
L-Glutamic acid	33.864184	33.864184	33.864184	33.864184	33.864184
Sarcosine	119.044184	119.044184	119.044184	119.044184	119.044184
Glycine	4.844184	4.844184	4.844184	4.844184	4.844184
L-Alanine	24.264184	23.264184	24.264184	24.264184	24.264184
L-Cysteine	4.824184	4.824184	4.824184	4.824184	4.824184
L-Valine	24.534184	22.864184	24.534184	24.534184	24.534184
L-Proline	1.924184	1.924184	1.924184	1.924184	1.924184
Cystathionine-2	42.294184	42.294184	42.294184	42.294184	42.294184
L-Isoleucine	17.244184	17.244184	17.244184	17.244184	17.244184
L-Leucine	37.844184	37.844184	37.844184	37.844184	37.844184
L-Tyrosine	40.794184	40.794184	40.794184	40.794184	40.794184
β-Alanine	12.224184	12.224184	12.224184	12.224184	12.224184
L-Homocysteine	12.714184	12.714184	12.714184	12.714184	12.714184
γ-Amino-butyric acid	21.724184	21.724184	21.724184	21.724184	21.724184
Oxothreonine	21.864184	21.864184	21.864184	21.864184	21.864184
L-Methionine	11.514184	11.514184	11.514184	11.514184	11.514184
L-Histidine	25.374184	25.374184	25.374184	25.374184	25.374184
L-Arginine	44.414184	44.414184	44.414184	44.414184	44.414184
Total	282.714184	287.814184	287.814184	282.414184	282.414184

(재)남해마늘연구소
 경남 남해군 마천면 남해대로 2465-8
 Tel : 055-860-8941 Fax : 055-860-8960

접수번호 : 14-12
 페이지 : 4 / 총 4 /

남해마늘연구소

표 3. 고초균 첨가농도별 유리아미노산 분석 (mg/100 g)

Free amino acids	0	0.5	1	2	4
L-Phenylalanine	4.854184	4.854184	4.854184	4.854184	4.854184
L-Aspartic Acid	64.864184	64.864184	64.864184	64.864184	64.864184
L-Threonine	27.824184	27.824184	27.824184	27.824184	27.824184
L-Serine	34.214184	34.214184	34.214184	34.214184	34.214184
L-Asparagine	43.314184	43.314184	43.314184	43.314184	43.314184
L-Glutamic acid	33.844184	33.844184	33.844184	33.844184	33.844184
Sarcosine	120.514184	120.514184	120.514184	120.514184	120.514184
Glycine	4.834184	4.834184	4.834184	4.834184	4.834184
L-Alanine	24.244184	24.244184	24.244184	24.244184	24.244184
L-Cysteine	4.814184	4.814184	4.814184	4.814184	4.814184
L-Valine	24.514184	24.514184	24.514184	24.514184	24.514184
L-Proline	1.914184	1.914184	1.914184	1.914184	1.914184
Cystathionine-2	42.274184	42.274184	42.274184	42.274184	42.274184
L-Isoleucine	17.224184	17.224184	17.224184	17.224184	17.224184
L-Leucine	37.824184	37.824184	37.824184	37.824184	37.824184
L-Tyrosine	40.774184	40.774184	40.774184	40.774184	40.774184
β-Alanine	12.214184	12.214184	12.214184	12.214184	12.214184
L-Homocysteine	12.744184	12.744184	12.744184	12.744184	12.744184
γ-Amino-butyric acid	21.744184	21.744184	21.744184	21.744184	21.744184
Oxothreonine	21.844184	21.844184	21.844184	21.844184	21.844184
L-Methionine	11.544184	11.544184	11.544184	11.544184	11.544184
L-Histidine	25.354184	25.354184	25.354184	25.354184	25.354184
L-Arginine	44.444184	44.444184	44.444184	44.444184	44.444184
Total	282.814184	287.814184	287.814184	282.414184	282.414184

그림 76. 황국균-고초균-백국균 첨가에 따른 유리아미노산 함량 변화

차. 다량 활성화된 금화균 종균 제조 과정

(1) 본 연구의 총괄연구기관인 하동녹차연구소에서 분리하여 기탁한 금화균(*Eurotium sp.*)을 종균으로 사용하였고 2가지 방법으로 신선한 종균액 제조 방법을 고안함

(가) 금화균을 표면을 건조시킨 PDA 한천평판에 접종하고 30℃, 6~8일 배양하여 형성된 콜로니에 멸균 증류수를 붓고 시약 스폰으로 긁은 현탁액(포자)을 유리구슬 첨가 삼각플라스크에 넣고 유리구슬이 분당 200 회전 되게 1시간 동안 진탕하여 소량의 신선한 포자수 $1\sim 5 \times 10^8$ /mL의 금화균 현탁액을 조제할 수 있음

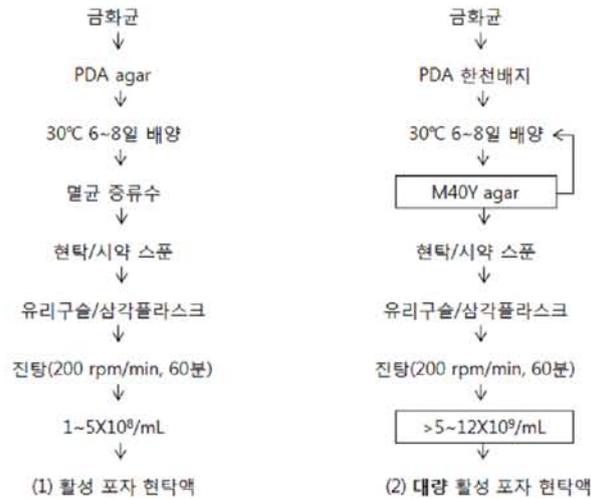


그림 77. 고효성 금화균 포자 현탁액의 제조 공정

(나) 금화균을 증식시킬 때 설탕을 사용해서 수분활성을 강제로 낮춘 M40Y를 사용하면 5배 이상의 신선하고 활력이 높은 금화균 포자를 조제할 수 있었음 (그림 26)

(다) 이 포자액을 녹차 혹은 황차에 약 2%접종하여 성형 후 온도 및 습도 관리를 하여 수분 함량 18%, 27 ~ 30℃에서 발효시키면 10일 정도의 기간이 경과하면 금화차 편 발효차를 대량으로 제조할 수 있음. 이 때 전통식 누룩 제조 공장과 유사한 시설을 사용하면 되므로 하동군 관내의 소규모 녹차 가공 시설을 갖춘 사업자가 정확한 발효 공정과 각 공정 관리 기술을 습득한다면 금화차를 제조 가능 할 것으로 확신함

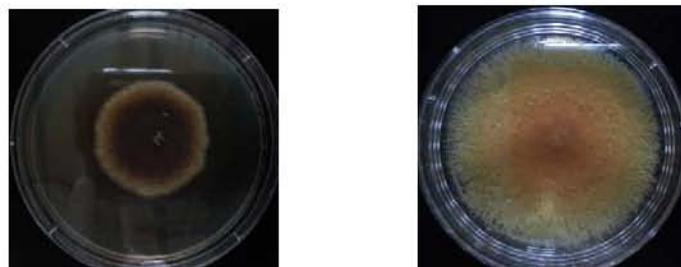


그림 78. PDA 배지와 M40Y 배지에서의 금화균의 증식

카. 단계 발효 중 유해 미생물 검사

(1) 1년차 단일 종균을 이용한 발효차 제조 및 2년차 다단 발효 제품의, 생균수 측정용

한천 평판에서 분리된 콜로니는 대부분 집중한 종균이 검출되었고 간혹 공기 중에 존재하는 오염성 *Bacillus* 속의 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 일부와 *Janibacter hoylei*¹⁾가 일시적으로 검출된 경우가 있으나 발효차에 상존하는 미생물이 아니고 독성에 관한 부정적인 보고가 없음. *B. cereus* 혹은 *B. thurengiensis*를 비롯한 유해 미생물은 검출되지 않았음



그림 79. 발효차 유래의 오염 미생물

- (2) 성층권에서 2009년 발견된 균주. 높은 UV내성, 그람 양성, 호기성, 비운성동, 탄닌 내성, ~45℃ 생육 가능, 내열성 없음
- (3) 최근 호건성 금화균의 안전성에 관한 연구를 중국 연구팀에서 쥐를 대상으로 투여 후 관찰한 결과 건강상 문제가 없는 것으로 밝혀짐. 이 균에 의한 건강 장애나 곰팡이독 생산 관련 보고는 없다. 그러나 일반적으로 대량의 곰팡이 포자를 흡입하는 근무 환경에 노출되는 작업자의 경우 건강 상 문제를 일으키는 빈도가 높다고 알려져 있음. 중국산 고급발효차에서 분리한 금화균 자체의 생체 독성 평가에는 1균주 당 많은 예산이 소요되지만 제1세부 기관과 협력하여 결정할 계획임

10. 배양조건에 따른 단계 발효 미생물의 발효 특성

가. 배양 조건에 따른 단계발효 및 금화균의 발효 특성(1차 발효미생물 제어 및 금화균 정착 방안 확립)

- (1) 차잎을 곰팡이로 곰팡이류로 발효시키면 차잎의 표면에 미세한 균사체가 균일하게 피복되어 마치 흰색의 가루를 뿌려놓은 것처럼 보인임. 재고차의 1단 발효에 사용된 백국균도 역시 균사로 팽창되며 증식하는 진균류 이므로 발효 말기에는 균사가 표면을 덮은 상태로 변함. 이 상황에서 2 번째 발효 미생물인 금화균을 뿌리고 또 압착, 성형을 실시하여 고체 발효를 시켜야 함. 그러나 발효차 제조의 첫 중요한 공정인 성형 과정이 쉽지가 않음
- (2) 차잎이 서로 접촉되며 달라붙어야 덩어리가 형성되어 병차로 성형되는데 중요한 과정을 미세한 균사가 차잎 사이의 밀착 공간을 차지하여 접촉 면적을 좁게 하므로 차잎은 떨어져서 흩어져 결국 산차 형태로 됨
- (3) 백국균과 금화균은 증식 온도 범위가 동일하고, 백국균의 영양 균사가 공존하는 상황에서 금화균을 접종하더라도 발아 기간이 4일 이상으로 너무 길어서 그 기간 동안에 미리 발아되어 증식 중인 백국균의 영양세포가 우점적으로 증식하면서 신생 포자가 생성되고 발효차는 백국균의 과발효로 원하지 않는 변화가 일어남
- (4) 균체의 자기소화로 인해 이취나 이미가 발생될 가능성이 높다. 종균 접종부터 포자

의 발아까지 소요되는 기간이 5일로 백국균 보다 2배 이상 긴 금화균이 재고차에서 우세하게 증식하도록 유도하는 방법은 백국균의 영양세포를 불활성화 시켜 원천적인 증식을 막는 방법 밖에는 없음. 미생물 증식을 억제하는 방법으로는 온도, 수분, pH와 영양원 등의 조절법이 보편적으로 사용됨

- (5) 무미 무취가 기본적 제품의 특성으로 인식되는 차잎을 소재로 한 가공에서 흔히 사용되는 방법이 열처리임. 가능하면 낮은 온도, 확실한 제균 능력, 가열 조작 후에 탄 냄새가 나지 않아야 한다는 이상적 조건을 충족시킬 수 있는 효율적 포자 제거법은 고압증기멸균임. 일반적으로 실시되는 조건은 121, 15분이지만 미생물의 동결 저장용 부형제로 사용할 목적으로 멸균하는 경우에 앞의 조건에서 탈지 우유가 영기며 침전이 형성되는 것을 방지하는 부드러운 조건인 110℃, 15분간 처리하여 1차 발효 미생물은 충분히 제어할 수 있음. 예비 실험 결과 85℃, 25분의 증기 습열 조건도 활용이 가능함
- (6) 가루 상태의 백국(백국균의 포자 제품)을 물과 섞어서 균일하게 산포시켜도 차잎에서 침출된 영양분을 이용하여 백국균이 충분히 증식됨. 고유의 차맛을 살리기 위해 전분이나 당을 첨가하지 않아도 잘 증식하는 백국균으로 1차 발효를 실시하였으며, 그 결과 재고차와 반발효차 모두 백국균 발효가 순조롭게 진행됨



그림 80. 모차와 반발효차를 백국균으로 1단 발효 중 차 잎의 변화

① 녹차의 백국균 1단 발효 ② 황차의 백국균 1단 발효

- (7) 백국균의 균사가 차잎의 표면에 증식하여 차잎이 흰색으로 덮이고 포자가 형성되기 전에 50℃ 열풍으로 건조시켜 1차 백국균 발효차를 제조함. 건조된 백국균 발효차는 밀봉 포장하여 저온에서 보관하였다. 백국균에 의한 1단 발효가 종료되는 시점에 가열 살균하여 과발효를 예방해야 함
- (8) 1단 발효로 끝내거나 1단 발효에 이어 2단 발효까지 진행하더라도 가열에 의한 성분의 변성 혹은 유해 물질 생성을 최소화하기 위해서 가열처리는 110℃, 15분, 1 회만 실시하는 것이 좋으며, 금화균은 습도가 높은 환경을 기피하므로 초기의 습도를 차 무게 대비 20% 이하로 조절하여 약 5일간은 초기의 습도를 그대로 유지하며 발아 및 균사 출현을 기다리고 증식이 확인되면 표면의 습도를 낮추는 주의가 필요함



그림 81. 발효차의 수분 함량 변화 (좌: 건조 전, 19%, 우: 과발효잎 21.2% 열풍건조 후 7.7%, 50℃, 열풍건조 5시간 후 수분은 4.9%, 실 내 건조 후 태양건조: 9.7~10.7%)

(9) 습도를 낮추고 블록형태의 누룩이나 메주로 고체 발효시키는 방법은 전통 식품용 효소제 가공 분야에 예부터 사용해왔음. 금화균은 습도에 민감하게 반응하므로 덩어리 형태로 성형해야 발효차 제조가 가능함. 발효된 차잎을 다시 금화균으로 2차 발효시키려면 단백질 함량은 낮고 점착성이 있으며 오염균수가 낮은 점착성을 가진 소재를 첨가해야 함. 가용성 전분, 밀가루, 쌀가루 등을 성형 보조제로 사용하여 시험적으로 병차를 제조한 결과 팽화미 5% 수용액을 첨가하면 재고차의 1단 백국균 발효 후 생성된 균사에 의한 점착성 저하 현상을 해소할 수 있음. 2 번째 발효 미생물인 금화균의 안정적인 정착을 위해서는 성형 과정을 거쳐 병차로 가공한 상태로 발효시켜야 금화균의 증식이 촉진됨. 상세한 금화균 발효를 위한 준비 과정은 아래와 같음



그림 82. 황차 1단(백국균)발효차의 성형 및 2단 발효 중의 사진



그림 83. 황차 1단(금화균) 및 2단(백국·금화균) 고체발효 2일 경과 사진

- ① 110℃, 15분 증숙 처리 후 5% 팽화미수용액과 금화균포자를 동시 첨가하여 성형함
- ② 1단 발효는 황차금화균 발효 개시 후 2일째의 사진으로 차잎이 상호간에 견고하게 붙어 이상적인 성형 양상을 보여줌. 2단 발효는 황차를 백국균으로 1단 발효 후 다시 금화균으로 2단 발효를 수행하기 전에 성형하여 발효함. 오른쪽은 2단 발효 2일째의 사진으로 차 잎 간의 성형 상태가 영성하게 보이고 이상 발효의 기미는 없었음

(10) 황차를 금화균으로 1단 발효 시키는 과정에 일어나는 성분 변화를 관찰하기 위해 아래와 같이 실험구를 구분하여 실시함

- ① 금화균 첨가 없이 황차에 물만 넣고 병차로 성형 후 바로 건조시킨 대조구
- ② 금화균을 첨가하여 배양하지 않고 건조시킨 그룹
- ③ 금화균을 첨가하여 2일간 배양한 시험구
- ④ 금화균을 첨가하여 5일간 배양한 시험구

- ⑤ 금화균을 첨가하여 7일 이상 충분히 배양한 실험구
 - ⑥ 백국균을 첨가하여 3일간 1단 발효 후 건조시킨 차
 - ⑦ 황국균으로 4일 이상 1단 발효시켰으나 외관상 균사의 증식이 관찰되지 않았지만 건조시킨 차를 제조함
- (11) ①, ②는 금화균을 접종하지 않았으므로 균사는 당연히 관찰되지 않았음. 금화균을 종균으로 첨가하였지만 포자의 발아에 소요되는 기간보다 3일 정도 짧게 배양한 시험구 ③에서도 균사는 관찰되지 않았음. 그러나 금화균을 종균으로 첨가하여 성형 후 5일간 배양한 시험구 ④, ⑤에서는 균사의 증식이 관찰됨. 특히 7일간 배양한 ⑤는 표면 전체는 물론 내부에도 금화균이 증식하여 노란색의 포자도 관찰됨. 이상의 결과로 미루어 금화균은 황차를 가열, 성형 후 발효시켜도 잘 증식함을 알 수 있었음



그림 84. 황차의 1단(금화균)발효 중 균사 증식 비교



그림 85. 황차의 2단(백국·금화균)발효 중 금화균의 변화

- (12) 백국균으로 1단 발효시킨 후 다시 금화균을 2번째 종균으로 접종 후 발효 5~8일간 관찰한 사진으로 발효 5일째 균사체의 생성이 관찰되었고, 발효 6일 급격한 균사의 팽창이 확인되었고 7일에 포자가 완성되었음. 소량의 팽화미 첨가에 따른 연속 발효가 이루어져 금화균이 차 잎에 증식하여 생성된 포자를 관찰 할 수 있음
- (13) 황차를 2단 발효시켜 차잎에 증식된 금화균을 접종 후 발효 7일째 현미경으로 관찰한 사진으로 금화균의 미성숙 균사와 포자가 백색으로 관찰되고 완전히 성숙되어 포자 형성이 완료된 황금색의 금화가 동시에 혼재함을 알 수 있음. 이 사진으로 미루어 백국균 발효 후 팽화미를 전분성 접착제로 사용하고 금화균 포자를 동시에 접종하여 발효시키면 금화균이 순조롭게 증식함을 알 수 있음
- (14) 녹차를 산차 형태의 모차로 사용하여 금화균 발효(녹), 황차를 백국균으로 1단 발효시킨 산차(1단), 황차를 백국균으로 1단 발효 후 다시 금화균으로 (2단)발효시킨 차의 형상을 비교한 사진임. 2단 발효가 완료된 차에서 탄닌의 삼미는 거의 감지하기가 어렵고 찻물의 색상이 흑색에 가까울 정도로 진하며 무겁고 부드러운 맛을 느낄 수 있음

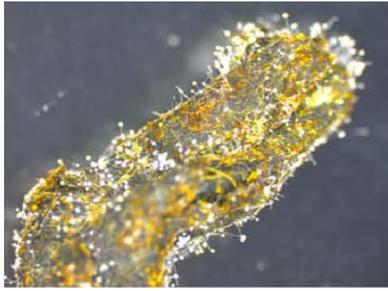


그림 86. 황차 1단 발효 금화균 사진 그림 87. 녹차, 1단 발효차, 2단 발효차의 외형 비교

(15) 모차로 사용 가능한 재고차로는 녹차나 약한 갈색을 지닌 황차가 있음. 발효차 제조가 가능한 색상이 가장 연한 녹차(녹)와 이미 어느 정도 효소 반응이 진행되어 황색을 띤 황차를 백국균 발효시킨 1단 발효차(1단), 그리고 연속해서 백국·금화균의 두 균주를 접종할 수 있도록 성형 방법을 고안해서 2단 발효시킨 미생물 발효차의 형상 및 발효차를 열수로 추출한 찻물의 색상을 촬영한 사진을 그림에 나타내었음. 녹차를 모차로 사용하면 특유의 청색이 강하고 선명하며 짧은맛이 지속되지만 미생물 발효 후에는 맛이 온화해지고 어두운 발효차 특유의 색상이 짙어짐을 알 수 있음

(16) 효율적인 2단 발효를 위한 성형법 개발

(가) A: 금화균포자의 제조 및 최종 첨가 농도

(나) M40Y 사레에 금화균을 충분한 기간 배양하여 포자를 형성시킨 직경 90 mm의 사레에 멸균 Tween 80 용액 20 ml를 첨가하여 포자를 긁어모음. 금화균 포자와 전분성 현탁액을 혼합하고 발효 시 최종 금화균 포자농도는 1000 SFU/ml로 함

(다) A(금화균포자전분혼합액) : 5g 팽화미를 80g 증류수에 현탁(5%용액), 멸균함

(라) 5% 팽화미+금화균포자현탁액을 합쳐 100 ml로 맞춤. 1단 백국균 발효시킨 모차를 110℃, 15분 오토클레이브 한 후 모차 140g 당 28 ml(무게 비 20%)씩 금화균포자전분혼합액을 첨가하여 차잎에 수분과 금화균 포자가 균일하게 섞이도록 비닐 봉지 속에 넣고 흔들며 비닐의 측면에 수분이 맺히지 않을 때 까지 간헐적으로 섞은 후 성형 과정을 거쳐 발효시킴. 이 과정을 상세히 설명하면 아래와 같음

- ① 백국균발효차 145g , 녹차 145g을 작은 스텐망 바스켓 위에 알미늄호일 깔고
- ② 121℃, 20분 멸균 실시
- ③ 오토클레이브 온도가 85℃로 식으면 꺼내고
- ④ 미리 B액 29 ml/비닐봉지 2개에 녹차, 백국균발효차를 각각 1 트레이씩 넣고
- ⑤ 공기 불어 넣고 차잎의 수분이 균일하게 되도록 4분 정도 전후·좌우 흔들며 보내기, 봉지 밖에서 손가락 5개를 작은 공 잡듯 모아서 봉지 안으로 밀어 넣고 전후·좌우, 상하로 차잎을 이동시키며 섞고, 비닐 한 쪽 구석으로 모아 비틀어 누르며 공기 빼며 압축, 다시 펴서 흔들기를 반복
- ⑥ 성형 돌과 두 손의 바닥, 손가락을 모두 사용하고 병아리 형태의 청석 도구로 활용 할 것
- ⑦ 실온에서 발효: 수분이 많으면 잡 곰팡이 증식 가능, 표면 건조를 언제, 프레스를

사용하면 바로 말려도 됨. 가용성 전분은 2% 농도라도 점성이 낮아 팽화미가 좋을 듯함

- ⑧ 모차 발효용 1단 접종 미생물인 백국균은 차잎의 유기물을 영양원으로 산차 상태의 호기 발효 조건에서 잘 증식됨
- (마) 1단 발효용 금화균도 차잎에 별도의 영양분 첨가 없이 병차 상태의 호기 발효 조건에서 증식이 양호함. 그러나 차잎을 백국균으로 먼저 1단 발효 후 다시 금화균을 2단 발효용 종균으로 첨가하여 진행하는 2단 발효는 상당히 지연되는 경향이 나타남. 1단에 이은 연속 2단 발효를 순조롭게 유도하기 위해서는 백국균으로 발효가 종료된 산차를 병차로 성형시키는 과정이 우선적으로 이루어져야 함. 접착력 부족 현상을 해결하기 위해 이취의 근원이 될 수 있는 단백질 함량이 낮고 수용액 상태에서 접착력을 증강시켜 줄 수 있는 소재가 필요함. 여러 가지 소재를 검토한 결과 5% 팽화미 수용액을 종균과 혼합하여 차 양의 20% 혼합함으로써 접착력의 증가 및 전분질 보강에 의해 아래 그림의 ②처럼 차 잎 사이의 결합력이 강화되어 벽돌형으로 성형이 용이하였고 금화균의 증식도 활발히 일어남. 따라서 이후 2단 금화균 발효 시에는 5% 팽화미를 성형 보조제로 사용함으로써 1단 발효 백국균이 증식 과정 중 생성한 균사체에 의한 병차 성형 억제 현상을 극복할 수 있음



그림 88. 1단 발효와 2단 발효차의 사진

- (바) 황차를 모차로 사용한 1단 백국균발효 산차(좌측①)는 백색의 균사가 차잎 표면에 균일하게 덮힌 상태임. 2단 백국·금화균발효 병차(우측②)의 차잎 표면에 노란색의 금화균 포자가 선명하게 관찰됨

11. Golden Flower Tea의 제품화

가. 중국 미생물발효차와 금화차의 완성도 평가 및 품질 평가

(1) 금랑엽전차 제작을 위한 성형틀 개발

(가) 소비자 조사 또는 시장 조사를 통한 시장 맞춤형 시제품 제작을 위하여 아래와 같이 소단위 생산이 가능한 성형틀을 제작함. 성형틀을 이용하여 생산되는 금화차는 1개당 10 ~ 13 g 정도의 무게가 나감. 기존의 복전차의 경우 300 g ~ 1,000 g 정도로 많은 양을 구매해야 하기 때문에 보관상의 또는 고가이기 때문에 가격적인 부분에서 그 경쟁력이 있다고 판단됨. 아래의 제품은 현재 제작 중이며, 소단위 금화차의 좁은 발효 면적으로 인한 금화균 증식이 느리다는 점은 앞으로의 과제라고 판단됨

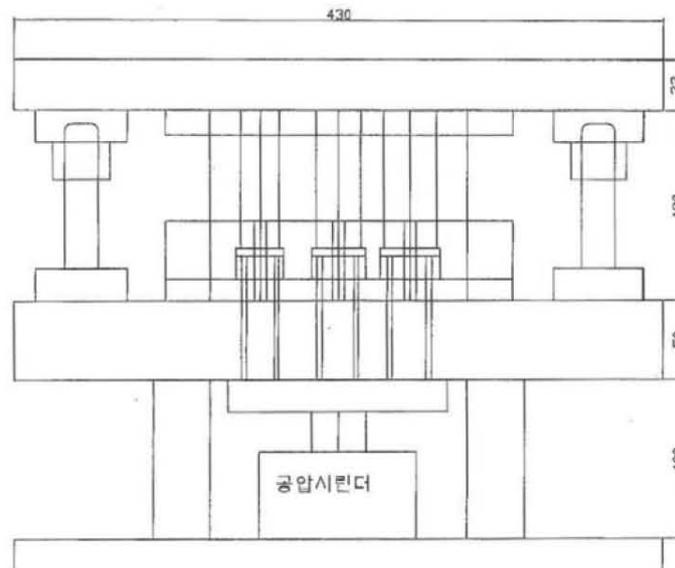


그림 89. 금랑엽전차 성형틀 시안



그림 90. 시장 맞춤형의 10 g 단위 금화차(금랑엽전차) 개발을 위한 성형틀(목형) 제작

(2) 소비자 맞춤형 시차품 제작

(가) 소비자 선호도 조사를 통하여 다음과 같이 일반소비자 시장을 겨냥한 25g 단위의 시차품을 개발하였음



그림 91. 둥근 엽전 형태의 10 g 단위 금화차(황차, 녹차) 시제품

(나) 전문가 패널 및 소비자(일반인) 품평 결과 색에서는 금화차에서 더 좋은 점수를 받음. 이는 모차의 특성(악퇴 과정이 없음) 때문으로 우려 후 색이 더 좋다는 평가를 받았다. 향 또한 기존 녹차 또는 황차를 모차로 사용하였기 때문에 조금 더 좋은 평가를 받았으며, GC/MS를 통한 향기성분 분석 결과 더 풍부하고 신선한 향기 성분을 더 보유한 것으로 확인됨. 미의 경우 전문가패널 및 소비자 평가의 경우 숙성기간이 오래된 복전차에서 더 깊은 맛이 있다는 의견이 많음

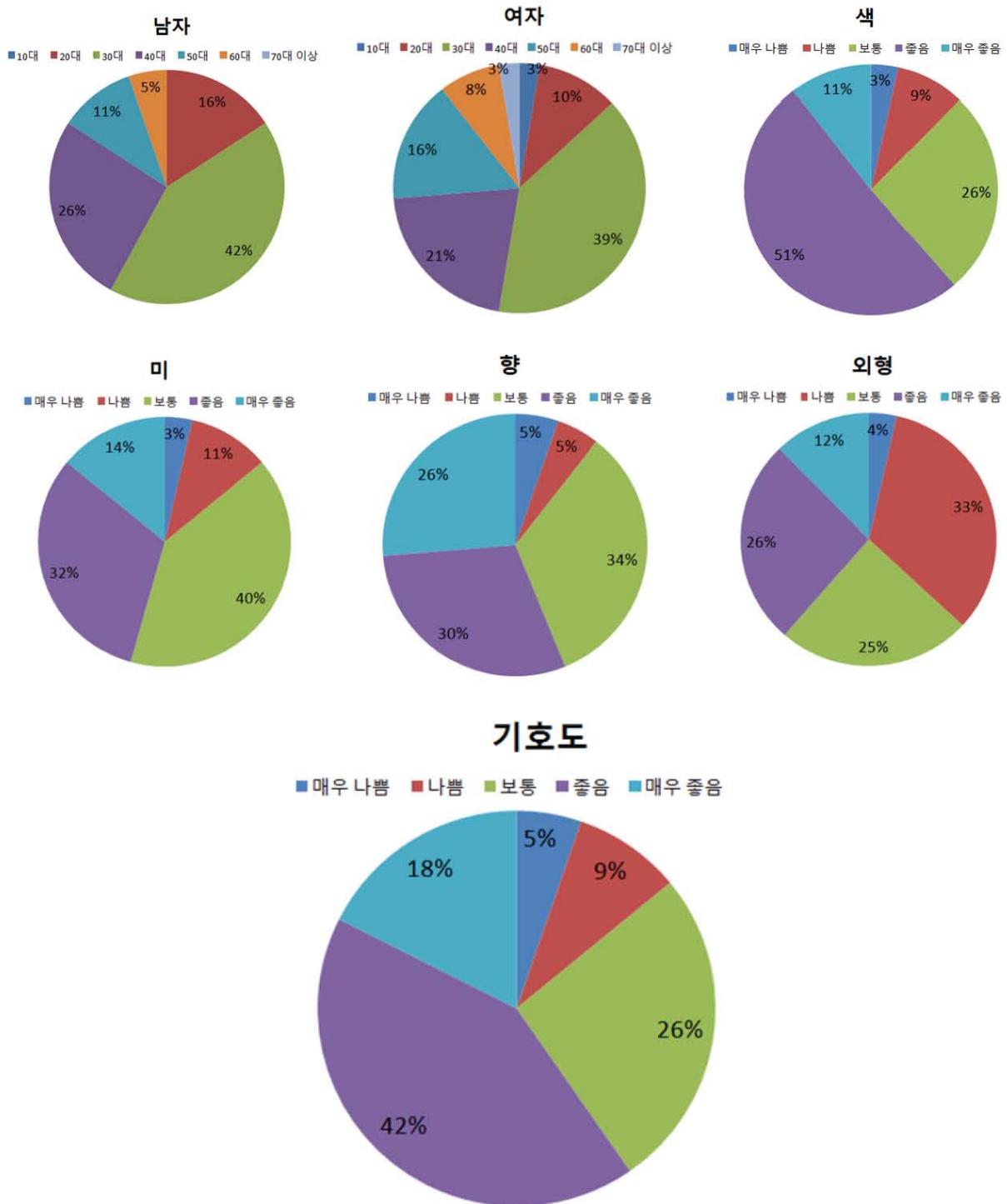


그림 92. 금화엽전차 소비자 선호도 조사

- (다) 중국 미생물발효차와 금화차의 관능검사와 과학적 분석을 통하여 금화균의 함량, TF 함량, 아미노산 함량 등이 금화차에서 높게 측정되었고, 색, 향, 미 또한 기존 미생물발효차에 버금갈 정도로 평가됨
- (라) 또한, 기존 미생물발효차(복전차)는 악취 과정이 있어 미생물발효차에 생소한 소비자들에게는 인기가 없었다. 그러나 금화차의 경우 악취 과정을 생략하였기 때문에 향, 미에서 더 높은 점수를 줄 수 있다고 판단됨. 중국의 미생물발효차 시장 또한

속차 시장보다 생차 시장의 성장률이 더 크다는 점 또한 금화차의 중국 시장 진출에 유리하다고 판단됨

(3) 시제품 브랜드 개발 및 제품디자인 제작

(가) 금랑엽전차로 브랜드 개발완료 : 연구개발 제품의 기능성·제품형상 및 스토리텔링 마케팅을 표현한 브랜드

(나) 금랑엽전차 신제품 디자인 제작 : 신제품 출시할 모형·중량 결정 완료 후 타켓 시장인 30·40대 여성 기능성 차 시장을 겨냥한 디자인 작업 진행 중

(다) 현재, 진행중인 금랑엽전차 브랜드 시안 (수정 작업 진행 중)



(라) 보이차가 젊은 여성들 특히 다이어트에 관심이 많은 여성들이 많이 음용을 한다는 점에 착안하여 고급차라는 이미지와 여성에게 어필이 가능한 디자인으로 제작할 예정

(4)포장재 디자인 및 소재 개발

(가) 금랑엽전차로 포장재 개발 및 제작 : 소비자 친화적·편리성·소비성을 고려한 포장재의 개발 및 제작중임

(나) 제품 중량 60g 포장재 : 10g단위의 소비 편리성을 갖춘 금랑엽전차를 20개를 한상자에 담은 고급 포장재로 소비자 가격은 70,000원으로 정함



- 금랑차의 제품 형상화를 위해 녹차연구소의 디자인과 비슷한 컨셉의 포장재 디자인 개발 중
- 주요 타켓층인 여성층을 상대로 한 화장품 디자인 박스를 디자인 사전 조사
- 중국 시장을 위한 고급스러운 디자인



- 금랑차의 제품 형상화를 위해 녹차연구소의 디자인 과 비슷한 컨셉의 포장재 디자인 개발
- 주요 타겟층인 여성층을 상대로 한 화장품 디자인 박스를 디자인 사전 조사
- 중국 시장을 위한 색깔 금박의 포인트화
- 친환경적인 한지의 소재 사용

12. Golden Flower Tea의 유통

가. 금화차 유통망 사전 조사 및 유통망의 구축 작업

- (1) 녹차유통체인 : 원홍 F&D, 제이팜스, 케이제이라이프, 애니원푸드
- (2) 차류 프랜차이즈 : 아띠제니의티움, 올버바웃차
- (3) 차류 판매점 : 티나라, 연파란, 녹차명가, 다향원, 예다원, 차이야기
- (4) 1차년도 12개 업체 신규 발굴 및 거래처 확충
- (5) 향후, 보이차 대형유통체인 확보(지유명차)와 광역권 유통 체인망 구축 (강원권, 충청권, 전라권)

거래처명	대표자	소재지	업체유형	주요 생산품
원홍 F&D	신민철	경기 가평	온라인/오프라인/특판 직영	- 농특산품 - 차류 유통 - 기업 특판 납품 - 농식품 전처리
제이팜스	이왕제	충북 공주	온라인/오프라인매장/프랜차이즈 운영	- 산들드림 오프라인 매장 운영 - 차류 유통 및 판매
케이제이라이프	백균필	서울	오프라인매장/기업특판	- 차류 유통 및 판매 - 기업 특판
티나라	강종우	부산광역시	온라인/오프라인 매장	- 차류 유통 및 판매
(주)연파란	유영미	인천광역시	오프라인 매장	- 차류 유통 및 판매
녹차명가	이형구	대구광역시	온라인 유통	- 차류 유통 및 판매
다향원	주기백	대전광역시	오프라인 매장	- 차류 유통 및 판매
아띠제니의티움	신화진	서울	오프라인 매장/프랜차이즈	- 차류 유통 및 판매
전주예다원	황혁인	대전광역시	오프라인 매장	- 차류 유통 및 판매
올버바웃차	박철민	서울	온라인 / 오프라인/프랜차이즈	- 차류 유통 및 판매
차이야기	삼중녀	경기 파천	오프라인 매장	- 차류 유통 및 판매
애니원푸드	봉종복	서울	온라인/오프라인매장/프랜차이즈 운영	- 시럽 전문 유통 - 차류 판매 및 유통 - 프랜차이즈 카페리앙 운영

풍부한 향을 낸

- (5) 가격 : 중국의 보이차는 300g당 80,000원~1,000,000원으로 다양하여 소비자의 선택이 어렵고 높은 가격이 형성되었지만, 개발된 금화차의 소비자는 금랑엽전차 60g 70,000원과 금랑차 200g 200,000원으로 형성되어 대중시장과 고급시장을 겨냥할 것임
- (6) 30·40대 여성 기능성 차 시장 마케팅 전략 : 보이차는 몸이 따뜻해진다는 이유로 몸에 찬기운을 느끼는 많은 여성들이 소비시장을 형성 시키고 있음. 이 시장을 겨냥하여 금화균을 발효해서 3g단위로 고급스럽고 간편하게 포장된 금랑엽전차의 제품의 기능적 특징을 홍보함. 특히, 다이어트에 뛰어나다고 알려지면서 20·30·40대 경제력을 가진 여성 고객층이 형성됨

라. 스토리텔링 마케팅 전략

- (1) 연인선물 마케팅 : 녹차나무는 세계에서 유일하게 꽃과 열매가 마주본다. 꽃이 지고 생겨난 열매는 녹차꽃의 아름다움을 보기 위하여 이듬해 꽃이 필때까지 나무에서 4계절을 견디어 낸다. 이듬해 녹차꽃이 피고 질 때 비로서 생명을 다한다. 사랑하는 여인을 기다리는 남자의 절개를 나타내는 마케팅으로 활용
- (2) 건강과 금전운의 마케팅 : 조선시대 남부지역에서 한양으로 과거를 보러가든 선비들의 필수품이 엽전차다(돈차로 불렸음). 천리길을 한달에 걸쳐서 가야하기 때문에 몸의 피로를 회복시키고 머리의 총명함을 유지하며 감기와 잔병을 없애기 위하여 엽전꾸러미 모양의 엽전차를 휴대하였음. 산적들이 진짜엽전인줄 알고 훔쳐가서 실망하는 에피소드도 많았음. 금전운과 액운을 피하고 건강을 지킨다고 하여 양반가에서는 필수품으로 소장하여 애용함. 현대 과학이 밝혀내는 녹차의 성분에는 이를 증명하는 성분들이 다량 함유함이 밝혀짐

마. 온라인 마케팅 전략

- (1) 3차년도 제품판매에는 제품의 특징을 나타내는 상세페이지 제작
- (2) 제품의 효능 홍보와 스토리텔링을 이미지화 하여 블로그, SNS, 소셜네트워크 등 바이럴마케팅(온라인 구전마케팅) 홍보 강화
 - (가) 대형 5대 쇼핑몰 입점 - AK몰, GS몰, 롯데쇼핑몰, CG몰, 현대쇼핑몰
 - (나) 대형오픈마켓 입점 홍보 - 11번가, 옥션, G마켓 등
 - (다) 자체 쇼핑몰 운영 및 차전문 쇼핑몰 입점

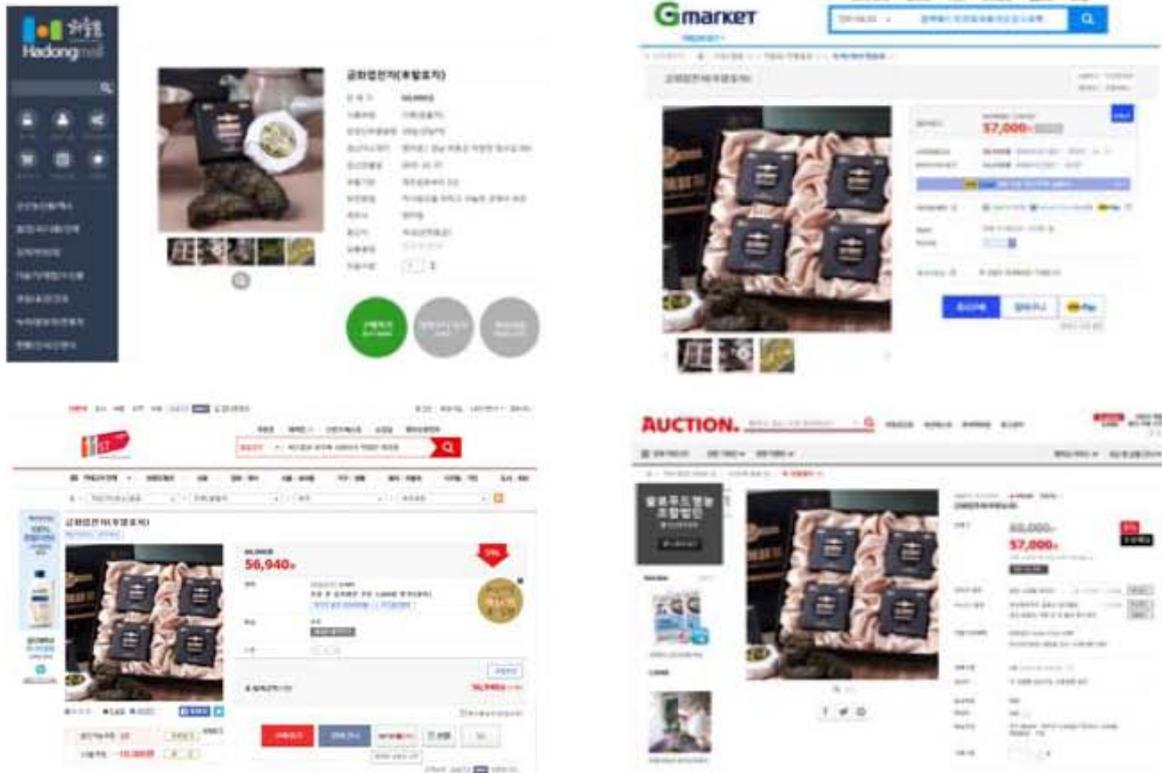


그림 94. 대형 온라인 쇼핑몰 입점 및 판매

바. 수출 전략

- (1) 2016년 홍콩식품박람회 참가하여 수출바이어 확보
- (2) 홍콩시장 : 중국수출의 교두부를 확보할 수 있으며 중국을 직접수출하는 것 보다 홍콩 바이어를 통하여서 수출하는 것이 차류시장에서는 다 효과적임
- (3) AT(한국농수산물유통공사)와 협력을 통하여서 세계식품박람회를 참가 및 수출전략 수립

사. 확보된 유통망을 통한 제품 판매 및 홍보·마케팅

- (1) 김해 롯데이몰렛 농산물특산품관 입점 및 전시판매 진행
 - (가) 한달 유통인구 30만명에 달하는 유통 체인
 - (나) 운영주체인 사나래(주) 농업회사법인에 금량엄전차 90세트 납품
 - ① 납품가 30,000원(부가세 별도) 총 2,700,000 만원 판매



거래명세서		영문번호	20150910 - 6	TEL	055-884-0009											
회사명(주)농업회사법인 영농주	영남남도 하동군 하동읍 봉천삼대로 7571	사업자번호	813-81-57685	영업	영농주											
☎ 055-884-0039 / 055-882-0048		상호	영농주지영농조합법인													
		주소	경상남도 하동군 하동읍 봉천삼대 317													
금액 : 이백칠십만 원정 (₩ 2,700,000)																
년/월/일	품명 및 규격	수량	단가	금액가액	부가세	최소										
15/09/10	금량엽전차(25g*4EA)	90.8	30,000	2,454,545	245,455											
<table border="1"> <tr> <td>수량</td> <td>90</td> <td>금액가액</td> <td>2,454,545</td> <td>VAT</td> <td>245,455</td> <td>합계</td> <td>2,700,000</td> <td>환수</td> <td>인</td> </tr> </table>							수량	90	금액가액	2,454,545	VAT	245,455	합계	2,700,000	환수	인
수량	90	금액가액	2,454,545	VAT	245,455	합계	2,700,000	환수	인							
비고	영농주 / 3010062500081 / 영농주지영농조합법인															

전자세금계산서		승인번호	20150903-41000061-c11a6d8f		
등록번호	613-81-57685	영수증번호	613-81-72390	회사명	영농주
상호	영농주지영농조합법인	영수증명세	시나(주)농업회사법인	판매	이광영
사업장주소	경상남도 하동군 하동읍 봉천삼대 317-22	사업장명	영농주지영농조합법인	판매	이광영
담당	도수영	담당	김민	판매	김민
이메일	slowfood000@hanmail.net	이메일	en2013@opam.net	판매	김민
작성일자	2015-09-03	금액가액	2,454,545	세액	245,455
품명	금량	수량	90	단가	30,000
비고	영농주 / 3010062500081 / 영농주지영농조합법인				
합계금액	2,700,000	환급		수급	

- (2) 롯데백화점 추석마중 한가위 선물세트 특판행사 진행
- (가) 행사기간 : 2015년 9월 10일 ~ 9월 29일
- (나) 수행업체 : 농업회사법인 경남농식품
- (다) 장 소 : 롯데백화점 서면점, 롯데프리미엄아울렛 김해점
- (라) 판매성과 : 금량엽전차 90 세트 판매

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 목표달성도

세부 연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
·금화균(<i>Eurotium sp.</i>)을 이용한 발효 공정 연구	·금화균의 생육조건 탐색 ·저비용 고효율 산업화 공정 개발 ·금화균을 활용한 금화차 제조공정 설정	100
·모차에 금화균(<i>Eurotium sp.</i>) 정착을 위한 공정개발	·금화차 모차 선발 및 우수한 Seed 영양원을 이용한 금화균 정착 공정 표준화 개발	100
·유해 미생물 안전성 연구	·금화균의 대사산물 분석 ·선발된 우수한 미생물 발효 유발독소(mycotoxin) 검사 ·염기서열 분석을 통한 유해 미생물 검사	100
·금화균 보급을 위한 상용 배양 기술 연구	·배양시간에 따른 금화균의 생육패턴 분석 및 DB화 ·금화균 표준 배양조건 설정 및 종균화를 위한 균주 수집	100
·금화균의 종균화 기술개발	·바인더에 종균 안착을 위한 바인더 가공기술 개발 ·종균의 2차 오염 방지를 위한 포장기술 탐색 및 개발	100
·Golden Flower Tea 종균의 제품화	·종균의 2차 오염 방지를 위한 포장기술 탐색 ·종균 활성화 및 사용방법에 대한 매뉴얼 개발 및 작성	100
·고품질 금화차 개발을 위한 품질특성 연구	·기존 발효차와 Golden Flower Tea의 이화학적 특성 및 품질특성 비교 분석 ·관능분석, 항산화 활성 분석 ·유리당, 총페놀량 등 일반성분 분석 ·유리아미노산 등 영양성분 분석 ·향기성분, 카테킨 함량, 카페인 함량 등 특수성분 분석	100
·단계발효 접목을 통한 금화균 발효 조건 확립	·금화차 개발을 위한 1차 발효미생물의 탐색 ·발효미생물과 <i>Eurotium</i> 속을 융합한 단계적 발효 조건 개발 및 최적 조건과 환경 설정 ·차 발효 미생물 제어 및 금화균 정착 방안 설정	100
·배양 조건에 따른 단계 발효 및 금화균의 발효 특성	·미생물 발효 조건 설정 및 연계 발효 단계 설정 ·배양 조건에 따른 단계 발효 및 금화균의 발효 특성	100
·Golden Flower Tea의 제품화	·Golden Flower Tea의 제조공정 설정 및 제품화 ·단계발효를 통한 Golden Flower Tea의 제조공정 설정 및 제품화	100
·Golden Flower Tea 의 대량생산화	·설정된 Golden Flower Tea 의 대량생산	100
·Golden Flower Tea 의 유통	·대량생산된 Golden Flower Tea 의 유통	100

2절 관련분야에의 기여도

1. 금화균을 이용한 미생물 발효차 개발로 국제경쟁력강화

- 가. 본 연구를 통해서 중국에서 분리한 금화균(*E. cristatum*)을 국내특허기탁하고 종균화 기술개발 및 이 균을 이용한 금화차 발효공정개발과 제조공정을 개발 할 수 있었음
- 나. 미생물 발효차분야는 우리나라에서는 연구가 매우 적고 상품화도 미진한 실적임. 따라서 국내에서 유통되는 대부분의 미생물발효차(흑차)는 중국수입차로서 보이차, 복전차, 천량차 등으로 보이차가 대부분을 차지함
- 다. 본연구의 성과로는 중국의 수입흑차와 경쟁할 수 있는 한국형 흑차개발을 완료 하였을 뿐만 아니라 역으로 중국에 수출할 수 있는 계기를 마련하였다는 점에서 대한민국 차 산업 발전에 크게 기여하였다고 사료됨
- 라. 미생물 발효차 발효 및 제조공정 기술이전 및 기술지도를 통하여 농민·기업의 제다기술 경쟁력을 강화할 수 있었고 산업화의 단초를 마련할 수 있었으며, 이와 더불어 금화균의 농가보급을 위하여 쇠구슬, 세라믹볼 등을 활용한 바인더개발 및 대량증식화 기술개발을 통하여 금화균 보급을 확대함으로써 차산업의 활성화에 기여 할 수 있음
- 마. 향후 금화차의 성분분석과 효능평가를 통하여 현재 밝혀지고 있는 항암작용, 대사성 질환예방작용, 항노화작용 등의 기능을 규명하고자 하며 이를 바탕으로 추출물의 기능성식품화와 의약소재화도 가능 할 것으로 기대됨

2. 단계발효를 접목한 미생물 발효차의 다양화

- 가. 금화균의 단계발효조건을 확립하기위해서 국내에서 많이 사용되는 백국균, 황국균, 고초균 등을 활용하여 녹차와 황차를 모차로하여 발효조건을 확립하고 다양한 풍미(flavour)의 1차 미생물 발효차를 개발할 수 있었음
- 나. 1차 미생물 단독으로도 제품화가 가능할 것으로 기대되어 기업에 기술이전 하였으며, 금화균과의 단계발효를 통하여 발효조건탐색과 특성분석을 수행하였으며 새로운 컨셉의 미생물발효차제품화도 기대됨

3. 금화차의 상품화를 통한 차 관련기업 매출 및 고용증대

- 가. 금화차의 상품화를 통하여 금량차와 금량엽전차의 디자인 및 패키지를 개발하고 상표를 출원하였고 식품품목제조보고를 완료하였음
- 나. 금량차는 300g단위로서 벽돌형태의 전차이며 금량엽전차는 25g이 4개 포함된 100g으로서 소비자의 선택권을 넓혔고 가격대도 다양화(3~15만원) 하였으며, 금량엽전차의 제조방법에 관한 특허를 출원하여 지적재산권을 확보하였음
- 다. 참여기업의 다양한 유통채널구축을 통하여 현재 판매가 이루어지고 있으며 현재 2명의 고용실적과 향후 매출과 고용도 증대 될 것으로 기대됨. 향후 기술이전기업 3곳을 통하여 본격적으로 판매가 이루어지면 국내 차 산업의 활성화와 수출도 기대됨

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 특허 출원 및 등록 성과

1. 특허 출원 및 등록

- 가. 특허명 : 중국 복전차로부터 분리된 금화균인 유로티움 크리스타툼 균주
- 나. 출원국 : 대한민국
- 다. 출원번호 : 10-2013-0017155
- 라. 등록번호 : 10-1456509

2. 특허 출원_1

- 가. 특허명 : 금화균을 이용한 미생물 발효차 제조방법
- 나. 출원국 : 대한민국
- 다. 출원번호 : 10-2014-0010502

3. 특허 출원_2

- 가. 특허명 : 금화균을 이용한 엽전차 제조방법
- 나. 출원국 : 대한민국
- 다. 출원번호 : 10-2015-0068926

4. 미생물 특허 등록

- 가. 미생물 명칭 : *Eurotium cristatum*
- 나. 수탁번호 : KACC93171P
- 다. 수탁기관 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

5. 상표 출원 및 등록

- 가. 상표명 : 금랑차
- 나. 출원국 : 대한민국
- 다. 출원번호 : 40-2014-0011386
- 라. 등록번호 : 40-1075526

6. 상표 출원

- 가. 상표명 : 금화엽전차
- 나. 출원국 : 대한민국
- 다. 출원번호 : 40-2015-0058152

3. 논문_3

- 가. 논문명 : *Eurotium cristatum* ssp.가 발현된 미생물발효차의 특성 분석
나. 학술지명 : Journal of the Korean Tea Society

4. 논문_4

- 가. 논문명 : *Eurotium cristatum*을 이용한 미생물발효차의 품질특성 변화
나. 학술지명 : 농업생명과학연구지 (논문 게재 확정 : 2015. 12. 31, Vol 49, No 6)

5. 학술발표_1

- 가. 제목 : 금화현상이 발현된 복전차의 휘발성 향기성분 비교 분석
나. 학회명 : 한국차학회

6. 학술발표_2

- 가. 제목 : 미생물 발효차로부터 금화균 단일분리 및 동정과 이를 이용한 금화차 개발에 관한 연구
나. 학회명 : 한국차학회

7. 학술발표_3

- 가. 제목 : Characteristic of Green Tea according to Fermenting Microorganisms
나. 학회명 : 한국미생물·생명공학회

8. 학술발표_4

- 가. 제목 : 미생물발효차로부터 분리된 금화균을 활용한 금화차 개발 및 개발된 금화차의 품질특성 연구
나. 학회명 : 한국차학회

9. 학술발표_5

- 가. 제목 : Identification of Microbes on the Single Fungus Fermented Tea by Pyrosequencing
나. 학회명 : 한국차학회

10. 학술발표_6

- 가. 제목 : *Eurotium cristatum* ssp.를 이용하여 개발된 미생물발효차의 이화학적 특성 분석
나. 학회명 : 한국차학회

11. 학술발표_7

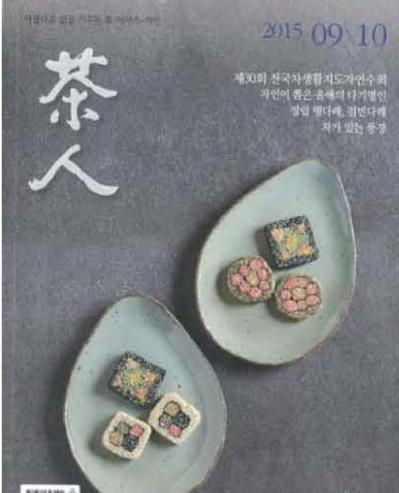
- 가. 제목 : 녹차를 활용한 미생물 발효차 제조 연구 1 - *Aspergillus* 속균 발효차의 제조
나. 학회명 : 한국식품저장유통학회

12. 학술발표_8

- 가. 제목 : 녹차를 활용한 미생물 발효차 제조 연구 2 - 금화균의 생육 최적 조건 조사
나. 학회명 : 한국식품저장유통학회

다. 홍보일 : 2015. 09. 10

5. 증빙자료

<p style="text-align: center;">언론홍보 성과_1</p> 	<p style="text-align: center;">언론홍보 성과_2</p> 	<p style="text-align: center;">언론홍보 성과_3</p> 
<p style="text-align: center;">언론홍보 성과_4</p> 	<p style="text-align: center;">언론홍보 성과_5</p> 	<p style="text-align: center;">언론홍보 성과_6</p> 

4절 기술이전 및 교육지도 성과

1. 기술이전 성과_1

- 가. 계약자 : 화개제다(대표 : 홍소술)
- 나. 계약일 : 2014. 05. 30
- 다. 계약명 : 금화차(미생물발효차)

2. 기술이전 성과_2

- 가. 계약자 : 연우제다(대표 : 박순애)
- 나. 계약일 : 2015. 08. 03

다. 계약명 : 금화차(미생물발효차)

3. 기술이전 성과_3

가. 계약자 : 햇차원(대표 : 이기남)

나. 계약일 : 2015. 08. 02

다. 계약명 : 가공된 차의 부가가치 향상을 위한 발효차 제조

4. 교육지도 성과_1

가. 교육명 : 금화차 농가 보급을 위한 기술 설명 및 품평회

나. 교육일 : 2015. 03. 04

다. 참석자 : 농가 및 기업 대표 등 30여명

5. 교육지도 성과_2

가. 교육명 : 금화차 기술이전을 위한 농가 및 기업 대상 설명회

나. 교육일 : 2015. 08. 03

다. 참석자 : 농가 및 기업 대표 등 30여명

6. 증빙자료

기술이전 성과_1	기술이전 성과_2																								
<p style="text-align: center;">기술이전 계약서</p> <p>■ 계약명 : 금화차(미생물발효차)</p> <p style="text-align: center;">2014년 5월 30일</p> <p>“계약당사자”</p> <table border="0"> <tr> <td></td> <td>(재)하동농차연구소 소장</td> <td>이종국</td> <td></td> </tr> <tr> <td>연구책임자</td> <td>(재)하동농차연구소 책임연구원</td> <td>김종철</td> <td></td> </tr> <tr> <td>‘乙’</td> <td>화개제다 대표</td> <td>홍소슬</td> <td></td> </tr> </table>		(재)하동농차연구소 소장	이종국		연구책임자	(재)하동농차연구소 책임연구원	김종철		‘乙’	화개제다 대표	홍소슬		<p style="text-align: center;">기술이전 계약서</p> <p>■ 계약명 : 금화차(미생물발효차)</p> <p style="text-align: center;">2015년 8월 3일</p> <p>“계약당사자”</p> <table border="0"> <tr> <td></td> <td>(재)하동농차연구소 소장</td> <td>이종국</td> <td></td> </tr> <tr> <td>연구책임자</td> <td>(재)하동농차연구소 책임연구원</td> <td>김종철</td> <td></td> </tr> <tr> <td>‘乙’</td> <td>연우제다</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		(재)하동농차연구소 소장	이종국		연구책임자	(재)하동농차연구소 책임연구원	김종철		‘乙’	연우제다		
	(재)하동농차연구소 소장	이종국																							
연구책임자	(재)하동농차연구소 책임연구원	김종철																							
‘乙’	화개제다 대표	홍소슬																							
	(재)하동농차연구소 소장	이종국																							
연구책임자	(재)하동농차연구소 책임연구원	김종철																							
‘乙’	연우제다																								
기술이전 성과_3																									
<p style="text-align: center;">기술이전 계약서</p> <p>계약명 : 가공된 차의 부가가치 향상을 위한 발효차 제조</p> <p style="text-align: center;">2015년 8월 2일</p> <table border="0"> <tr> <td style="text-align: center;">甲</td> <td style="text-align: center;">乙</td> </tr> <tr> <td>주소: 경남 진주시 진주대로 301 기관: 국립경상대학교 산학협력단 대표: 단장 남태희 (인)</td> <td>주소: 경남 하동군 학암면 정서길 202 장소: 햇차원 대표: 이기남 (인)</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">연구책임자</td> </tr> <tr> <td colspan="2">주소: 국립경상대학교 산학협력대학 성명: 홍 소 슬 교수</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">담당자</td> <td style="text-align: center;">담당자</td> </tr> <tr> <td>주최: 산학협력단 기술지원팀 성명: 이종국 전화번호: 053-772-2000 E-mail: sdh100@gnu.ac.kr</td> <td>주최: 햇차원 성명: 이기남 전화번호: 053-772-2000 E-mail: sdh100@gnu.ac.kr</td> </tr> </table>	甲	乙	주소: 경남 진주시 진주대로 301 기관: 국립경상대학교 산학협력단 대표: 단장 남태희 (인)	주소: 경남 하동군 학암면 정서길 202 장소: 햇차원 대표: 이기남 (인)	연구책임자		주소: 국립경상대학교 산학협력대학 성명: 홍 소 슬 교수		담당자	담당자	주최: 산학협력단 기술지원팀 성명: 이종국 전화번호: 053-772-2000 E-mail: sdh100@gnu.ac.kr	주최: 햇차원 성명: 이기남 전화번호: 053-772-2000 E-mail: sdh100@gnu.ac.kr	<p style="text-align: center;">계약 기술의 내용 및 범위</p> <p>경상대학교 산학협력단(이하 “갑”이라 한다)과 햇차원(이하 “을”이라 한다)가 체결한 기술이전계약서에 기재된 “계약기술”의 내용과 범위는 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 계약 기술 : 가공된 차의 부가가치 향상을 위한 발효차 제조 2. 계약 기술의 범위 <ol style="list-style-type: none"> ① 농차 및 발효차를 소재로 국산 발효차의 제조 ② 원료의 발효, 숙성, 건조법 ③ 천연 혹은 인공 감미료 사용법 <table border="0"> <tr> <td style="text-align: center;">甲</td> <td style="text-align: center;">乙</td> </tr> <tr> <td>주소: 경남 진주시 진주대로 301 기관: 국립경상대학교 산학협력단 대표: 단장 남태희 (인)</td> <td>주소: 경남 하동군 학암면 정서길 202 기관: 햇차원 대표: 이기남 (인)</td> </tr> </table>	甲	乙	주소: 경남 진주시 진주대로 301 기관: 국립경상대학교 산학협력단 대표: 단장 남태희 (인)	주소: 경남 하동군 학암면 정서길 202 기관: 햇차원 대표: 이기남 (인)								
甲	乙																								
주소: 경남 진주시 진주대로 301 기관: 국립경상대학교 산학협력단 대표: 단장 남태희 (인)	주소: 경남 하동군 학암면 정서길 202 장소: 햇차원 대표: 이기남 (인)																								
연구책임자																									
주소: 국립경상대학교 산학협력대학 성명: 홍 소 슬 교수																									
담당자	담당자																								
주최: 산학협력단 기술지원팀 성명: 이종국 전화번호: 053-772-2000 E-mail: sdh100@gnu.ac.kr	주최: 햇차원 성명: 이기남 전화번호: 053-772-2000 E-mail: sdh100@gnu.ac.kr																								
甲	乙																								
주소: 경남 진주시 진주대로 301 기관: 국립경상대학교 산학협력단 대표: 단장 남태희 (인)	주소: 경남 하동군 학암면 정서길 202 기관: 햇차원 대표: 이기남 (인)																								

교육지도 성과_1	교육지도 성과_1
	

5절 기타 성과

1. 중국 절강대학교와 MOU 체결

가. 체결일 : 2013. 04. 24

나. 내 용 : (재)하동녹차연구소와 중국 절강대학교 차학과 (교수 : Yue Rong Liang)와의 상호 교류 및 발전을 위한 업무협약 체결

2. 제품 브랜드 개발

가. 브랜드 명 : 금랑엽전차

3. 개발 제품의 품목제조보고

가. 브랜드 명 : 금랑엽전차

4. 시작품 개발_1

가. 제 품 명 : 금랑차

나. 내 용 량 : 300 g

다. 소비자 가격 : 150,000원

5. 시작품 개발_2

가. 제 품 명 : 금랑엽전차

나. 내 용 량 : 100 g (25 g * 4 ea)

다. 소비자 가격 : 60,000원

6. 구매의향 계약 체결

가. 체 결 일 : 2015. 04. 01

나. 체결업체 : 석가명차(중국 지점)

7. 기업체 신규 고용창출

가. 업 체 명 : 슬로푸드 영농조합법인

나. 고용인원 : 2명

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 중국 호남농업대학의 Wang et. al(Nutrients 2015, 7,5309-5326)의 연구에 의하면 호남성 복전차(금화차)추출물을 마우스에 급여했을 때 식중독대장균 O157:H7의 신장과 간에서 감염을 막고 면역기능 또한 증가 시킴. 또한 락토바실러스(*Lactobacillus*), 박테리오테(*Bacterodes*), 클로스트리듐(*Clostridium*) 등 장내 세균의 종 다양성이 증가함을 보여주고 있음
2. 중국북경 Tsinghua 대학의 Liu Z. (Electrophoresis 2015, 36(17), 2002-16) 등은 2DE-LC-MS/MS 기법을 사용하여 호남복전차(Fuzhuan brick tea, 금화차)추출물을 쥐에 급여하여 proteomic 분석을 수행하였음. 그 결과 금화차를 급여한 쥐에서 간에서의 지방생성과 베타산화 등이 감소하였고 간의 지방축적도 개선됨을 확인하였으며, 이는 금화차가 비알콜성지방간병에 효과가 있음을 제안하고 있음
3. 중국 안휘농업대학의 Zhu TE(Food Chem. 2015, 170:110-7)등은 복전차(Fu brick tea)에서 카테킨에서 변한 4개의 B-ring fission metabolites를 보고하였음. 또한 안휘농업대학의 Luo ZM(J Agric Food Chem. 2013 61(28):6982-90) 등은 미생물 발효차인 복전차에서 새로운 B-ring fission lactons of flavan-3-ols를 발견하고 Fuzhuanins A와 B로 명명하였으며, 또한 미지의 compound1을 발견하여 항암작용이 있음을 밝힘
4. 중국호남농업대학의 Li Q. (J Sci Food Agric. 2013 93(6):1310-6) 등은 복전차가 항비만 효과와 hypolipidemic효과가 있음을 밝힘. 복전차 추출물은 체중 증가를 억제하고 TG, LDL cholesterol을 낮추는 것을 확인함. 또한 유전자발현 연구를 통하여 다양한 비만유전자들의 발현을 감소시키는 것을 보고하고 있음
5. 일본 나가사키대학의 Huang YL(Molecules 2013, 18(5):4868-75) 등은 차의 혐기미생물 발효를 통해서 4개의 triterpenes을 분리하였으며, 그중 2개는 새로운 13,26-epoxy-3 β ,11 α -dihydroxyolean-12-one 과 3 β ,11 α ,13 β -trihydroxyolean-12-one이였으며 나머지 두 개는 이미 알려진 taraxastane-3 β ,20 β -diol and taraxastane-3 β ,20 α -diol로 밝혔음. 이들 물질들은 보통의 녹차 잎에서 검출되지 않는 물질임
6. 태국 Kasetsart 대학의 Wang Q.(Biotechnol Lett 2014, 36(12):2515-22) 등은 중국 미생물 발효차(흑차)의 하나인 보이차(Pu-erh)에서 *Aspergillus fumigatus*에 의해 tea 폴리페놀이 Theabrownins(TB)으로 바이오컨버전(Bioconversion)되는 것을 밝혔음. 이는 미생물이 가진 폴리페놀옥시데이스와 퍼옥시데이스 A에 의해 Bioconversion이 일어나는 것으로 여겨짐

제 7 장 연구시설·장비 현황

1절 발효 및 숙성 시설 도입



- 시설명 : 다단식 자연환경 자동제어 발효 시스템
- 제조국 : 대한민국(고려과학)
- 구입가격 : 68,200 천원
- 취득일시 : 2013. 03. 24
- 설치장소 : 하동녹차연구소 시험생산동 3층
- 구입목적 : 미생물발효차 및 고급 발효차 개발을 위하여 자연통풍과 온도기능이 가능한 시설
- 구축재원 : 하동녹차연구소 자체 연구비

2절 발효기 도입



- 장비명 : 발효기(Fermentor, Biotron GX)
- 제조국 : 대한민국(한일과학)
- 구입가격 : 18,205 천원
- 취득일시 : 2014. 02. 06
- 설치장소 : 하동녹차연구소 본관동 2층 액상소재개발실
- 구입목적 : 금화균을 포함한 미생물의 대용량 액체배양
- 구축재원 : 하동녹차연구소 자체 연구비

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1절 기관별 연구실 안전관리 이행실적

1. 실험·연구실 안전관리 규정

가. 하동녹차연구소에서는 별도의 연구실안전관리위원회 운영규정 및 안전관리규정에 의하여 연구실이 운영되고 있으며, 주기적인 안전 교육 및 일일점검일지, 안전관리 일지 등을 작성하고 있음

재단법인하동녹차연구소 연구실안전관리위원회 운영규정

제정 2015. 9. 9

제1조(목적) 이 규정은 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률(이하 “법”이라 한다)」 및 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙」 등에 따라 재단법인하동녹차연구소(이하 “연구소”라 한다) 내에서 각 연구실의 안전환경에 관한 기준을 확립하고, 안전사고 방지 및 대책을 수립하기 위하여 연구실 안전관리위원회의 구성 및 운영 등에 대한 제반 사항을 규정함을 목적으로 한다.

제2조(적용범위) 이 규정은 연구소의 연구실 등에서 근무하는 임직원과 연구활동 종사자에게 적용한다.

제3조(용어의 정의) 이 규정에서 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다.

1. “연구실”이라 함은 과학기술분야의 연구개발 활동을 위하여 설치한 시설, 장비, 실험실 등 연구시설을 말한다.
2. “실험실”이라 함은 실험 기초 자료가 생산되는 연구, 시험, 검사를 수행하는 연구시설을 말한다.
3. “연구활동 종사자”라 함은 연구, 실험에 종사하는 연구원, 연구보조원등을 말한다.
4. “연구실 안전”이라 함은 연구실 등에서 발생할 수 있는 모든 종류의 안전, 보건, 환경에 관련된 사항을 말한다.
5. “안전환경관리자”라 함은 연구실의 안전과 관련한 기술적인 사항에 대하여 연구소장을 보좌하고 연구실 안전관리담당자를 지도하는 자로 전담 부서장이 지정한 자를 말한다.
6. “연구실책임자”라 함은 각 연구실을 관장하는 부서의 장을 말한다.
7. “안전관리담당자”라 함은 각 연구실에서 안전관리 업무를 담당하는 자를 말한다.

(별표 1)

주의가 필요한 시약류

분류	성질	예	주의사항
제 1 류 강산화제	염소산염류	염소산암모늄, 차이염소산염, 염소산칼륨	가연류(제4류)와 혼계금지
	과염소산염류		
	과산화물	산화은, 과산화나트륨	
	질산염류	질산은	
	과망간산염류	과망간산 암모늄, 과망간산 칼륨	
제 2 류 강산화제	제1류와 접촉하면 발화하기 쉽다	황린, 적린, 황화인, 유황, 마그네슘 알루미눔 분말	황, 인은 물속에 보관
제 3 류 발성금속류	물과 접촉하면 발열, 발화 폭발을 일으키는 물질	금속 sodium, 금속 potassium 카바이드, 이화석회, 생석회	금속 sodium은 석유류에 보관
제 4 류 가연성 유기용매		특수 인화물, 석유류, 초산에스테르류, 규산에스테르류, 메틸에틸케톤, 알코올유페리딘, 글로로벤젠	제1류와 혼합금지 실내에 대량으로 두지 않는다. 중류추출 시 주의
제 5 류 폭발성 화합물		질산 에스테르류 니트로화합물 : 피크린산, 니트로글리세린, 디니트로벤젠, 트리니트로톨루엔	충격을 주지 않도록 한다.
제 6 류 산형성강산	물과 접촉하면 발열, 가연물(제5류)과 접촉하면 발화	발연질산, 발연황산, 클로로셀론산, 무수황산, 무수크롬산, 농질산, 농황산	

연구활동종사자 교육·훈련의 시간 및 내용

교육 과정	교육 대상	교육 시간	교육 내용
1. 정기 교육·훈련	연구활동종사자	반기별 6시간 이상	· 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 · 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 안전한 연구개발활동에 관한 사항 · 물질안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
2. 신규 채용 등에 따른 교육·훈련	신규채용된 연구활동 종사자(계약직 포함)	8시간 이상	· 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 · 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 · 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 · 안전표지에 관한 사항 · 물질안전자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
3. 특별한 안전 교육·훈련	중대 연구실사고 발생 및 연구내용 변경 등의 경우 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 연구활동종사자	2시간 이상	· 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 · 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 · 물질안전보건자료에 관한 사항 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항

비고

정기교육·훈련은 사이버교육의 형태로 실시할 수 있다. 다만, 이 경우 평가를 실시하여 100점을 만점으로 하여 60점 이상을 득점한 사람에 한정하여 교육이수를 인정한다.

(별표 2)

인체에 유독한 시약류

분류	독성 및 중독증상	예	중독 시 처치	주의사항
신열안료	·결속하면 통증, 발작, 부종이 생기고 피부결막염 증후군, 조혈단핵 무식, 중기중립 시 과중중, 폐염류염 ·상염을 때 소화기계 부식, 원종	무기산 : HCl, HNO ₃ , H ₂ SO ₄ 유기산 : Cl ₂ COOH, 일킬리글루, 알칼리토르 산화수산화물 탄산염 : NaOH, KOH, Na ₂ CO ₃	·중독시키면 발열 반응이 일어나므로 분포 세척한다. ·시약을 취할 때에는 상부소화기관이 filler 사용 계층상위로 우유도 취해지 않는다.	·피부와 접촉하지 않도록 주의 ·시약을 취할 때에는 hood내에서 사용
Gas 중독	·흡입 시 호흡기 점막 자극하여 통증, 작열감, 발진, 작소폐사 ·눈물, 코물 증가	CO gas, Cl, Br gas, 암모니아 gas, H ₂ S gas	·신선한 공기흡입 ·신선한 산소호흡	Hood내에서 취급
포르말린	·단백질과 반응 ·기도흡입 시 결막염, 상기도염증, 호흡곤란 ·경구흡입 시 소화관 자극, 구토, 하리, 복통, 현공		·기도흡입 시 신선한 공기흡입 ·경구흡입 시 알도날 요스로 위세척	
유기용매	·위발생과 저용성이 강하므로 피부, 기도 흡입이 용이하고 중추신경계 이성이 빠르다. ·일반적인 호흡기, 소화기 자극 및 미취중추를 일으키고 무경계 유발	CHCl ₃ , CCl ₄ , Dioxane, Ethyleneglycol, Cresol(이상 신장해 및 간세포 괴사) Benzene(조혈기장애) Aniline	·기도호흡 시 신선한 공기흡입, 산소호흡 ·경구흡입 시 위세척, 흡취제투여, 수액제 투여	
중금속	·수산화합물은 세포의 효소작용 방해 ·비수산화합물은 배에 침착되어 조직적 작용방해	납화합물 주산납 신안납 비수산화합물 아비산나트륨 카드뮴 화합물 인화합물	·피도, 위세척, 전도혈 투여 ·경구흡입, 만성중독일 경우, 혈액투여 ·주사제 투여 (BAL)투여	·경구흡입, 만성중독일 경우 주의
시안화물	·경구흡입 시 명독성이며, 속독성 ·호흡곤란, 호흡중단, 구토, 구조 ·심계항진	HCN, KCN	·피도, 위세척, 전도혈 투여	·지체 없이 병원이송

2. 실험·연구실 안전관리 일지(일부)

실험·연구실 안전관리 일지

실험·연구실명	발차가능실	담당자	김중권	(Tel) 880-2882
점검년월일	이상유무	처리내용	점검자	서명
2012 04 10	목	실험실 사용차 안전관리 교육 (연구사·강원측)	김중권	김중권
" 05 06	목	소화기 점검 및 전기 점검	"	김중권
" 06 11	목	화학안전 점검 및 시약 점검	"	김중권
" 07 10	목	소화기의 적정상태 점검	"	김중권
" 08 23	목	개인보호복 보류 및 사용상태 점검	"	김중권
" 09 10	목	면역반응 예방, 물질안전보건표(MSD) 확인	"	김중권
" 10 16	목	냉장고 및 배기 팬 필터 교체 점검	"	김중권
" 11 12	목	소화기 점검 상태 점검	"	김중권
" 12 10	목	유해물질 및 안전, 경고표지 부착여부	"	김중권
2013 1 04	목	전기 점검, 재학생 및 재직 직원 교육	"	김중권
" 2 11	목	관로, 배기구 등의 환풍 및 구멍 점검여부	"	김중권
" 3 11	목	전통기구 안전 사용 방법의 비치여부	"	김중권
" 4 15	목	수질시험기의 설치 및 작동상태 점검	김중권	김중권
" 5 13	목	화학물질 취급 안전 교육	"	김중권
" 6 10	목	화학물질의 설치 및 사용상태 점검	"	김중권
" 7 15	목	불로배출 냉방기 및 소화기 점검	"	김중권
" 8 14	목	전통기구 및 관로(배기) 점검	"	김중권
" 9 16	목	관로 점검, 유해물질 점검	"	김중권
" 10 14	목	비상구 점검, 화재 예방 교육	"	김중권
" 11 11	목	전통기구, 유해물질 점검	"	김중권
" 12 9	목	유해물질 안전관리 교육	"	김중권
2014 1 13	목	냉장고 작동기 및 보류장비 점검	"	김중권
" 2 10	목	안전관리 점검에 따라 불로 배기 점검	"	김중권
" 3 10	목	화학물질 및 배기상태 관리	"	김중권
" 4 14	목	후드, 환풍기 등 환기장치 및 작동상태	"	김중권
" 5 12	목	관로 및 환풍기 사용시 안전관리 철저	"	김중권
" 6 9	목	레이저 레이저 안전관리 철저	"	김중권
" 7 14	목	대형 기구 점검, 안전관리 철저	"	김중권

실험·연구실 안전관리 일지

실험·연구실명	발차가능실	담당자	김중권	(Tel) 880-2882
점검년월일	이상유무	처리내용	점검자	서명
2014 8 11	목	소화기 점검 및 안전관리 점검	김중권	김중권
" 9 8	목	소화기 점검 상태 점검	"	김중권
" 10 6	목	유해물질 및 안전, 경고표지 부착여부	"	김중권
" 11 10	목	전통기구 안전 사용 방법의 비치여부	"	김중권
" 12 8	목	화학물질 취급 안전 교육	"	김중권
2015 1 14	목	비상구 점검, 화재 예방 교육	"	김중권
" 2 9	목	관로 점검, 유해물질 점검	"	김중권
" 3 2	목	안전관리 점검에 따라 불로 배기 점검	"	김중권
" 4 13	목	화학물질 및 배기상태 관리	"	김중권
" 5 11	목	후드, 환풍기 등 환기장치 및 작동상태	"	김중권
" 6 15	목	관로 및 환풍기 사용시 안전관리 철저	"	김중권
" 7 13	목	대형 기구 점검, 안전관리 철저	"	김중권
" 8 10	목	개인보호복 보류 및 사용상태 점검	"	김중권
" 9 7	목	유해물질 및 안전, 경고표지 부착여부	"	김중권

실험·연구실 안전관리 일지

실험·연구실명	기능성응용실험실	담당자	조경환	조경환	(Tel) 880-2882
점검년월일	이상유무	처리내용	점검자	서명	
2012 05 01	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2012 06 21	목	전기 안전점검	조경환	조경환	
2012 07 17	목	기계점검	조경환	조경환	
2012 08 9	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2012 09 17	목	화재안전점검	조경환	조경환	
2012 10 21	목	기계점검	조경환	조경환	
2012 11 20	목	사용자 안전관리 교육 (신규생)	조경환	조경환	
2012 12 21	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2013 1 23	목	화재안전점검 및 기계점검	조경환	조경환	
2013 2 17	목	기계점검	조경환	조경환	
2013 3 9	목	전기안전점검	조경환	조경환	
2013 4 11	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2013 5 15	목	기계점검	조경환	조경환	
2013 6 28	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2013 7 2	목	전기안전점검	조경환	조경환	
2013 8 10	목	기계점검	조경환	조경환	
2013 9 14	목	화재안전 점검	조경환	조경환	
2013 10 29	목	기계점검	조경환	조경환	
2013 11 17	목	전기안전점검	조경환	조경환	
2013 12 19	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2014 1 21	목	기계점검	조경환	조경환	
2014 2 18	목	전기안전점검	조경환	조경환	
2014 3 11	목	화재안전점검	조경환	조경환	
2014 4 21	목	사용자 안전관리 교육 (신규생)	조경환	조경환	
2014 5 15	목	전기안전점검	조경환	조경환	
2014 6 13	목	기계점검	조경환	조경환	
2014 7 20	목	소화기 점검	조경환	조경환	
2014 8 9	목	전기안전점검	조경환	조경환	

실험·연구실 안전관리 일지

실험·연구실명	기능성응용실험실	담당자	조경환	조경환	(Tel) 880-2882
점검년월일	이상유무	처리내용	점검자	서명	
2014 9 10	목	전기안전점검	조경환	조경환	
2014 10 22	목	기계점검	조경환	조경환	
2014 11 22	목	소화기 및 화재안전 점검	신유진	신유진	
2015 3 8	목	전기안전점검	신유진	신유진	
2015 3 12	목	소화기 점검 및 화재 안전 점검	신유진	신유진	
2015 4 21	목	기계점검	신유진	신유진	
2015 5 24	목	사용자 안전관리 교육 (신규생)	신유진	신유진	
2015 6 23	목	전기안전점검	신유진	신유진	
2015 7 15	목	전기안전 점검	신유진	신유진	
2015 8 26	목	소화기 점검 및 화재안전점검	신유진	신유진	
2015 9 26	목	기계점검	신유진	신유진	

3. 안전관리 일상점검 일지(일부)

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2015.01.14

실험·연구실명	담당자	점검 목적	담당부	적정	부적정	부적정사유
실험실의 정리정돈 및 청결상태	김종철	개인 보호장비 보유 및 사용 상태		✓		
연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부		비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태		✓		
실험 폐기를 관리상태		위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부		✓		
전기		전기기기의 절연, 피복손상 및 절지 적정여부		✓		
코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부		전열기 주변 가연성물질 등의 방치 여부		✓		
누전차단기의 설치 및 작동상태		소방				
화재별 소화기 적정 비치 및 숙지 여부		화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부		✓		
불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태		가스				
가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		✓		
고압가스 용기 중전기한 적정여부		고압가스 용기 중전기한 적정여부		✓		
미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		✓		
가연성, 동성가스 누출 상태		가연성, 동성가스 누출 상태		✓		
화학		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		✓		
약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		✓		
폐액보관 및 배출 관리상태		폐액보관 및 배출 관리상태		✓		
후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		✓		
기계설비		고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태		✓		
레이저 등의 광학기구 작동상태		레이저 등의 광학기구 작동상태		✓		
대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2014.07.11

실험·연구실명	담당자	점검 목적	담당부	적정	부적정	부적정사유
실험실의 정리정돈 및 청결상태	김종철	개인 보호장비 보유 및 사용 상태		✓		
연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부		비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태		✓		
실험 폐기를 관리상태		위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부		✓		
전기		전기기기의 절연, 피복손상 및 절지 적정여부		✓		
코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부		전열기 주변 가연성물질 등의 방치 여부		✓		
누전차단기의 설치 및 작동상태		소방				
화재별 소화기 적정 비치 및 숙지 여부		화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부		✓		
불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태		가스				
가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		✓		
고압가스 용기 중전기한 적정여부		고압가스 용기 중전기한 적정여부		✓		
미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		✓		
가연성, 동성가스 누출 상태		가연성, 동성가스 누출 상태		✓		
화학		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		✓		
약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		✓		
폐액보관 및 배출 관리상태		폐액보관 및 배출 관리상태		✓		
후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		✓		
기계설비		고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태		✓		
레이저 등의 광학기구 작동상태		레이저 등의 광학기구 작동상태		✓		
대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2015.04.29

실험·연구실명	담당자	점검 목적	담당부	적정	부적정	부적정사유
실험실의 정리정돈 및 청결상태	김종철	개인 보호장비 보유 및 사용 상태		✓		
연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부		비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태		✓		
실험 폐기를 관리상태		위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부		✓		
전기		전기기기의 절연, 피복손상 및 절지 적정여부		✓		
코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부		전열기 주변 가연성물질 등의 방치 여부		✓		
누전차단기의 설치 및 작동상태		소방				
화재별 소화기 적정 비치 및 숙지 여부		화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부		✓		
불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태		가스				
가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		✓		
고압가스 용기 중전기한 적정여부		고압가스 용기 중전기한 적정여부		✓		
미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		✓		
가연성, 동성가스 누출 상태		가연성, 동성가스 누출 상태		✓		
화학		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		✓		
약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		✓		
폐액보관 및 배출 관리상태		폐액보관 및 배출 관리상태		✓		
후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		✓		
기계설비		고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태		✓		
레이저 등의 광학기구 작동상태		레이저 등의 광학기구 작동상태		✓		
대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2014.05.13

실험·연구실명	담당자	점검 목적	담당부	적정	부적정	부적정사유
실험실의 정리정돈 및 청결상태	김종철	개인 보호장비 보유 및 사용 상태		✓		
연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부		비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태		✓		
실험 폐기를 관리상태		위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부		✓		
전기		전기기기의 절연, 피복손상 및 절지 적정여부		✓		
코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부		전열기 주변 가연성물질 등의 방치 여부		✓		
누전차단기의 설치 및 작동상태		소방				
화재별 소화기 적정 비치 및 숙지 여부		화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부		✓		
불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태		가스				
가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태		✓		
고압가스 용기 중전기한 적정여부		고압가스 용기 중전기한 적정여부		✓		
미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부		✓		
가연성, 동성가스 누출 상태		가연성, 동성가스 누출 상태		✓		
화학		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		독성물질 보관상태(MSDS)의 비치 여부		✓		
약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부		✓		
약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부		✓		
폐액보관 및 배출 관리상태		폐액보관 및 배출 관리상태		✓		
후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		후드, 환풍기 등 환기시설 관 및 작동 상태		✓		
기계설비		고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태		✓		
레이저 등의 광학기구 작동상태		레이저 등의 광학기구 작동상태		✓		
대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태		✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2013. 09. 21

실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
일반사항	실험실의 정리정돈 및 청결상태			✓		
	개인 보호장비 보유 및 사용 상태			✓		
	연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부			✓		
	비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태			✓		
	실험 폐기물 관리상태			✓		
	위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부			✓		
전기	전기기기의 절연, 피복손상 및 접지 적정여부			✓		
	코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부			✓		
	전열기 주변 가연성물품 등의 방치 여부			✓		
	누전차단기의 설치 및 작동상태			✓		
소방	화재발 소화기 적정 비치 및 숙지 여부			✓		
	화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부			✓		
	불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태			✓		
가스	가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태			✓		
	고압가스 용기 중전기한 적정여부			✓		
	미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부			✓		
	가연성, 독성가스 누출 상태			✓		
화학	독질안전 보건자료(MSDS)의 비치 여부			✓		
	약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부			✓		
	약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부			✓		
	폐액보관 및 배출 관리상태			✓		
	후드, 환풍기등 환기시설 관 및 작동 상태			✓		
기계설비	고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태			✓		
	레이저 등의 광학기구 작동상태			✓		
	대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태			✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2013. 12. 06

실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
일반사항	실험실의 정리정돈 및 청결상태			✓		
	개인 보호장비 보유 및 사용 상태			✓		
	연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부			✓		
	비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태			✓		
	실험 폐기물 관리상태			✓		
	위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부			✓		
전기	전기기기의 절연, 피복손상 및 접지 적정여부			✓		
	코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부			✓		
	전열기 주변 가연성물품 등의 방치 여부			✓		
	누전차단기의 설치 및 작동상태			✓		
소방	화재발 소화기 적정 비치 및 숙지 여부			✓		
	화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부			✓		
	불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태			✓		
가스	가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태			✓		
	고압가스 용기 중전기한 적정여부			✓		
	미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부			✓		
	가연성, 독성가스 누출 상태			✓		
화학	독질안전 보건자료(MSDS)의 비치 여부			✓		
	약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부			✓		
	약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부			✓		
	폐액보관 및 배출 관리상태			✓		
	후드, 환풍기등 환기시설 관 및 작동 상태			✓		
기계설비	고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태			✓		
	레이저 등의 광학기구 작동상태			✓		
	대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태			✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2014. 05. 20

실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
일반사항	실험실의 정리정돈 및 청결상태			✓		
	개인 보호장비 보유 및 사용 상태			✓		
	연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부			✓		
	비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태			✓		
	실험 폐기물 관리상태			✓		
	위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부			✓		
전기	전기기기의 절연, 피복손상 및 접지 적정여부			✓		
	코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부			✓		
	전열기 주변 가연성물품 등의 방치 여부			✓		
	누전차단기의 설치 및 작동상태			✓		
소방	화재발 소화기 적정 비치 및 숙지 여부			✓		
	화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부			✓		
	불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태			✓		
가스	가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태			✓		
	고압가스 용기 중전기한 적정여부			✓		
	미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부			✓		
	가연성, 독성가스 누출 상태			✓		
화학	독질안전 보건자료(MSDS)의 비치 여부			✓		
	약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부			✓		
	약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부			✓		
	폐액보관 및 배출 관리상태			✓		
	후드, 환풍기등 환기시설 관 및 작동 상태			✓		
기계설비	고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태			✓		
	레이저 등의 광학기구 작동상태			✓		
	대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태			✓		

실험·연구실 안전관리 일상점검 일지

점검일자(년월일) : 2014. 06. 25

실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
실험·연구실명	책임자/담당자	점검 목적	담당자	점검자	점검자	점검자
일반사항	실험실의 정리정돈 및 청결상태			✓		
	개인 보호장비 보유 및 사용 상태			✓		
	연구실내 금연, 음식물 반입 및 섭취여부			✓		
	비상 연락망 및 비상시 행동요령 비치 상태			✓		
	실험 폐기물 관리상태			✓		
	위험표지 및 안전, 경고 표지 부착 여부			✓		
전기	전기기기의 절연, 피복손상 및 접지 적정여부			✓		
	코드, 배선기구의 용량 및 규격 적합 여부			✓		
	전열기 주변 가연성물품 등의 방치 여부			✓		
	누전차단기의 설치 및 작동상태			✓		
소방	화재발 소화기 적정 비치 및 숙지 여부			✓		
	화재경보기의 설치 및 설치장소 숙지여부			✓		
	불꽃내는 난방기구/실험기구 관리 상태			✓		
가스	가스용기 고정 및 관리(밸브 및 배관)상태			✓		
	고압가스 용기 중전기한 적정여부			✓		
	미사용 고압가스용기 보호캡 설치여부			✓		
	가연성, 독성가스 누출 상태			✓		
화학	독질안전 보건자료(MSDS)의 비치 여부			✓		
	약품별 저장용기 및 보관 장소 적정 여부			✓		
	약품 위험성 분류에 따라 분류 보관 여부			✓		
	폐액보관 및 배출 관리상태			✓		
	후드, 환풍기등 환기시설 관 및 작동 상태			✓		
기계설비	고온/고압 실험장비 사용시 안전장치 설치상태			✓		
	레이저 등의 광학기구 작동상태			✓		
	대형 가동 기계의 안전장치 작동 상태			✓		

제 9 장 참고문헌

1. Ru Y, Guo W, Luo S, Sakata K (2004) Everything of china Pu-erh tea. Saiwai Book Store, Japan, Tokyo, pp. 73-97
2. Kang OJ (2008) Isolation and identification of yeast strain from fermented tea. Korean J. Food Cookery Sci. 24: 11-15
3. Hou CW, Jeng KC, Chen YS (2010) Enhancement of fermentation process in Pu-Erh tea by tea-leaf extract. J. Food Sci. 75(1): H44-H48
4. Han SK, Song YS, Lee JS, Bang JK, Suh SJ, Cho JY, Moon JH, Park KH (2010) Changes of the chemical constituents and antioxidant activity during microbial-fermented tea (*Camellia sinensis* L.) processing. Food Sci Biotechnol. 42: 21-26
5. Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W (2001) Characterization of Antimicrobial Activity in Kombucha Fermentation. Acta Biotechnologica. 21(1): 49-56
6. Greenwalt CJ, Ledford RA, Steinkraus KH (1998) Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the Fermented Tea Kombucha. Food Science and Technology. 31(3): 291-296
7. Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA (2000) Kombucha, the fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. Journal of Food Protection. 7: 855-986
8. Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W (2000) Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. J. Agric. Food Chem. 48(6): 2589-2594
9. Xu A, Wang Y, Wen J, Liu P, Liu Z, Li Z (2011) Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea. International Journal of Food Microbiology. 146(1): 14-22
10. Liang YR, Zhang Ly, Lu JL (2005) A study on chemical estimation of Pu-erh tea quality. J Sci Food Agric. 86: 381-390
11. Haizhen M, Yang Z, Chen Z (2008) Microbial fermented tea a potential source of natural food preservatives. Trends Food Sci. Tech. 19: 124-130
12. Chung YH, Shin MK (2005) A study on the physicochemical properties of korean teas according to degree of fermentation. Korean J. Food and Nutr. 18: 94-101
13. Mo H, Zhu Y, Chen Z (2007) Microbial fermented tea-a potential source of natural food preservatives. Trends Food Sci. Tech. 19(3): 124-130
14. Steinkraus KH, Shapiro KB, Hotchkiss JH, Mortlock RP (1996) Investigation into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage, Acta Biotechnologica. 16(2-3): 199-205
15. Xu XQ, Mo HZ, Yan MC, Zhu Y (2007) Analysis of characteristic aroma of fungal fermented Fuzhuan brick-tea by gas chromatography/mass spectrophotometry. J Sci Food Agr. 87(8): 1502-1504

16. Jeong YS, Park SG, Cho KH, Son GH, Kim YD, Hwang JG, Lee JG, Ryu CH, Kim JC (2014) Isolation and Characterization of *Eurotium cristatum* ssp. for Microbial Fermented Tea. *J. Kor. Tea Soc.* 20(1): 45-49
17. Jeong YS, Park SG, Cho KH, Kim YD, Hwang JG, Son GH, Kim JC (2015) Identification of Microbes on the Single Fungus Fermented Tea by Pyrosequencing. *J. Kor. Tea Soc. Special Issue*: 126-131
18. Amin A, Razieh Y (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* 104(1): 21-29
19. Rober S, Leslaw J, Slawomir P, Teresa F (2009) Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chem.* 133(2): 568-574
20. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 188: 1199-1200
21. Yen GC, Duh PD, Tsai HL (2002) Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid and garlic acid. *Food Chem.* 79: 307-313
22. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" : The FRAP assay. *Anal Biochem.* 230: 70-79
23. Kim JH, Kim JK, Kang WW, Ha YS, Choi SW, Moon KD (2003) Chemical composition and DPPH radical scavenger activity in different section of safflower. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 733-738
24. Kim MH, Kim MC, Park JS, Kim JW, Lee JO (2001) The antioxidative effects of the water-soluble extracts of pants used as tea materials. *Korea J. Food Sci. Technol.* 33: 12-18
25. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Aqarwal R, Mukhtar H (1997) Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer inst.* 89: 1881-1886
26. Seo SJ, Choi YM, Lee SM, Kong SH, Lee JS (2008) Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J. Korean Soc. Food S채. Nutr.* 37: 129-135
27. Graf E, Eaton JW (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic. Biol. Meo* 8: 61-69
28. Jeng KC, Chen CS, Fang YP, Hou RCW, Chen YS (2007) Effect of Microbial Fermentation on Content of Statin, GABA, and Polyphenols in Pu-Erh Tea. *J. Agric. Food Chem.* 55:8787-8792.
29. Chen PC, Chang FS, Chen IZ, Lu FM, Cheng TJ, Chen RLC (2007) Redoxpotential of tea infusion as an index for the degree of fermentation. *Analytica. Chimica. Acta.* 594:32-36.
30. Yamamoto MM, Inagaki N, Kitaura J, Chikumoto T, Kawahara H, Kawakami Y, Sano M, Miyase T, Tachibana H, Nagai H, Kawakami, T (2004) O-Methylated Catechins from Tea Leaves Inhibit Multiple Protein Kinases in Mast Cells. *The Journal of Immunology.* 172:4486-4492.
31. Choi SH (2009) Changes in the Composition of Catechins, Theaflavins and Alkaloids in

- Leaves from Korean Yabukida Tea Plant During Processing to Fermented Black Tea. Korean J. Food Culture. 24(3):308-314.
32. Wang Y, Ho CT (2009) Polyphenolic Chemistry of tea and Coffee : A Century of Progress. J. Agric. Food Chem. 57:8109-8114.
 33. Syu KY, Lin CL, Huang HC, Lin JK (2008) Determination of theanine, GABA, and Other Amino Acids in Green, Oolong, Black, and Pu'rh Teas with Dabsylation and High-Performance Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem. 56:7637-7643.
 34. Icazar A, Ballesteros O, Jurado JM, Pablos F, Martin MJ, Vilches JL, Navalon A (2007) Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-erh Teas According to Their Free Amino Acids Content. J. Agric. Food Chem. 55:5960-5965.
 35. Mashimoto F, Ono M, Masuoka C, Ito Y, Sakata Y, Shimizu K, Nonaka GI, Nishioka I, Nohara T (2003) Evaluation of the Anti-oxidative Effect (invitro) of Tea Polyphenols. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(2):396-401.
 36. Yoon MH, Lee MJ, Hwang SI, Moon SK, Kim JK, Jeong IH, Yim JR (2001) A Evaluation of the Caffeine Contents in Commercial Foods. J. FdHyg. Safety. 16:295-299.
 37. Kim SD, Yun ES, Chang MS, Park YA, Jung SO, Kim DG, Kim YC, Chae YZ, Kim MY (2009) Survey of Daily Caffeine Intakes from Children's Beverage Consumption and the Effectiveness of Nutrition Education. J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr. 38:709-720.
 38. Park YH, Won EK, Son DJ (2002) Effect of pH on the Stability of Green tea Catechins. J. FdHyg. Safety. 17(3):117-123.
 39. Yu MO, Chun JW, Oh KH (2004) Effect of Tea Catechin, EGCG (Epigallo catechin Gallate) on killing of Oral Bacteria. Kor. J. Microbiol. 40(4):364-366.
 40. Kang Jh, Park YK, Chung ST, Row KH (1999) Extraction and Purification of EGCG (Epigallo catechin Gallate) from Green Tea. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 14(5):517-522.
 41. Vignes M, Maurice T, Lante F, Nedjar M, Thethi K, Guiramand J, Recasens M (2006) Anxiolytic properties of green tea polyphenol(-)-epigallo catechin gallate(EGCG). BRAIN. RESEARCH. 1110:102-115.
 42. Song I, Choi IS, Yoon HK, Koo SJ (2005) The Effect of Camelliasinensis LINNE on Alcohol Concentration and hangover in Normal healthy Students. Korean J. Food Cookery. 21(5):591-598.
 43. Khallouki F, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW (2006) Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of Anisophyllea dichostyla R. Br. Food and Chemical Toxicology. 45:472-485.
 44. A.O.A.C : Official method of analysis 15th ed. The association of official analytical chemists, Washington, D.C. USA (1990)
 45. Kilani S, Ammar RB, Bouhlel I, Hayder N, Mahmoud A, Chedira K, Chekir-Ghedira L (2005) Investigation of extracts from (Tunisian) Cyperus rotundus as antimutagens and radical scavengers. Environ. Toxicol. Phar. 20: 478-484
 46. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing

sugar. Anal. Chem., 31, 426-428

47. Jung DH, Jung HG. Food analysis, Jin-Lo. Co. Seoul. p. 197

48. Bernfeld P (1955) Enzymes of carbohydrate metabolism, amylase alpha and beta. In S. P. Colowish & N. O. Kaplan (Eds). Method in Enzymology, New York, Academic Press, 1, 146-158

<첨부>

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	금화균(<i>Eurotium sp.</i>)을 활용한 고부가가치 Golden Flower Tea(금화차) 개발		
주관연구책임자	김 중 철	주관기관	(재)하동녹차연구소

1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
금화균 발효속도 향상을 통한 차 제조공정 개발	중국 100	80	70	100	
금화균 대량 증식화 배양 및 종균화 기술개발	일본 100	80	80	100	

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	미생물발효차의 제조공정	미생물발효차의 재다공정	
Keyword	발효차	떡차	
검색건수	37건	5건	
유효특허건수	15건	3건	
핵심특허 및 관련성	특허명	바실러스속 균주를 이용한 발효차 제조방법	발효숙성 녹차의 제조방법
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2009년	2011년
	관련성(%)		
	유사점	미생물을 활용하여 발효차 제조	발효숙성 공정
차이점	바실러스속 균주를 활용	자연발효 및 자연숙성	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		녹차, 발효차에 금화균 적용한 미생물 발효차	금화균을 발효균주로 사용한 미생물 발효차
Keyword		미생물 발효차	청태전
검색건수		13건	9건
유효논문건수		9건	2건
핵심논문 및 관련성	논문명	발효차 청태전 제조용 미생물의 분리	균주를 접종하여 제조한 청태전차의 관능적 특성과 생리활성 효과
	학술지명	KOREAN J. FOOD CULTURE	Korean J. Community Living Science
	저 자	박정숙, 조정일	허복구, 조정일, 박용서, 박윤점, 조자용
	게재년도	2011년	2010
	관련성(%)		
	유사점	우수한 발효균을 적용	발효 균주를 접종하여 차 제조
	차이점	발효균 미생물 분리	유산균, 황국균 등을 이용