

발간등록번호

11-1541000-001089-01

한국산 미생물발효차의 제조기술 개발
(Development of production method for
Korean microbial fermented tea)

한국산 미생물발효차의 제조기술 개발 및 안전성 연구
(Development of production method and evaluation
of Korean microbial fermented tea)

미생물발효차의 화학성분과 이화학적 특성 및 기능성 평가
(Evaluations of chemical and functional properties
of Korean microbial fermented tea)

목포대학교산학협력단

농림축산식품자료실



0008369

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한국산 미생물발효차의 제조기술 개발” 과제(세부과제“한국산 미생물발효차 제조기술 개발 및 안전성 연구”, 협동과제 “미생물발효차의 화학성분 분석과 이화학적 특성 및 기능성 평가”)의 보고서로 제출합니다.

2011년 6월 24일

주관연구기관명 : 목포대학교

주관연구책임자 : 마 승 진

세부연구책임자 : 마 승 진

연 구 원 : 은 종 방

연 구 원 : 서 상 균

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 문 제 학

요 약 문

I. 제 목

한국산 미생물발효차의 제조기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 최근 국산 녹차 재고량이 증가하여 심각한 문제가 되고 있다. 녹차 재고 누적의 원인은 국내 차잎의 과잉생산에도 일부 원인이 있으나 이보다 저가의 차 제품과 보이차를 비롯한 발효차의 수입이 증가한 것이 주된 원인이다. 특히, 미생물발효차는 과학적인 근거가 부족한 상태임에도 불구하고 항비만, 항고혈압 등의 기능성 있다고 알려지면서 수입이 급격히 증가하고 있다. 반면, 국내에서는 차잎의 90%이상을 녹차로만 가공하고 있는 실정이다.
- 이에 대한 대처와 함께 국내 재고 녹차 해소를 위하여 우리나라의 차잎을 이용한 표준화되고 과학화된 국산 발효차 제조기술 확립이 필요하다고 생각하였다. 특히, 발효차는 녹차 제품에 비해 10배 이상의 고부가가치를 가지고 있기 때문에 국내의 잉여 차잎을 이용하여 미생물발효차로 개발함으로써 새로운 블루오션 시장 창출이 가능하며 이를 통해 차 재배 농가 및 국내 제다업체의 수익창출과 지역경제 활성화에 크게 이바지 할 수 있다고 생각되었다.
- 이를 위하여 본 연구에서는 발효메커니즘, 기능적 우수성, 안전성 확보 등에 대한 과학적 분석을 바탕으로 한국산 차잎을 이용한 미생물발효차의 제조기술을 확립하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 국내산 차잎을 이용하여 고품질의 미생물발효차를 개발함으로써 국내산 차잎의 활용도 증진과 국내산 차시장 규모 확대를 통한 차산업 활성화를 목적으로 하였다. 따라서 국내에서 미생물발효차를 생산하기 위한 기술을 확보하기 위해서는 먼저 외국의 미생물발효차 제조 공정을 벤치마킹하고 품질특성을 분석함으로써 공정의 주요 팩터를 파악해야 할 것

으로 생각되었으며 또한 이 주요 팩터를 기준으로 국내산 찻잎과 환경에서 제조가 가능한 지 가능성을 파악한 후에 최종적으로 파악된 정보에 기반하여 기술을 개발하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

- 이러한 문제를 해결하기 위하여 수행된 주요 연구내용은 다음과 같다.
 - 미생물발효차에 대한 과학적 해석을 통하여 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차 제조 기술 개발
 - 미생물발효차의 이화학적 성분 및 기능성을 분석함으로써 과학적 품질평가 기준 확립
 - 새로운 한국산 미생물발효차의 기능적 우수성과 안전성 확보를 위한 과학적 근거 마련

연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도(2008) 외국산 미생물 발효차의 제조 공정 및 이화학적 특성 분석	<ol style="list-style-type: none"> 1. 문헌 및 현지탐사를 통한 제조공정 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차의 역사와 종류 ○ 미생물발효차의 생산 환경 분석 ○ 미생물발효차의 제조공정 분석 2. 외국산 고품질 미생물발효차의 제조공정 주요 팩터 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차로부터 주요 미생물의 분리 및 동정 ○ 미생물발효차 저장 중의 주요 미생물의 거동 분석 ○ 차 추출물과 주요 미생물 생육과의 관계 ○ 미생물발효차 안전관리 진단항목 설정 및 분석 3. 외국산 미생물발효차의 지표성분(일반성분, 특수성분, 향기성분) 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 일반성분 및 색도 분석 ○ 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분 분석 ○ 관능적 등급에 따른 이화학적 성분 및 향기성분의 차이 분석 4. 외국산 미생물발효차의 기능성분 및 기능성 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 항고혈 기능성 지표성분으로서의 statin화합물 탐색 ○ 카테킨류와 카페인의 정량 ○ Vitamin E(α-tocopherol)의 분석 ○ 항산화 활성 분석 ○ 동맥경화 예방효과 검정

<p>2차년도(2009) 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조공정 검토 및 이화학적 특성 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 국내산 찻잎을 이용한 발효차 생산 환경 적용 <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조 ○ 미생물발효차 발효과정 중 온도습도 변화 ○ 찻잎의 종류, 발효조건에 따른 발효과정 중 주요 미생물의 거동 2. 한국산 미생물발효차의 발효과정 중 이화학적 성분 변화 <ul style="list-style-type: none"> ○ 일반성분 분석 및 이화학적 특성 분석 ○ 영양성분 분석 ○ 미생물발효차의 특수성분 분석 ○ 미생물발효차의 생리활성 평가 ○ 향기성분의 GC-MS 분석 ○ 미생물발효차의 미생물 독소 분석
<p>3차년도(2010) 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조기술 확립 및 이화학적 특성 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조 2. 관능평가단 구성 및 제조된 미생물발효차의 관능평가 3. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 발효조건 탐색 <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효온도 및 수분함량 탐색 ○ 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효기간 탐색 ○ 중국산 대엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조 ○ 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성 탐색 ○ 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 원료 적합성 탐색 ○ 국내산 찻잎의 최적 발효방법 탐색 4. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 특수성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ Gallic acid 분석 ○ 휘발성 향기(methyl caprate 성분) 분석 ○ Tocopherol 류 분석 5. 국내산 미생물발효차의 이화학적 특성 및 일반성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차의 색도 분석 ○ 총질소, 총유리아미노산, 데아닌, 총당 분석 ○ 가용성 고형분, pH, 산도, 불소 성분 분석 6. 미생물발효차 제조과정 중 생육 미생물의 거동 7. 제조된 미생물발효차의 기능성 및 기능성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ L-citrulline 생성억제 활성 측정 ○ 항고혈압 지표성분인 Statin화합물 분석 8. 제조된 미생물발효차의 식품위해 요소 분석 9. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차 시제품 제작

IV. 연구개발결과

1. 외국산 미생물발효차의 제다공정 및 이화학적 특성 분석

- 문헌 및 현지답사를 통하여 외국산 고품질 미생물발효차의 제다공정을 분석하였으며 미생물발효차의 품질평가 기준을 확립하기 위하여 이력(제조연도, 생산처, 원료등급 등)이 확실한 30여종의 중국산 미생물발효차를 확보한 후 이화학적, 미생물학적 특성을 분석하였다.
- 미생물발효차로부터 미생물을 분리한 후 18S rRNA 분석을 실시하여 동정한 결과, 8종의 곰팡이와 효모의 존재를 확인하였으며 이 중, *Aspergillus*와 *Penicillium*이 main 미생물임을 확인하였다.
- 이들 미생물의 생육 패턴은 차잎 중 카테킨의 항미생물 효과, 미생물 상호간의 저해 작용 등과 밀접한 관계가 있음이 시사되었다.
- 미생물발효차의 주요 미생물이 *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속 곰팡이로 밝혀짐에 따라 이 균주가 생성할 수 있는 독소인 aflatoxin 및 ochratoxin의 분석법을 확립하였다.
- 확립된 분석법을 이용하여 총 90여종의 미생물발효차 분석을 실시한 결과, 4종의 시료로부터 aflatoxin의 잔류 가능성이 제시되었으나 그 함량은 잔류허용치를 초과하지 않은 수준이었다.
- 이화학적 성분 분석 결과, 대다수의 미생물발효차들의 수분함량은 7~10%, 총질소 함량은 4~5%, 조지방 함량은 0.6~0.9%, 조섬유 함량은 12~15%, 조회분 함량은 5~7%, 가용성 고형분 함량은 20~25%, pH는 5~6, 산도는 1.0~1.3% 사이에서 나타났다.
- 이 때, 총질소 함량은 어린 고급 차잎을 원료로 제조한 경우 높고 성숙한 저급 차잎을 사용하는 경우 낮은 경향을 보였으며 조지방 함량은 반대로 어린 고급 차잎을 원료로 제조한 경우 낮고 성숙한 저급 차잎을 사용하는 경우 높은 경향을 보였다.
- pH, 산도, 총페놀 함량은 비교적 저장기간이 길수록 높은 경향을 확인하였다.
- 중국산 미생물발효차의 영양성분 분석 결과 주요 유기산은 oxalic acid, maleic acid, citric acid 등이었으며 대체적으로 고급 원료로 제조한 미생물발효차에서 함량이 높은 경향을 보였다.
- 무기성분 분석 결과, Ca, P, K, Mg이 미생물발효차의 주요 무기성분이었다.

- 관능적 선호도와 이화학적 성분과의 관계를 조사한 결과, 관능적 등급이 높은 발효차들이 다른 시료들보다 가용성 고형분의 함량이 높은 경향을 나타냈다.
- 관능적 등급에 따른 발효차의 향기성분 분석 결과, 관능적 등급이 낮은 시료에서는 methyl-, methoxy- 유도체의 향기성분이 검출된 반면 관능적 등급이 높았던 시료에서는 거의 나타나지 않아 이들 성분이 향기 선호도를 결정하는 향기성분일 가능성이 제시되었다.
- 미생물발효차의 항산화 활성을 측정된 결과, DPPH 소거능과 아질산염 소거능은 녹차 및 우롱차보다 낮았으나 iNOs 생성억제활성은 녹차, 우롱차보다 높은 활성을 나타냈다.
- 미생물발효차로부터 혈중 콜레스테롤 감소효과가 있는 물질로 알려진 statin화합물을 탐색한 결과, 발효가 진행될수록 statin화합물의 함량이 증가하는 경향을 보여 발효차에 존재하는 미생물이 대사과정 중 statin화합물을 생성할 가능성이 시사되었다.

2. 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조공정 검토 및 이화학적 특성 분석

- 외국의 미생물발효차 기술자를 초청하여 기술자와 함께 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 국내 생산 환경 적용시험을 실시하였다. 즉, 국내에서 재배되고 있는 자생종(소엽종)과 도입종 찻잎(대엽종) 및 재외국 발효차의 원료잎(대엽종)을 이용하여 국내에서 발효차를 제조한 후, 발효과정 중 생육 미생물 거동, 생리활성 성분, 향기성분, 영양성분 및 이화학적 특성을 조사, 비교함으로써 국내에서의 미생물발효차의 생산 가능성을 검토하였다.
- 외국의 제조기술을 도입하여 미생물발효차 제조하면서 발효조건 및 발효단계별 주요 미생물의 거동을 조사한 결과, 대부분의 조건에서 발효 초기 과정에 *Aspergillus niger*가 우점종으로 생장율이 높았으며 발효가 진행 될수록 점차적으로 감소되면서 *Penicillium*의 증가가 관찰되는 경향을 보였다. 또한, 동일한 중국 모차를 원료로 국내에서 본 연구진이 제조한 미생물발효차와 국외의 미생물발효차 제조 공장에서 제조한 미생물발효차의 발효관련 주요 균주의 생장패턴이 유사한 것으로 보아 국내 미생물발효차제조 공정의 산업화 적용이 가능함을 확인하였다.

- 차 추출액의 L값은 발효 후 감소하고 a와 b 값은 모두 발효에 의해 증가하는 경향을 보였는데 중국산 발효차가 유의적으로 높은 값을 나타내 가장 진한 적색, 황색으로 변해감을 알 수 있었다.
- pH는 발효 후 현저하게 증가하였고 국내 자생종(소엽종)으로 제조한 모차와 이 모차로 제조한 미생물발효차의 pH가 다른 차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타낸 반면, 중국산 모차(대엽종)로 제조한 발효차는 다른 미생물발효차들과 비교해 볼 때 현저히 낮은 값을 나타냈다.
- 산도는 발효에 의해 감소하는 경향을 볼 수 있었는데 중국산 모차로 제조한 발효차가 다른 발효차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈다.
- 미생물발효차의 가용성 고형분 함량은 발효 후 증가하는 경향을 볼 수 있었는데 중국산 모차로 제조한 발효차가 가장 높은 함량을 나타내었다.
- 미생물발효차의 수분활성도는 발효 후 증가하는 경향을 나타내었는데 특히 국내 소엽종 증청녹차로 제조한 미생물발효차는 수분함량과 수분활성도가 다른 미생물발효차보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다.
- 미생물발효차에 함유된 주요 유기산을 분석한 결과 maleic acid가 주요 유기산으로 나타났고 대부분의 유기산은 발효 중 그 함량이 증가하여 발효 전보다 발효 후에 현저히 높은 함량을 나타내었다.
- 발효 전 모차에서는 총 17종의 유리아미노산이 검출되었고 발효차에서는 총 11종의 유리아미노산이 검출되었는데 모차와 발효차 모두 glutamic acid와 alanine이 중요한 유리아미노산으로 나타났다.
- 발효차의 총 유리아미노산 함량은 모차에 비해 현저히 감소하는 경향을 보였는데 그 중에서도 중국산 모차로 제조한 발효차가 가장 많이 감소한 것을 알 수 있었다.
- 본 연구 그룹에 의해 제조된 차에 있어 모차로부터 제조된 미생물발효차의 당 함량은 발효 후에 감소되는 경향을 보였다.
- 중국산 모차로 제조한 발효차의 경우 성숙한잎(저급)보다 어린잎(고급)으로 제조한 미생물발효차의 rat blood plasma의 CE-OOH 생성 억제능이 더 높았다. 즉 미생물발효차는 성숙한 잎보다 어린잎을 이용하는 것이 기능성 측면에서 바람직하다고 판단된다.
- 미생물발효차의 보존기간은 rat blood plasma의 CE-OOH 생성 억제능에 일관성 있는 경향이 관찰되지 않았다.

- 차에 함유된 tocopherol류들은 그 chroman환의 수산기에 미지의 화합물이 ester 결합되어 있을 가능성이 시사되었으며 보존기간이 오래된 차일수록 tocopherol류의 함량이 감소됨을 알 수 있었다.
- 중국산 미생물발효차의 경우 저급차는 보존기간이 오래될수록 δ -tocopherol 함량이 낮아짐에 반해, 고급차는 보존기간이 오래되어도 δ -tocopherol의 함량이 거의 감소되지 않았다. 즉 δ -tocopherol 함량은 미생물발효차의 보존기간 평가 지표로 응용가능성이 높다고 시사되었다.
- 미생물발효차 모두 시료 무처리군에 비하여 농도 의존적으로 L-citrulline 생성능을 억제하였으며, 본 연구그룹에 의해 제조된 7종의 미생물발효차 중 국내 재래종으로 제조된 미생물발효차가 중국산 모차로 제조한 발효차보다 높은 억제활성을 보여 국내 재래종을 원료로 미생물발효차를 개발하였을 때 L-citrulline 생성억제 작용이 우수한 발효차로 개발할 수 있는 가능성이 제시되었다.
- 미생물발효차의 심혈관계 효과를 갖는 기능성분으로 존재할 가능성이 제시된 statin화합물에 대하여 본 연구그룹이 직접 제조한 미생물발효차 안에서의 존재 여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 Compactin-H와 Lovastatin-H의 존재가 확인 되었으며 중국 모차로 제조된 미생물발효차보다 우리나라 소엽종으로 제조된 미생물발효차가 statin 화합물의 함량이 높음을 확인할 수 있었다.
- 다양한 중국산 미생물발효차 완제품의 분석 결과, 고급차일수록 methyl caprate 함량이 낮고 저급차일수록 높은 경향을 보였다. 즉 methyl caprate는 미생물발효차의 품질평가 지표로 활용가능성이 매우 높다고 판단되었다.
- 미생물발효차는 식품위해 요소 가능성이 높은 aflatoxin과 ochratoxin의 분석법을 확립하고 본 연구과정에서 제조된 미생물발효차를 대상으로 aflatoxin과 ochratoxin의 존재 여부를 모니터링 한 결과, 국내산 차잎과 외국산 차잎으로 제조된 미생물발효차 7종 모두 aflatoxin과 ochratoxin이 검출되지 않았다.
- 이상의 결과를 종합하였을 때 국내산 소엽종 차잎을 이용하여 대엽종 차잎으로 제조되고 있는 외국의 미생물발효차에 뒤떨어지지 않는 발효차를 제조할 수 있는 가능성이 확인되었다.

3. 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조기술 확립 및 이화학적

특성분석

- 국내산 소엽종 찻잎을 이용하여 발효온도, 모차의 수분함량, 발효 균주, 발효방식 등을 달리한 다양한 조건에서 미생물발효차를 제조한 후 관능평가단에 의한 관능적 평가를 지표로 미생물발효차를 제조하기 위한 최적의 발효조건을 탐색하였다.
- 국내산 찻잎의 최적 발효온도와 수분함량을 탐색하기 위해 국내산 소엽종 찻잎으로 제조한 모차를 발효 온도 35℃에서 55℃까지(35, 45, 50, 55℃), 수분함량 30%에서 50%까지(30, 40, 45, 50%) 각각 조건을 다르게 하여 35일(뒤집기 기간 7일 × 뒤집기 횟수 5회) 동안 발효하여 관능평가 하였다. 그 결과, 색, 맛, 향 모두 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 발효하였을 때 가장 우수하였다.
- 국내산 찻잎의 최적 발효기간을 탐색하기 위해 발효온도 45℃, 수분함량 40%로 고정시키고 발효 기간 및 뒤섞기 횟수를 달리하여 제조한 발효차의 관능평가를 실시하였다. 그 결과, 7일×5회(35일)의 조건으로 발효한 발효차의 경우 각 분야에서 최고점을 받거나 최고점을 받은 발효차와 큰 차이 없이 고르게 높은 평가를 받는 것으로 확인되어 7일×5회(35일)의 조건이 가장 바람직한 것으로 판단되었다.
- 균주의 접종발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성을 탐색하기 위하여 각각의 균주를 다양하게 조합하여 접종하고 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 발효시켜 미생물 발효차를 제조한 후 관능평가단에 의뢰하여 평가를 실시하였다. 그 결과, 자연발효시켜 제조한 발효차 보다 균주를 접종하여 제조한 발효차가 전반적으로 더 좋은 평가를 얻었으며 접종한 균주의 수가 많을수록 좋은 평가를 얻었다.
- 국내외 다양한 미생물발효차의 완제품, 미생물발효과정 중의 시료로부터 총 34종의 미생물을 분리, 동정하였으며 이 중 검출빈도를 고려하여 주요 균주로 15종을 선별하였다.
- 선택된 15종의 균주를 함께 접종하여 제조한 발효차는 다른 발효차보다 월등히 좋은 평가를 얻어 발효차를 제조하는 경우 선별된 15종의 균주를 혼합하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.
- 한국산 소엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 생산조건에서의 찻잎의 원료에 따른 차이를 알아보하고자 5월, 6월, 7월에 채취하여 제조한 국내산 모차와 중국에서 5월말에 채취한 중국산 모차를 이용하여 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 15종의 균주

의 조합하여 접종하고 발효시켜 미생물발효차를 제조한 후 관능평가를 실시하였다. 그 결과, 7월에 찻잎을 채취하여 제조한 미생물발효차가 다른 시기에 채취한 찻잎을 원료로 한 미생물발효차보다 관능적으로 좋은 평가를 얻었다. 따라서 한국산 찻잎을 이용하여 미생물발효차를 제조하는 경우 5월에 채취한 고가의 어린 순을 이용하지 않고 상대적으로 저가인 7월말~8월초의 성숙한 찻잎을 이용하여 제조해도 관능적으로 우수한 발효차를 제조할 수 있을 것으로 판단되었다.

- 미생물발효차의 특수성분 중 gallic acid 함량은 발효가 충분히 진행되지 않은 시료의 경우 그 함량이 매우 낮은 경향을 보여 gallic acid의 함량이 발효의 진행을 판단하는 척도의 하나가 될 수 있음이 시사되었다. 또한 관능적으로 비교적 좋은 평가를 받은 발효차의 경우 100 g 당 5~40 mg 정도의 gallic acid가 함유되어 있었으며 이 함량이 지나치게 높거나 낮을 경우 관능적으로 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 것으로 판단되었다.
- 미생물발효차의 특수성분 중 methyl caprate 함량은 기호도가 높은 차일수록 적은 함량을 나타내 methyl caprate 함량은 관능적 기호도의 척도로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.
- 특히, 발효온도 45℃, 수분함량 40% 조건에서 균주접종에 의해 발효시켜 제조한 미생물발효차의 경우 gallic acid 함량은 100 g 당 5~40 mg 정도이며 methyl caprate 함량이 낮은 값을 갖는 경향이 관찰되어 이 발효조건에서 발효가 잘 이루어졌음을 의미하는 결과로 판단되었다.
- 미생물발효차의 이화학적 성분분석 및 품질평가의 결과, 미생물발효차의 품질평가지표로 총질소, pH, 가용성 고형분 함량, 총유리아미노산 등의 함량을 사용할 수 있는 가능성이 제시 되었다. 그러나 미생물발효차의 등급 판별과 개별 기준치 설정을 확립하기 위해서는 추후 체계적인 보완연구가 수행 되어야할 것으로 생각되었다.
- 색도, 산도 총당, 불소, 데아닌 함량 등을 가공방법 원료 및 발효조건에 따른 일정한 패턴이 보이지 않아 미생물발효차의 품질 지표로 사용하기에 어려움이 있을 것으로 판단되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

- 산업재산권: 1건
 - 미생물발효차의 제조방법, 출원번호 10-2011-0058972, 목포대학교산학협력단
- 국내외 전문학술지 게재: 4건
 - 박성화, 이형재, 마승진, 박근형, 문제학. 보이차의 품질 및 보존기간 판별을 위한 평가지표. 한국차학회지. 15(3): 59-67 (2009)
 - 강대진, 문예화, 최강현, 오덕환, 은종방. *Aspergillus niger* 이용 미생물 발효차의 발효 중 미생물학적, 물리적 및 관능적 품질특성. 한국차학회지. 15(2): 107-113 (2010)
 - 강대진, 이성희, 마승진, 은종방. *Aspergillus niger*를 이용하여 제조한 미생물발효차의 발효 중 화학적 특성 변화. 한국차학회지. 16(3): 81-87 (2010)
 - 한선경, 송연상, 이준설, 방진기, 서세정, 조정용, 문제학, 박근형. 미생물발효차 (*Camellia sinensis* L.) 제조과정 중의 품질 특성 변화. 한국식품과학회지. 42(1):21-26 (2010)
- 국내 및 국제학술회의: 12건
 - 박성화, 이형재, 마승진, 박근형, 문제학. 미생물발효차의 품질 정도 판별을 위한 평가지표 도출 가능성 검토. 한국차학회 (2009)
 - WEN YIHWUA, 은종방. 중국산 미생물발효차의 영양성분. 한국차학회 (2009)
 - WEN YIHUA, 은종방. 중국산 미생물발효차(보이차)의 영양성분 및 이화학적 특성. 한국차학회 (2009)
 - 홍희철, 최정연, 손영란, 마승진. 미생물발효차의 미생물 및 기능성 대사물질 탐색. 한국차학회 (2009)
 - WEN YIHUA, 신경미, 신기호, 마승진, 문제학, 은종방. 보성산 찻잎을 이용하여 제조한 국산 미생물발효차의 영양성분. 한국차학회 (2010)
 - WEN YIHUA, 은종방. 가압 및 방사선 살균 후 *Asperigillus niger*, *Penicillium glabrum* 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종한 미생물발효차의 이화학적 특성 조사. 한

국차학회 (2010)

- WEN YIHUA, 신경미, 신기호, 마승진, 문제학, 은종방. 한국산 미생물발효차의 이화학적 특성. 한국식품과학회 (2010)
 - 김수희, 김기안, 정종훈, 김귀덕, 이형재, 마승진, 박근형, 문제학. 미생물발효차의 화학성분 분석과 생리활성 평가. 한국식품과학회 (2010)
 - 윤하얀, 손영란, 고기봉, 정재천, 최정연, 천길용, 마승진. 미생물발효차의 발효관련 미생물 및 기능성 분석. 한국식품과학회 (2010)
 - WEN YIHUA, 마승진, 황수정, 은종방. 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차의 이화학적 특성. 한국차학회 (2011)
 - 왕승진, 이형재, 김수로, 이기훈, 마승진, 강성구, 박근형, 문제학. 미생물발효차(보이차)의 품질 평가 지표 설정을 위한 휘발성 성분 분석. 한국식품과학회 (2011)
 - Y.-L. Son, L. Zhang, P.-L. Jung, G.-Y Cheon, H.-K. Kim, S.-H. Park, S.-J. Ma. Sensory Evaluations and Biological Activities of the Microbial Fermented Tea Manufactured by Various Fermentation Conditions with Korean Native Tea Cultivar. Korean Society of Food Science and Technology (2011)
- 연구인력활용 및 양성 성과: 4명
- 강대진. *Aspergillus niger*를 이용한 미생물발효차의 제조. 전남대학교 대학원 2009년 석사학위논문
 - Yi Hua Wen. microbial fermented tea prepared with a mixture of organisms of fungi and yeast after sterilization with different methods. 전남대학교 대학원 2010년 석사학위논문
 - 박성화. 미생물발효차의 품질 및 보존기간 판별을 위한 평가지표 검토. 전남대학교 대학원 2010년 석사학위논문
 - 박정은. 보이차(미생물발효차)의 품질 평가를 위한 지표 설정에 관한 연구. 전남대학교 개발대학원 2011년 석사학위논문
- 기타(단행본 발간) 실적
- 마승진, 신기호, 박용모, 미생물발효차의 이해 (2009.5)

2. 활용계획

- 미생물발효차의 제조방법 (기술이전, 2011년)
- 발효 우수 균주를 이용한 관능적, 기능적 품질이 우수한 미생물발효차의 제조기술 (특허 출원 2011년, 기술이전 2012년)
- 이화학적 평가 지표를 통한 미생물발효차의 품질관리 기술 (기술지도, 2011년)

SUMMARY

I. Title: Development of production method for korean microbial fermented tea

II. Objectives and Significance

- Recently a risk is raised because of the increasement of the total stock of domestic green tea. The cause of the total stock accumulation is partly in the over production of domestic tea leaves but mainly in the rise of import of lower-priced tea products and fermented teas including puer tea.
- As the citizen's interest in health rises, the import of foreign microorganism fermented tea which is known to have the function of anti-obesity, antihypertensives is increasing dramatically. On the other hand, within our country generally over 90% of tea products are green tea based.
- With a measure for this and for the reduction of domestic green tea stockpile, an establishment of standardization and scientific manufacturing technique using Korean tea leaves for Korean microbial fermented tea is needed. Because this fermented tea has over 10 times the high value compared to green tea products, creating a new blue ocean market is possible by developing surplus tea leaves into microbial fermented tea and this would contribute greatly to the tea cultivating farmhouses, the gains of domestic tea manufacturing industry and activation of regional economy.
- For this, in this research, it is intended to establish manufacturing technique based on scientific analysis about fermenting mechanism, functional superiority, confirmed safety, etc of microbial fermented tea using Korean tea leaves.

III. Results

- The objeives of this studies are to revitalize tea industry through advancement in practicality of domestic tea leaves and expansion of domestic tea market is the purpose by developing high quality microbial fermented tea out of Korean tea leaves.
- The major researches in this study are as following.

- Developing manufacturing technique of microbial fermented tea using Korean tea leaves through scientific explanation regarding microbial fermented tea.
- Establishing scientific product quality standardization by analyzing physicochemical characteristics and physiological effect of microbial fermented tea.
- Arranging scientific basis for superiority in functional effect and safety confirmation of new Korean microbial fermented tea.

1. Investigation of tea manufacturing process and physicochemical characteristics of foreign microbial fermented tea

- Tea manufacturing progress of foreign high quality microbial fermented tea through literature and field investigation was analyzed.
- To establish the product quality standardization of microbial fermented tea, the physicochemical and microbial characteristic after securing about 30 kinds of Chinese microbial fermented tea with precise history were studied.
- As the result of 18S rRNA analysis after separating microorganisms from microbial fermented tea, 8 kinds of mold and yeast existed and among them, *Aspergillus* and *Penicillium* were confirmed as the main microorganisms.
- Rearing pattern of these microorganisms being closely related with catechin's antimicrobial effect, an obstruction effect between microorganisms was hinted
- As the main microorganisms of microbial fermented tea turned out to be mold in *Aspergillus* and *Penicillium*, an analysis method of aflatoxin and ochratoxin which are toxins produced by the strains was established.
- Using the established analyzing method, about 90 kinds of microbial fermented tea was analyzed and as a result, existence of aflatoxin from 4 kinds of sample was suggested but the amount did not exceed the permissible content in food regulation.
- In physicochemical analysis in most of microbial fermented tea, moisture content was 7~10%, total nitrogen content 4~5%, crude fat content 0.6~0.9%, crude fiber content 12~15%, crude ash content 5~7%, soluble solid content 20~25%, pH 5~6, and total acidity 1.0~1.3%.
- In here, total nitrogen content was lower when used high class tea leaves as an ingredient compared to the lower quality matured tea leaves and in contrast, crude fat content was

higher when used the young high quality tea leaves compared to the lower quality matured tea leaves.

- As the storage period increased, pH, total acidity, and total phenol content increased.
- In result of analysis of the nutrition composition for most of the Chinese microbial fermented tea, major organic acids were oxalic acid, maleic acid, and citric acid and generally, high content was found in microbial fermented tea made with high quality raw material.
- In mineral analysis, Ca, P, K, and Mg were the major minerals microbial fermented tea.
- As the result of examining the relation between sensual preference and physico-chemical characteristics, fermented teas with high sensual grade showed higher soluble solid content than other samples.
- As the result of analysis of fermented tea's flavor component regarding sensory evaluation, methyl- and methoxy- derivatives were detected in samples with low sensory score but almost nothing was detected in samples with high sensory score. Therefore, a possibility that this compound is the flavor component for deciding sensory preference was suggested.
- After measuring antioxidant activity of microbial fermented tea, it was found that DPPH scavenging effect and nitrite scavenging effect were lower than green tea and oolong tea but iNOs formation prevention activity showed higher activity than green tea and oolong tea.
- As a result for investigating statins which are known to have an effect for decreasing blood cholesterol from microbial fermented tea, as the fermentation progresses statins content increased so the possibility that the microorganism in fermented tea might create statins during metabolism was suggested.

2. Manufacturing progress investigation of Korean microbial fermented tea using domestic tea leaves and analyzing physicochemical characteristics

- With the invited foreign microbial fermented tea technician, domestic production environment application test of microbial fermented tea using domestic tea leaves was operated. That is, after manufacturing fermented tea in Korea using indigenous and introduced species tea leaves that are cultivated within country and raw materials of leaf of foreign fermented tea, production possibility of microbial fermented tea in Korea was examined by

investigating and comparing microorganism growth behavior, bioactive components, flavor compounds, nutrition composition and physicochemical characteristics during fermentation.

- Fermentation condition and major microorganism's behavior for each fermentation step while manufacturing microbial fermented tea with introduced foreign manufacturing technique were investigated. Under the most of the conditions during an early stage of fermentation, *Aspergillus niger* was highest in growth rate as one of major microorganisms. And as the fermentation progressed it decreased gradually and penicillium's growth was observed. Moreover, as the growth pattern of the fermentation-related main strains of the microbial fermented tea manufactured by the present researchers using same Chinese raw material tea and the microbial fermented tea manufactured from foreign microbial fermented tea manufacturing factory seems similar, it was confirmed that industrialization application of domestic microbial fermented tea manufacturing process is possible.
- There was a tendency showing that L value of tea extract decreased after fermentation and value of a and b increased due to the fermentation but Chinese fermented tea showed significantly high and it was possible to see the color changing to the very dark red and yellow.
- pH increased remarkably after fermentation and pH of raw material tea manufactured with domestic native kind and microbial fermented tea manufactured with this raw material tea was significantly high compared to the other teas but when fermented tea manufactured with Chinese raw material tea was compared to other microbial fermented tea, it showed remarkably low value.
- Acidity had tendency of increasing due to the fermentation and the fermented tea manufactured with Chinese material tea showed significant high value compared to the other fermented tea.
- Soluble solid content of microbial fermented tea had tendency of increasing after fermentation and the fermented tea manufactured with Chinese raw material tea showed the highest value.
- Water activity of microbial fermented tea also showed tendency of increasing after fermentation and especially the microbial fermented tea manufactured with Korean small leaf green tea had significant high value compared to the other microbial fermented tea in moisture content and water activity.
- In the organic acid analysis of microbial fermented tea, maleic acid was a major organic

acid. The most organic acids increased with increasing fermentation time, showing much higher content of organic acid after fermentation than one before fermentation.

- Seventeen kinds of free amino acids were detected from raw material tea and 11 kinds of them were detected from microbial fermented tea. Glutamic acid and alanine were major free amino acids in all the raw material tea and the microbial fermented tea.
- The total free amino acid content showed a trend to decrease significantly compared to raw material tea and among them, it from the microbial fermented tea made of Chinese raw material tea decreased much more.
- Among the teas made by our research team, the sugar content of microbial fermented tea made of raw material tea showed a trend to decrease after fermentation.
- In the microbial fermented tea made of Chinese raw material tea, the CE-OOH production preventing ability of rat blood plasma in the microbial fermented tea made of young tender leaves, high quality tea was higher than in one made of matured tea leaves, low quality tea. The results suggested that it would be considered to use young tea leaves for the microbial fermented tea rather than matured ones when considering functional effects.
- The shelf-life of the microbial fermented tea was not shown in the positive correlation with the CE-OOH production preventing ability of rat blood plasma.
- The tocopherols in the teas could be esterified between hydroxy radical in their chroman ring and a unknown compound. And the longer the storage time of a tea was, the less the tocopherols content was.
- In the microbial fermented tea made from China, the δ -tocopherol content in low quality tea decreased as storage time increased, whereas the content in high quality tea little decreased, even with increasing storage time. It suggested that the δ -tocopherol content would be one of the best index to evaluate the shelf-life of microbial fermented tea.
- All the microbial fermented teas inhibited L-citrulline forming ability, depending on their concentration compared to the control. Among 7 kinds of microbial fermented teas manufactured by our research team, the microbial fermented tea made of domestic native tea leaves showed higher its inhibition effect than the fermented tea made of Chinese raw material tea did. It suggested that it would be possible to develop a good microbial fermented tea having good inhibition effect of L-citrulline forming ability when using domestic native tea leaves for microbial fermented tea.
- In the analysis of statin compounds which could be existed in microbial fermented tea and

have the effect for cardiovascular disease, compactin-H and Lovastatin-H was confirmed in all tea samples. And the content of statin compounds in the microbial fermented tea made of domestic native tea leaves was higher than that made of Chinese raw material tea.

- In the analysis of microbial fermented teas from China, the higher the tea quality was, the lower the content of methyl caprate was. It suggested that methyl caprate would be a good index for quality evaluation of microbial fermented tea.
- An analytical method for aflatoxin and ochratoxin which could be one of potentials for food hazard in microbial fermented tea was established. And in the result of monitoring the microbial fermented tea made by our research team, neither aflatoxin nor ochratoxin was detected from all the 7 kinds of microbial fermented teas made of both domestic tea leaves and tea leaves from foreign contry.
- In conclusion, Korean native tea leaves, a species of small tea leaves would be used to manufacture a microbial fermented tea, instead of utilization of a species of large tea leaves which have been used for it in the foreign countries.

3. Analysis of physiochemical characteristics and standardization of manufacturing technique of microbial fermented tea with domestic native tea leaves from Korea

- After manufacturing the microbial fermented tea at the different conditions; variation in fermentation temperature, moisture content of raw material tea (*Mocha*), fermentation strain, and fermentation method, using the domestic tea leaves from Korea, sensory evaluation was carried out for investigation of the optimum fermentation condition for manufacturing the microbial fermented tea with the sensory indices.
- Sensory evaluation provides the optimum fermentation temperature and moisture content of the domestic tea leaves in the *Mocha* manufactured with the domestic tea leaves at different fermentation temperature, 35°C-55°C (i.e. 35, 45, 50 and 55°C) and moisture content, 30% - 50% (i.e. 30, 40, 45 and 50%) for 35 days fermentation time (turned over at the interval of 7 days). The results suggested that fermentation at the temperature of 45°C and the moisture content 40% was the best in the respect to color, taste, and flavor of the microbial fermented teas.
- Consequently, it also showed that microbial fermented tea which is fermented with 7 days × 5th turn over (for 35 days) has the highest score and it suggested that 35 days of the

fermentation time would be the most desirable.

- Each microbial strain was mixed with another and inoculated in order to investigate the production possibility of microbial-fermented tea by the inoculation and fermentation of the strain. Microbial-fermented tea fermented at the temperature of 45°C and moisture content of 40% was produced, and conducted sensory evaluation. Consequently, fermented tea inoculated with microbial strains was better than naturally fermented tea, and as the number of inoculated strain was increased, the product was perceived as better quality.
- For the suitability of fermentation, 15 kinds of microorganisms were considered as appropriate among all 34 kinds of microorganisms for domestic microbial fermented tea,
- It is desirable to use the mixture of selected 15 kinds of microorganisms for microbial fermented tea which produce better quality than other microbial fermented tea.
- Korean tea (*Camellia sinensis*) leaves were harvested in May, June, and July and Chinese *Mocha* collected at the end of May. They were fermented with inoculation of 15 kinds of microbial strain at the temperature of 45C and moisture content 40%. And sensory evaluation was conducted to select the optimum condition based on raw materials. Consequently, the microbial fermented tea, which was prepared from tea leaves collected on the month of July, was better than the tea which was prepared from the leaves collected on the other months in respect to sensory parameters.
- Therefore, in manufacturing the microbial fermented tea by using Korean tea leaves, manufacturing by using the low-priced matured tea leaves collected at the end of July or early August was relatively better than the tea, which was prepared by using the high-priced young tea leaves collected in May could be desirable.
- Gallic acid content, one of the special compounds in the microbial fermented tea could be a good parameter to determine optimum fermentation time because it was very low in the microbial fermented tea, in which was not completed.
- In addition, the microbial fermented tea was evaluated better in sensory quality when having the content of gallic acid in about 5~40 mg per 100g. Much higher or much lower level of gallic acid in the products could affect their sensory properties badly.
- The microbial fermented tea having very low content of methyl caprate, a special component of fermented tea, was shown better preference in sensory evaluation. Therefore, methyl caprate content would be a good parameter for their sensory quality.
- In the microbial fermentation, temperature of fermentation at 45°C and moisture content

40% and the gallic acid content 5~40 mg per 100g were the optimum condition. A good fermentation condition would be to achieve the low level of methyl caprate content.

- The result of physicochemical characterization and quality evaluation of microbial fermented tea suggested that total nitrogen content, pH, soluble solid content, total free amino acids content could be good quality assessment indicators for microbial fermented tea. However, the further studies should be conducted to establish standards and grading indices for the microbial fermented tea in the future.
- The quality parameter such as color, total acidity and total sugar, fluorine and theanine content did not show any kinds of correlation with processing method and fermentation condition of raw material. Therefore, it would be very difficult to use them as the quality parameters of the microbial fermented tea.

CONTENTS

Introduction	1
1. The measurement of foreign microbial fermented tea manufacturing process and physico-chemical properties	7
A. Materials and methods	8
(1) Sample list of microbial fermented tea	8
(2) Isolation and identification of microorganism from microbial fermented tea	9
(3) Behavior of major microorganisms during microbial fermented tea manufacturing process	9
(4) Analysis of mycotoxin in microbial fermented tea	9
(5) Sensory evaluation	13
(6) Proximate analysis	14
(7) Measurement of physico-chemical properties	14
(8) Nutritive components analysis	15
(9) Analysis of catechins and caffeine	17
(10) Analysis of gallic acid	18
(11) Extraction of Volatile matter and GC/MS analysis	18
(12) Determination of antioxidant activity	19
(13) HPLC analysis of statins	20
B. Results and Discussion	22
(1) Measurement of microbial fermented tea manufacturing process by literature and field investigation	22
(2) Analysis of major factor of foreign microbial fermented tea	31
(3) Analysis of physico-chemical compound in foreign microbial fermented tea	57
(4) Measurement of bioactivity and functional compound in foreign microbial fermented tea	63
C. Summary	74
2. The investigation of Korea microbial fermented tea manufacturing process and physico-chemical properties	76
A. Materials and methods	76
(1) Manufacture of microbial fermented tea using native tea leaves	77
(2) Behavior of major microorganisms during microbial fermented tea manufacturing	

process	77
(3) Proximate analysis	78
(4) Measurement of physico-chemical properties	78
(5) Nutritive components analysis	79
(6) Analysis of special components	80
(7) Measurement of bioactivity	82
(8) GC/MS analysis of volatile matter	85
(9) Measurement of mycotoxin	86
B. Results and Discussion	87
(1) Manufacture of Korea microbial fermented tea using native tea leaves	87
(2) Measurement of temperature and water contents during microbial fermented processing	91
(3) Behavior of major microorganisms during microbial fermented tea manufacturing process by different raw tea and fermentation condition	95
(4) Measurement of physico-chemical properties in Korea microbial fermented tea manufacturing process	125
□ Proximate analysis	125
□ Measurement of physico-chemical properties	128
□ Nutritive components analysis	135
④ Analysis of special components	140
⑤ Measurement of bioactivity	144
⑥ GC/MS analysis of volatile matter	147
⑦ Measurement of mycotoxin	156
C. Summary	156
3. The establishment of Korea microbial fermented tea manufacturing process and physico- chemical properties analysis	160
A. Materials and methods	160
(1) Manufacture of Korea microbial fermented tea using native tea leaves	161
(2) Sensory evaluation of Korea microbial fermented tea using native tea leaves	161
(3) Behavior of major microorganisms during microbial fermented tea manufacturing process	162
(4) Methods of physico-chemical properties and Proximate analysis	162

(5) Analysis of Special components	165
(6) Measurement of bioactivity	166
(7) Measurement of mycotoxin	167
B. Results and Discussion	169
(1) Manufacture of Korea microbial fermented tea using native tea leaves	169
(2) Organize a sensory evaluation team and Sensory evaluation of Korea microbial fermented tea	170
(3) Investigation of optimal fermentation condition of Korea microbial fermented tea using native tea leaves	172
(4) Analysis of Special components in Korea microbial fermented tea using native tea leaves	181
(5) Measurement of physico-chemical properties and Proximate analysis in Korea microbial fermented tea	207
(6) Analysis of nutritive components in Korea microbial fermented tea	219
(7) Behavior of major microorganisms during microbial fermented tea manufacturing process	222
(8) Investigation of bioactivity from Korea microbial fermented tea and measurement of functional compound	224
(9) Analysis of mycotoxin in Korea microbial fermented tea	224
(10) Production of prototype	228
C. Summary	228
References	236

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
1.	연구개발의 목적 및 필요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	2
1.	미생물발효차에 대한 국외 기술개발 및 연구현황	2
2.	미생물발효차에 대한 국내 기술개발 및 연구현황	3
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	4
제 1 절.	이론적, 실험적 접근방법	4
제 2 절.	연구내용	5
제 3 절.	실험결과	7
1.	외국산 미생물발효차의 제다공정 및 이화학적 특성분석	7
가.	재료 및 방법	8
(1)	미생물발효차 시료	8
(2)	미생물발효차에 관여하는 주요 미생물의 분리 및 동정	9
(3)	미생물발효차 제조과정 중 주요 미생물의 거동	9
(4)	미생물발효차의 곰팡이 독소 분석	9
(가)	Aflatoxin 분석	9
(나)	Ochlatoxin 분석	11
(다)	Patulin 분석	13
(5)	관능검사	13
(6)	일반성분 분석	14
(7)	이화학적 특성분석	14
(가)	색도	14
(나)	pH 및 산도	14
(다)	가용성 고형분	14
(라)	총 페놀 성분	14
(마)	통계처리	15
(8)	영양성분 분석	15
(가)	유기산	15
(나)	유리당	15
(다)	총당	15

(라) 무기원소	16
(마) Vitamin E(α -Tocopherol)	16
(바) Vitamin C(Ascorbic acid)	16
(9) Chemical profile 비교를 위한 분석시료 조제 및 카테킨류와 카페인 분석	17
(10) Gallic acid	18
(11) SDE 장치를 이용한 향기성분 추출 및 GC-MS 분석	18
(12) 항산화활성 평가	19
(가) RAW 264.7 세포주를 이용한 NO 및 L-citrulline 생성억제 작용	19
(나) DPPH 및 아질산염 소거능 측정	20
(13) 항고혈압 기능성분인 statin 화합물 탐색	20
(가) statin 유도체 6종 구입 및 합성	20
(나) 시료 추출 및 정제와 HPLC 분석	21
나. 결과 및 고찰	22
(1) 문헌 및 현지탐사를 통한 제다공정 분석	22
(가) 미생물발효차의 역사와 종류	22
(나) 미생물발효차 생산 환경 분석	24
(다) 미생물발효차의 제다공정 분석	26
(2) 외국산 고품질 미생물발효차의 제다공정 주요 팩터 분석	31
(가) 미생물발효차로부터 주요 미생물 분리 및 동정	31
(나) 미생물발효차 저장 중 주요 미생물의 거동 분석	54
(다) 차 추출물과 주요 미생물의 생육과의 관계	55
(라) 미생물발효차의 미생물 독소 진단항목 설정 및 분석	56
(3) 외국산 미생물발효차의 이화학적 성분(일반성분, 특수성분, 향기성분 등)분석	57
(가) 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분	57
(나) 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분 분석	58
(다) 관능적 등급에 따른 미생물발효차의 이화학적 성분 및 향기성분 차이	59
(4) 외국산 미생물발효차의 기능성분 및 기능성 분석	63
(가) 항고혈압 기능성 지표성분으로서의 Statin 화합물 탐색	63
(나) HPLC 분석에 의한 카테킨류와 카페인의 정량	66
(다) 미생물발효차의 Vitamin E(Tocopherol) 분석	68
(라) 항산화활성 분석	72
(마) 미생물발효차의 동맥경화 예방효과 검증	72

다. 요약	74
2. 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조공정 검토 및 이화학적 특성분석 ·	76
가. 재료 및 방법	76
(1) 실험재료	76
(2) 실험방법	77
(가) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조	77
(나) 미생물발효차의 발효과정 중 주요 미생물의 거동	77
(다) 일반성분 분석 방법	78
(라) 이화학적 특성 분석	78
(마) 영양성분 분석	79
(바) 특수성분 분석	80
(사) 생리활성 평가	82
(아) 향기성분 분석 (GC-MS)	85
(마) 곰팡이 독소 분석	86
나. 결과 및 고찰	87
(1) 국내산 찻잎을 이용한 발효차 생산 환경 적용	87
(가) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조	87
□ 외국 발효차 기술자 초청 및 기술이전	87
□ 미생물발효차의 제조방법(습식발효법)	87
□ 미생물발효차의 제조조건	88
(나) 미생물발효차의 발효과정 중 온·습도 변화	91
(다) 찻잎의 종류 및 발효조건에 따른 발효과정 중 주요 미생물의 거동	95
□ 미생물발효차로부터 주요 미생물 분리 및 동정	95
□ 발효과정 중 주요 미생물의 거동	115
□ 미생물발효차에서 존재가 확인된 미생물의 종류	123
(2) 한국산 미생물발효차의 발효과정 중 이화학적 성분 변화	125
(가) 일반성분 분석 결과	125
(나) 이화학적 특성 분석 결과	128
(다) 영양성분 분석 결과	135
(라) 미생물발효차의 특수성분 분석	140
(마) 미생물발효차의 생리활성 평가	144
(바) 향기성분의 GC-MS 분석	147

(사) 미생물발효차의 미생물 독소 분석	156
다. 요약	156
3. 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조기술 확립 및 이화학적 특성 분석	160
가. 재료 및 방법	160
(1) 실험재료	160
(2) 실험방법	161
(가) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조	161
(나) 제조된 미생물발효차의 관능평가	162
(다) 미생물발효차의 발효과정 중 주요미생물의 거동	162
(라) 이화학적 특성 및 일반성분 분석 방법	162
(마) 특수성분 분석	165
(바) 기능성 평가	166
(사) 곰팡이독소 분석	167
나. 결과 및 고찰	169
(1) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조	169
(2) 제조된 미생물발효차의 관능평가(관능평가단 구성)	170
(3) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 발효조건 탐색	172
(가) 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효온도 및 수분함량 탐색	172
(나) 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효기간 탐색	173
(다) 중국산 대엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 발효조건	174
(라) 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성 탐색	175
(마) 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 원료적합성 탐색	178
(바) 국내산 찻잎의 최적 발효방법 탐색	180
(4) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 특수성분 분석	181
(가) 미생물발효차의 gallic acid 분석	181
(나) 휘발성 향기(methyl carprate) 분석	188
(다) 미생물발효차의 Tocopherol류 분석	195
(5) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 이화학적 특성 및 일반성분 분석	207
(가) 총질소	207
(나) 색도	209
(다) pH 및 총산도	212

(라) 가용성 고형분	214
(마) 총당	216
(바) 총유리아미노산	217
(6) 미생물발효차의 영양성분 분석	219
(가) 불소	219
(나) 데아닌	221
(7) 미생물발효차 제조과정 중 생육 미생물의 거동	222
(8) 미생물발효차의 기능성 및 기능성분 평가	224
(가) L-citrulline 생성억제 활성 측정	224
(나) Statin 화합물 분석	225
(9) 제조된 미생물발효차의 식품위해 요소 분석	226
(10) 국내산 차잎을 이용한 미생물 발효차 시제품 제작	228
다. 요약	228
제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	232
1. 실용화 · 산업화 계획(기술실시)	232
2. 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 성과 및 계획	232
3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 성과 및 계획	233
4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획	235
제 5 장 참고문헌	236

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

- 국내 차 생산량은 2005년 3,309톤, 2006년 4,080톤, 2007년 4,352톤으로 점차적으로 증가하는 추세에 있으나 잔류 농약 파동 및 소비자 기호 다양화 등의 영향으로 국내 소비량이 감소함에 따라 국산 녹차 재고량이 2005년 130톤, 2006년 900톤, 2007년 1,200톤에 이르는 등 해마다 증가하는 심각한 문제에 직면하고 있다.
- 녹차 재고 증가의 원인은 국내 차원의 과잉생산보다 저가의 차 제품과 중국산 보이차를 비롯한 발효차의 수입이 증가한 것이 주된 원인이다.
- 자료(농산물유통공사 및 한국차생산자연합회 자료)에 따르면 2007년 기준 공식적으로 수입된 발효차만 900톤이며 비공식적으로 수입된 양을 합하면 1,200톤 이상의 발효차가 국내로 유입되고 있는 것으로 추정되어 이에 대한 대처와 대외 경쟁력 강화 방안이 절실히 필요한 상황이다.
- 특히 외국산 미생물발효차(보이차)가 항비만 등의 기능성이 있다고 알려지면서 최근 그 판매량이 급증하고 있을 뿐 아니라 터무니없이 고가로 판매되고 있어 국고낭비와 함께 국가적 위상을 저하시키는 요인으로도 작용하고 있다.
- 외국산 미생물발효차가 국내에서 대량 유통·판매됨에 따른 심각한 문제점들은 다음과 같다.
 - 유해 미생물 및 대사산물에 대한 안전성 미확보
 - 저급 및 고급 차의 판별기준 미확보
 - 오래된 미생물발효차가 고급이라고 판단할 수 있는 과학적 근거 부족
 - 규격화된 미생물발효차의 생산법 미확립
 - 함유성분의 화학적 및 분석학적 연구미비
 - 구전되고 있는 기능성 및 기능성분에 대한 과학적 근거 부족
- 반면, 국내에서는 차원의 90%이상이 녹차로 가공되고 있는 녹차 일변도의 가공시스템이기 때문에 이에 대한 대처가 시급한 실정이다.
- 또한, 발효차는 녹차제품에 비해 10배 이상의 고부가가치를 가지고 있기 때문에 국내의

잉여 찾임을 이용하여 미생물발효차로 개발함으로써 4,000억원 규모의 새로운 블루오션 시장 창출이 가능할 것으로 생각된다.

- 따라서 발효차 수입 억제, 국민건강의 보호, 국내 차 생산량의 수급 조절 및 관련 산업 활성화 측면에서 국내산 찾임을 이용한 국산 미생물발효차의 개발이 필요하다고 생각되었다.
- 현재 발효차 제조에 주로 사용되는 품종은 중국 운남성이나 열대 지방에서 재배되고 있는 대엽종으로 소엽종인 국내품종으로 발효차를 제조하였을 경우 맛이나 수량에서 크게 뒤질 것이라는 우려가 있으므로 국내에서 현재 재배되고 있는 품종에 알맞은 처리 방법을 탐색할 필요가 있다.
- 이를 위해서는 먼저 외국의 미생물발효차에 대한 분석 및 벤치마킹, 두 번째로 우리나라 찾임을 이용한 제조 가능성 확인, 마지막으로 우리나라의 재료와 환경에 맞는 미생물발효차의 제조기술 확립의 단계를 거치는 체계적인 기술개발이 필요하다고 생각되었다.
- 또한 이러한 문제를 해결하기 위하여 미생물발효차의 발효메커니즘에 대한 과학적 연구, 미생물발효차의 이화학적 성분 및 기능성분 분석, 안전성 확보 등의 종합적인 연구가 진행된다면 고품질의 차별화된 한국형 미생물발효차를 제조할 수 있는 기술을 개발할 수 있을 것으로 판단되어 이러한 방향으로 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 미생물발효차에 대한 국외 기술개발 및 연구 현황

- 미생물발효차의 주 생산국은 중국으로 운남, 사천, 호남성을 중심으로 생산되고 있으며 1973년 운남성 곤명차장에서 속성발효법을 개발한 이후로 현재까지 이 방법을 주로 이용하여 생산하고 있다.
- 미생물발효차에 대한 연구는 중국 운남성 농업과학원 맹해 다엽시험장을 중심으로 제

다기술개발, 육종 등의 연구를 진행하고 있으나 과학적인 제조기술을 아직 완성하지 못한 단계로 품질의 표준화 안정성 등의 문제를 해결하고 있지 못한 상태이다.

- 최근의 중국내 미생물발효차 생산은 점차 기업화 방향으로 발전하고 있으며 베트남 등 지에서도 미생물발효차 생산 공장이 들어서는 등 점점 확대되고 있는 추세이나 제조 기술 및 생산 환경은 대부분 매우 낙후되어 있는 실정이다.
- 미생물발효차에 대한 연구보고 역시 최근 들어 활발해지고 있으나 미생물발효차에서 생육하고 있는 미생물에 대한 일부 보고와 간단한 성분분석 등이 대부분인 수준이어서 아직 과학적인 해명이 거의 이루어지지 않은 실정이다.
- 기능성 연구에 있어서도 항비만, 콜레스테롤 저하, 혈당 저하, 당뇨우울증 억제 효과, 간암세포에서의 고지혈증 차단 등의 분야에서 일부의 기초적 연구가 진행되어 있을 뿐 과학적인 성과는 미비한 편이다^{1,2)}.

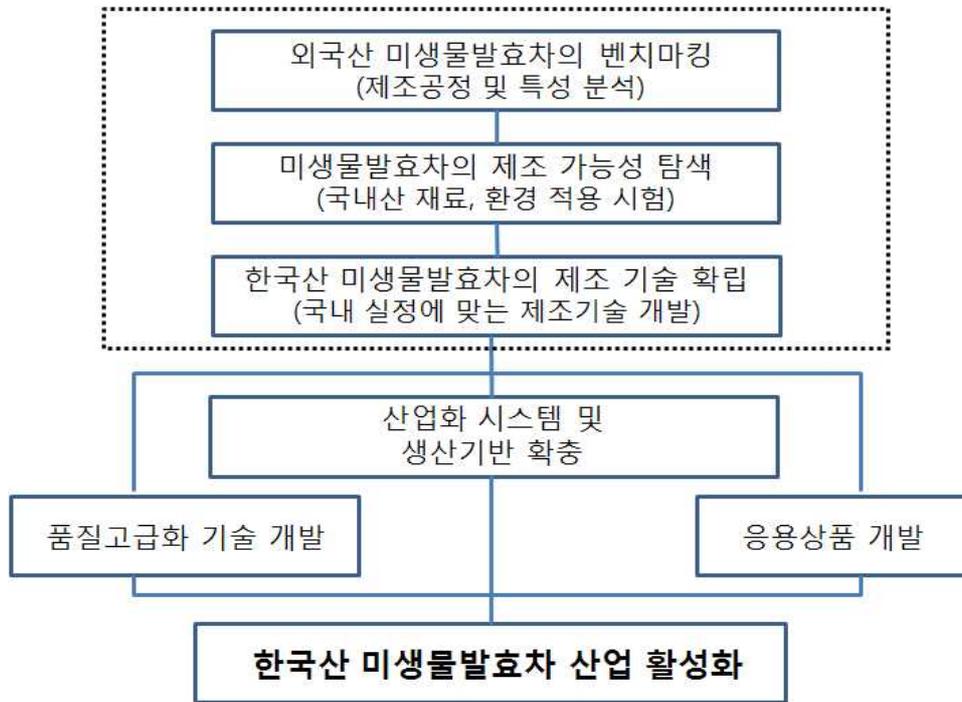
2. 미생물발효차에 대한 국내 기술개발 및 연구 현황

- 연구를 막 시작하는 기초단계로 전통적인 미생물발효차 제조 기술을 재현하기 위하여 일부 개인과 사업체, 연구회 등에서 시도한 바 있으나 극히 초보적인 단계이며 과학적인 근거 없이 진행되었기 때문에 표준화 및 산업화에 도달하기 어려운 수준이다.
- 국내에도 중국의 미생물발효차와 비슷한 전통 떡차가 있으나 중국의 미생물발효차와는 차이가 있으며 일부 기업에 의하여 보이차를 이용한 콜레스테롤 저하용 조성물 및 보이차가 함유된 액상차의 제조 등 단순한 부분에 대하여 특허 출원을 한 바 있으나 이를 이용한 실질적인 활용은 아직 미비한 실정이다.
- 국내에서도 화학적인 성분 및 과학적인 품질 기준에 대하여 일부 연구를 시도한 흔적은 보이나 이에 대한 의미있는 연구 성과는 아직 도출되지 못한 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적, 실험적 접근방법

- 앞서 언급한 바와 같이 미생물발효차는 3000여년전 중국 운남지역에서 제조되기 시작하여 1973년 속성발효법을 개발된 것을 계기로 대중화에 성공하였다. 따라서 현재까지 시장의 대부분을 차지하고 있는 미생물발효차는 중국에서 제조되며 대부분 1973년에 개발된 속성발효방식에 의하여 제조되고 있다.
- 현재 중국에서 제조되고 있는 미생물발효차는 대부분 온도와 습도에 대한 컨트롤을 기술자의 감각에 의하여 조절하고 있으며 온도와 습도를 유지하기 위하여 수톤 이상의 대량의 모차를 한꺼번에 쌓아서 발효를 진행하기 때문에 소규모의 미생물발효차의 제조가 불가능하며 품질 균일화를 이루기 어렵다는 단점이 있다.
- 제조환경 또한 대단히 열악한 상태이며 제조기술 및 특성 분석에 대한 과학적인 연구도 부족해 정보도 충분 하지 않은 실정이다. 최근에는 이러한 기술마저도 미생물발효차가 인기를 끌면서 자국의 미생물발효차 제조기술이 해외로 유출되는 것을 극도로 꺼리고 있는 실정이다.
- 중국의 보이차를 비롯한 대부분의 미생물발효차는 대엽종 찻잎(*Camellia sinensis* var. *assamica*)을 원료로 제조되고 있으나 우리나라의 거의 대부분 소엽종의 찻잎(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)만이 생산되고 있어 원료 특성에 대한 염려도 존재하고 있는 상황이었다.
- 따라서 국내에서 미생물발효차를 생산하기 위한 기술을 확보하기 위해서는 먼저 외국의 미생물발효차 제조 공정을 벤치마킹하고 품질특성을 분석함으로써 공정의 주요 팩터를 파악해야 할 것으로 생각되었다. 이어서 주요 팩터를 기준으로 국내산 찻잎과 환경에서 제조가 가능한지 가능성을 파악한 후 최종적으로 파악된 정보에 기반하여 기술을 개발하는 것이 바람직하다고 생각되었다.
- 이를 위해 미생물발효차의 미생물학적, 이화학적 특성을 과학적으로 분석하고, 이를 바탕으로 국내의 환경과 소재에 적합한 미생물발효차의 생산 기술을 확보하고자 노력하였다.



한국산 미생물발효차 산업 활성화를 위한 과정(안)

(점선의 상자안의 과정이 본 과제에서 수행된 내용임)

제 2 절 연구내용

- 국내산 찻잎을 이용하여 고품질의 미생물발효차를 개발함으로써 국내산 찻잎의 활용도 증진과 국내산 차시장 규모 확대를 통한 차산업 활성화를 목적으로 하였다.
- 이 목적을 달성하기 위하여 본 연구에서 수행된 주요 연구내용은 다음과 같다.
 - 미생물발효차에 대한 과학적 해석을 통하여 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차 제조 기술 개발
 - 미생물발효차의 이화학성분 및 기능을 분석함으로써 과학적 품질평가 기준 확립
 - 새로운 한국산 미생물발효차의 기능적 우수성과 안전성 확보를 위한 과학적 근거 마련

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>외국산 미생물 발효차의 제조 공정 및 이화학적 특성 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 문헌 및 현지탐사를 통한 제조공정 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차의 역사와 종류 ○ 미생물발효차의 생산 환경 분석 ○ 미생물발효차의 제조공정 분석 2. 외국산 고품질 미생물발효차의 제조공정 주요 팩터 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차로부터 주요 미생물의 분리 및 동정 ○ 미생물발효차 저장 중의 주요 미생물의 거동 분석 ○ 차 추출물과 주요 미생물 생육과의 관계 ○ 미생물발효차 안전관리 진단항목 설정 및 분석 3. 외국산 미생물발효차의 지표성분(일반성분, 특수성분, 향기성분) 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 일반성분 및 색도 분석 ○ 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분 분석 ○ 관능적 등급에 따른 이화학적 성분 및 향기성분의 차이 분석 4. 외국산 미생물발효차의 기능성분 및 기능성 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 항고혈 기능성 지표성분으로서의 statin화합물 탐색 ○ 카테킨류와 카페인의 정량 ○ Vitamin E(α-tocopherol)의 분석 ○ 항산화 활성 분석 ○ 동맥경화 예방효과 검정
<p>국내산 차잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조공정 검토 및 이화학적 특성 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 국내산 차잎을 이용한 발효차 생산 환경 적용 <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 차잎을 이용한 미생물발효차의 제조 ○ 미생물발효차 발효과정 중 온/습도 변화 ○ 차잎의 종류, 발효조건에 따른 발효과정 중 주요 미생물의 거동 2. 한국산 미생물발효차의 발효과정 중 이화학적 성분 변화 <ul style="list-style-type: none"> ○ 일반성분 분석 및 이화학적 특성 분석 ○ 영양성분 분석 ○ 미생물발효차의 특수성분 분석 ○ 미생물발효차의 생리활성 평가 ○ 향기성분의 GC-MS 분석 ○ 미생물발효차의 미생물 독소 분석

연구개발의 목표	연구개발의 내용
<p>국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조기술 확립 및 이화학적 특성 분석</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조 2. 관능평가단 구성 및 제조된 미생물발효차의 관능평가 3. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 발효조건 탐색 <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효온도 및 수분함량 탐색 ○ 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효기간 탐색 ○ 중국산 대엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조 ○ 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성 탐색 ○ 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 원료 적합성 탐색 ○ 국내산 찻잎의 최적 발효방법 탐색 4. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 특수성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ Gallic acid 분석 ○ 휘발성 향기(methyl caprate 성분) 분석 ○ Tocopherol 류 분석 5. 국내산 미생물발효차의 이화학적 특성 및 일반성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물발효차의 색도 분석 ○ 총질소, 총유리아미노산, 데아닌, 총당 분석 ○ 가용성 고형분, pH, 산도, 불소 성분 분석 6. 미생물발효차 제조과정 중 생육 미생물의 거동 7. 제조된 미생물발효차의 기능성 및 기능성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> ○ L-citrulline 생성억제 활성 측정 ○ 항고혈압 지표성분인 Statin화합물 분석 8. 제조된 미생물발효차의 식품위해 요소 분석 9. 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차 시제품 제작

제 3 절 실험결과

1. 외국산 미생물발효차의 제조공정 및 이화학적 특성 분석

- 국내 환경에서 국내 소재를 이용하여 고품질의 미생물을 제조할 수 있는 기술을 확립하기 위해서는 먼저 외국의 미생물 발효차 및 제조 공정에 대한 분석과 벤치마킹이 필요하다고 생각 하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 미생물발효차 시료

- 본 연구에 사용된 미생물발효차 시료는 중국현지 또는 국내 발효차 전문점에서 구입하였으며, 연구에 사용된 주요 미생물발효차의 이력을 Table1-1에 나타내었다. 또한, 분석을 위한 시료는 -40℃에 저장하면서 실험에 사용하였다.

Table 1-1. Details of microbial fermented teas used in this study.

Sample No.	Area	year	remarks
PT-3	운남	1990	20년 저장 숙병
PT-4	운남	1980	30년 저장 숙병
PT-5	운남	1980	30년 저장 숙병
PT-6	운남	1970	40년 저장 숙병
PT-7	운남/운남경호	1970	40년 저장 숙병
PT-33	호남 (익양차창)	2007	흑차진품/금화보이차
PT-34	운남 (해만차창)	2008	여린잎으로 제조된 고급
PT-35	운남 (해만차창)	2008	거친잎(7급)으로 제조된 저급
PT-36	운남 (해만차창)	2004	여린잎으로 제조된 고급
PT-37	운남 (해만차창)	2004	성숙한잎으로 제조된 저급
PT-38	운남 (차엽진흥공사)	2008	성숙한잎으로 제조된 저급
PT-39	운남 (차엽진흥공사)	2008	여린잎으로 제조된 고급
PT-40	운남 (차엽진흥공사)	2003	성숙한잎으로 제조된 저급
PT-41	운남 (차엽진흥공사)	2003	여린잎으로 제조된 고급
PT-42	운남 (맹해차창)	2008	아주 저급 찻잎으로 제조
PT-43	운남 (맹해차창)	2008	발효방법이 잘못된 아주 저급
PT-121	운남/자체실험		PT-122로 제조한 발효차 완성품
PT-122	운남/자체실험		PT-121의 원료(모차)
PT-123	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(1차 뒤집기 전)
PT-124	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(2차 뒤집기 전)
PT-125	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(3차 뒤집기 전)
PT-126	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(4차 뒤집기 전)
PT-127	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(5차 뒤집기 전)
PT-129	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(발효 후)
PT-130	운남 칠선산차창		제조과정 별 시료(반성품)
PT-131	운남 칠선산차창		PT-123~PT-130의 원료
PT-141	사천 아안차창	2006	장차-강전
PT-146	국내/자체실험	2008	모차 (발효차 시제품)
PT-147	국내/자체실험	2008	재래종 (발효차 시제품)
PT-148	국내/자체실험	2008	대차12호 (발효차 시제품)
PT-149	국내/자체실험	2008	아부기다 (발효차 시제품)
PT-156	호남	2004	복전차 / 숙병
PT-157	광동보관 (상인극장)	1950년대	청병
PT-159	광동보관 (상인극장)	1997	청병
PT-160	운남 (맹해차창)	1970년대	청병
PT-161	운남 (맹해차창)	1988	7542(숙병)
PT-162	운남 (봉경차창)	1999	청병
PT-150	호북	2000	홍차로 제조한 긴압차
PT-151	호북	2000	녹차로 제조한 긴압차
PT-152	호남	1996	복전 / 금화
PT-153	복건 (무이성차창)	2005	무이암차 (수선)
PT-154	안취	2007	안차(육안차)
PT-155	호남/공침	98~2000	숙병, 중소엽종으로 제조
PT-163	운남 (하관차창)	1990년대말	청병
PT-164	운남 (하관차창)	1964년도	하관철전/금화발생

PT-167	운남 (보이시고 보이차창)	2008	청병
PT-168	운남(오씨전익차창)/맹고	2008	청병
PT-170	운남 (이무산차창)	2004	청병
PT-171	운남 (차엽진흥공사)	2005	청병
PT-172	운남 (차엽진흥공사)	2006	청병
PT-173	운남 (차엽진흥공사)	2007	청병
FT48	운남 (육대차산)	2004	보이중타차 / 청병
FT49	사천 (초의다실)	1995	금첨 / 생차
FT50	사천 (우의차창)	2005	강전 / 생차
FT59	운남 (자명차창)	2005	보이원차
FT60	운남 (랑하차창)	2004	철자병9579 / 숙병
FT62	광서	2002	육보차 / 숙차
FT69	호남 (익양차창)	2004	부전차 / 숙병
FT80	운남 (백사계차창)	2002	청량차 / 청차
FT31	운남 (맹해차창)		대익철자병(숙병), 저급
PT174	운남 (맹해차창)	1996	맹해숙차(고급)
PT175	운남 (곤명차창)	1994	9016(고급)

(2) 미생물발효차 관여하는 주요 미생물의 분리 및 동정

- 발효차 시료 1 g에 멸균수 10 mL을 첨가하여 균질화 시킨 시료액을 10배, 100배, 1000배로 희석한 후 200 µL씩 PDA(potato dextrose agar, Gibco)배지에 spreading하였다. 28°C에서 4일간 배양 후 각 각의 미생물을 순수분리 하였다.
- 균주의 포자 형태는 위상차 현미경을 이용하여 그 형태를 조사하였으며, 유전학적 동정은 Total DNA 추출 후 18S rRNA primer를 이용한 PCR 수행 및 각각의 gene을 cloning하여 염기서열을 분석하였다.

(3) 미생물발효차 제조 과정 중 주요 미생물의 거동

- 중국의 미생물발효차 제조 공장에 의뢰하여 각 제조 단계별 시료를 확보한 후 상기에 나타낸 바와 같이 시료 1 g에 멸균수 10 mL을 첨가한 시료액을 PDA 배지에서 배양하면서 균주의 거동을 관찰하였다.

(4) 미생물발효차의 곰팡이 독소 분석

(가) Aflatoxin 분석

① ELISA kit를 이용한 시험방법

- 시료 0.5~3 g을 피검체 여러 곳에서 골고루 분취한 후 80% methanol 1.5~9 mL에 넣고 30분간 상온에서 교반 추출하여 여과(Whatman No.1)하였다. 여액의 상층

액 50 μL 을 취하여 분석 kit에 내장된 희석완충용액 150 μL 로 희석하고 잘 섞은 후 ELISA kit.(96 wells, Total Aflatoxin-EIA, EURO-DIAGNOSTICA, Netherland) well당 상층액 50 μL 취하였다. 여기에 희석완충용액 50 μL , total aflatoxin-HRP (Conjugate solution) 25 μL , Antibody solution 25 μL 을 넣은 후 37°C 암소에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Rinsing Buffer로 3회 세척하여 용액들을 제거하였다. 여기에 기질용액 100 μL 을 넣고 상온에서 30분 동안 방치하였으며 stop solution 100 μL 을 넣어 반응을 종료시킨 후 ELISA Reader(BIORAD 680)의 450nm에서 total aflatoxin을 측정하였다.

② HPLC 이용한 시험방법

㉠ 시험용액 조제

- 시료 20 g를 취하여 70% methanol 100 ml(1% NaCl포함)를 넣고 진탕기로 3분 간 교반하여 얻은 추출액을 여과지(Whatman paper NO.1)로 여과하였다. 여액에 동량의 증류수를 첨가한 다음 10 mL를 취해 immunoaffinity column에 2drop/sec의 유속으로 용출시켰다. 증류수 10 mL로 세척하고, acetonitrile 3 mL로 용출시킨 후 질소로 농축하였다. 이 농축액에 Trifluoroacetic acid 100 μL 를 넣어 aflatoxin를 유도체화 시킨 후 HPLC 이동상 용매(25% acetonitrile) 1.9 mL를 주입하여 용해시키고 0.45 μm 필터를 통과시켜 HPLC 분석조건용 시료 용액으로 사용하였다.

Table 1-2. HPLC conditions for analysis of aflatoxin

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Phenomenex Luna 5u C ₁₈
Flow rate	1.0mL/min
MobilePhase	25% acetonitrile
Detector	Fluorescence detector (Ex 360nm, Em 418nm)

㉡ 검출한계: 0.05ppb 회수율: 81.75%

㉔ HPLC 크로마토그램

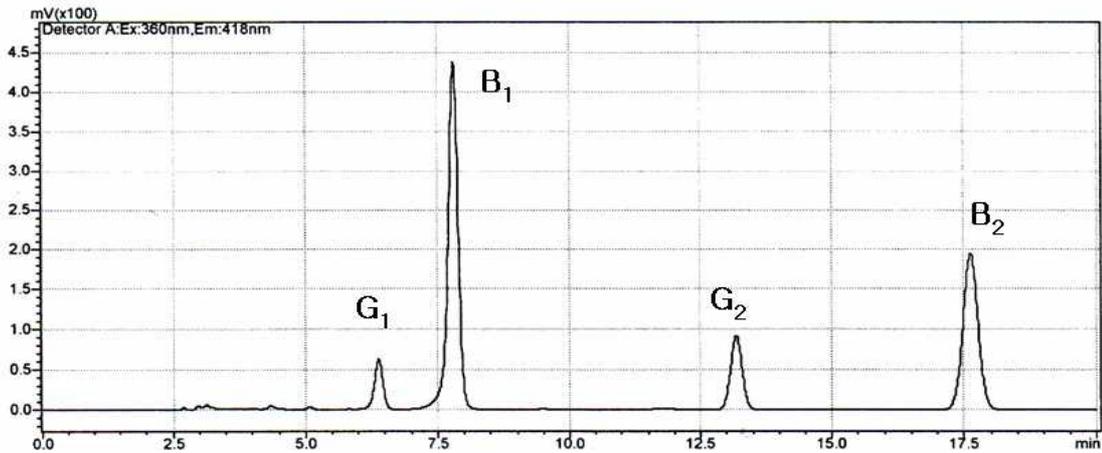


Fig. 1-1. HPLC chromatogram of standard aflatoxin.

(나) Ochratoxin 분석

① ELISA kit를 이용한 시험방법

- 시료 0.5~3 g을 여러 곳에서 골고루 취한 후 500mM phosphoric acid 1~6 mL 에 넣어 10분간 상온에서 교반 추출하였다. 여기에 Dichloromethane 2~10 mL을 넣고 다시 10분간 상온에서 교반하여 추출하였다. 추출액을 감압여과(Whatman No.2)한 후 이 여액을 3,000 rpm, 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 50℃에서 질소 계류 하에 농축하였다. 분석 kit에 내장된 Extraction Buffer 300~750 μ L 를 넣은 *n*-Hexane 0.4~1.0 mL 첨가하였다. 이것을 1분간 격하게 섞은 후 3,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. Micro-syringe filter(0.22 μ m)을 이용하여 여과하고 여액 중 50 μ L을 취하여 분석 kit에 내장된 희석완충용액 200 μ L으로 희석하여 잘 섞은 후 ELISA kit.(96 wells, Ochratoxin-A EIA, EURO-DIAGNOSTICA, Netherland) well당 상층액 50 μ L 취하였다. 여기에 희석완충용액 50 μ L, Ochratoxin-A-HRP(Conjugate solution) 25 μ L, Antibody solution 25 μ L을 넣은 후 37℃ 암소에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 Rinsing Buffer로 3회 세척하여 용액들을 제거한 이후 기질용액 100 μ L을 넣고 상온에서 30분 동안 방치하였다. stop solution 100 μ L을 넣어 반응을 종료한 후 ELISA(BIORAD 680)를 이용하여450nm에서 Ochratoxin-A을 측정하였다.

② HPLC 이용한 시험방법

㉠ 시험용액 조제 (Immunoaffinity column method)

- 시료 20 g에 70% acetonitrile 100 mL에 넣고 3분간 균질화하여 얻은 추출액을 여과하였다. 여과액 4 mL을 PBS용액 44 mL과 혼합한 후 immunoaffinity column에 통과시켰다. column을 증류수 10 mL로 세척한 후 methanol 2 mL로 용출시키고 질소로 농축하였다. 이 농축액을 HPLC 이동상으로 용해시킨 후 0.45 μ m필터를 통과시켜 HPLC 분석조건용 시료 용액으로 사용하였다³⁾.

㉡ 유도체화

- 시료를 수욕조상에서 질소로 농축한 후 500 μ L boron trifluoride methanol을 넣어 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 다시 질소 농축하여 이동상으로 녹인 후 HPLC 분석에 사용하였다.

Table 1-3. HPLC conditions for analysis of ochratoxin

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Phenomenex Luna 5u C ₁₈
Flow rate	1.0mL/min
Mobile Phase	water:acetonitrile:acetic acid=5:5:0.1(v/v)
Detector	Fluorescence detector (Ex 333nm, Em 460nm)

㉢ 검출한계: 0.1ppb, 회수율: 93.0%

㉣ HPLC 크로마토그램

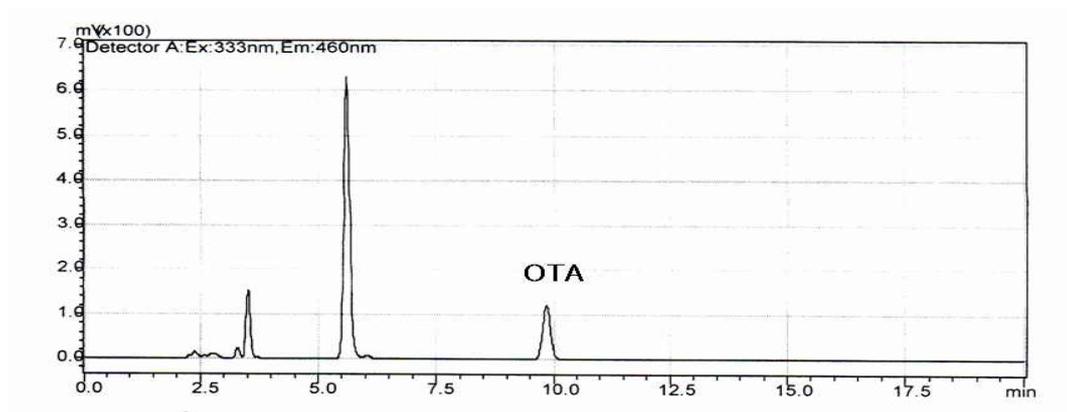


Fig. 1-2. HPLC chromatogram of standard ochratoxin.

(다) Patulin 분석

① 시험용액 조제

- 시료 5 g을 시험관(I)에 취한 뒤 에틸아세테이트 10 mL를 넣고 1분간 격렬하게 흔들어 섞은 후 정치하고 파스퇴르 피펫으로 상층액을 다른 시험관(II)에 옮겼다. 시험관(II)에 에틸아세테이트 5 mL를 넣고 격렬하게 흔들어 섞어 정치한 후 상층액을 시험관(III)에 합하였다. 이 에틸아세테이트 추출액에 무수황산나트륨을 1 g을 넣고 30초간 격렬하게 흔들어 섞은 후, 상층액을 시험관(IV)에 옮겨 담아 40°C에서 질소 농축한 후 잔류물을 초산 용액 0.5 mL에 용해하여 시험용액으로 하였다.

Table 1-4. HPLC conditions for analysis of patulin

Item	Conditions
Instrument	JASCO HPLC
Column	COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II Waters
Flow rate	0.8mL/min
MobilePhase	0.8% THF
Detector	UV 276 nm

② 검출한계: 0.5 ppb, 회수율: 85.5%

③ HPLC 크로마토그램

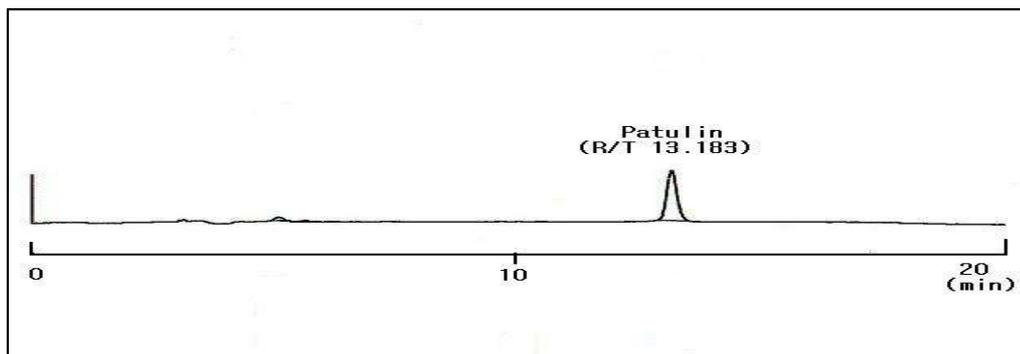


Fig.1-3. HPLC chromatogram of patulin.

(5) 관능검사

- 보성군 발효차 평가그룹 및 목포대학교 차문화학과 그룹의 숙련된 패널 21명을 대상으로 실시하였다. 일정시간 다양한 발효차로 교육을 시킨 후 최종 검사는 5종의

시료를 이용하여 5점 척도법을 실시하였다. 얻어진 결과는 SAS를 이용하여 통계처리 하였다.

(6) 일반성분 분석

- 찻잎의 일반성분 분석은 AOAC법에 의하여, 수분은 105℃ 상압가열 건조법으로, 총 질소는 micro-Kjeldahl법으로, 조지방은 Soxhlet 추출법으로, 조섬유는 Henneberg-Stohmann 법으로, 조회분은 550℃ 직접 회화법을 이용하여 그 함량을 측정하였다.

(7) 이화학적 특성 분석

(가) 색도

- 미생물발효차의 찻잎을 Color spectrophotometer (CM-3500d, Minolta Co Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 L*, a*, b*값을 각각 측정하였다.

(나) pH 및 산도

- 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80℃에서 5분간 추출한 후 여과한 여액을 pH meter (Model 8000, ORION, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고 적정산도는 pH를 측정한 추출액 중 20 mL를 취하여 중화에 필요한 0.1 N-NaOH용액 소비량을 측정한 후 malic acid로 환산하여 나타내었다.

(다) 가용성 고형분

- 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80℃에서 5분간 추출한 후 여과한 차 증류수 추출액을 Refractometer (PR-1, ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

(라) 총 페놀 성분

- 미생물발효차의 총 페놀 함량은 김 등^{26,27)}의 방법에 의하여 측정하였다. 시료 5 g에 60% MeOH 250 mL를 가하여 제조한 추출물 중 0.5 mL를 취하여 농축한 후, 30% MeOH 0.5 mL와 Folin&Ciocalteau's phenol reagent 0.5 mL를 가해 혼합하

였다. 여기에 Na_2CO_3 포화용액 0.5 mL를 가해 암소에서 한 시간 동안 방치한 후, UV/VIS spectrophotometer (V-550, JASCO)로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 표준물질로 gallic acid를 사용하여 동일한 방법으로 측정하여 작성된 표준 곡선으로부터 총 페놀 함량으로 환산하였다.

(마) 통계처리

- 모든 자료는 SAS package를 이용하여 평균 및 준편차를 구하였다. 집단별 차이는 One-way ANOVA와 사후검정(Duncan's multiple range test)을 실시하여 검정하였다.

(8) 영양성분 분석

(가) 유기산

- 찻잎 시료 1 g에 증류수 50 mL를 가하여 80°C에서 4시간 동안 추출한 후 Whatman filter paper로 여과하였다. 여과한 추출액은 evaporator로 농축한 뒤 10 mL로 정용하여 이온크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

(나) 유리당

- 찻잎 시료 1 g에 80% ethanol을 50 mL를 가하여 heating block에서 70°C로 약 5 시간 동안 당 성분을 추출하였다. 추출액은 Whatman filter paper로 여과한 후 evaporator로 ethanol을 휘발시켜 시료용액을 10 mL로 농축, 정용하여 이온크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

(다) 총당

- 총당의 정량은 Dinitrosalicylic acid에 의한 비색법⁴⁾을 이용하였다. 즉, 마쇄한 찻잎 1 g을 증류수 20 mL로 추출, 여과한 후 50 mL로 보정하였다. 여기에 중성초산납 포화용액을 침전이 더 이상 생기지 않을 때까지 가하였다. 이를 여과 한 후 여액 900 μL 와 발색시약 100 μL 를 혼합하였다. 90°C 수욕조에서 5min동안 반응시키고 냉각한 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 Glucose을 사용 측정하여 작성된 표준곡선으로부터 총당질 함량으로 환산하였다.

(라) 무기원소

- 건식 분해법을 이용하여 찻잎 시료를 550°C 직접 회화법으로 회화시킨 후 0.01 g 을 취하였다. 여기에 염산 1 mL을 가하여 2시간 정도 분해시킨 뒤 증류수 9 mL 을 가하여 ICP를 이용하여 측정하였다.

(마) Vitamin E(α -Tocopherol)

- 찻잎 중의 α -Tocopherol 함량은 HPLC(형광검출기)를 이용하여 분석하였다. 시료 0.5 g을 취한 후 1% NaCl 0.5 mL와 3% pyrogallol 10 mL를 가하여 5분 동안 초음파 추출을 하였다. 60% KOH 1 mL를 첨가한 후, 70°C에서 30분 동안 검화하였다. 검화가 끝난 후 실온으로 냉각하고, 1% NaCl 22.5 mL를 가한 후, EtOAc/*n*-hexane=1:9 (v/v) 혼합 용액 15 mL를 첨가하여 용매분획을 행하였다. 상층액을 취해 농축한 후 CHCl₃/MeOH=1:1 (v/v)에 용해시켜 HPLC 분석을 행하였다.

Table 1-5. HPLC conditions for analysis of vitamin E

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Octyl column
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	methanol/water = 90:10 (v/v)
Detector	Fluorescence detector (Ex 295nm, Em 325nm)

(바) Vitamin C(Ascorbic acid)

- 찻잎 3 g을 비이커에 취한 후, 냉장 보관된 10% 메타인산 30 mL를 첨가하여 1분 동안 homogenization(BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki LTD., Japan)을 실시한 후, 냉장 보관된 5% 메타인산으로 100 mL가 되도록 정용하였다. 정용된 용액 중 2 mL를 취하여 원심분리(3000 rpm, 15 min, 4°C)를 행한 후, 상등액을 취하여

MeOH 2 mL와 혼합하여 여과(Millipore, 0.45 μ m)한 다음, 얻어진 여과액을 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

Table 1-6. HPLC conditions for analysis of vitamin C

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	CLC-ODS
Flow late	1.0 mL/min
Mobile Phase	25 mM metaphosphoric acid
Detector	PDA detector (254 nm)

(9) Chemical Profile 비교를 위한 분석 시료 조제 및 카테킨류와 카페인 분석

- 찻잎 5 g에 60% MeOH 250 mL를 가해 homogenization (BM-2 Nissei bio-mixer, Nihonseiki LTD., Japan)을 행한 후, 암소에서 1시간 추출하였다. 여과(No. 2)하고, 남은 잔사는 100% MeOH 250 mL로 재추출하였다. 얻어진 여액을 합하여 농축한 후, 60% MeOH을 이용하여 최종 용량이 30 mL가 되도록 정용하였으며 Millipore로 여과(0.45 μ m)한 후, HPLC 분석 시료로 하였다.

Table 1-7. HPLC conditions for analysis of catechins and caffeine

Item	Conditions												
Instrument	SHIMADZU HPLC												
Column	shim-pack Prep-ODS												
Flow late	1.0 mL/min												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>min</th> <th>20 mM KH₂PO₄</th> <th>100% MeCN</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>97</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>93</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table>	min	20 mM KH ₂ PO ₄	100% MeCN	0	97	3	10	93	7	60	75	25
min	20 mM KH ₂ PO ₄	100% MeCN											
0	97	3											
10	93	7											
60	75	25											
Mobile Phase													
Detector	PDA detector (210, 254, 280, 375 nm)												

(10) Gallic Acid

- 상기 (9)의 항에서 조제한 용액 중 1 mL를 취하여 농축한 후, H₂O 5 mL (pH 2.65 adjusted by TFA)로 회수하여 Sep-pak cartridge C₁₈에 charge시켰다. H₂O 5 mL (pH 2.65 adjusted by TFA)와 10% MeOH 10 mL로 용출시킨 후, 용출액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 HPLC 분석을 행하였다.

Table 1-8. HPLC conditions for analysis of gallic acid

Item	Conditions
Instrument	Shimadzu HPLC
Column	Shim-pack Prep-ODS
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	20 mM KH ₂ PO ₄
Detector	PDA detector (210 nm)

(11) SDE 장치를 이용한 향기성분 추출 및

GC-MS 분석

- 시료의 휘발성 향기성분 추출에는 Likens and Nickerson형 동시증류추출장치(SDE)를 사용하였다. 분쇄한 시료 각 50 g과 증류수 500 mL를 Likens and Nickerson형 동시증류추출장치의 시료플라스크에 넣고 용매플라스크에는 dichloromethane과 n-pentane의 1:1 혼합용매 250 mL를 넣은 후 2시간동안 가열 환류하여 향기성분을 추출하였다. 향기성분이 추출된 용매층은 무수황산나트륨으로 탈수한 후 질소로 농축하여 휘발성 향기성분 분석 시료로 사용하였다.
- 향기성분의 분석 및 동정은 gas chromatography(GC-MS, Shimadzu QP5000)를 이용



Fig. 1-4. Simultaneous distillation and extraction (SDE) apparatus.

하여 행하였다. Column은 DB-WAX(30m×0.25mm×0.25μm)를 사용하였으며 carrier gas는 Helium 을 사용하였고, Column 온도는 60℃에서 3분간 유지하고 160℃까지 2℃/min 상승 후 3℃/min으로 220℃까지 승온하였다.

(12) 항산화활성 평가

(가) RAW 264.7 세포주를 이용한 NO 및 L-citrulline 생성억제 작용

① RAW 264.7 세포주의 배양

- Mouse 유래 대식세포(RAW264.7)는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, Md, USA)에서 분양받아 사용하였다. 10% FBS(heat-inactivated fetalbovine serum, 55℃, 30min)와 1% penicilline-streptomycin이 함유되어 있는 DMEM 배지를 75cm² T-flask를 이용해 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 2~3일간 배양하여 세포가 confluent 상태가 되면 scraper를 이용하여 부착된 세포를 떼어낸 후 계대배양 하였다. 3회 이상 계대 배양 후 안정화된 세포를 실험에 사용하였다.

② 시료 및 시약처리

- inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 형성하는 다량의 Nitric oxide를 유발시키기 위해 LPS, IFN-γ 그리고 기질인 L-arginine을 사용하였다. 먼저 10% FBS DMEM배지에 1well당 세포가 2×10⁵/mL이 되도록 seeding 한 후, 24hr동안 전배양하였다. 전배양 후 모든 well의 배지를 suction하고 PBS(pH 7.2) 500 μL로 2회 washing한 후 무색 DMEM을 1 mL 넣었다. 시료의 최종농도가 25, 50, 100, 200 μg/mL이 되도록 처리한 후, LPS, IFN-γ, L-arginine를 50 ng/mL, 10 ng/mL, 10 μM 농도로 처리하고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24hr 동안 배양하였다.

③ NO생성 억제작용

- NO의 측정은 Green등⁷⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 배양액 450 μL와 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylendiamide dihydrochloride in 5% H₃PO₄) 용액 450 μL를 섞고 실온에서 10min간 반응시킨 후 UV/VIS Spectrophotometer 543 nm에서 absorbance를 측정하였다.

④ L-citrulline 생성 억제작용

- L-citrulline의 측정은 chromogenic reagent를 이용한 Boyde & Rahmatullah 등⁸⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 배양액 450 μ L와 chromogenic reagent 용액 450 μ L를 섞고 heating blot에서 heating(100 $^{\circ}$ C, 10min)한 후 방냉하여 UV/VIS Spectrophotometer 530nm에서 absorbance를 측정하였다.

(나) DPPH 및 아질산염 소거능 측정

① DPPH free radical scavenging activity

- DPPH를 이용한 radical scavenging activity의 측정은 Abe 등⁹⁾과 Yamaguchi 등¹⁰⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 96well plate에 200 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl in ethanol) 용액 196 μ L와 시료용액 4 μ L를 넣어 최종농도가 25, 50, 100, 200 μ g/mL가 되도록 하였다. 10분간 암소에서 반응시킨 후 ELISA reader 517nm에서 absorbance를 측정하였다. Positive control로는 vitamin C를 사용하였고, DPPH radical activity는 %와 SC₅₀ 값으로 나타내었다.

② Nitrite scavenging activity

- 아질산염 소거능 측정은 Duh 등¹¹⁾의 방법으로 측정하였다. 즉 96well plate에 0.1N HCl 용액 192 μ L와 20 mM NaNO₂ (in methanol) 용액 4 μ L를 넣은 후 시료의 최종농도가 25, 50, 100, 200 μ g/mL가 되도록 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 1 hr 동안 반응시켰다.
- 생성된 Nitrite의 양을 구하기 위해 Griess reagent 50 μ L와 반응액 200 μ L를 반응시키고 ELISA의 520 nm에서 absorbance를 측정하였다. Positive control로는 vitamin C를 사용하였고 nitrite scavenging activity는 %로 나타내었다.

(13) 항고혈압 기능성분인 Statin 화합물 탐색

(가) Statin 유도체 6종 구입 및 합성

- 본 실험에 사용된 Statin (lovastatin-L, compactin-L, simvastatin-L, pravastatin-H)은 SIGMA에서 구입하였고, atorvastatin-H은 (주)현대약품에서 지원받아 사용하였다.

- Lactone form의 statin (lovastatin, compactin, simvastatin)을 hydroxyl acid form으로 합성하기 위하여 Brown et al.¹²⁾의 방법을 사용하였다. 각각 lactone form의 statin 5 mg을 100% acetonitrile 500 μ L로 용해한 다음 0.1N NaOH (50% acetonitrile)를 ice bath상에서 천천히 첨가하고 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 0.1N HCl (50% acetonitrile)을 첨가하여 pH 7~8이 되도록 하였다. 반응물을 농축한 뒤 MeOH/EtOAc (1:1) 용매 2 mL로 녹이고 여과하여 hydroxy acid form의 statin을 얻었다. 합성된 시료는 각 ampule에 N₂ gas로 농축 충전한 후 -80°C 냉동고에 보관 실험에 사용하였다.

(나) 시료 추출 및 정제와 HPLC 분석

- 시료 50 g에 100% MeOH 1 L를 넣고 homogenization (12,000 rpm, 5 min) 한 후 1 hr 동안 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 2로 여과한 후 감압농축하여 100% MeOH 추출물을 얻었다.
- 시료 10 g에 상당하는 MeOH 추출물을 2 mL의 MeOH로 용해하여 Sep-Pak (Waters C₁₈ Cartridge, 12 cc)에 charge한 후 solid-phase extraction 정제하였다. Sep-pak내에 추출물을 전부 흡착시킨 후 질소가스를 이용해 Sep-pak 내의 MeOH 증발시켜 주었다. 여기에 100% H₂O을 흘려보내주어 흡착되지 않는 성분을 세척하였다. Sep-pak에 흡착된 성분은 100% MeOH을 가하여 색의 변화가 없을 때까지 충분히 용출하였다. 용출된 100% MeOH 획분을 감압농축 한 후 MeOH 1 mL로 용해하고, 0.20 μ m syringe filter로 여과한 후 HPLC 분석을 실시하였다. Statin 분석에 사용된 시료의 양은 전체 volume의 1/20 (50 μ L)을 injection하였다.

Table 1-9. HPLC conditions for analysis of statin

Items	Conditions
HPLC model	Waters Autosampler (LC module I plus)
Column	Waters C ₁₈ Bondapak TM 3.9×150mm
Flow rate	1 mL/min
UV detector	237 nm
Oven temp.	40°C
Mobile phase	Acetonitrile/1% acetic acid (55:45, v/v)

나. 결과 및 고찰

(1) 문헌 및 현지탐사를 통한 제다공정 분석

(가) 미생물발효차의 역사와 종류

□ 역사

- 3천여년 전, 상주시대에 차의 고향인 운남에 살던 북쪽 사람들이 차를 심고 찻잎을 생산한 것이 미생물발효차의 시초라 전해진다. 또한 당나라시대, 중국에서는 차순을 벌에 말려 덩어리차인 떡차를 만들어 양념을 첨가하여 마셨는데 이때 산 중 오지에서 자란 야생 찻잎의 성분이 너무 강하자 차를 묵혀 순화시킨 것이 미생물발효차를 마시는 계기가 되었다고도 전해지고 있다.
- 연구자료에 의하면 당나라 때 전국의 미생물발효차가 보이(푸얼)시에 모인 후 각지로 운송되어 팔렸다고 하며 이러한 이유로 보이(푸얼)이라는 이름을 가지게 되었다고 한다. 역사에서 보이차는 윈난 차구역의 차농들이 윈난 대엽종 차나무 잎을 신선한 것으로 채집하여 만든 청모차를 말리고 가공하여 만든 것이다.
- 말린 청차는 원래 수분함량이 비교적 높은데다(대략 10%이상) 집산지로 운송할 때 찻잎이 부수지는 것을 방지하기 위하여 찻잎에다 물을 뿌렸다고 전해진다. 푸얼 집산지에 모인 청차를 다시 집중적으로 선별, 체로 치고 섞고 찌서 부드럽게 하고 압제하여 여러 가지 긴압차로 만들었다. 이렇게 형성된 긴압차는 수분함량이 비교적 높는데 차마고도를 지나 서장, 베이징 및 해외로 운송되는데 적을 때는 10일 많으면 1년까지 걸렸다고 한다.
- 긴압차의 장시간 운송 과정 중에서 여러가지 기후변화를 겪게 되는데 장기적인 습하고 더운 날씨 등 요인의 작용하에서 찻잎중의 폴리페놀물질이 효소변화가 아닌 발효작용이 진행되었을 것으로 생각된다. 이러한 과정에서 찻잎내에 포함된 물질이 변화되며, 최종 판매하는 곳에 도착하여 전통적인 보이차의 독특한 품질이 형성되었다고도 전해진다.
- 현재 티베트·서장·신강 등 육식을 위주로 하는 소수민족에게는 필수식품으로 인식되어 있다. 미생물발효차 중 가장 잘 알려진 차가 보이차(푸얼차)인데 보이차는 중국 운남지역의 대엽종 찻잎으로 만든 비생물발효차를 말하지만 우리나라에서는 모든 미생물발효차를 보이차로 부르는 경향이 있다.

- 한편, 1973년 소비시장을 요구를 만족시키기 위하여 원난차엽진축구공사가 쿤밍차장에서 원난의 대엽종 모차를 가지고 특수한 후발효기술을 거쳐 습하고 더운 조건하에서 단시간에 변화시킨 습식발효법을 개발하였다. 이 기술은 발효기간을 줄였으며 독특한 품질을 구비한 보이차를 형성하였으며 이것이 곧바로 현대 보이차로 알려진 숙병(숙차)이다. 이 새 후발효 기술의 운용과 일반화를 통해 보이차 생산의 현대화를 통한 새로운 시장을 넓혀 놓아 보이차가 새로운 발전시기에 들어서게 되었다.

□ 발효방식에 따른 종류

- 미생물 발효차의 발효의 과정에는 두 종류가 있는데, 옛날부터 내려오는 전통적인 발효공정으로 찻잎을 건조하고 동시에 습도가 낮은 곳에 보관하면서 찻잎이 계속하여 발효되도록 하는 것을 건식발효라 하며 이 방식으로 만들어진 미생물발효차를 청병(긴압차 형태) 및 청차(산차 형태)라고 한다.
- 반면, 1973년 운남성 곤명의 차공장에서 개발한 인위적인 방법을 통해 숙성발효시키는 것을 습식 발효라하며 이 방식으로 만들어진 미생물발효차를 숙병(긴압차 형태) 및 숙차(산차 형태)라고 한다.
- 현재 대부분의 미생물발효차는 단시간의 제조를 위해 습식발효를 이용하고 있다. 습식발효 과정은 먼저 찻잎을 살청한 후에 유념하여 하루 정도 일광 건조를 시킨 후 곧바로 퇴적을 시키는데 이때 약 30~40℃ 정도의 미지근한 물을 찻잎의 수분 함량이 20~30% 정도 되도록 뿌린 후 대나무통이나 나무상자에 넣는다. 이때 수분 증발을 방지하고 미생물에 의한 발효가 촉진되도록 물에 적신 헝겊을 덮어준다. 보통 퇴적 후 일주일 후에 1차 뒤집기를 한다. 이는 뒤집기를 통해 내부 통기를 시켜 찻잎의 온도를 내려줌과 동시에 호기성균에 의한 발효를 촉진시키기 위해서이다. 1차로 뒤집은 후 다시 일주일 간격으로 2번 이상을 더 뒤집어 준다. 이렇게 발효시킨 미생물발효차를 실내에서 일주일 동안 건조시킨 다음 숙성 과정에 들어간다. 숙성 작업은 포대에 넣어 창고에 보관하는데 저장 기간은 보통 1년 이상으로 잡는다. 오래될수록 좋는데 20년 이상이 되면 상품으로 친다.
- 긴압차는 위와 같은 공정을 거친 찻잎을 틀에 넣고 100℃에서 30초간 증기를 가해 병차·타차 등의 모형을 만든 다음 포장한 후 숙성시킨 것이다. 본 연구에서는

경제성을 고려할 때 속성발효 제품을 타겟으로 하는것이 바람직하다고 생각되었다.

□ 형태에 따른 종류

- 미생물발효차에는 잎차인 산차와 증기로 찌서 압력을 주어 형태를 만드는 긴압차가 있다. 이 두 종류의 미생물발효차는 성분상으로는 거의 유사하다.
- 산차는 홍콩 및 광동 지역에서 주로 소비되고, 덩어리 형태로 보관과 운반이 용이한 긴압차는 변방지방에서 선호된다.
- 긴압차는 그 형태에 따라 찻잔 모양의 타차, 동그랗고 납작한 떡모양의 병차, 네모난 벽돌모양의 전차, 버섯모양의 고타차 등이 있다. 가장 많이 볼 수 있는 긴압차의 형태로 칠자병차가 있는데 이것은 한 개당 375그램의 떡차 7개를 모아 포장한 것을 가리킨다.
- 옛날에는 발효하는 과정에 이물질의 냄새가 흡착되지 않도록 대나무 껍질로 포장하는 것이 원칙이었으나 근래에는 한지를 포장지로 사용하고 있다.

(나) 미생물발효차 생산 환경 분석

□ 생산환경

- 고대 보이차 생산구역은 6대 차산이 가장 유명한데 6대차산은 주로 명랍현 경내의 만사, 망즈, 만촨, 이방, 거덩 및 경흥 경내의 유러를 말한다. 이곳은 물과 산은 이어져있으며 대부분 북회귀선(북위 23°26' 선) 근처에 위치해있으며 열대북연 및 아열대구역에 위치해 있다.
- 이 지역은 일조량이 충분하며 년 평균 기온이 18~20℃사이이고 년 평균 강우량은 1500밀리리터 내외이고, 평균습도는 80%이상이며, 따뜻하고 습윤하여 안개가 잘 생기는 기후특징이 있다. 전 경내의 해발고가 300~3400미터 사이이며 산지면적이 95%이상이다.
- 현재 보이차 생산지역은 1973년 이후 쿤밍, 대리, 인창, 흥하, 덕흥 등지로 확산되었으며, 중국의 DB53/T171-2006에 따르면 푸얼차 산지의 환경조건은 면에서는 해발고도가 300미터~2300미터, 년 평균기온이 15℃~22℃, 극단최저기온이 -6℃, 강우량이 200~800밀리리터인 지역이라고 규정하고 있다.

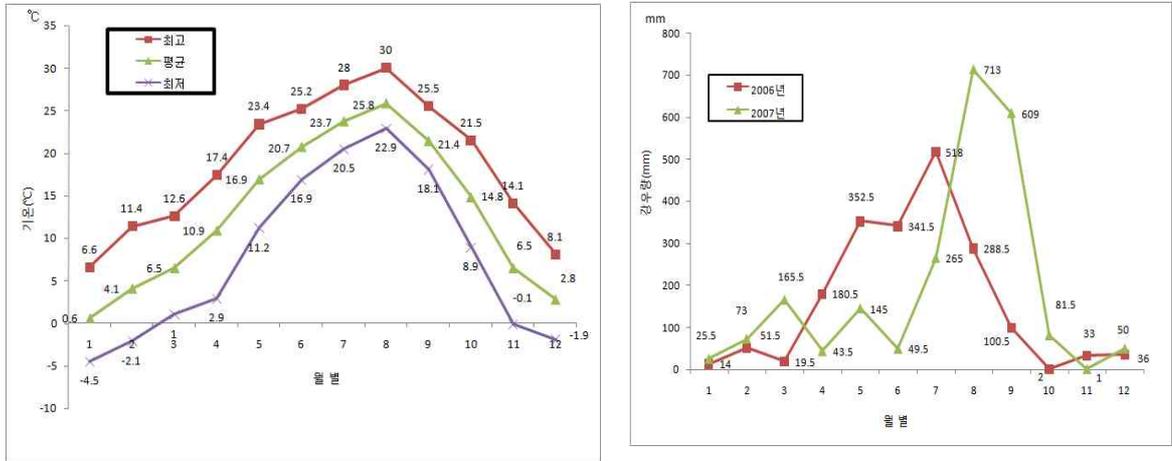


Fig. 1-5. Climate and precipitation amount of Bosung region.

- 참여기업이 위치하고 있는 보성군은 북위 30°~34°에 위치하고 있으며 년 평균기온이 16°C~17°C, 해발고도 평균 300미터, 연평균 강우량이 300밀리리터 정도로 보이차 주생산지와 비슷한 환경을 가지고 있다.
- 특히 5~7월, 9~10월의 기온과 습도가 보이차 생산지 환경과 가장 흡사하므로 이 시기에 미생물발효차를 생산하는 것이 바람직하다고 생각되었다. 또한, 5~7월은 새로운 녹차가 생산되는 시기이므로 해 육은 녹차를 원료로, 9~10월은 상품성이 떨어지는 성숙한 찻잎이 생산되는 시기이므로 이 잎을 이용하여 미생물발효차를 제조하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

□ 원료

- 미생물발효차의 품질을 결정하는 가장 중요한 요소 중 하나가 원료인 찻잎이다. 찻잎의 등급은 등급의 구분은 주로 여린 정도를 기초로 하는데 잎이 여릴수록 그 등급은 높다. 여린 정도의 좋고 나쁨을 결정하는 데는 다음과 같은 3가지 요소가 있다. 첫째는 순이 얼마 있는가를 보는데 순이 많을수록 여린 정도가 좋다고 볼 수 있다. 둘째는 건조된 잎 하나하나를 보는데 잎이 탄탄하고 여린 것이 좋다. 셋째로 색채의 윤택을 보는데 색채가 밝고 윤이 나는 것이 좋다. 고급의 미생물발효차는 외형이 황금색 솜털이 뚜렷하고 갈색이 나고 윤택이 나며 크기가 균일하고 탄탄하며 여리고 튼실한 것이 좋다.

㉠ 여린 정도

- 잎의 여린 정도는 찻잎의 품질을 가능하는 중요한 요소이고 찻잎의 등급을 결정하는 중요한 요소이다. 여린정도에 따라 찻잎의 내부 화학적구성 성분이 차이가 있으며 여린 선잎으로 가공하였을 때 모양과 품질이 좋다고 알려져 있다.
- 잎의 연한정도와 생산량은 직접적인 관계가 있다. 잎이 연하면 제품의 질은 좋으나 생산량이 감소한다. 최근의 상품은 수량이 많을 뿐아니라 품질도 좋을 것을 요구하기 때문에 1, 2, 3잎을 이용하여 제조한다.

㉡ 균일한 정도

- 잎의 균일한 정도도 중요하다. 일정한 품질의 잎들로 구성되어 있는 재료를 사용하는 것이 좋는데 여린 잎과 성숙한 잎이 혼합되어 있거나 상한 잎이 혼합되어 있으면 품질저하의 원인이 된다.
- 균일정도를 통일하기 위하여 분기별로 채집하는 것을 원칙으로 하며 한번에 모두 채집하는 것을 삼가하고 공장에서 처리하기 전에 검사를 하는 것이 필요하다.

㉢ 신선도

- 신선도는 채집한 잎이 신선한 원래의 모습을 보전하는 정도를 말한다. 신선도는 찻잎의 질량을 검증하는 중요한 지침 하나이다.
- 잎의 채집되어 나무에서 분리된 후에도 여전히 호흡작용을 한다. 이 호흡작용은 잎 내부의 당류물질을 분해 소모하여 이산화탄소를 발생하고 대량의 열량을 방출한다. 그러므로 보관하는 과정에서 통풍이 잘되는 곳에 보관하여 잎이 마르는 것을 감소시켜야 한다.

(다) 미생물발효차의 제다공정 분석

□ 산차의 가공

- 미생물발효차(숙차)의 가공은 원료준비(모차제조), 물 뿌리기, 후발효, 뒤섞기, 건조, 선별, 이물질 골라내기, 섞기(서로 다른 등급이나 산지의 원료), 저장숙성의 과정으로 이루어진다.

㉠ 원료의 준비

- 채취한 찻잎을 분체, 선택, 건조 과정을 거쳐 수분을 10%이하로 유지시킨다. 이것을 모차라고 한다. 수분과 이물질을 검사해서 규격에 합격되면 차로 제조한다.

㉡ 물 뿌리기

- 후발효 전에 모차에 일정량의 물을 첨가한 후 섞어서 후발효를 시작한다.
- 첨가하는 물의 양은 아래의 공식으로 계산한다.

$$\text{물 첨가량(kg)} = \text{원료(kg)} \times \frac{\text{목표 수분함량(\%)} - \text{원료의 수분함량(\%)}}{1 - \text{목표 수분함량}}$$

- 원하는 수분함량, 원료의 신선도, 공기습도, 온도에 따라서 첨가하는 물의 양이 다르다. 원료를 쌓은 후에 적당량의 물을 첨가하고 습한 천으로 덮는다. 이렇게 해야 높은 온도와 습기를 유지하고, 후발효를 잘 진행시킬 수 있다.

㉢ 후발효

- 후발효는 미생물발효차의 특성과 품질을 결정하는 중요한 과정이다¹³⁾. 미생물발효차 품질의 형성은 원료의 성분에 기초한다. 후발효 과정중에서 미생물대사에 의해 물질의 산화, 중합, 축합, 분해, 분해 등이 일어나 미생물발효차 특유의 품질이 형성된다.
- 보통 모차의 수분 함량은 9~12%정도이므로 발효시 수분함량을 증가시켜야 발효가 잘 일어난다. 후발효과정에 영향을 주는 인자는 매우 많다. 그중 찻잎 온도, 찻잎 수분함량, 산소 등이 매우 중요하다. 이 과정에서 물의 매질작용이 매우 중요하다. 후발효전 일정한 양의 물을 첨가해서 발효과정 중의 수분 함량을 유지해야 한다.
- 후발효 과정 중 수분함량은 점점 감소하고 온도는 점점 증가하는데 발효온도가 65℃를 넘지 않도록 해야 한다. 가용성물질의 변화는 수분과 온도에 의해 크게 변화된다고 알려져 있다.
- 폴리페놀류 화합물은 후발효과정 중의 산화속도, 온도, 시간과 관련이 있다. 후발효온도가 증가함에 따라 산화가 가속되므로, 후발효시 온도와 시간이 너무 높거나 오래되면, 찻잎이 탄화되거나 찻잎의 향기, 풍미가 감소된다. 반대의 경우

후발효 온도가 너무 낮거나 발효시간이 너무 적으면 발효도가 부족해져 폴리페놀화합물의 산화가 부족해져 품질이 저하 된다.

㉔ 뒤섞기

- 보이차 후발효 중에서 뒤섞기 기술이 보이차 품질과 제다 효율에 매우 중요하다. 발효정도, 발효온도, 습도와 발효환경의 변화를 잘 알아야 적당한 시기에 뒤섞기를 할 수 있다. 예를 들어서 수분함량이 낮으면 이 단계에서 새로이 물을 첨가해야한다. 뒤섞기를 함으로써 온도를 감소시킬 수 있고, 쌓여있는 찻잎의 온도, 습도, 산소, 미생물과 효소의 공통작용을 균등하게 할 수 있다.
- 보통 뒤섞기와 뒤집기 사이의 시간은 5~10일로 한다. 후발효 환경, 온도습도, 후발효정도 따라서 조절하며 온도는 35~65℃ 정도로 유지해야 된다.

㉕ 건조

- 후발효가 끝나면 발효가 진행되는 것을 방지하기 위해서 꼭 건조시켜야 하지만 보통 열에 의한 건조가 아닌 실내에서 통풍건조를 한다. 찻잎의 수분함량이 13%이하로 되면 체로 쳐서 크기 별로 나눈다.

㉖ 체로 치기

- 분체는 굵거나, 길거나, 짧거나 균일하지 않은 차를 나누는 과정이다. 분체의 배치에 따라서 1분, 2분, 3분, 4분, 차 덩어리, 부서진 차로 나눈다.

㉗ 선별

- 선별은 찻잎 중에서 이물질을 제거하는 과정으로 품질을 유지하는데 중요한 과정이다. 각 등급별로 차를 선별하고 이물질 등을 제거한다.

㉘ 섞기

- 섞기는 급, 크기, 품질이 서로 다른 차를 일정비율에 따라서 섞는다는 말이다. 서로 다른 차를 섞어 상호단점을 보완하여 품질을 향상시킨다.

㉔ 저장숙성

- 미생물발효차 품질의 형성에 숙성과정은 필수적인 요소이다. 이 과정 중에서 차의 성분이 서로 조화를 이룬다. 올바른 숙성과정은 미생물발효차의 품질과 풍미 생성에 도움을 준다. 저장숙성은 전용창고에서 이루어져야 한다. 보통 습도 70% 이하, 온도 25도씨 정도의 깨끗하고 이취가 없는 곳이 좋다.

□ 긴압차의 가공

- 긴압차는 원래 후발효차를 거치기 전의 쇠청모차를 압축해 놓은 차이다. 맛이 깔끔하고 마지막에 단맛이 난다. 찻물은 밝은 진한 홍색이다. 찻잎은 홍갈색이며 특이한 향 등의 품질 특징이 있다. 최근의 긴압차는 후발효를 거친 산차를 고온증제 후 압축해서 만든다. 장방형, 그릇모양, 정방형, 원병, 심장형 또는 기타 특별한 형태로 만든다. 산차를 점착하여 긴압차로 가공함으로써 운반에 편리하고 저장성을 높이는 효과가 있다.

㉕ 원료제조

- 긴압차(숙차) 원료는 모차를 후발효 가공해서 만든 산차이다. 보통 수분함량이 12~14% 이내가 되도록 건조시킨다. 건조는 잡냄새가 없고 깨끗한 환경에서 쌓아서 습기가 차서 변질되는 것을 방지해야하며 가공 전에 꼭 수분함량을 분석해야 한다.

㉖ 분체(체로 쳐서 구분하기)

- 분체는 찻잎의 크기, 무게, 길이 별로 나누는 과정이다. 분체에의 기준에 따라서 찻잎의 번호가 결정된다.

㉗ 반제품 섞기

- 섞기는 미생물발효차의 풍미를 조절하는 중요한 과정이다. 섞을 때 숙성차의 특성을 고려하여 색, 향, 미, 형을 뛰어나게 한다. 섞기 전에 차를 관능검사하고 차의 발효도와 색, 향, 미 상태를 조사한다. 각 등급별 품질요구에 따라서 다른 품질의 차를 비율에 따라서 혼합한다.

㉠ 윤차

- 윤차는 찻잎을 압축하기 전에 깨지는 것을 방지하기 위해서 하는 전처리이다. 윤차 수분량은 찻잎의 신선도와 공기습도에 따라서 결정된다. 윤차를 해야만 찻잎을 찌고나서 압축성형이 잘된다.

㉡ 찌기와 긴압

- 찌기의 목적은 차를 부드럽게 하여 압축성형하기 쉽게하기 위해서이지만 동시에 일부 살균효과도 있다. 찌차의 온도는 보통 90℃ 이상 유지해야 한다. 찌기가 과하면 건조가 어렵고 부족하면 압축시 점착성이 떨어져 품질에 영향을 미친다. 증기의 온도가 90℃ 이상이면 보통 15분 찌고, 찻잎이 부드러워지면 압축하면 된다.
- 긴압방법에는 수공과 기계압축 두 종류가 있다. 조작할 때 압력을 일정하게 유지하고 두께가 불균등해지는 것을 방지해야한다. 주형에 넣을 때는 차를 주형내로 모두 넣어야 한다. 압축한 후에 차 반제품을 주형에서 3분 이상 냉각, 정형하고 퇴압해야 한다. 퇴압 후에 압출차를 적당히 펼쳐 놓고 그늘에서 말린다.

㉢ 건조

- 실내자연풍건과 실내가온건조 두 가지 방법이 있다. 건조방법은 온도, 공기의 상대습도, 차 종류와 각 지방에 따라서 다르다.
- 건기: 보통 120~190시간 실내자연 풍건하면, 원남보이 압축차정도의 강도를 달성할 수 있다.
- 실내가온건조: 기후 상태에 따라서 다르지만 보통 60℃를 넘지않는 범위에서 시행한다. 온도가 너무 높으면 불량품이 나타난다.

㉣ 포장

- 포장은 식품위생에 부합하는 인체의 건강에 맞는 보정재료를 사용해야 한다. 원남보이 긴압차(숙차) 포장은 대부분 전통 포장 재료를 사용한다. (예: 내포장-면지, 외포장-대나무 바구니, 대껍질을 삼노끈으로 단단히 묶어서 사용한다) 포장하기 전에 수분을 검사해야 한다. 상품차의 수분함량은 보통 13%이하가 되도록 한다. 각종 포장재료는 깨끗하고 이취가 없어야 한다. 포장지에는 상품명, 함량,

회사명, 회사주소, 생산날짜, 품질등급 등을 기입한다.

㉠ 저장속성

- 긴압차(숙차)의 후발효는 자연산화, 미생물 등의 종합작용에 의한 것이다. 후발효가 끝난 미생물발효차는 가공과 저장을 통해서 특이한 향이 점점 생성된다. 향기는 저장 길수록 증가되어 진향(오래된향)이 짙어지며 품질이 높아진다. 긴압차(숙차)는 포장 후에 깨끗하고 통풍, 음건, 건조, 이취 없는 창고 안에서 저장해야한다. 자연숙성 시킴으로써 숙성작용이 완만히 진행되도록 한다. 저장과정 중 특히 온도와 습도의 변화를 주의해야하며 상품과 원료, 반제품을 뒤섞여 섞어 놓으면 안되고 오염을 방지해야한다.

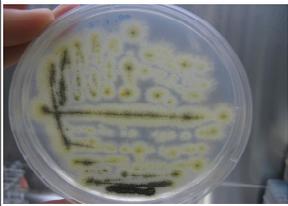
(2) 외국산 고품질 미생물발효차의 제다공정 주요 펙터 분석

(가) 미생물발효차로부터 주요 미생물 분리 및 동정

- 미생물발효차는 주로 발효과정 중 곰팡이의 작용에 의하여 발효되는 것으로 알려져 있다. 미생물발효차로부터 발효관련 곰팡이를 알아보기 위해서 저장기간이 서로 다른 청병(10년~60년) 7종, 숙병(20년~40년) 5종, 금화가 생성된 흑차 2종으로부터 미생물을 분리하였다.
- 각각의 미생물발효차 시료에 멸균수를 첨가하여 균질화 시킨 후 배지에 spreading한 후 28℃에서 4일 간격으로 배양하면서 각각의 미생물을 순수분리 하였다. 분리된 각각의 미생물은 위상차 현미경을 이용한 포자 형태 조사 및 18S rRNA primer를 이용한 PCR 수행 및 각각의 gene을 cloning하여 염기서열을 분석하였다. 동정 결과, *Aspergillus sp.* 2종(*A. niger*, *A. fumigatus*) 및 *Penicillium sp.* 2종(*P. ochrochloron*, *P. glabrum*)과 함께 *Absidia ramosa*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Eurotium cristatum*가 분리되어 총 7종의 곰팡이와 효모 1종(*Candida tropicalis*)이 분리되었다.
- 또한 품질이 좋고 오래된 미생물발효차에 생성된다고 알려져 있는 금화(金花)가 형성되어 있는 흑차로부터 금화 생성 원인균으로 노란색 균체의 *Eurotium cristatum*¹⁴⁾와 *Eurotium chevalieri*가 분리되었다.

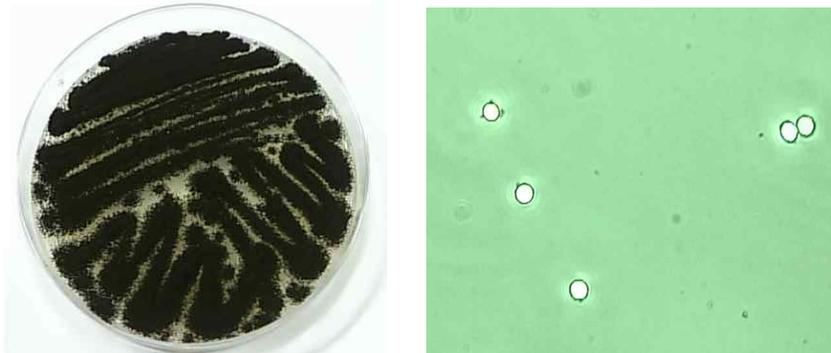
○ Main 미생물

- 발효차내의 미생물을 분리한 결과 *Aspergillus sp.* 2종(*A. nigar*, *A. fumigatus*) 및 *Penicillium sp.* 2종(*P. ochrochloron*, *P. glabrum*)이 main 미생물임을 확인 할 수 있었다.

Main fungus			
			
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium glabrum</i>

□ *Aspergillus niger*

- ㉠ 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Aspergillus sp.* 곰팡이로 추정되었다.



- ㉡ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 거의 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 균일

- ㉢ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv	7	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGC	66
Sbjct	3	CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGC	62
Querv	67	TCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGGC	126

```

Sbjct 63   TCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTGGC|      122
Querv 127   CGCCTTTGCCCGCGGGGCCGTGCCCGCGGAGACCCCAACACGAACAC|      186
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 123   CGCCTTTGCCCGCGGGGCCGTGCCCGCGGAGACCCCAACACGAACAC|      182
Querv 187   GTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGG|      246
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 183   GTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGG|      242
Querv 247   CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC|      306
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 243   CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC|      302
Querv 307   AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGG|      366
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 303   AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGG|      362
Querv 367   GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTC|      426
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 363   GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTC|      422
Querv 427   GGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGT|      486
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 423   GGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGT|      482
Querv 487   TCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCAT|      546
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 483   TCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCAT|      542
Querv 547   TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 592
          |::::::::::::::::::::::::::|
Sbjct 543   TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 588

```

Ⓐ *Aspergillus niger* strain UWFP 515 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 Length=599

Score = 1083 bits (586), Expect = 0.0

Identities = 586/586 (100%), Gaps = 0/586 (0%) Strand=Plus/Plus

Ⓑ *Aspergillus tubingensis* strain 3.4342 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 Length=674

Score = 1083 bits (586), Expect = 0.0

Identities = 586/586 (100%), Gaps = 0/586 (0%) Strand=Plus/Plus

㉟ *Aspergillus awamori* 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
Length=608

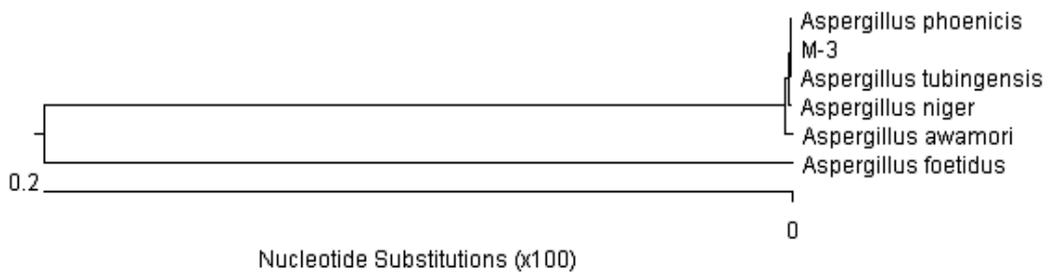
Score = 1083 bits (586), Expect = 0.0

Identities = 586/586 (100%), Gaps = 0/586 (0%) Strand=Plus/Plus

㉠ Gene identity 결과

		Percent Identity							
		1	2	3	4	5	6		
Divergence	1	■	99.6	100.0	100.0	100.0	100.0	1	Aspergillus awamori
	2	0.4	■	99.6	99.6	99.6	99.6	2	Aspergillus foetidus
	3	0.0	0.4	■	100.0	100.0	100.0	3	Aspergillus niger
	4	0.0	0.4	0.0	■	100.0	100.0	4	Aspergillus phoenicis
	5	0.0	0.4	0.0	0.0	■	100.0	5	Aspergillus tubingensis
	6	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	■	6	M-3
		1	2	3	4	5	6		

㉡ Phylogenic tree 결과

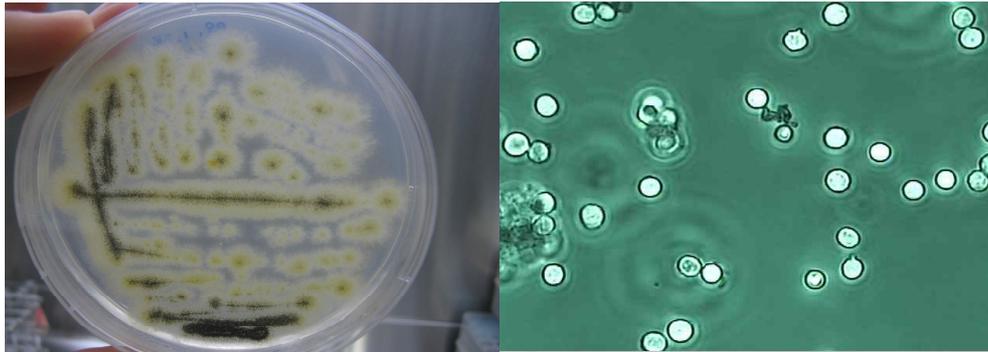


㉢ 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Aspergillus* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Aspergillus niger*와 100% 동일한 결과가 나타났다.
- 또한, DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석 결과 역시 *Aspergillus niger*로 확인됨에 따라 최종적으로 *Aspergillus niger*로 동정되었다.

□ *Aspergillus fumigatus*

㉔ 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Aspergillus sp.* 곰팡이로 추정되었다.



㉕ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 거의 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 균일

㉖ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv	16	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT	75
Sbjct	1	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT	60
Querv	76	GAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTG	135
Sbjct	61	GAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTG	120
Querv	136	ccgccgttttcgacggcccgccgggagggccttgccccccggcccgccgc	195
Sbjct	121	CCGCCGTTTCGACGCCGCCGGGAGGCCTTGCGCCCCGGGCCCGCGC	180
Querv	196	CCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGT	255
Sbjct	181	CCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGT	240
Querv	256	ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	315
Sbjct	241	ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	300
Querv	316	GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA	375
Sbjct	301	GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA	360
Querv	376	GGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCA	435
Sbjct	361	GGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCA	420
Querv	436	TTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGC	495
Sbjct	421	TTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGC	480
Query	496	CGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCG	555

```

Sbjct 481 |||||CGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCG||| 540
Querv 556 CACCCAACCTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCG 615
Sbjct 541 CACCCAACCTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCG 600
Querv 616 AGCATATCAATAAGCGGAGGA 636
Sbjct 601 AGCATATCAATAAGCGGAGGA 621

```

㉑ *Aspergillus fumigatus* strain xsd08062 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 Length=621

Score = 1147 bits (621), Expect = 0.0

Identities = 621/621 (100%), Gaps = 0/621 (0%) Strand=Plus/Plus

㉒ *Neosartorya fischeri* genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 54311 Length=617

Score = 1105 bits (598), Expect = 0.0

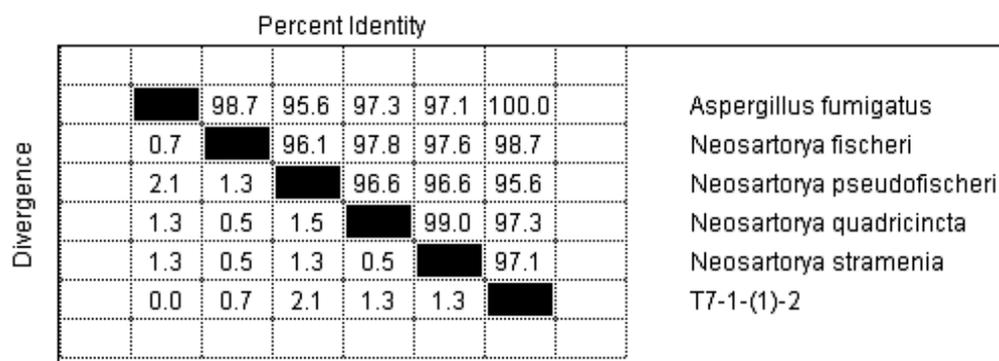
Identities = 614/621 (98%), Gaps = 4/621 (0%) Strand=Plus/Plus

㉓ *Neosartorya quadricincta* NRRL 2154 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 Length=1199

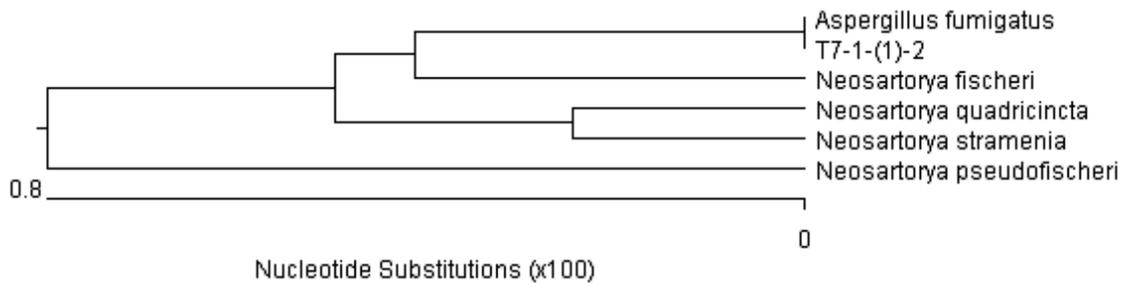
Score = 1061 bits (574), Expect = 0.0

Identities = 603/616 (97%), Gaps = 5/616 (0%) Strand=Plus/Plus

㉔ Gene identity 결과



㉓ Phylogenetic tree 결과



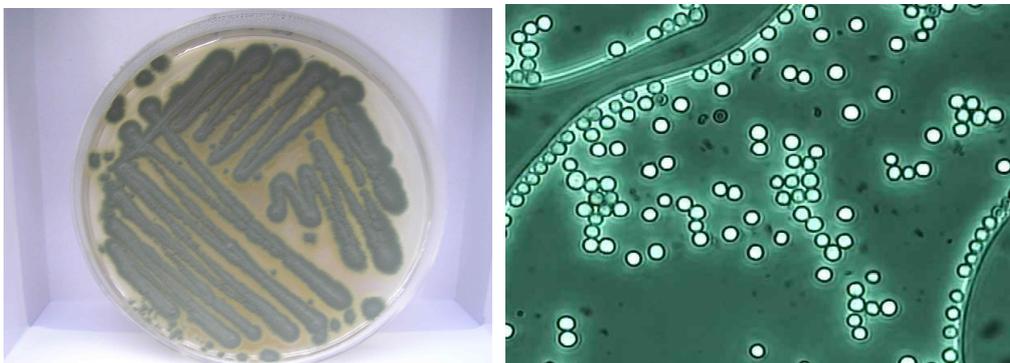
㉔ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Aspergillus* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Aspergillus fumigatus* 와 100% 동일한 결과가 나타났다.
- 또한, DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenetic tree를 분석 결과 역시 *Aspergillus fumigatus*로 확인됨에 따라 최종적으로 *Aspergillus fumigatus*로 동되었다.

□ *Penicillium ochrochloron*

- ㉕ 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Penicillium* sp. 곰팡이로 추정되었다.

400X



㉖ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 거의 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 균일

㉔ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv	37	TCCTTCCGCAGTGTA	94
Sbjct	8	TCCTTCCGCAGTGTA	67
Querv	95	GACTCTAAAGAACTCGGTGCCG-C-TGCAAGTC-G-G--TCCGCCCGC'	145
Sbjct	68	GACTATAAACCAGCCCGG-GCCGCCATGCAAGTCGGCGCCCCCGCCCC'	126
Querv	146	TTGG--GCCGGCGACACTTTCGAATTGACGGGGACACCCTAAAGCCGAT	203
Sbjct	127	CGGGCCGCGGGCGACACTCTCGAACTGCCGGGGACACCCTAAAGCCAAT	186
Querv	204	GCGGGCGGAAACCGCCCGGGGGCCCGTGGTAACGACACGGGGGACGGTA	263
Sbjct	187	GCGGGCGGAAACCGCCCGGGGGCCCGTGGTAACGACACGGGGGATGGTA	246
Querv	264	GGATA--GTTCTGCGC-CC-GCGCAGA-GAGGATGGGCAATCCGCAGCG	318
Sbjct	247	GGATACCG-CCC	305
Querv	319	TCCCCTCCGGGGGATACGAGGAACGTCCACAGACTAAGTGGAAGTGGGT	377
Sbjct	306	GCCCCCGGGGGCTATGGGGAACGTCCACAGACTAAGTGGAAGTGGGT	362
Querv	378	GTGCCG-CCCTGCTTAAGATATAGTCGGGCCCCCCGGGAGACCgggggg	436
Sbjct	363	CCGCCGTCCC-GCTTAAGATATAGTCGGGCCCCCCGGGAGACC	421
Querv	437	GCCT-C-TGCGCTGAGAAACCGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC	493
Sbjct	422	G-CTCCAACCCCT--AAACCGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC	477
Querv	494	GCA-GGCCCTCTGGGTCTAACCTCCCACCCGTGTCTATTGTACCTTGTT	552
Sbjct	478	G-AGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATT-TACCTTGTT	535
Querv	553	CCCGCCTGACCCAGGTGCGCCAGGGGGCA-CT--CCCCGGGCGCGCGC	609
Sbjct	536	CCCGCCT---CAC-GGCCGCGGGGGGCATCTGCCCGGGCCCGCGC	591
Querv	610	CCCTGGA	665
Sbjct	592	CCATTGAACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAG--CGATTA	649
Querv	666	TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT	725
Sbjct	650	TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT	709
Querv	726	TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC	785
Sbjct	710	TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC	769
Querv	786	TTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCACCCCTCAAGCCGGC'	844
Sbjct	770	TTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGC'	829
Querv	845	GTTGTGTCCCTCCG-TCCC	902
Sbjct	830	GCCCCGCC-CCGGTCCC	886
Querv	903	GTCCTCGA-GCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTTTGTAGGCC-GGCCGG'	953
Sbjct	887	GTCCTCGAAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCGTANGCCCGGGCGG	938

㉠ *Penicillium ochrochloron* internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1007

Score = 990 bits (536), Expect = 0.0

Identities = 823/953 (86%), Gaps = 58/953 (6%) Strand=Plus/Plus

㉡ *Penicillium pulvillorum* strain WSF 239 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1003

Score = 957 bits (518), Expect = 0.0

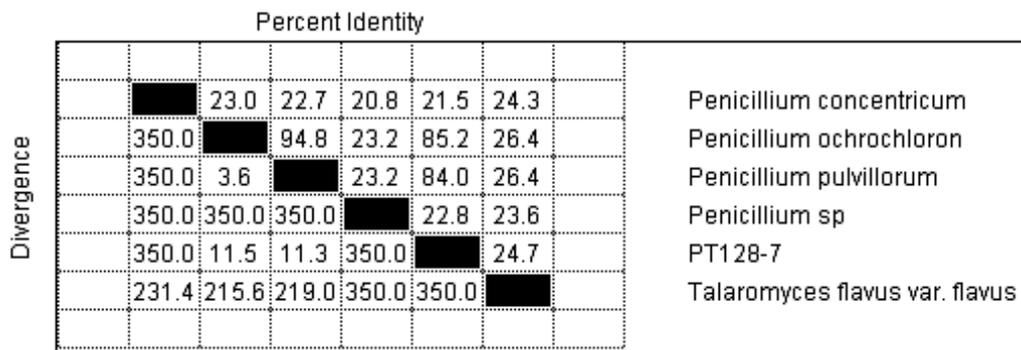
Identities = 817/953 (85%), Gaps = 61/953 (6%) Strand=Plus/Plus

㉢ *Penicillium* sp. SWP-2007b isolate NRRL 35509 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1126

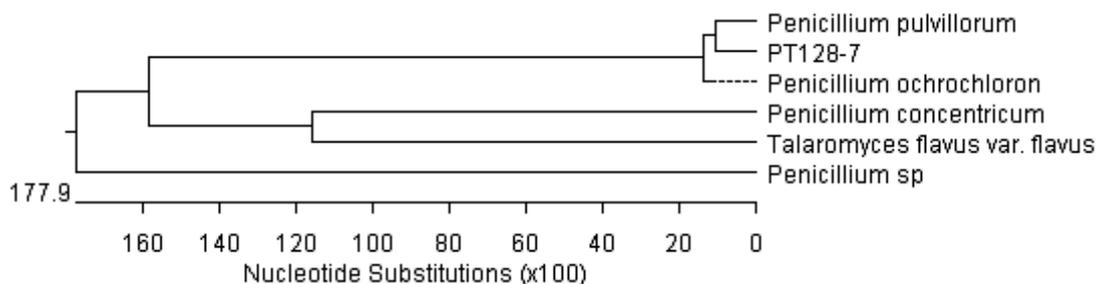
Score = 878 bits (475), Expect = 0.0

Identities = 502/514 (97%), Gaps = 6/514 (1%) Strand=Plus/Plus

㉣ Gene identity 결과



㉤ Phylogenic tree 결과



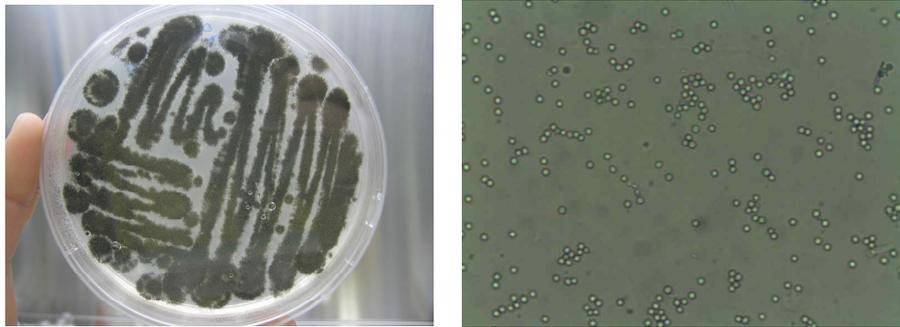
㉞ 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Penicillium* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Penicillium ochrochloron* 와 86% 동일한 결과가 나타났다.
- 또한, DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석 결과 역시 *Penicillium ochrochloron*로 확인됨에 따라 최종적으로 *Penicillium ochrochloron*로 동정되었다.

□ *Penicillium glabrum*

㉞ 균사 생장 형태: 포자의 형태로 보아 *Penicillium* sp. 곰팡이로 추정되었다.

400X



㉞ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 거의 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 균일

㉞ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv	16	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT	75
Sbjct	3	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT	62
Querv	76	GAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTATACCTTGTTG	135
Sbjct	63	GAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTGTACCTTGTTG	122
Querv	136	CCGCCTCACGGCCCGGGGGGCTTCTGCCCCGGGTCGCGCGCACCG	195
Sbjct	123	CCGCCTCACGGCCCGGGGGGCTTCTGCCCCGGGTCGCGCGCACCG	182

Querv	196	GAACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCATAAACTAAATAAGTTAAAAA	255
Sbjct	183	GAACTCTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCATAAACTAAATAAGTTAAAAA	242
Querv	256	GGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC	315
Sbjct	243	GGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC	302
Querv	316	GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG	375
Sbjct	303	GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG	362
Querv	376	GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGT	435
Sbjct	363	GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGT	422
Querv	436	CCCCCGGGGACGGGTCCGAAAGGCAGCGGGCACCGAGTCCGGTCTCTC	495
Sbjct	423	CCCCCGGGGACGGGTCCGAAAGGCAGCGGGCACCGAGTCCGGTCTCTC	482
Querv	496	GCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGGCAGGCCAGCCGACAACCA	555
Sbjct	483	GCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGGCAGGCCAGCCGACAACCA	542
Querv	556	TTCAGGT-GACCTCGGATCAGGTAG	579
Sbjct	543	TTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG	567

Ⓐ *Penicillium glabrum* isolate 909 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 Length=608

Score = 1031 bits (558), Expect = 0.0

Identities = 563/565 (99%), Gaps = 1/565 (0%) Strand=Plus/Plus

Ⓑ *Penicillium adametzioides* isolate 432 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 Length=607

Score = 1009 bits (546), Expect = 0.0

Identities = 560/566 (98%), Gaps = 4/566 (0%) Strand=Plus/Plus

Ⓒ *Penicillium thomii* strain 1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Length=566

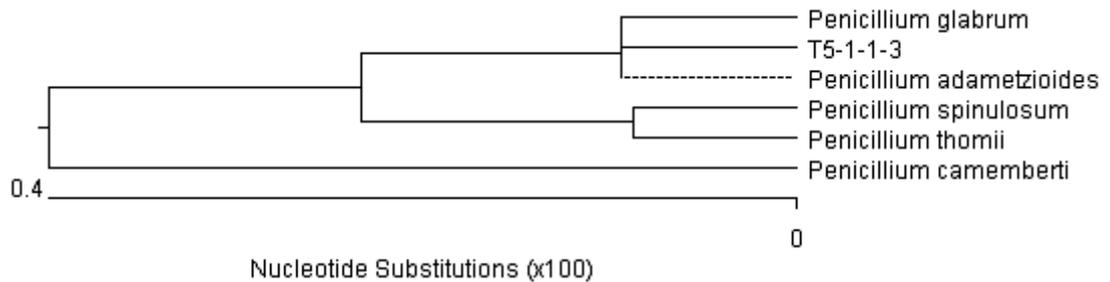
Score = 983 bits (532), Expect = 0.0

Identities = 548/555 (98%), Gaps = 4/555 (0%) Strand=Plus/Plus

라) Gene identity 결과

		Percent Identity						
Divergence		■	98.4	99.5	99.6	99.3	99.1	Penicillium adametzioides
		0.7	■	97.8	98.8	98.2	97.8	Penicillium camemberti
		0.0	0.7	■	99.2	98.7	99.6	Penicillium glabrum
		0.2	0.6	0.2	■	100.0	99.0	Penicillium spinulosum
		0.4	0.7	0.4	0.0	■	98.5	Penicillium thomii
		0.2	0.9	0.2	0.4	0.6	■	T5-1-1-3

마) Phylogenic tree 결과



바) 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Penicillium* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Penicillium glabrum* 와 99% 동일한 결과가 나타났다
- 또한, DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석 결과 역시 *Penicillium glabrum*로 확인됨에 따라 최종적으로 ***Penicillium glabrum***로 동정되었다.

○ Minor 미생물

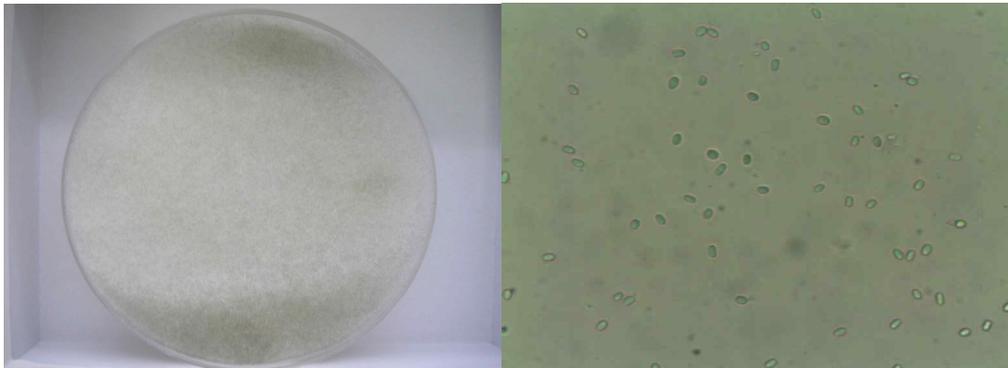
발효차내의 미생물을 분리한 결과, minor 미생물로서 *Absidia corymbifera*, *Scopulariopsis brevicaulis*의 곰팡이 2종과 효모 1종(*Candida tropicalis*)이 minor 미생물로서 분리되었다.

minor fungus/yeast		
		
<i>Absidia ramosa</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Candida tropicalis</i>

□ *Absidia ramosa*

㉑ 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 ***Absidia sp.*** 곰팡이로 추정되었다.

400X



㉒ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 거의 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 균일

㉓ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

```

Querv: 6  acctgcggaaggatcattactgagagettaaaaaaccactagttegggg;          65
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbict: 12  acctgcggaaggatcattactgagagettaaaaaaccactagttegggg;          71
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Querv: 66  tctaagtagttcctcacagttttgtgcaaaagtcgggtcaacctggttggc;        125
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbict: 72  tctaagtagttcctcacagttttgtgcaaaagtcgggtcaacctggttggc;        131

```

```

Querv: 126 ccttggatctctggttgttggcatagagaccctccttttaggagacttg      185
          |||
Sbict: 132 ccttggatctctggttgttggcatagagaccctccttttaggagacttg      191

Querv: 186 agatctaggctgcttgaaacgagacgtatggacccttctttcaggagac      245
          |||
Sbict: 192 agatctaggctgcttgaaacgagacgtatggacccttctttcaggagac      251

Querv: 246 gtcaaaaagcaagcaagcgaagcctttggggctctagtactaactatccc      305
          |||
Sbict: 252 gtcaaaaagcaagcaagcgaagcctttggggctctagtactaactatccc      311

Querv: 306 attcttctcgtgtaaaccatgatgtacgaaaaaagttagttgttaactt      365
          |||
Sbict: 312 attcttctcgtgtaaaccatgatgtacgaaaaaagttagttgttaactt      371

Querv: 366 ttggcaatggatctcttggttctcgcacgcgatgaagagcgtagcagaagt      425
          |||
Sbict: 372 ttggcaatggatctcttggttctcgcacgcgatgaagagcgtagcagaagt      431

Querv: 426 tgcgacttgcattcatagcgaatcatcaggttctcgaacgcacatcttgcg      485
          |||
Sbict: 432 tgcgacttgcattcatagcgaatcatcaggttctcgaacgcacatcttgcg      491

Querv: 486 atctactaggcacagtgtttcagttatctgcaactaccaatcagttcaa      545
          |||
Sbict: 492 atctactaggcacagtgtttcagttatctgcaactaccaatcagttcaa      551

Querv: 546 gaatctaagcgaactggaaatgggcttctgttggatggcattcagttgct      605
          |||
Sbict: 552 gaatctaagcgaactggaaatgggcttctgttggatggcattcagttgct      611

Querv: 606 aaatacatttagtccttagcgaattggccttagtcattttgccggatgta      665
          |||
Sbict: 612 aaatacatttagtccttagcgaattggccttagtcattttgccggatgta      671

Querv: 666 gcctgaggagcaacgacttggttagtgagttcataattccaagtcaatc      725
          |||
Sbict: 672 gcctgaggagcaacgacttggttagtgagttcataattccaagtcaatc      731

Querv: 726 gaactaggtcttaatctttacggactagtgagaggatctaacttgggtc      785
          |||
Sbict: 732 gaactaggtcttaatctttacggactagtgagaggatctaacttgggtc      791

Querv: 786 aaactcacatctagatctgaaatcaactgagatcacccgctgaacttaa      845
          |||
Sbict: 792 aaactcacatctagatctgaaatcaactgagatcacccgctgaacttaa      851

Querv: 846 a 846
          |
Sbjct: 852 a 852

```

Ⓐ Absidia sp. TU-GM13 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
Length=818

Score = 1469 bits (795), Expect = 0.0

Identities = 800/802 (99%), Gaps = 2/802 (0%) Strand=Plus/Plus

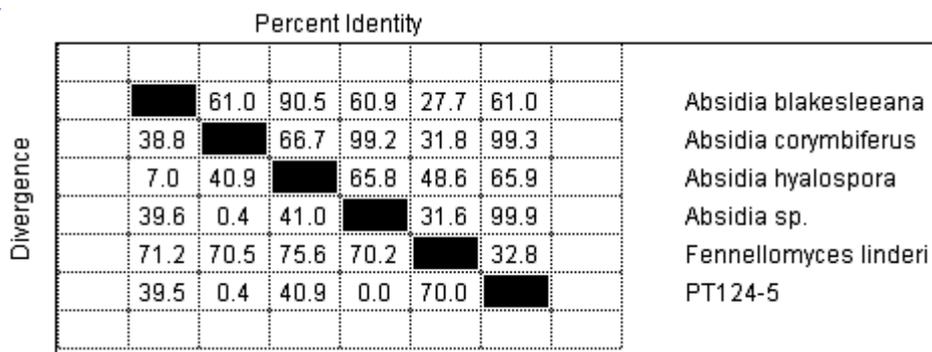
㉑ Absidia(Lichtheimia) ramosa strain CNRMA/F 09-12, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 860

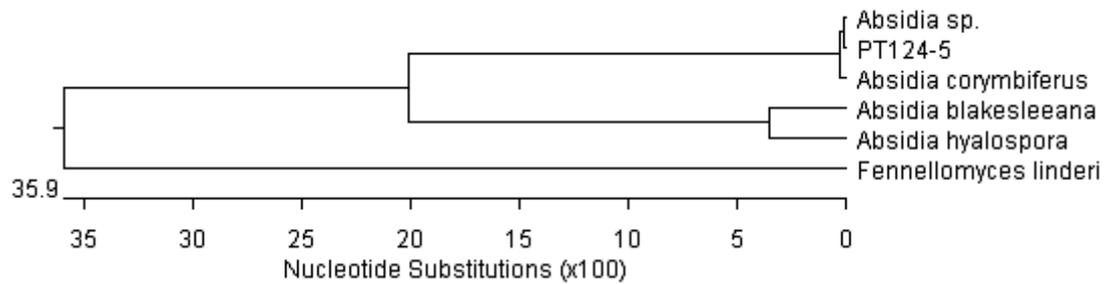
Score = 1667 bits (841), Expect = 0.0

Identities = 841/841 (100%), Strand=Plus/Plus

㉒ Gene identity 결과



㉓ Phylogenic tree 결과



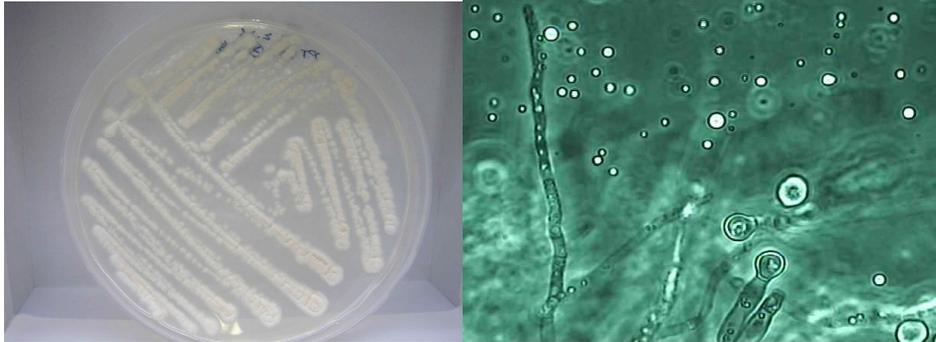
㉔ 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Absidia sp.* 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Absidia ramosa* 와 100% 동일한 결과가 나타났다.
- DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석 결과 *Absidia ramosa* 로 확인되었다.

□ *Scopulariopsis brevicaulis*

㉑ 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Scopulariopsis sp.* 곰팡이로 추정되었다.

400X



㉒ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 거의 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 균일

㉓ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv	22	GGAAGTAAAAATCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT	81
Sbjct	3	GGAAGTAAAAATCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGAT	62
Querv	82	TTACTCTTCAAAACCCATTGTGAACCTTACCTCTTGCCGCGCGTTGCCT	141
Sbjct	63	TTACTCTTCAAAACCCATTGTGAACCTTACCTCTTGCCGCGCGTTGCCT	122
Querv	142	CGGGGTCTGGGTCGGCcgcgcccctcaccggcgcccgctccccgtccccg	201
Sbjct	123	CGGGGTCTGGGTCGGCGCGCCCTCACGGGCGCCGTCCCCGTCCCCG	182
Querv	202	cgcgccAAACTCTAAATTTGAAAAAGCGTACTGCACGTTCTGATTCAAA	261
Sbjct	183	CGGCCAAACTCTAAATTTGAAAAAGCGTACTGCACGTTCTGATTCAAA	242
Querv	262	GTCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC	321
Sbjct	243	GTCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC	302
Querv	322	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA	381
Sbjct	303	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA	362
Querv	382	CCCGGCAGCAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCT	441
Sbjct	363	CCCGGCAGCAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCT	422
Querv	442	AGCCCTACGGGGCCTGCCGTCGCCCGGTGTTGGGGCTCTACGGGTGGGG	501
Sbjct	423	AGCCCTACGGGGCCTGCCGTCGCCCGGTGTTGGGGCTCTACGGGTGGGG	482

```

Querv 502 cGCAGTCCCCGAAATGTAGTGGCGGTCCAGCCGCGGCGCCCCCTGCGTA 561
          |||
Sbjct 483 CGCAGTCCCCGAAATGTAGTGGCGGTCCAGCCGCGGCGCCCCCTGCGTA 542

Querv 562 ATCTCGCATCGGGTCCCGGCGAAGGCCAGCCGTCGAACCTTTTATTTCA 621
          |||
Sbjct 543 ATCTCGCATCGGGTCCCGGCGAAGGCCAGCCGTCGAACCTTTTATTTCA 602

Querv 622 CGGATCAGGTAGG 634
          |
Sbjct 603 CNGATCAGGTAGG 615

```

㉑ *Scopulariopsis brevicaulis* isolate 2737 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 Length=655

Score = 1129 bits (611), Expect = 0.0

Identities = 612/613 (99%), Gaps = 0/613 (0%) Strand=Plus/Plus

㉒ *Scopulariopsis* sp. RP38.3 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 Length=577

Score = 1038 bits (562), Expect = 0.0

Identities = 567/569 (99%), Gaps = 2/569 (0%) Strand=Plus/Plus

㉓ *Doratomyces* sp. HZ-10 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 Length=650

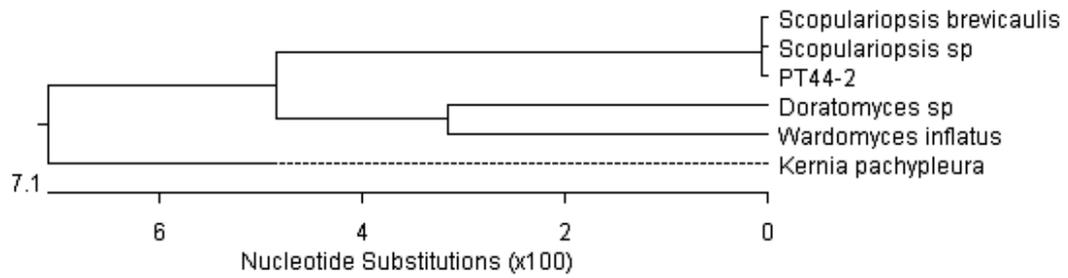
Score = 660 bits (357), Expect = 0.0

Identities = 545/629 (86%), Gaps = 39/629 (6%) Strand=Plus/Plus

㉔ Gene identity 결과

		Percent Identity						
Divergence		■	84.1	86.5	86.3	85.6	88.6	Doratomyces sp
		11.0	■	85.7	85.5	85.3	83.7	Kernia pachypleura
		10.7	8.6	■	99.8	99.7	86.1	PT44-2
		10.7	8.7	0.0	■	99.5	85.9	Scopulariopsis brevicaulis
		11.5	8.6	0.0	0.0	■	86.1	Scopulariopsis sp
		6.3	9.1	8.2	8.2	8.3	■	Wardomyces inflatus

㉓ Phylogenetic tree 결과



㉔ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Scopulariopsis sp.* 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Scopulariopsis brevicaulis* 와 99% 동일한 결과가 나타났다.
- 또한, DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenetic tree를 분석 결과 역시 *Scopulariopsis brevicaulis*로 확인됨에 따라 최종적으로 *Scopulariopsis brevicaulis*로 동정되었다.

□ *Candida tropicalis*

- ㉕ 균사 성장 형태: 효모로 추정되었다.



㉖ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 균체가 전형적인 이스트의 모양을 하고 있었으며 출아해 나가는 모습도 이스트의 출아와 동일한 형태

㉔ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

```

Querv 309 CAAAGGGCATGGCTGTATGAGTGTCAATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTT 368
          !!!!!!!!!!!!!!! !!!!! !!!!! !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct 322 CAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCCCTCAAACCCCGGGTT 381

Querv 369 AATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAAACTTATTTTAAG 428
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct 382 AATACGCTAGGTTTGTGTTGAAAGAATTTAACGTGGAAACTTATTTTAAG 441

Querv 429 TATCCAAAACGCTTATTTTGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTCTATAA 487
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct 442 TATCCAAAACGCTTATTTTGCTAGTGGCCACCACAATTTATTTTC-ATAA 500

Querv 488 AATCAGGTAG 497
          !!!!!!!!!!!!!
Sbjct 501 AATCAGGTAG 510
    
```

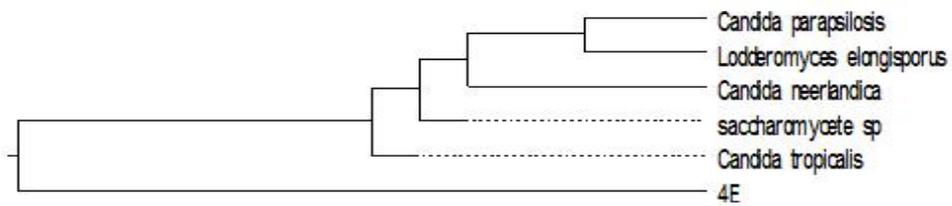
- ㉔ *Candida tropicalis* strain zhuan7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=547
Score = 322 bits (174), Expect = 9e-85
Identities = 185/190 (97%), Gaps = 2/190 (1%) Strand=Plus/Plus
- ㉔ *Saccharomyce* sp. jbra529 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=467
Score = 235 bits (127), Expect = 1e-58
Identities = 173/193 (89%), Gaps = 11/193 (5%) Strand=Plus/Plus
- ㉔ *Candida neerlandica* strain NRRL Y-27057 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=510
Score = 178 bits (96), Expect = 2e-41
Identities = 120/131 (91%), Gaps = 4/131 (3%) Strand=Plus/Plus

라) Gene identity 결과

		Percent Identity					
Divergence							
			33.5	24.0	37.1	28.9	37.3
		66.0		86.9	89.8	81.8	91.9
		70.6	10.8		85.1	99.7	85.4
		51.0	11.7	10.9		78.4	92.7
		76.0	25.1	0.3	30.1		78.8
	56.2	10.7	12.1	6.2	22.2		

4E
 Candida neerlandica
 Candida parapsilosis
 Candida tropicalis
 Lodderomyces elongisporus
 saccharomycete sp

마) Phylogenic tree 결과

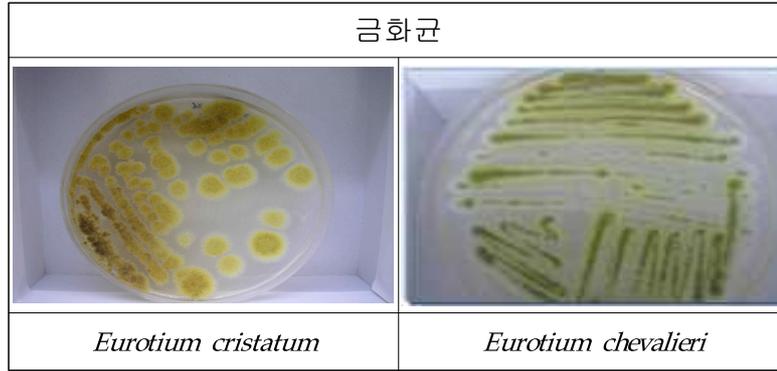


바) 결론

- 배지내의 생장모습과 포장의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 이스트일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Candida tropicalis*와 97%이상의 상동성을 나타냈다.
- DNASTAR를 이용하여 이들 염기서열의 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석하여 유사도를 측정 한 결과 *Candida tropicalis*의 가능성이 가장 높게 나타났다.

○ 금화균

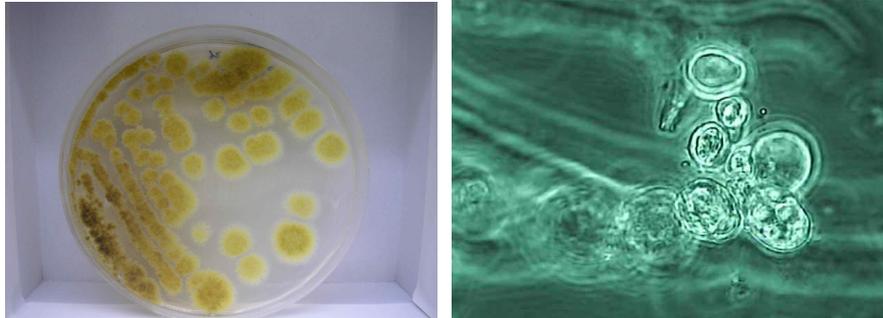
- 금화는 예로부터 오래된 미생물발효차의 내부에 생성된다고 하는 노란색의 가루 형태의 물질로 고품질의 지표로까지 인식되고 있으나 그 실체에 대해서는 자세히 알려지지 않은 상태이다. 본 연구에서는 금화가 생성된 미생물발효차로부터 노란색 균체를 가지고 있는 곰팡이를 분리한 결과, 그것이 *Eurotium cristatum*와 *Eurotium chevalieri*를 최종 확인하였다.



□ *Eurotium cristatum*

㉠ 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Eurotium sp.* 곰팡이로 추정되었다.

400X



㉡ 위상차 현미경을 통한 포자의 형태

: 포자가 원형에 가까운 형태이며 포자간 크기가 불균일

㉢ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv	1	TGGTATGTCTGCATTATAATCAGAGTCGGATTTAGTGATATACTAACAG'	60
Sbjct	1	TGGTATGTCTGCATTATAATCAGAGTCGGATTTAGTGATATACTAACAG'	60
Querv	61	GACTATCTCCGGCGAGCACGGTCTCGACGGCTCTGGTGTGTAAGTACAG'	120
Sbjct	61	GACTATCTCCGGCGAGCACGGTCTCGACGGCTCTGGTGTGTAAGTACAG'	120
Querv	121	GGATGGATGCGTATCGGATATGGATATCTAAATGGATTGCAGCTACAAT'	180
Sbjct	121	GGATGGATGCGTATCGGATATGGATATCTAAATGGATTGCAGCTACAAT'	180
Querv	181	CCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTTGCTTAATT'	240
Sbjct	181	CCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTTGCTTAATT'	240

```

Querv 241 ATGTGGAAAACAGTTCTGACAGTGACAGGCCTCCAACAACAAATATGTC 300
          |||
Sbjct 241 GTGTGGAAAACAGTTCTGACAGTGACAGGCCTCCAACAACAAATATGTC 300

Querv 301 CCTCGTCGACCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCC' 360
          |||
Sbjct 301 CCTCGTCGACCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCC' 360

Querv 361 CTTCCGTCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCCGGTAACAAC' 412
          |||
Sbjct 361 CTTCCGTCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCCGGTGCCGGTAACAAC' 412

```

㉑ *Eurotium cristatum* strain NRRL 78 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 Length=578

Score = 1024 bits (554), Expect = 0.0

Identities = 554/554 (100%), Gaps = 0/554 (0%) Strand=Plus/Plus

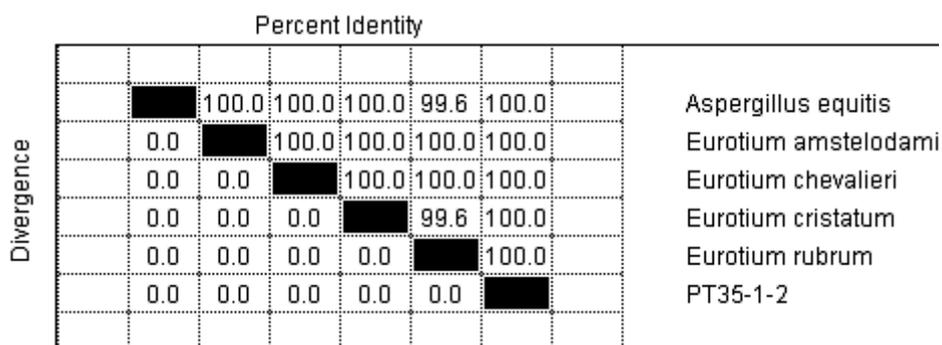
㉒ *Eurotium amstelodami* strain NRRL 90 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=578

Score = 1024 bits (554), Expect = 0.0

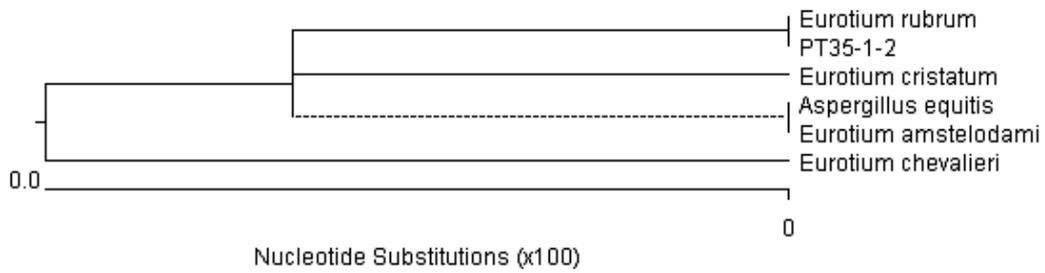
Identities = 554/554 (100%), Gaps = 0/554 (0%) Strand=Plus/Plus

㉓ *Eurotium rubrum* isolate wb190 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer

㉔ Gene identity 결과



㉔ Phylogenic tree 결과



㉔ 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Eurotium* sp. 곰팡이 일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Eurotium cristatum* 와 100% 동일한 결과가 나타났다.
- DNASTAR를 이용한 염기서열의 Gene identity와 Phylogenic tree를 분석 결과 *Eurotium cristatum* 으로 확인되었다.

□ *Eurotium chevalieri*

㉔ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv: 10	ggatgaacctgcggaaggatcattaccgagtgccggccctctgggtccaa	69
Sbict: 7	ggatgaacctgcggaaggatcattaccgagtgccggccctctgggtccaa	66
Querv: 70	tgtctatctgtaccctgttgccttcggcgtggccacggcccggcggagac	129
Sbict: 67	tgtctatctgtaccctgttgccttcggcgtggccacggcccggcggagac	126
Querv: 130	cgctgtctgaagtttgagctctgagtttttagttaacaatcgttaaaa	189
Sbict: 127	cgctgtctgaagtttgagctctgagtttttagttaacaatcgttaaaa	186
Querv: 190	ggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataat	249
Sbict: 187	ggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataat	246
Querv: 250	gcagaattcagtgaaatcatcgagctcttgaacgcacattgcgcccctg	309
Sbict: 247	gcagaattcagtgaaatcatcgagctcttgaacgcacattgcgcccctg	306
Querv: 310	ggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcacggcttctgtgt	369
Sbict: 307	ggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcacggcttctgtgt	366
Querv: 370	ccctggcaacggggacggcccaaaaaggcagtgccggcaccatgtctgg	429

```

Sbict: 367 ccctggcaacggggacgggcccacaaaggcagtgccggcaccatgtctgg           426
Querv: 430 atggggctttgtcaccggctcccgtaggtccagctggcagctagcctcg       489
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbict: 427 atggggctttgtcaccggctcccgtaggtccagctggcagctagcctcg       486
Querv: 490 ttttaaccaggttgacctcggatcaggtagggtatcccggctgaacttaag       549
          !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbict: 487 ttttaaccaegttgacctcggatcaggtagggtatcccggctgaacttaag       546
Querv: 550 gcggaggaa 558
          !!!!!!!!!!!!!
Sbjct: 547 gcggaggaa 555

```

① *Eurotium chevalieri* strain NRRL 78 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, Length = 578

(나) 미생물발효차 저장 중 주요 미생물의 거동 분석

- 미생물발효차는 전통적 방법인 건식발효법과 속성 발효법인 습식발효으로 나뉘는데 건식발효법 모차를 긴 시간동안 자연 발효시키는 것이고 습식발효법은 퇴적 속성발효를 시켜 제조한다. 그러나 건식발효법에 의해 제조되는 청병은 물론이고 습식발효법에 의해 제조되는 숙병 발효차도 시간이 지나면서 맛이 부드러워지기 때문에 저장(후숙)과정이 대단히 중요하다고 알려져 있다.
- 미생물발효차의 저장과정 중의 주요 미생물의 거동을 알아보기 위하여 저장기간이 20년~40년이 된 숙병 발효차와 저장 기간이 10년~60년이 된 청병 발효차를 대상으로 생육하고 있는 미생물을 확인하였다.
- 그 결과, 20년 저장 한 숙병발효차(PT3)에서는 *Aspergillus niger* 와 함께 *Penicillium* 속 곰팡이(*Penicillium glabrum*)가 확인되었으나 30년 저장 한 숙병발효차에는 *Aspergillus* 속 곰팡이는 보이지 않고 *Penicillium glabrum*가 우점종을 차지하고 있었다.
- 반면, *Aspergillus* 속 곰팡이인 *Aspergillus funigatus*는 20년 저장 시료(PT3)에는 발견되지 않다가 30년 저장 발효숙병(PT4, 5)에서 *Penicillium glabrum*과 함께 발견되어 이 곰팡이는 다른 *Aspergillus* 속 곰팡이와 달리 *Penicillium*에 의한 길항작용에 영향을 받지 않는 것으로 생각되었다. 또한 40년 저장 한 숙병발효차(PT6)에서는 *Penicillium glabrum* 대신 *Penicillium ochrochloron*의 존재가 확인되었다.

- 또한, 청병의 경우 10년~20년 저장 한 청병에서는 *Aspergillus* 속 곰팡이의 존재가 확인되었으나 40년 이상 저장 한 청병에서는 *Aspergillus* 속 곰팡이가 발견되지 않았고 대신 금화균인 *Eurotium cristatum*의 존재가 확인되어 오래된 미생물발효차에 금화가 생성된다는 이야기가 전혀 근거 없는 이야기는 아니라는 것이 확인 되었다. 다만, 청병에서 확인된 미생물의 수가 매우 적기 때문에 반복 실험을 통하여 재현성을 확인할 필요가 있다고 생각되었다.

Table 1-10. Behaviors of microorganisms in microbial fermented tea during storage

Type	Sample list	Identified mold list				
		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Eurotium cristatum</i> **
숙병	PT3	+			+	
	PT4		+		+	
	PT5		+		+	
	PT6		+		+	
	PT7		+	+		
청병	PT157	+	+			
	PT159	+	+			
	PT160	+	+			
	PT161					+
	PT162					+
	PT163					+
	PT164					+

PT3: 20년 저장 숙병, PT4: 30년 저장 숙병, PT5: 30년 저장 숙병,

PT6: 40년 저장 숙병, PT7: 40년 저장 숙병,

PT157: 10년 저장 청병, PT158: 20년 저장 청병, PT160: 20년 저장 청병, PT161: 40년 저장 청병

PT162: 40년 저장 청병, PT163: 45년 저장 청병, PT164: 60년 저장 청병,

** : 금화균

(다) 차 추출물과 주요 미생물의 생육과의 관계

- 앞에서 수행된 미생물발효차 제조 공정 중의 주요 미생물 거동을 확인 한 결과 미생물발효 초기에 *Aspergillus* 속 미생물이 우점을 차지하고 있음이 확인됨에 따라, 이들 미생물의 생육과 차의 성분과의 상관관계를 알아보았다.
- 미생물발효차의 재료인 모차는 녹차와 거의 비슷한 공정으로 제조되기 때문에 녹차의 열수 추출물에 agar를 넣어 굳힌 후 미생물발효차로부터 분리된 *Aspergillus*,

Penicillium 그리고 효모 각 1종씩을 petri dish 가운데에 1점 접종하고 4일간 배양한 후, 성장 속도를 비교하였다. 그 결과, *Aspergillus niger*는 녹차 추출물이 함유된 배지에서도 잘 자라는 반면, *Penicillium glabrum*과 *Candida tropicalis*의 성장 속도가 *Aspergillus* 보다 현저히 느린 것을 확인할 수 있었다. 이는 녹차 추출물에 함유되어 있는 성분이 미생물의 생육과 관여하고 있음을 시사하는 것으로 초기 발효 시 *Aspergillus niger*가 우점종을 차지하게 되는 주요 원인으로 생각되었다^{15,16}).

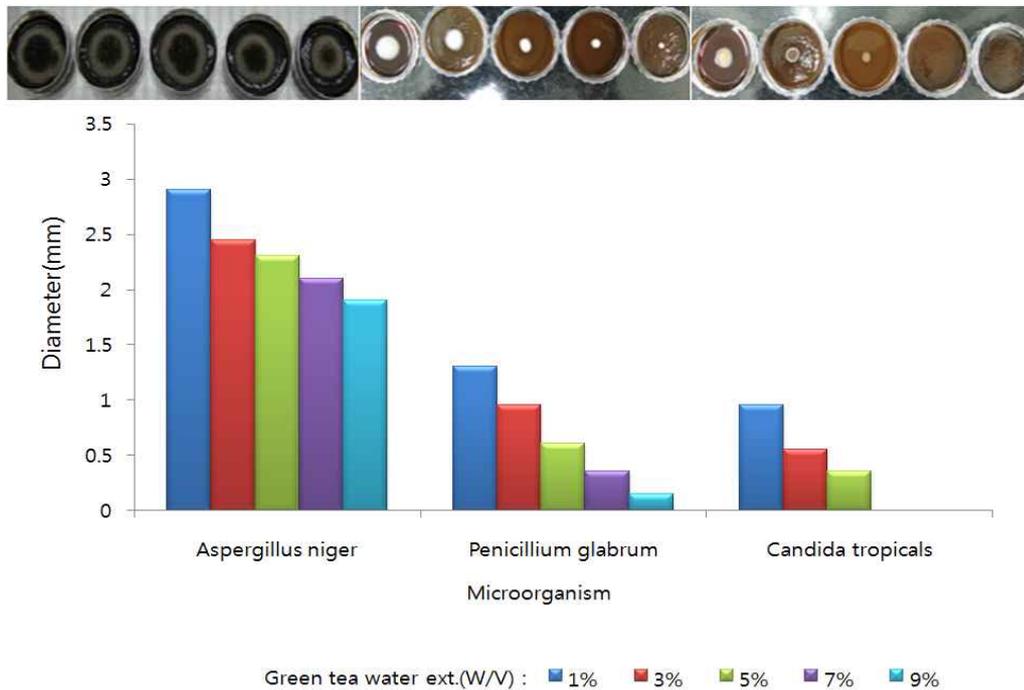


Fig. 1-6. Growth of main microorganisms obtained from microbial fermented tea in medium containing the hot water extracts of green tea.

(라) 미생물발효차의 미생물 독소 진단항목 설정 및 분석

- 미생물발효차는 주요 미생물이 *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속 곰팡이가 밝혀짐에 따라 이 균주가 생성할 수 있는 독소인 aflatoxin 과 Ochratoxin의 분석법(ELISA kit법, HPLC분석법)을 확립하였다¹⁷⁻²⁰. 또한 확립된 2종류의 분석법을 이용하여 총 90여종의 미생물발효차 분석을 실시하였다.
- 그 결과 ELISA kit를 사용한 분석에서 4종의 시료로부터 aflatoxin의 잔류 가능성과 5종의 시료로부터 Ochratoxin의 잔류가능성이 제시되었다. 이를 시료를 HPLC로 분석한 결과 4종의 시료에서 aflatoxin의 존재가 확인되었으며 Ochratoxin과 Patulin의

존재는 확인되지 않았다.

Table 1-11. The analysis of microtoxins

Sample No.	FT49	FT50	FT59	FT60	FT69
Area	ChuYi tea factory (SiChuan)	YouYi tea factory (SiChuan)	ChaMing tea factory (YunNan)	LangHa tea factory (YunNan)	YiYang tea factory (HuNan)
Year	1995	2005	2005	2004	2004
Aflatoxin	Kit	-	+	++	+
	HPLC	-	0.471*	1.85*	1.28*
Ochratoxin	Kit	+	+	+	+
	HPLC	-	-	-	-
Patulin	HPLC	-	-	-	-

* : 단위(µg/kg, ppb)

(3) 외국산 미생물발효차의 이화학적 성분(일반성분, 특수성분, 향기성분 등) 분석

(가) 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분

- 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분의 변화를 검토하기 위하여 일반성분분석을 실시하였다.
- 각 시료의 총질소의 함량은 원료인 찻잎의 품질에 따라 고급 찻잎을 사용하는 경우 높고 저급 찻잎을 사용하는 경우 낮은 함량을 보였다. 저장 기간 따른 차이는 발견되지 않았다. 고급차가 저급차에 비하여 1~2% 정도 높았으나 보존기간에 따른 유의할 만한 차이는 보이지 않았다.
- 조지방 함량은 고급 찻잎으로 제조된 차는 낮고 저급 찻잎으로 제조한 차는 높은 경향을 보였다. 저장기간에 따른 차이는 보이지 않았다.
- 조섬유와 조회분은 뚜렷한 경향을 보이지 않았다.
- L 값, a 값, b 값은 모두 고급 찻잎으로 제조한 차의 수치가 높았으며, 저장기간이 길수록 높아지는 경향을 보였다.

(나) 미생물발효차의 원료품질 및 보존기간에 따른 이화학적 성분분석

① pH, 산도, 고형분, 총페놀 분석

- pH, 산도, 총페놀 함량은 비교적 저장기간이 길수록 높은 경향을 확인할 수 있었으며 gallic acid의 함량은 차입의 등급이나 보관연도에 따른 유의할만한 변화 양상을 나타내지 않았다.

Table 1-12. pH, acidity, soluble solids, and total phenolics of microbial-fermented teas

Area	Year	Grade	pH	acidity (%)	soluble solids (Brix)	Total phenolics (mg/100 g)
HaiWan tea factory	2008	high	5.76±0.02	1.12±0.07	20.81±1.1	8777.89
	2008	low	5.50±0.01	1.15±0.04	22.79±1.09	8107.49
	2004	high	5.48±0.02	1.28±0.04	23.26±0.63	9537.77
	2004	low	5.51±0.02	1.27±0.07	18.75±1.1	9397.06
YunNan Tea Production Co.	2008	low	6.21±0.01	0.96±0.06	22.83±0.64	8390.55
	2008	high	6.12±0.01	0.88±0.02	22.09±0.63	9041.68
	2004	low	5.60±0.02	1.16±0.03	18.67±0.63	10112.58
	2004	high	5.60±0.01	1.38±0.07	26.39±0.63	9094.92
MenHai tea factory	2008	very low	5.92±0.02	0.75±0.08	16.63±1.11	9208.87
	2008	very low	5.95±0.02	0.74±0.03	18.06±0.64	8256.49

② 유리당 및 유기산, 비타민 함량 분석

- 유리당을 분석한 결과 차잎의 등급이나 보관연도에 따라 유의할만한 변화양상을 보이지 않았으며, formic acid, maleic acid, oxalic acid, citric acid 등의 유기산의 경우 저급에 비해 고급에 함유된 양이 대체적으로 높게 나왔다.
- 비타민 함량을 측정된 결과 ascorbic acid는 모든 시료에서 검출되지 않은 반면 모든 시료에서 검출된 α-tocopherol은 고급보다는 저급에서 2004년산보다는 2008년산에서 상대적으로 함량이 높음을 확인할 수 있었다.

Table 1-13. The contents of sugars, organic acids, and vitamins in microbial fermented teas

Area		HaiWan tea factory				YunNan Tea Production Co.				MenHai tea factory	
Year		2008	2008	2004	2004	2008	2008	2004	2004	2008	2008
Grade		high	low	high	low	high	low	high	low	very low	very low
Sugars (mg/g)	Rhamnose	3.37	4.62	N.D	19.09	2.53	25.30	N.D	N.D	6.06	N.D
	Galactose	2.23	N.D	N.D	N.D	N.D	11.22	N.D	57.05	N.D	N.D
	Glucose	0.10	N.D	N.D	110.14	4.12	N.D	6.97	5.26	3.96	3.74
	Fructose	N.D	N.D	0.44	N.D	13.91	1.87	22.52	1.76	N.D	N.D
	Ribose	N.D	0.82	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Lactose	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
organic acids (mg/g)	Formic	2848.63	2173.85	2135.69	1661.23	N.D	1619.35	2834.53	1882.63	2344.01	3640.54
	Succinic	171.11	180.27	266.05	136.82	1629.14	809.24	854.96	77.83	34.31	113.94
	Maleic	1384.45	1016.2	1300.95	590.02	43.15	1140.1	5124.92	2130.14	5536.65	3360.91
	Oxalic	6104.58	5375.08	5868.35	5317.26	3155.95	5435.02	4748.56	5150.4	5725	15163.74
	Citric	43.72	301.64	367.67	222.02	5520.91	254.37	1776.9	221.79	234.21	301.71
Vitamins (mg/100g)	Benzoic	35.26	N.D	N.D	N.D	336.64	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	α -Tocopherol	373.54	371.27	149.78	225.33	36.55	500.86	104.59	114.76	410.40	190.90
	Vitamin C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	312.00	N.D.	N.D	N.D	N.D	N.D

(다) 관능적 등급에 따른 미생물발효차의 이화학적 성분 및 향기성분 차이

① 관능적 등급에 따른 이화학적 성분의 차이

- 관능적 등급이 높았던 1994년, 1996년산 시료는 다른 시료에 비해 조지방 및 총페놀 함량이 높게 함유되어 있으며, 가용성 고형분의 함량도 높은 편임을 확인 할 수 있었다.

Table 1-14. Proximate compositions of microbial fermented teas

Area	HaiWan tea factory	MenHai tea factory	MenHai tea factory	MenHai tea factory	KunMing tea factory
Year	2004	2008	2005	1996	1994
Water ¹	8.30±0.21	9.56±0.07	11.73±0.10	7.74±0.11	7.44±0.06
Crude ash ¹	7.85±0.11	7.80±0.11	7.39±0.11	6.68±0.11	7.95±0.11
Crude lipid ¹	0.53±0.09	0.74±0.09	0.67±0.03	0.84±0.02	0.77±0.03
Crude dietary fiber ¹	14.44±0.22	13.84±0.08	13.79±0.07	12.80±0.04	13.21±0.09
Total Nitrogen ¹	35.11±0.33	32.91±0.42	37.04±0.29	36.31±0.11	35.22±0.11
Acidity ¹	1.27±0.04	0.74±0.03	1.16±0.08	1.40±0.05	0.99±0.05
Soluble solids ²	23.26±0.05	18.05±0.05	18.96±0.05	28.53±0.05	26.28±0.05
Total phenolics ³	9537.77	8256.49	8671.72	13681.24	9487.16
Vitamin E ³	149.78	190.90	712.55	664.11	347.73
Vitamin C ³	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Gallic acid ³	797.62	223.26	589.11	447.43	139.46

단위 ¹ : %, ² : Brix, ³ : mg/100g

② 관능적 등급에 따른 발효차의 색도 측정

- 관능적 등급에 따른 발효차의 색도 변화를 측정한 결과 색에 대한 관능평가의 점수가 비교적 높았던 시료들(1994, 1996, 2005년 생산시료)의 L, a, b 값이 높은 경향을 보였다.

Table 1-15. Hunter values of microbial fermented teas

Area	HaiWan tea factory	MenHai tea factory	MenHai tea factory	MenHai tea factory	KunMing tea factory	
Year	2004	2008	2005	1996	1994	
Color	L	25.82±0.50	24.33±0.20	29.53±0.49	30.25±0.94	26.69±0.01
	a	4.46±0.21	3.80±0.09	5.55±0.14	5.76±0.04	4.89±0.30
	b	7.70±0.04	5.86±0.04	10.16±0.04	10.12±0.04	7.47±0.04

③ 관능적 등급에 따른 유기산 및 유리당의 함량

- 관능적 등급에 따른 유기산 및 유리당의 함량 변화를 측정한 결과 유의할만한 차이를 나타내지 않았다.

Table 1-16. The contents of organic acids and free sugars of microbial fermented teas

Sample NO.	PT-36	PT-43	FT-31	PT-174	PT-175	
Area	HaiWan tea factory	MenHai tea factory	MenHai tea factory	MenHai tea factory	KunMing tea factory	
Year	2004	2008	2005	2996	1994	
Organic acids (mg/g)	Formic acid	2135.69	3640.54	N.D	N.D	N.D
	Succinic acid	266.05	113.94	N.D	N.D	N.D
	Maleic acid	1300.95	3360.91	1812.44	2879.71	1286.88
	Oxalic acid	5868.35	15163.74	15750.45	15189.12	14277.72
	Citric acid	367.67	301.71	549.5	809.84	631.66
	Benzoic acid	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Free sugars (mg/L)	Rhamnose	N.D	N.D	2.066	N.D	N.D
	Galactose	N.D	N.D	13.300	N.D	N.D
	Glucose	N.D	3.737	24.350	2.796	1.500
	Fructose	0.441	N.D	23.727	1.069	N.D
	Ribose	N.D	N.D	N.D	0.306	N.D
	Lactose	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Total sugar (mg/L)	25.18±1.27	17.24±0.53	33.03±1.74	16.99±0.90	41.40±0.80	

④ 관능적 등급에 따른 발효차의 향기 성분

- 관능적 등급에 따른 발효차의 향기 성분을 측정된 결과 공통적인 향기 성분으로 Hexnal, Isopropyl disulfide, Furfural, Phenylmethanal, Veratrol, Linalool oxide(III), Linalool oxide(IV) 이 외에도 2-Ethylhexanol, Ionone 등이 발견되었다. 또한, 향에 대한 관능적 등급이 낮은 시료에서는 methyl-, methoxy- 유도체의 향기성분이 검출된 반면 관능적 등급이 높았던 시료(1994년, 1996년산 발효차)에서는 거의 나타나지 않아 이들 성분이 향기 선호도를 결정하는 향기성분일 가능성이 제시되었다.

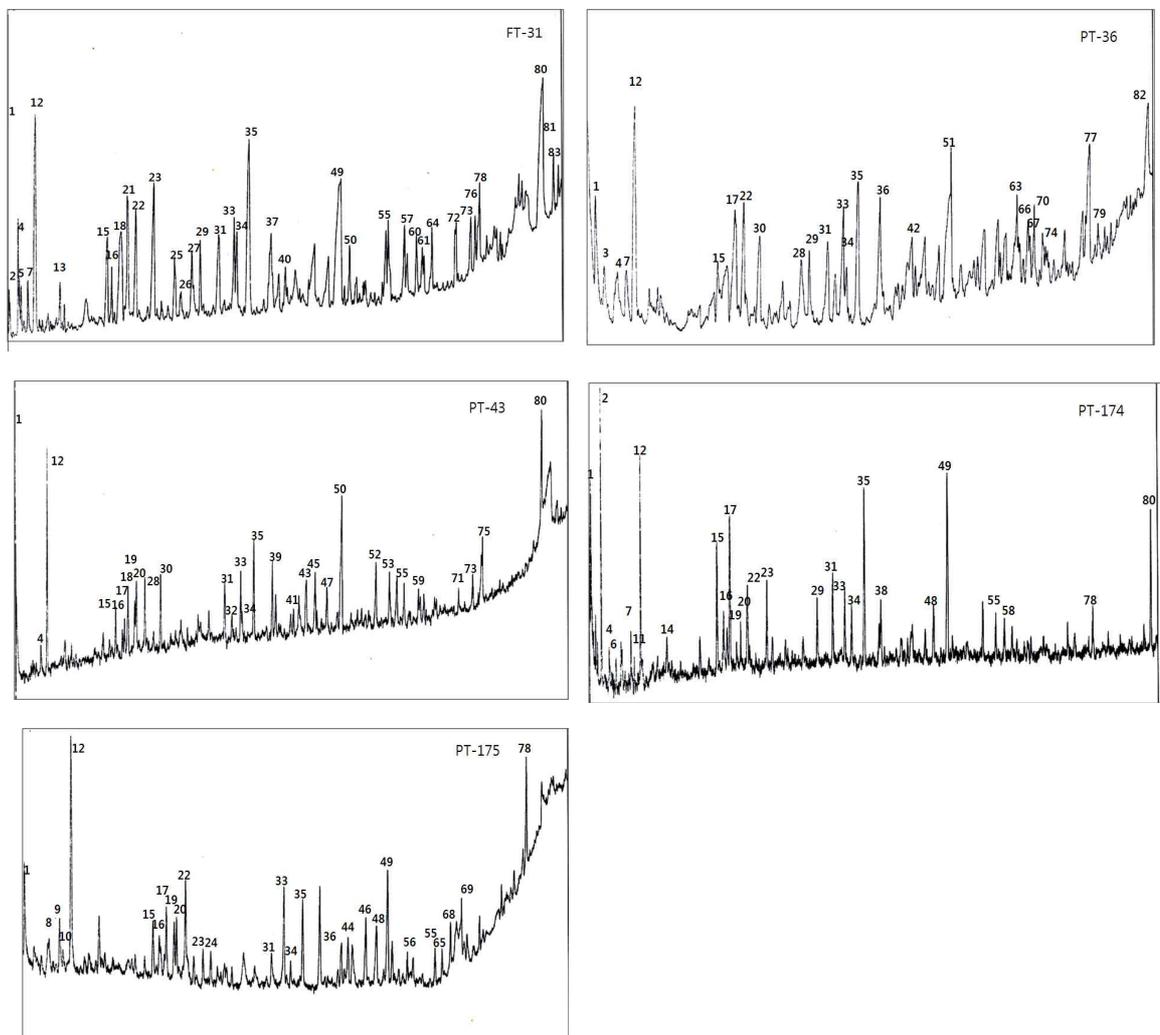


Fig. 1-7. GC-MS chromatograms of volatile compounds in microbial fermented teas

Table 1-17. Volatile contents in of microbial fermented teas

peak No.	Compounds	peak area(%)				
		FT-31	PT-36	PT-43	PT-174	PT-175
1	Hexanal	2.48	4.72	1.24	5.66	4.75
2	3-Pentne-2-one	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1-Hexene	0.00	1.23	0.00	0.00	0.00
4	N-Ethylpyrrole	1.63	0.35	0.00	1.48	0.00
5	Limonene	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00
6	Heptanal	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00
7	2-Hexenal	0.75	1.23	0.84	1.63	0.00
8	2-Bromopentane	0.00	0.00	0.00	0.00	1.97
9	2-Heptene	0.00	0.00	0.00	0.00	3.28
10	2-amylfuran	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72
11	2-Pentylfuran	0.00	0.00	0.00	0.79	0.00
12	Isopropyl disulfide	6.53	16.93	9.97	6.52	12.79
13	2,3-Octanedione	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00
14	2,5-Dimethylhexa	0.00	0.00	0.00	1.11	0.00
15	Linalool oxide(1)	2.76	0.00	2.11	5.60	3.38
16	Furfural	0.72	2.00	0.89	1.78	1.03
17	2,4-Heptadienal(1)	0.00	1.79	1.79	0.00	0.00
18	Linalool oxide(2)	4.97	0.00	4.12	7.02	3.19
19	2,4-Heptadienal(2)	0.00	0.00	4.90	0.54	2.82
20	2-Ethylhexanol	0.00	0.00	0.00	0.94	2.72
21	4-Methyl-2-pentone	2.03	0.00	0.00	0.00	0.00
22	Phenylmethanal	3.08	6.53	3.44	4.50	3.66
23	Linalool	5.09	0.00	0.00	3.43	1.35
24	α -Terpinolene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25	2-Octanone	1.74	0.00	0.00	0.00	0.00
26	4-Methyl-isopulegole	0.58	0.00	0.00	0.00	0.00
27	2,3-Dimethyl-1,3,6-heptatriene	1.34	0.00	0.00	0.00	0.00
28	Phenethyl alcoho	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
29	Furfuryl alcohol	1.49	0.00	0.00	2.67	0.00
30	α -Terpinolene	0.00	6.08	4.41	0.00	0.00
31	α -Terpineol	2.79	0.00	3.99	3.57	0.69
32	Methylene-indene	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00
33	Veratrol	1.74	5.31	3.85	2.74	5.35
34	Linalool oxide(3)	1.79	2.19	1.17	1.81	0.50
35	Linalool oxide(4)	6.40	9.42	5.65	8.05	4.10
36	Methyl laurate	0.00	5.77	0.00	0.00	0.00
37	Methyl chavicol	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00
38	Dimethoxytoluene	0.00	0.00	0.00	2.45	0.00
39	Methyl dihydrohydroctocarpate	0.00	0.00	3.83	0.00	0.00
40	Geranyl Alcohol	0.95	0.00	0.00	0.00	0.00
41	5,9-Undecadien-2-one	0.00	0.00	1.48	0.00	0.00
42	Nonanol(1)	0.00	0.94	0.00	0.00	0.00
43	Nerylacetone	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
44	Butyl isobutyrate	0.00	0.00	0.00	0.00	1.94
45	Acetylhydrazide	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
46	2,2-Dimethylbuta	0.00	0.00	0.00	0.00	2.53
47	Edulan III	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00
48	Ionone	0.00	0.00	0.00	1.46	3.25
49	Methylsyringol	9.89	0.00	10.50	10.62	7.23
50	β -Ionone epoxid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
51	Nonanol(2)	0.00	1.12	0.00	0.00	0.00
52	1,2,3-Trimethoxy 5-methyl benzen	0.00	0.00	3.64	0.00	0.00
53	1,2,4-Trimethoxy benzen	0.00	0.00	0.72	0.00	0.00
54	Acetosyringone	0.00	0.00	2.16	0.00	0.00
55	Methylsyringol(2)	1.49	0.00	0.00	1.04	1.19
56	Methyl heptanoat	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91
57	2-Undecanone	1.63	0.00	0.00	0.00	0.00
58	1-Bromo-2-methyl	0.00	0.00	0.00	0.97	0.00
59	Tridecanenitrile	0.00	0.00	0.74	0.00	0.00
60	1-Decanol	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00
61	Vinyl cyclohexan	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00
62	5-Ethyl-2-heptan	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00
63	2-Dodecanone	0.00	1.02	0.00	0.00	0.00
64	Mrthyl 8-nonenoa	0.84	0.00	0.00	0.00	0.00
65	jasmolone	0.00	0.00	0.00	0.00	0.91
66	Palmitonitrile	0.00	1.53	0.00	0.00	0.00
67	2-Hexanol	0.00	1.37	0.00	0.00	0.00
68	Hexahydropseudoien	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50
69	2-Ethyl-2-heptan	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56
70	2-Undecanol	0.00	1.55	0.00	0.00	0.00
71	Pantoic lactone	0.00	0.00	0.51	0.00	0.00
72	Dimethoxy Octade	1.19	0.00	0.00	0.00	0.69
73	Dihydroactinidiololol	1.37	0.00	0.78	0.00	0.00
74	2-Mrthyl-4-hepta	0.00	1.72	0.00	0.00	0.00
75	Ethyl phthalate	0.00	0.00	2.13	0.00	0.00
76	Coumaran	0.95	0.00	0.00	0.00	0.00
77	1-Hexadecanol	0.00	2.82	2.53	0.00	0.00
78	1-Dodecanol	1.52	0.00	0.00	0.95	5.04

79	Indole	0.00	0.62	0.00	0.00	0.00
80	Phytol	5.13	0.00	0.00	5.34	0.00
81	Ethyl nonanionate	1.27	0.00	0.00	0.00	0.00
82	2-Undecanol	0.00	4.24	0.00	0.00	0.00
83	butylphthalate	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00

(4) 외국산 미생물발효차의 기능성분 및 기능성 분석

(가) 항고혈압 기능성 지표성분으로서의 Statin화합물 탐색

- Statin화합물은 미생물에 의해 생성되는 항고혈압 기능성분으로 알려져 있으며 HMG-CoA 환원효소 억제제(HMG CoA reductase inhibitor, Statin)로서 콜레스테롤 합성의 속도조절 단계인 HMG CoA reductase를 경쟁적으로 억제하여 간세포 (Hepatocyte)에서 콜레스테롤 합성을 감소시키고, 간세포의 LDL수용체의 활성도를 증가시키므로써 혈중 LDL-콜레스테롤의 제거를 촉진하여 혈중 콜레스테롤의 농도를 감소시킨다고 알려져 있다^{21,22}.
- 본 연구진은 아직 과학적인 기능성 평가가 이루어지지 않고 있는 미생물발효차의 지 기능성분을 탐색할 목적으로 먼저 자연계에 존재한다고 알려진 Statin유도체 8종을 확보한 후 HPLC 및 LC-MS 분석 통하여 제조방법과 저장기간이 다른 미생물발효차를 대상으로 미생물발효차 안의 Statin화합물 존재여부를 확인하였다.

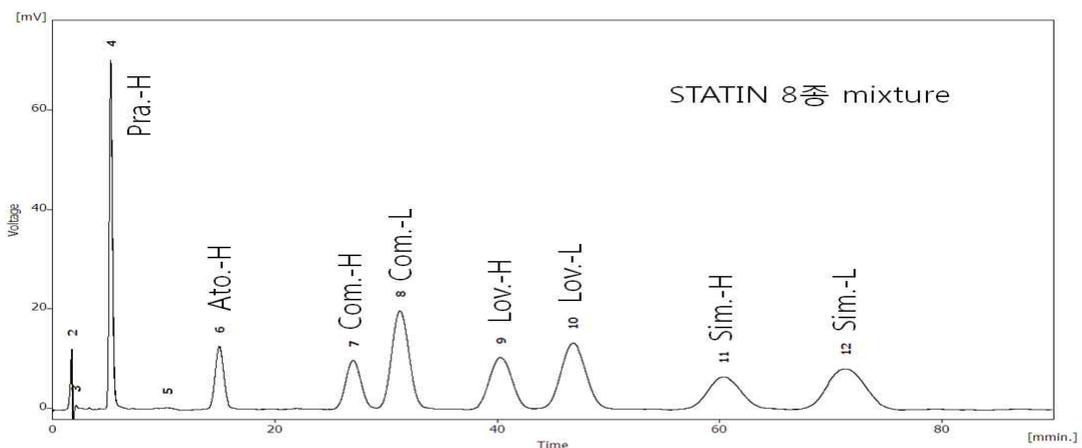
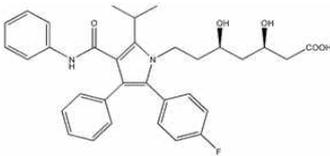
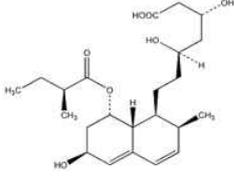
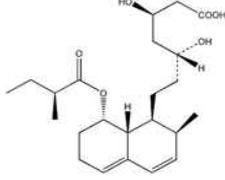
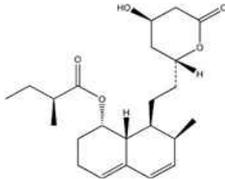
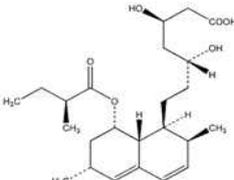
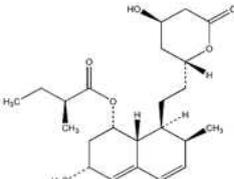
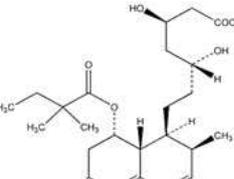


Fig. 1-8. HPLC chromatograms of standard statins

Table 1-18. Structure of statins

Statins	Structure of statins	M·W
Atovastatin		$C_{33}H_{35}N_2O_5F$ 558
Pravastatin		$C_{23}H_{36}O_7$ 424
Compactin-H		$C_{22}H_{34}O_6$ 394
Compactin-L		$C_{23}H_{34}O_5$ 390
Lovastatin-H		$C_{24}H_{38}O_6$ 422
Lovastatin-L		$C_{24}H_{36}O_5$ 404
Simvastatin-H		$C_{25}H_{40}O_6$ 436

- 그 결과, 발효가 진행된 미생물발효차에서 Lovastatin-L의 존재를 확인하였다(Table 1-19). 또한, 속성발효차인 속병에서 청병보다 4배 이상의 Lovastatin-L이 검출되었으며, 저장기간이 길어질수록 statin의 함량이 증가하는 경향을 보였다. 특히, 청병의 경우 제조된지 3년이 지난 시료에는 statin이 검출되지 않다가 그 이상 저장된 시료

에서 statin이 검출되는 것으로 보아 발효가 진행되면서 발효차에 존재하는 미생물이 statin를 생성하고 있음이 강하게 시사되었다.

- statin은 그 자체로도 심혈관계 질병의 치료에 효과가 있지만 항암, 항염증 성분의 상승작용에 크게 기여한다고 알려져 있어 이 statin를 미생물발효차의 지표물질로 이용할 수 있는 가능성이 제시되었다.

Table 1-19. The contents of statins in microbial fermented teas

Kinds	Year	Lovastatin-L($\mu\text{g/g}$, d.w.)
Pile cake puer	2008	0.566
	2004	0.561
Age cake puer	2004	0.187
	2005	0.133
	2006	N.D.
	2007	N.D.

- 또한, LC-MS 분석결과 Lovastatin-H의 존재가 확인되었으며, 추가로 Lovastatin-H와 Pravastatin-H의 존재가능성이 함께 확인되었다.

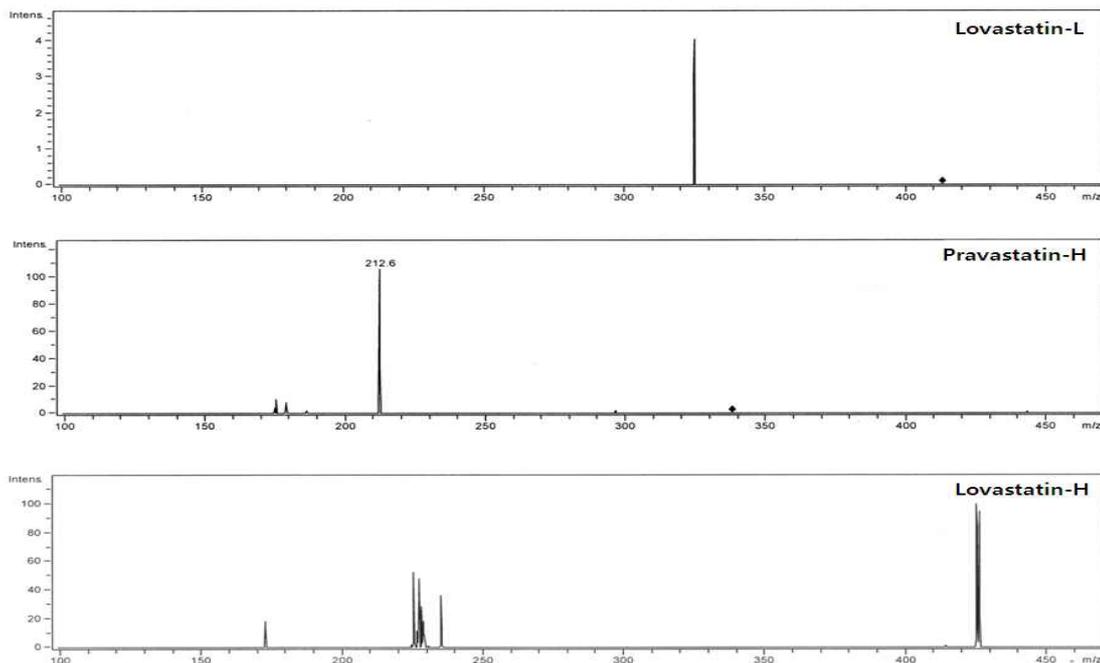


Fig. 1-9. LC-MS spectra of statins in microbial fermented teas

(나) HPLC 분석에 의한 카테킨류와 카페인의 정량

- 다양한 차 추출물을 210, 254, 280, 375 nm에서 분석한 HPLC chromatogram들을 비교한 결과, 파장에 따른 시료 간의 특징은 관찰되지 않았다. 그리고 분석 파장 중 210 nm에서의 chromatogram들이 상대적으로 감도가 높았고 비교적 다양한 화합물들을 동시에 분석할 수 있는 것으로 관찰되었다.
- 따라서, 카테킨류는 210 nm에서, 그리고 카페인은 275 nm에서의 data를 이용하여 함량을 비교하였다.
- 먼저 카테킨류의 시료별 상대적인 함량 비율에 정리하였다. 에 나타낸 바와 같이 고급차와 저급차를 구분할 수 있는 특정 성분이나 그들 성분 간의 특정 비율이 관찰되지 않았다. 뿐만 아니라 카페인 함량 또한 시료의 품질에 따른 차별성이 전혀 나타나지 않았다.
- 이 결과들로부터 차의 대적인 특징성분이라 할 수 있는 카테킨류와 카페인의 함량 및 존재 경향을 기준으로 보이차의 품질을 평가하기 어렵다고 판단되었다.

Table 1-20. Details of microbial fermented teas and other teas used in this study.

Sample No.	Area/common name	Year	Properties
1	YunNan (HaiWan tea factory)	2008	young leaves(high grade)
2		2008	old leaves(low grade)
3		2004	young leaves(high grade)
4		2004	old leaves(low grade)
5	YunNan (Tea Production Co.)	2008	old leaves(low grade)
6		2008	young leaves(high grade)
7		2004	old leaves(low grade)
8		2004	young leaves(high grade)
9		2008	old rough leaves(very low grade)
10		2008	wrong method(very low grade)
11	YunNan (KunMing tea factory, 9016)	1994	young leaves(high grade)
12	Boseong (green tea)	2008	middle-high grade
13	Boseong (green tea-bag)	2008	low grade
14	Tung ting (oolong tea)	2008	middle-high grade
15	Keemun (black tea)	2008	middle-high grade

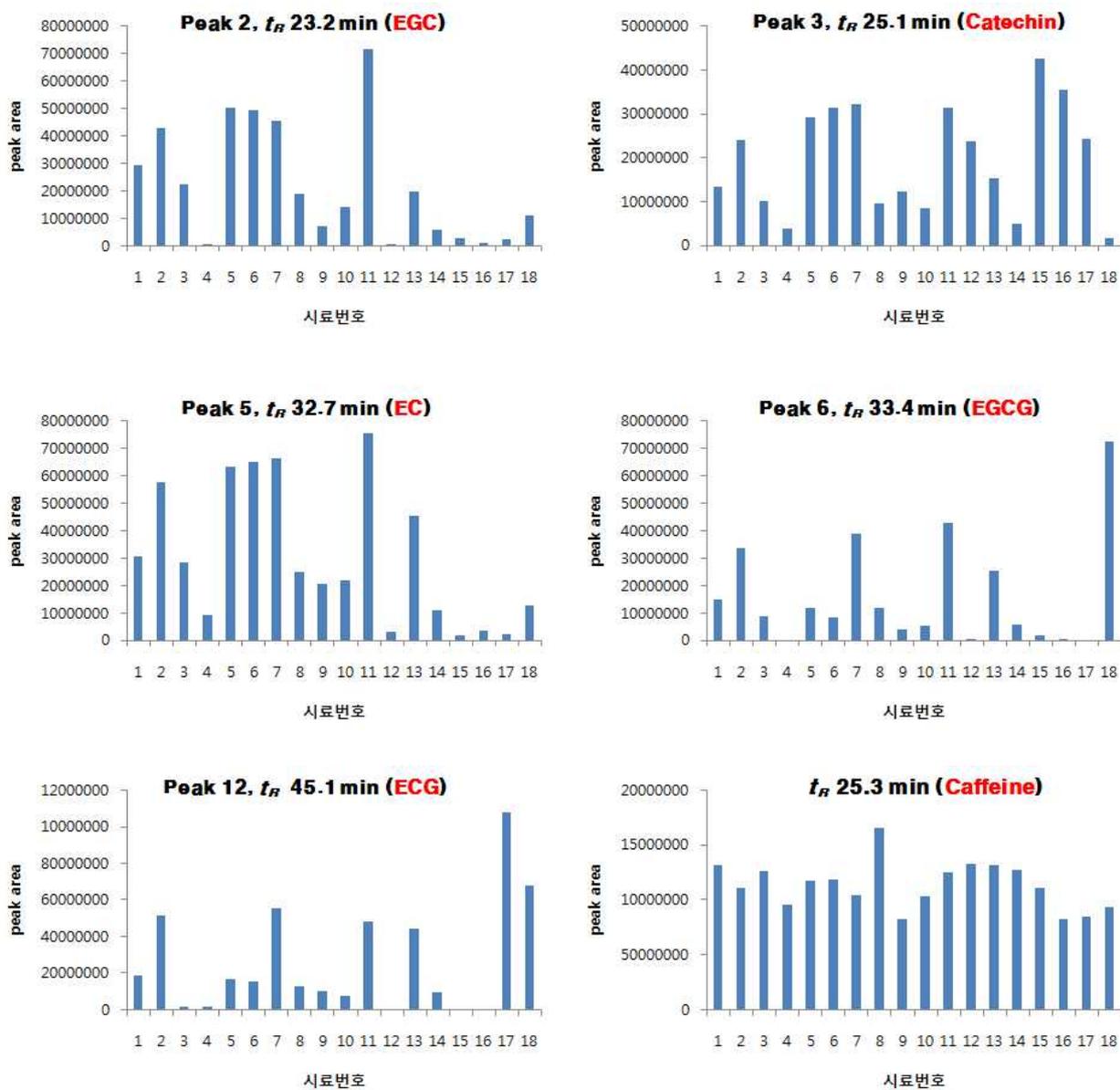


Fig. 1-10. The contents of catechins and caffeine in microbial fermented teas and others.

Table 1-21. Relative ratios of catechins in low and high graded Pu-erh teas

Grade	EGC	C	EC	EGC	ECG
High	3	1.3	3	1.5	2
	2	1	3	0.8	0.3
	2	1.7	4.5	3	4.8
	0.25	0.5	1	0.6	1
Low	trace	0.5	0.8	0	0.1
	7	3	7	4	4.5
	0.1	2.5	0.3	0.1	trace

(다) 미생물발효차의 Vitamin E (Tocopherol) 분석

- 동일 시료의 검화 유무에 따른 함량 변화를 검토하였으며, Fig. 11-13에 보인 바와 같이 tocopherol의 종류에 관계없이 검화를 행하지 않은 시료에 비해 검화를 행한 시료에 있어 tocopherol류 모두 함량이 증가함이 확인되었다.
- 검화에 의해 tocopherol 함량이 증가하였음은 tocopherol의 chroman환의 수산기에 모종의 치환체가 ester 결합되어 있을 가능성이 시사된 결과라 추측되었다.
- 또한 ascorbic acid가 미생물발효차로부터 검출되지 않았음과 tocopherol 또한 ascorbic acid처럼 산화에 매우 민감한 화합물임을 연결 지어 고려하였을 때, 보존기간이 오래된 미생물발효차로부터 tocopherol이 검출되었던 것은 tocopherol이 ester형으로 존재해 있다가 발효 또는 보존기간동안 서서히 유리형으로 변형되었기 때문일 것으로 해석되었다. 따라서 각 시료에 대해 검화 유무에 따른 tocopherol류의 함량을 동시에 분석하여 의미 있는 정보를 도출하고자 하였다.
- 먼저 Fig. 14~16의 data에 있어 거의 대부분의 시료 중에 함유된 tocopherol류의 함량을 검화하지 않은 시료에 비해 검화를 행한 시료에 있어 더 증가됨이 확인되었다. 이것은 차의 품종 및 종류에 관계없이 tocopherol류가 ester형으로 존재하고 있을 가능성을 시사한 매우 흥미로운 결과라 생각되었다.
- 또한 흥미롭게도 보존기간이 오래된 차일수록 tocopherol의 함량이 감소되었으며 검화 후 tocopherol류 함량 또한 검화하지 않은 시료의 tocopherol류 함량과 비례하여 감소되었다. 이것은 위에서 추측하였듯이 ester형의 화합물이 서서히 분해되어 유리형으로 변화됨을 지지하는 결과라 판단된다.
- α -Tocopherol의 함량의 경우에는 외국산 미생물발효차(Fig. 1-11)나 국내에서 제조된 차 대부분이 검화 후에 증가하는 경향을 보였다. δ -Tocopherol의 함량은 저급차인 시료 2와 4, 시료 5와 7의 경우 보존기간이 오래됨에 따라 검화 전후 시료 모두에 있어 그 함량이 다량 감소되었으나, 매우 흥미롭게도, 고급차인 시료 1과 3, 시료 6과 8에 있어서는 보존기간이 오래되었음에도 불구하고 δ -tocopherol의 함량이 거의 감소되지 않았음을 알 수 있었다. 이것은 δ -tocopherol이 다른 tocopherol류에 비해 산화 속도가 느리기 때문일 것으로 추측되었다. δ -tocopherol의 함량이 보존기간이 오래되었음에도 불구하고 감소되지 않고 유지된다는 것은 미생물발효차의 품질 평가 지으로써 가능성을 시사한 의미 있는 성과라 사료된다.

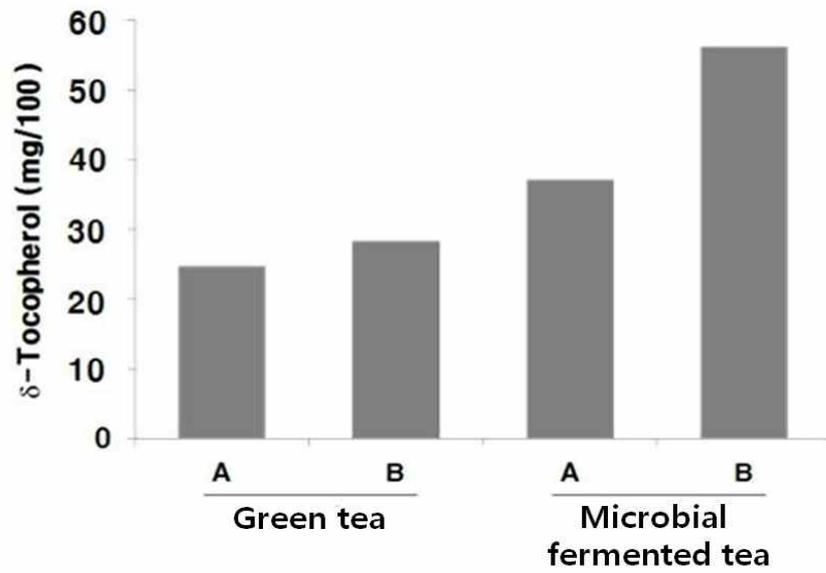


Fig. 1-11. Comparison of α -tocopherol content in green tea and microbial -fermented tea (sample 2) according to non-treatment (A) and treatment (B) of saponification.

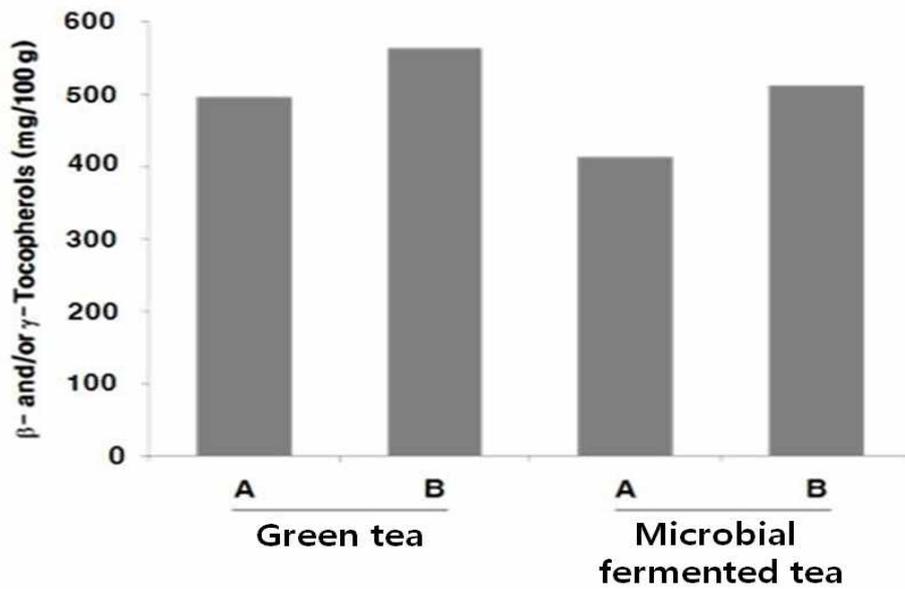


Fig. 1-12. Comparison of β and/or γ -tocopherol contents in green tea and microbial -fermented tea (sample 2) according to non-treatment (A) and treatment (B) of saponification.

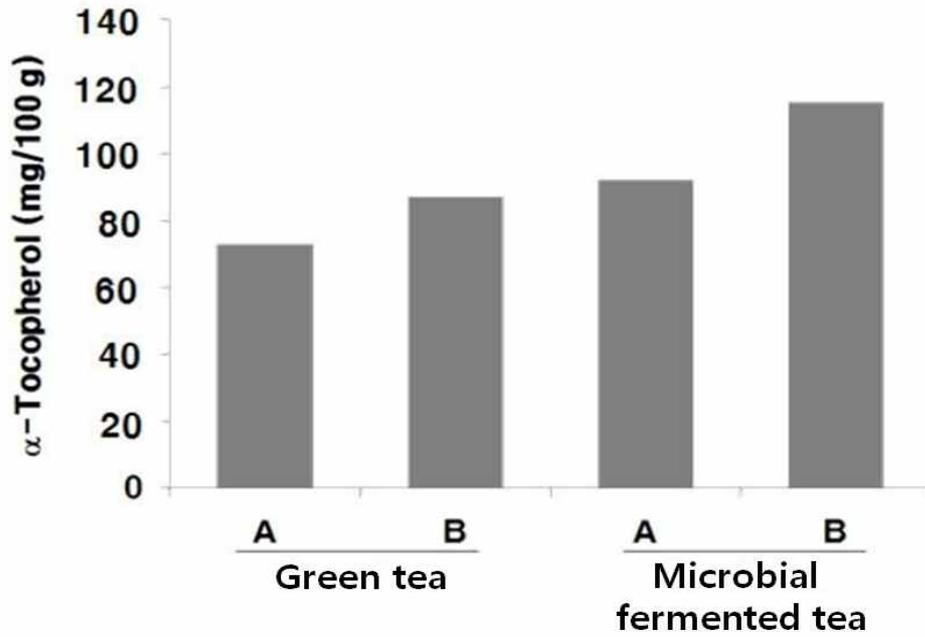


Fig. 1-13. Comparison of δ -tocopherol contents in green tea and microbial-fermented tea (sample 2) according to non-treatment (A) and treatment (B) of saponification.

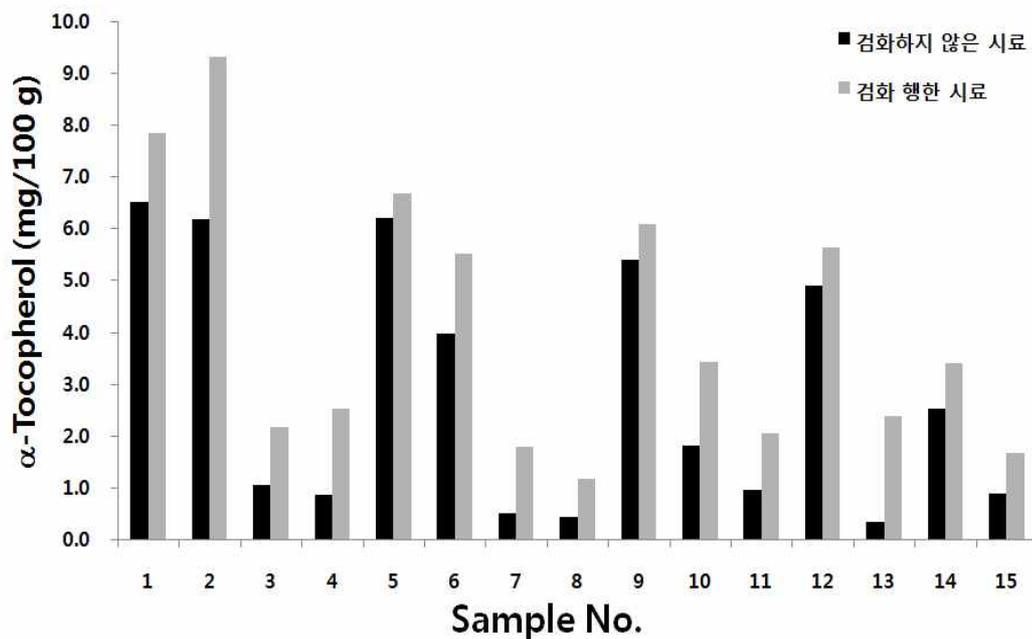


Fig. 1-14. Comparison of α -tocopherol content in microbial fermented teas and others by saponification.

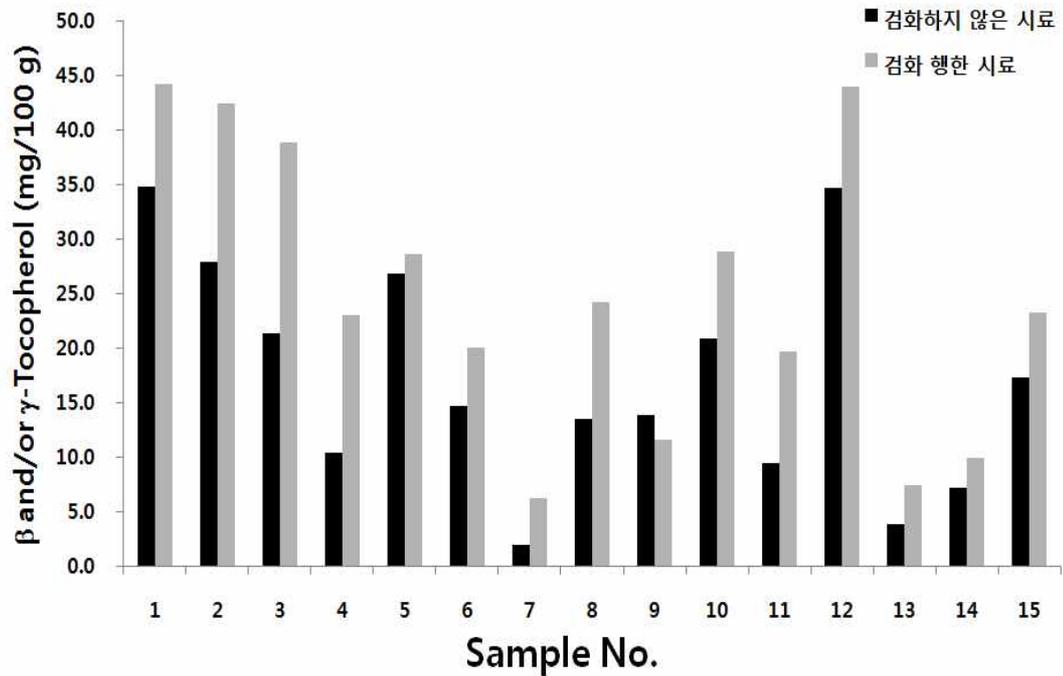


Fig. 1-15. Comparison of β and/or γ -tocopherol contents in microbial fermented teas and others by saponification.

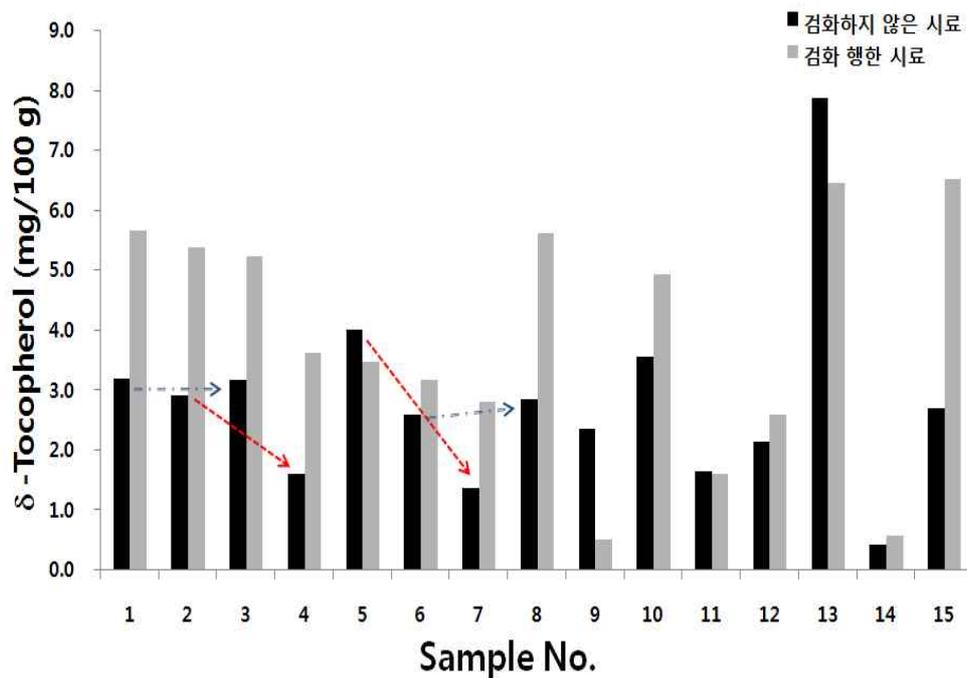


Fig. 1-16. Comparison of δ -tocopherol content in microbial fermented teas and others by saponification.

(라) 항산화활성 분석

- 미생물발효차의 항산화 활성을 측정한 결과 DPPH 소거능과 아질산염 소거능은 대조구인 녹차와 청차 등이 미생물발효차보다 높은 항산화활성을 나타냈으나, iNOs 생성 억제활성은 복전(금화), 소엽(장차) 등의 발효차가 대조구인 녹차, 청차보다 높은 활성을 나타냈다.

Table 1-22. Antioxidative activities of Pu-erh teas.

Area	Year	propertiese	IC50(μg/mL)			
			DPPH	Nitrate	Nitric oxide	iNOS
HaiWan tea factory	2008	high grade	41.8	137.7	148.7	76.8
	2008	low grade	78.9	202.9	169.1	75.9
	2004	high grade	18.3	200<<	400<<	400<<
	2004	low grade	25	200<<	400<<	400<<
MengHai tea factory	2008	very low grade	142.1	371.4	97.2	71.8
China	—	finished products	31.8	200<<	400<<	351.4
	—	raw tea	12.9	118.5	81.6	77.9
	—	a small leaf	84.7	164.4	74.5	64.1
Hunan	1996	Fujan	69.8	111.4	57.55	61.1
Korea	2008	Green tea	8.4	103.1	141.5	122.9
	2008	Qing cha	17.1	114.2	333.9	151.3
China	2008	Keemun	31.9	168.3	400<<	400<<

(마) 미생물발효차의 동맥경화 예방효과 검증

- 쥐 혈장의 동이온 산화에 의해 생성되는 CE-OOH 생성억제 활성을 나타낸 미생물발효차 시료 3, 6, 7, 8, 11의 동맥경화 예방효과를 확인하였다.
- 합성 CE-OOH를 1~300 nmol의 범위에서 HPLC로 분석하여 얻어진 peak area를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과, R 값($R^2=0.999$)이 1에 가까운 직선상의 그래프가 얻어졌다.
- 차추출물(신선중량 5 μg 상당량)을 쥐 혈장에 첨가하여 동이온에 의해 유도된 산화반응 6시간 후의 CE-OOH 생성농도를 측정하였다. 미생물발효차의 종류에 따른 CE-OOH 생성 농도를 Fig. 1-17에 나타냈다.

- 미생물발효차의 종류에 따른 CE-OOH 생성 농도를 비교한 결과, 해남차창(운남성)에서 2008년 여린잎(고급 원료)으로 제조된 미생물발효차(시료 1)가 같은 해 성숙한 잎(저급 원료)으로 제조된 미생물발효차(시료 2)보다 더 낮은 CE-OOH 생성농도를 보였으며, 2003년 여린잎으로 제조된 미생물발효차(시료 3)가 같은 해 성숙한 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 4)보다 더 낮은 CE-OOH 생성농도를 보였다.
- 또한 차엽진흥공사(운남성)에서 2008년 저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 6)가 같은 해 저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 5)와 아주저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 9)보다 더 낮은 CE-OOH 생성농도를 보여 저급의 성숙한 잎보다 고급 여린 잎으로 제조된 미생물발효차가 CE-OOH 생성을 보다 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.
- 미생물발효차가 제조된 연도와 CE-OOH 생성 억제능을 비교한 결과, 해남차창에서 2008년 고급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 1)가 2003년 고급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 3)보다 CE-OOH 생성농도가 더 높은 것으로 나타났고, 2008년 저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 2)와 2003년 저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 4)의 CE-OOH 생성정도가 유사한 것으로 나타났다.
- 차엽진흥공사에서 2008년 저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 5)가 2003년 저급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 7)보다 더 높은 CE-OOH 생성농도를 나타냈으며, 2008년 고급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 6)가 2003년 고급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 8)보다 더 낮은 CE-OOH 생성농도를 나타냈다.
- 그리고 곤명(운남성)에서 1994년에 고급 잎으로 제조된 미생물발효차(시료 11)는 최근에 제조된 다른 미생물발효차들 보다 CE-OOH 생성농도가 훨씬 낮게 나타나 발효 및 저장 기간이 길어지면서 CE-OOH 저해 활성도 저하되는 것으로 생각되었다.
- 비교구인 보성녹차(시료 15)와 비교한 결과, 녹차가 모든 미생물발효차(시료 1~11)보다 더 낮은 CE-OOH 생성농도를 보여서 더 높은 쥐 혈장 산화 억제 효과가 있음이 관찰되었으며, 그 효과는 보성녹차티백 (시료 13), 우롱차 (시료 14) 및 홍차(시료15)보다 월등히 더 높은 CE-OOH 생성억제 효과를 나타내었다.
- 이것은 앞서 진행된 기능성성분 함량분석 결과와 비교해 볼 때, 미생물발효차보다 녹차에 더 많이 함유되어 있는 기능성 성분들이 쥐 혈장의 산화를 효과적으로 억제시켜 준 결과라 사료된다.

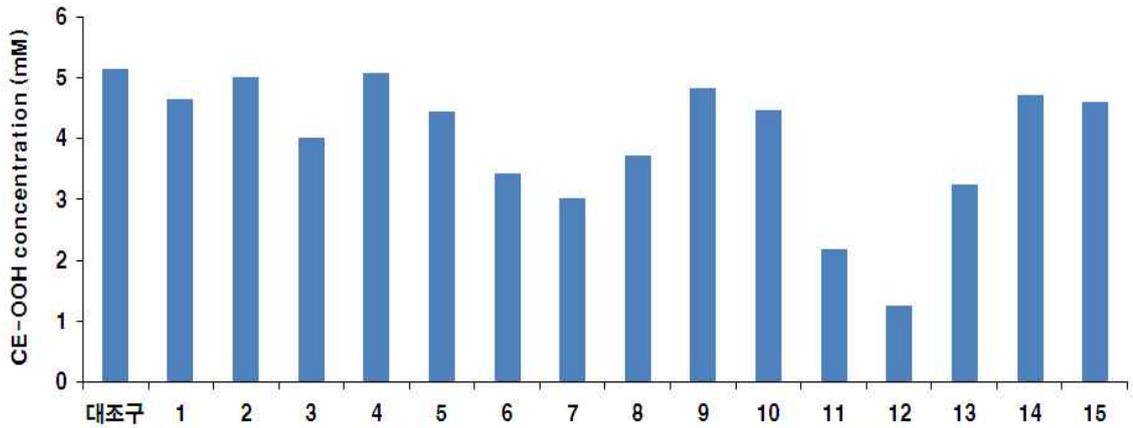


Fig. 1-17. Inhibition effect against CE-OOH formation by the extracts of microbial fermented teas during copper ion-induced oxidation of diluted rat blood plasma.

다. 요약

- 문헌 및 현지답사를 통하여 외국산 고품질 미생물발효차의 제다공정을 분석하였으며 미생물발효차의 품질평가 기준을 확립하기 위하여 이력(제조연도, 생산처, 원료등급 등)이 확실한 30여종의 중국산 미생물발효차를 확보한 후 이화학적, 미생물학적 특성을 분석하였다.
- 미생물발효차로부터 미생물을 분리한 후 18S rRNA 분석을 실시하여 동정한 결과, 8종의 곰팡이와 효모의 존재를 확인하였으며 이 중, *Aspergillus*와 *Penicillium*이 main 미생물임을 확인하였다.
- 이들 미생물의 생육 패턴은 차잎 중 카테킨의 항미생물 효과, 미생물 상호간의 저해 작용 등과 밀접한 관계가 있음이 시사되었다.
- 미생물발효차의 주요 미생물이 *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속 곰팡이로 밝혀짐에 따라 이 균주가 생성할 수 있는 독소인 aflatoxin 및 ochratoxin의 분석법을 확립하였다.
- 확립된 분석법을 이용하여 총 90여종의 미생물발효차 분석을 실시한 결과, 4종의 시료로부터 aflatoxin의 잔류 가능성이 제시되었으나 그 함량은 잔류허용치를 초과하지 않은 수준이었다.
- 이화학적 성분 분석 결과, 대다수의 미생물발효차들의 수분함량은 7~10%, 총질소 함량은 4~5%, 조지방 함량은 0.6~0.9%, 조섬유 함량은 12~15%, 조회분 함량은 5~7%, 가

용성 고형분 함량은 20~25%, pH는 5~6, 산도는 1.0~1.3% 사이에서 나타났다.

- 이 때, 총질소 함량은 어린 고급 찻잎을 원료로 제조한 경우 높고 성숙한 저급 찻잎을 사용하는 경우 낮은 경향을 보였으며 조지방 함량은 반대로 어린 고급 찻잎을 원료로 제조한 경우 낮고 성숙한 저급 찻잎을 사용하는 경우 높은 경향을 보였다.
- pH, 산도, 총페놀 함량은 비교적 저장기간이 길수록 높은 경향을 확인하였다.
- 중국산 미생물발효차의 영양성분 분석 결과 주요 유기산은 oxalic acid, maleic acid, citric acid 등이었으며 대체적으로 고급 원료로 제조한 미생물발효차에서 함량이 높은 경향을 보였다.
- 무기성분 분석 결과, Ca, P, K, Mg이 미생물발효차의 주요 무기성분이었다.
- 관능적 선호도와 이화학적 성분과의 관계를 조사한 결과, 관능적 등급이 높은 발효차들이 다른 시료들보다 가용성 고형분의 함량이 높은 경향을 나타냈다.
- 관능적 등급에 따른 발효차의 향기성분 분석 결과, 관능적 등급이 낮은 시료에서는 methyl-, methoxy- 유도체의 향기성분이 검출된 반면 관능적 등급이 높았던 시료에서는 거의 나타나지 않아 이들 성분이 향기 선호도를 결정하는 향기성분일 가능성이 제시되었다.
- 미생물발효차의 항산화 활성을 측정한 결과, DPPH 소거능과 아질산염 소거능은 녹차 및 우롱차보다 낮았으나 iNOs 생성억제활성은 녹차, 우롱차보다 높은 활성을 나타냈다.
- 미생물발효차로부터 혈중 콜레스테롤 감소효과가 있는 물질로 알려진 statin화합물을 탐색한 결과, 발효가 진행될수록 statin화합물의 함량이 증가하는 경향을 보여 발효차에 존재하는 미생물이 대사과정 중 statin화합물을 생성할 가능성이 시사되었다.

2. 국내산 차잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조공정 검토 및 이화학적 특성 분석

가. 재료 및 방법

(1) 실험재료

- 국내산 차잎으로는 국내 자생종인 재래종(소엽종), 도입종인 야부키다(소엽종, 일본 녹차용 품종)와 대차12호(대엽종, 중국 발효차용 품종) 등 3가지 품종의 차잎을 9말~10월초에 직접 채취하여 미생물발효차 제조 원료로 사용하였다. 재래종은 보성군 일대 다원에서, 야부키다와 대차 12호는 해남군 소재 다원에서 채취하였다. 또한 국내 재래종은 전통적인 모차 제조 방식과 녹차제조 방식으로 각각 가공하여 모차를 제조하여 사용하였다. 비교구로 사용된 중국산 모차는 중국 운남성에서 5월말~6월초에 대엽종 차잎을 채취하여 일반적인 모차 제조법으로 가공한 것을 중국 현지로부터 구입하여 사용하였다(Table 2-1). 또한 미생물 거동을 측정하기 위한 시료는 발효를 진행시키면서 각 단계별로 상부, 중심부, 하부에서 골고루 채취하여 바로 사용하였으며 성분변화 측정용 시료는 -80℃에 저장하면서 실험에 이용하였다.

Table 2-1. Details of microbial fermented tea used in this study

Sample No.	Materials (tea leaves)	Properties
CM CF	중국 발효차용 대엽종	전통방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) CM으로 발효시킨 미생물발효차
BIM BIF*	국내 재래종(소엽종)	전통방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) BIM으로 발효시킨 미생물발효차
BIIM BIIF*		전통방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) BIIM으로 발효시킨 미생물발효차
BIIM BIIF*		전통방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) BIIM으로 발효시킨 미생물발효차
BIIM BIIF*		전통방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) BIIM으로 발효시킨 미생물발효차
SM SF	국내 재래종(소엽종)	녹차 제조방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) SM으로 발효시킨 미생물발효차
JM JF	국내 도입종(대엽종)	전통방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) BIIM으로 발효시킨 미생물발효차
YM YF	국내 도입종(소엽종)	녹차 제조방법으로 가공한 발효 전 원료(모차) SM으로 발효시킨 미생물발효차

*원료 모차(국내 재래종, 전통방식 모차 가공)는 같으나 서로 다른 발효 조건으로 제조

(2) 실험방법

(가) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조

- 3종의 국내산 찻잎과 1종의 외국산 모차를 이용하여 다음의 Fig. 2-1에 나타낸 바와 같은 숙병제조 공정을 거쳐 총 7종의 미생물발효차를 제조하였다.

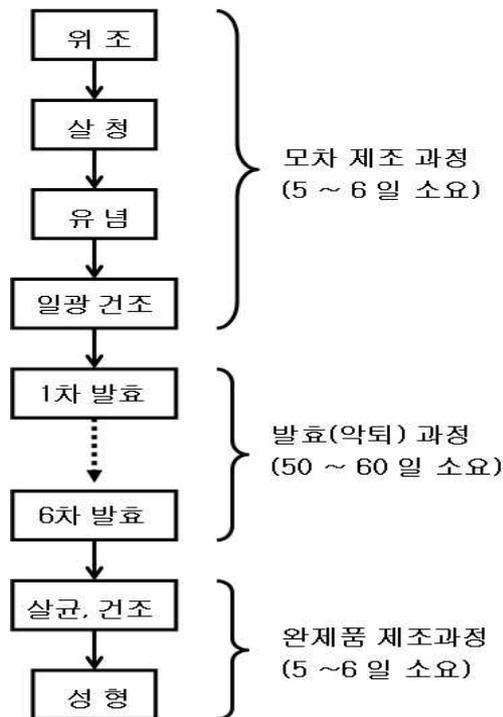


Fig. 2-1. The manufacturing process of microbial fermented tea (숙병).

(나) 미생물발효차의 발효과정 중 주요 미생물의 거동

① 균주 스크리닝 및 순수분리

- 검체는 발효를 진행시키면서 각 단계별로, 상부, 중심부, 하부에서 골고루 샘플링하여 실험에 사용하였다. 발효차 시료 1 g에 멸균수 10 mL을 첨가하여 균질화 시킨 시료액을 분리원으로 하여 10배, 100배, 1000배로 희석한 후 200 μ L씩 배지에 도말 및 접종 하였다. 분리 배지로는 potato dextrose agar (PDA, Potato Starch (from infusion) 4 g/L, Dextrose 20 g/L, Agar 17 g/L, pH5.6 \pm 0.2)를 사용하였으며, 28 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양 후 형성된 여러 종류의 균주를 순수 분리 하였다.

② 유전학적 동정 실시

- 분리 균주의 18S ribosomal DNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 균주의 외부 형태상 곰팡이로 분리된 균주의 18S rRNA 분석을 하기 위하여 PDA에서 고체상 배양을 실시한 후 배양 균사와 균체에서 Genomic DNA를 추출 (Genomic DNA extraction kit, Qiagen)하였으며, 18S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer인 NS1(5'-GTAGTACATAT GCTTGTCTC-3')primer를 사용하여 PCR증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 전기영동장치(Wizard SV Gel)와 PCR clean-up system(Promega,USA)을 이용하여 정제하였고 염기서열을 분석하였다.
- 그 결과는 NCBI의 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였다. Sequence의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교 분석하였다.

③ 차액도말 및 균수 Counting

- 각각의 찻잎을 이용하여 발효를 진행시키면서 채취한 검체 시료 1 g에 멸균수 10 mL을 첨가하여 균질화 시킨 시료액을 분리원으로 하여 10배, 100배, 1000배 이상으로 희석한 후 200 μ L씩 배지에 도말 및 접종 하였다. 분리 배지로는 potato dextrose agar (PDA, Potato Starch (from infusion) 4 g/L, Dextrose 20 g/L, Agar 17 g/L, pH5.6 \pm 0.2)를 사용하였으며, 28 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양 후 형성된 주요 생육 미생물을 각각 Counting하였다.

(다) 일반성분 분석 방법

- 찻잎의 일반성분 분석은 AOAC법⁴⁾에 의하여, 수분은 105 $^{\circ}$ C 상압가열 건조법으로, 총질소는 micro-Kjeldahl법으로, 조지방은 Soxhlet 추출법으로, 조섬유는 Henneberg-Stohmann법으로, 조회분은 550 $^{\circ}$ C에서 직접 회화법을 이용하여 그 함량을 측정하였다.

(라) 이화학적 특성 분석

① 색도

- 미생물발효차의 찻잎과 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 추출한

후 여과한 차 증류수 추출액을 Color spectrophotometer (CM-3500d, Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 L*, a*, b*값을 각각 측정하였다.

② pH 및 산도

- 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후, 여과한 여액을 pH meter (Model 8000, ORION, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고, 적정산도는 pH를 측정한 추출액 중 20 mL를 취하여 중화에 필요한 0.1 N-NaOH용액 소비량을 측정한 후 malic acid로 환산하여 나타내었다.

③ 가용성 고형분

- 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후, 여과한 차 증류수 추출액을 Refractometer (PR-1, ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

④ 수분활성도

- 찻잎 시료 2 g을 수분활성 측정기 (TH200, Novasina, Switzerland)를 사용하여 측정하였다.

(마) 영양성분 분석

① 유기산

- 차 분말 1 g을 cap이 달린 삼각플라스크에 넣고 증류수 50 mL를 가하여 80°C의 항온수조에서 4시간 동안 추출한 후 여과(No. 1, Whatman)하였다. 여과한 추출액은 감압회전농축기(WB 1200, Heidolph, Germany)로 농축한 뒤, 10 mL로 정용하여 이온크로마토그래피(DX-600, Dionex, USA)를 이용하여 분석하였다. Column은 IonPac AS11-HS Analytical (Dionex, Sunnyvale, USA)을 이용하였고, 용매는 38 mM KOH를 사용하였으며, 분당 1.0 mL의 흐름 속도를 유지시켰다.

② 유리아미노산

- 차 분말 2 g을 취하여 20 mL ethanol을 가하고 균질화 하였다. 다음 원심분리기를

이용하여 3000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액 A를 따로 담아두고, 침전물에 다시 10 mL의 75% ethanol을 가하여 위와 동일한 방법으로 원심 분리하여 분리한 상층액 B를 상층액 A와 혼합하여 rotary evaporator로 ethanol을 휘발시켰다. 농축이 끝난 후 8 mL의 초순증류수와 0.2 g의 sulfosalicylic acid를 가하여 녹인 후 1시간동안 4°C에 방치하였다. 이 용액을 다시 3000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하고, 초순증류수 10 mL로 정용한 후, 0.2 μ m membrane filter (Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 분석용 시료 용액으로 하였고, 아미노산 자동분석기 (Biochrom 20, Pharmacia, England)를 이용하여 분석을 실시하였다.

③ 무기성분

- 건식 분해법을 이용하여 채취 시료를 550°C 직접 회화법으로 회화시킨 후, 0.01 g을 취하여 염산 1 mL를 가하고, 2시간 정도 분해시킨 뒤 증류수 9 mL를 가하여 ICP를 이용하여 Zn, P, Fe, Cu, Mn, Si, Mg, Na, K 및 Ca 함량을 측정하였다

④ 통계처리

- 모든 실험측정은 3회 반복하여 측정하였고, 모든 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS program을 이용하여 분산분석을 실시하여 유의차가 인정되는 항목을 던컨의 다중 범위 시험 비교법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 각 처리구별로 유의성을 검증하였다.

(바) 특수성분 분석

① HPLC를 이용한 구성당 분석(Immunoaffinity column method)

- 시료 0.5 g에 80% EtOH 25 mL를 가해 80°C에서 2시간 동안 중탕 가열에 의해 환류 추출하고 실온에서 냉각 후 여과(No. 2, Whatman)하였다. 얻어진 여액을 농축하여 증류수로 최종 용량이 10 mL가 되도록 정용하였다. 정용된 용액을 원심분리(5000 rpm, 15 min, 4°C) 한 후, 상등액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 얻어진 여과액 중 10 μ L(0.5 mg eq.)를 HPLC 분석에 이용하였다.

Table 2-2. HPLC conditions for the analysis of sugars

Item	Conditions
Instrument	Ion Chromatography HPLC
Column	CarboPac PA10 Analytical, Dionex, USA 4.0 i.d x 250 mm
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	18 mM NaOH
Detector	ED50 Intergrated Amperometry Detector (50 mV, AgCl, Dionex, USA)

Table 2-3. GC-MS conditions for the analysis of sugars

Item	Conditions		
Instrument	GC-MS		
Column oven temp.	120°C		
Injection temp.	220°C		
Injection mode	Splitless		
Oven temp. program	Rate	Temperature(°C)	Hold time(min)
	-	120.0	0.0
	5.0	280.0	10.0

② 카테킨 관련 화합물 분석

- 시료 0.2 g을 60%MeOH 20ml에 침지시킨 후 Homogenizer를 이용하여 7000rpm으로 5분간 분쇄한 후 여과(Whatman No.2)하여 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물을 감압농축하고 다시 1ml의 60% acetonitrile으로 용해한 후 0.2 μ m Syr. filter로 여과하여 HPLC분석용 시료로 사용하였다. HPLC 분석조건은 다음의 Table 2-4 에 나타내었다.

Table 2-4. HPLC conditions for the analysis of catechins

Item	Conditions
Column	Nacalai Cosmic, C ₁₈ AR-II
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	2 μ L
Wave length	275 nm
Oven temperature	40°C
Mobile Phase	Sol. A : 100%MeCN
(gradient)	Sol. B : 20mM KH ₂ PO ₄

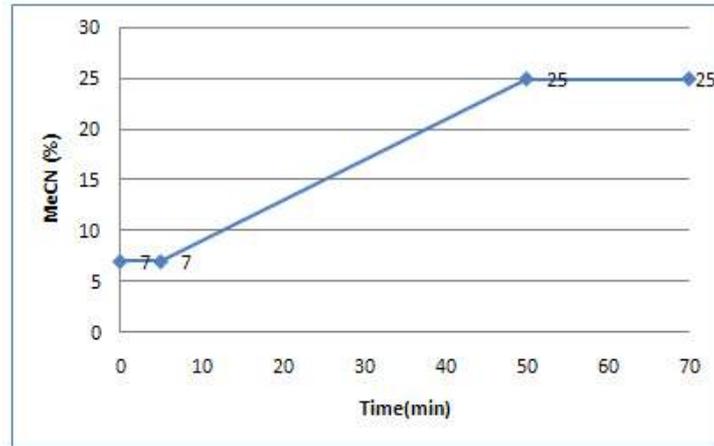


Fig. 2-2. Mobile phase condition for HPLC analysis of catechins

③ Vitamin E (Tocopherols) 분석

- 시료 0.5 g을 취한 후 1% NaCl 0.5 mL와 3% pyrogallol 10 mL를 가하여 5분 동안 초음파 추출을 하였다. 다음 60% KOH 1 mL를 첨가한 후, 70°C에서 30분 동안 검화하였다. 검화가 끝난 후 실온에서 냉각하고, 1% NaCl 22.5 mL를 가한 후, EtOAc/*n*-hexane=1:9 (v/v) 혼합 용액 15 mL를 첨가하여 2회 반복하여 용매분획을 행하였다. 상층액을 취해 농축 후, MeOH 2 mL에 용해시켜 HPLC (5 mg eq./20 μ L)로 분석하였다.

Table 2-5. HPLC conditions for the analyses of vitamin E

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC TSKgel Octyl-80Ts column, Tosoh, Japan
Column	4.6 i.d x 250 mm
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	90% MeOH
Detector	Fluorescence detector (RF-10A _{XL}) (Ex 295 nm, Em 325 nm, SHIMADZU, Japan)

(사) 생리활성 평가

① 쥐 혈장 Cholesteryl Ester Hydroperoxide (CE-OOH) 생성 억제능 평가

- 실험에 사용된 쥐는 6주령의 Sprague-Dawley계, 180~200 g body wt.로 수컷만을

구입(Samtako, Osan, Korea)하여 stainless wire cover 플라스틱 cage에서 3일 동안 사육하였다. 생육조건은 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 50~60%, 12시간 간격으로 light-dark cycle 을 유지하였으며, 식이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하여 실험실 환경에 순 화시켰다. 실험 15시간 전에 절식, 3시간 전에 절수시킨 후, ether 마취 하에서 개복 한 다음, 대동맥으로부터 헤파린이 첨가된 주사기로 채혈하여 원심분리(3000 rpm, 4°C , 20분, VS-15 CFN, Vision, Korea)를 행하였고, 얻어진 상층(혈장, plasma)을 취 하여 사용 직전까지 -40°C 에서 냉동 저장하였다. 그리고 쥐 혈장 250 μL 에 PBS buffer (pH 7.4) 640 μL 를 가하고, 미생물발효차 5 μg 상당량에 해당하는 MeOH 추출물을 EtOH 10 μL 에 각각 용해하여 첨가한 다음, 동이온(CuSO_4)이 최종적으로 120 μM 이 되도록 PBS buffer 용액으로 조제하여 100 μL 를 첨가함으로써 산화를 개시하였다. 혼합 용액은 37°C 에서 shaking incubation 시키면서 30분 간격으로 100 μL 를 취하여 2.5 mM BHT를 함유한 MeOH과 *n*-hexane을 각각 3 mL씩 가한 후 vortex로 혼합하였다. 상층액(*n*-hexane층)을 농축용기에 취한 후, 하층 용액에 다시 *n*-hexane 3 mL를 가하고 재차 vortex로 혼합하였다. 그 상층액을 취하여 전단계의 *n*-hexane층과 혼합하여 농축한 다음, 얻어진 농축물을 MeOH/ CHCl_3 (95:5, v/v) 용액 100 μL 로 용해 후 HPLC를 행하였다. 표준곡선은 Arai 등²³⁾의 방법에 의해 합 성된 CE-OOH를 MeOH 용액에 용해시켜 적당한 농도로 희석한 다음, 1.0~300 nmol의 범위에 해당되는 절대량을 HPLC로 분석하였다.

Table 2-6. HPLC conditions for the analyses of CE-OOH

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Pump	600 pump (Waters, USA)
Column	TSKgel Octyl-80Ts column, Tosoh, Japan 4.6 i.d x 250 mm
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	97% MeOH
Detector	SPD-10A UV/VIS (235 nm, SHIMADZU, Japan)

② 항산화 (L-citrulline 생성 억제) 작용

- L-citrulline의 측정은 chromogenic reagent를 이용한 Boyde & Rahmatullah 등⁸⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 배양액 450 μ L와 chromogenic reagent 용액 450 μ L를 섞고 heating blot에서 heating(100 $^{\circ}$ C, 10min)한 후 방냉하여 UV/VIS Spectrophotometer 530nm에서 absorbance를 측정하였다.

③ Statin 화합물 (항콜레스테롤 기능성분) 탐색

○ Statin 유도체 구입 및 합성

- 본 실험에 사용된 Statin (lovastatin-L, compactin-L, simvastatin-L, pravastatin-H)은 SIGMA에서 구입하였고, atorvastatin-H은 (주)현대약품에서 지원받아 사용하였다.
- Lactone form의 statin (lovastatin, compactin, simvastatin)을 hydroxyl acid form으로 합성하기 위하여 Brown et al.¹²⁾의 방법을 사용하였다. 각각 lactone form의 statin 5 mg을 100% acetonitrile 500 μ L로 용해한 다음 0.1N NaOH (50% acetonitrile)를 ice bath상에서 천천히 첨가하고 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 0.1N HCl (50% acetonitrile)을 첨가하여 pH 7~8이 되도록 하였다. 반응물을 농축한 뒤 MeOH/EtOAc (1:1) 용매 2 mL로 녹이고 여과하여 hydroxy acid form의 statin을 얻었다. 합성된 시료는 각 ampule에 N₂ gas로 농축 충전한 후 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관 실험에 사용하였다.

○ Statin 화합물 분석

- 시료 50 g에 100% MeOH 1 L를 넣고 homogenization (12,000 rpm, 5 min) 한 후 1 hr 동안 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 2로 여과한 후 감압농축하여 100% MeOH 추출물을 얻었다.
- 시료 10 g에 상당하는 MeOH 추출물을 2 mL의 MeOH로 용해하여 Sep-Pak (Waters C₁₈ Cartridge, 12 cc)에 charge한 후 solid-phase extraction 정제하였다. Sep-pak내에 추출물을 전부 흡착시킨 후 질소가스를 이용해 Sep-pak 내의 MeOH 증발시켜 주었다. 여기에 100% H₂O을 흘려보내주어 흡착되지 않는 성분을 세척하였다. Sep-pak에 흡착된 성분은 100% MeOH을 가하여 색의 변화가 없을 때까지

지 충분히 용출하였다. 용출된 100% MeOH 획분을 감압농축 한 후 MeOH 1 mL 로 용해하고, 0.20 μm syringe filter로 여과한 후 HPLC 분석을 실시하였다. Statin 분석에 사용된 시료의 양은 전체 volume의 1/20 (50 μL)을 injection하였다.

Table 2-7. HPLC conditions for the analysis of statins

Item	Conditions
Instrument	Waters Autosampler(LC module I plus)
Column	Waters C ₁₈ Bondapak™ 3.9×150mm
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	Acetonitrile/1%Acetic acid (55:45, v/v)
UV detector	237nm

(아) 향기성분 분석 (GC-MS)

- 32종의 향기성분 표준품들을 MeOH에 각각 용해하여 각 성분 10 μg 상당량을 취하여 혼합한 다음, 표준품들의 GC-MS 분석에 이용하였다. 분쇄한 29종 각각의 차시료 1 g에 내부표준물질(ethyl caprate, 60 $\mu\text{g}/30 \mu\text{L}$)을 첨가한 다음, headspace가 장착된 GC-MS를 사용하여 다음과 같은 분석조건을 이용하여 향기성분을 분석하였다.

Table 2-8. GC-MS conditions for the analysis of volatiles.

Item	Conditions
Instrument	GCMS-QP2010 Plus (SHIMADZU, Japan)
Column	HP-INNOWAX (Crosslinked Polyethylene Glycol) 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm (AGILENT, USA)
Carrier gas	N ₂ (1.0 mL/min)
Temperature	60°C (10 min) → 200°C, 2°C/min
Ionizing voltage	70 eV
Accelerating voltage	1.21 kV
Scanning range	<i>m/z</i> 40-500
Headspace	HT3 Dynamic Headspace (Teledyne instruments, USA) heating temp. 250°C (2 min)

(자) 곰팡이 독소 분석

① Aflatoxin 분석

- 시료 20 g를 취하여 70% methanol 100 ml(1% NaCl포함)를 넣고 진탕기로 3분간 교반하여 얻은 추출액을 여과지(Whatman paper NO.1)로 여과하였다. 여액에 동량의 증류수를 첨가한 다음 10 mL를 취해 immunoaffinity column에 2drop/sec의 유속으로 용출시켰다. 증류수 10 mL로 세척하고, acetonitrile 3 mL로 용출시킨 후 질소로 농축하였다. 이 농축액에 Trifluoroacetic acid 100 µL를 넣어 aflatoxin를 유도체화 시킨 후 HPLC 이동상 용매(25% acetonitrile) 1.9 mL를 주입하여 용해시키고 0.45µm필터를 통과시켜 HPLC 분석조건용 시료 용액으로 사용하였다.

Table 2-9. HPLC conditions for the analysis of aflatoxins

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Phenomenex Luna 5u C ₁₈
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	25% acetonitrile
Detector	Fluorescence detector (Ex 360nm, Em 418nm)

② Ochratoxin 분석

- 시료 20 g에 70% acetonitrile 100 mL에 넣고 3분간 균질화하여 얻은 추출액을 여과하였다. 여과액 4 mL을 PBS용액 44 mL과 혼합한 후 immunoaffinity column에 통과시켰다. column을 증류수 10 mL로 세척한 후 methanol 2 mL로 용출시키고 질소로 농축하였다. 이 시료를 500 µL boron trifluoride methanol을 넣어 80°C에서 10분간 반응시켜 유도체화 한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

Table 2-10. HPLC conditions for the analysis of ochratoxin

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Phenomenex Luna 5u C ₁₈
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	water/acetonitrile/acetic acid=5:5:0.1(v/v)
Detector	Fluorescence detector (Ex 333nm, Em 460nm)

나. 결과 및 고찰

(1) 국내산 찻잎을 이용한 발효차 생산 환경 적용

(가) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조

① 외국 발효차 기술자 초청 및 기술이전

- 최근 미생물발효차가 인지도와 인기가 세계적으로 상승하면서 발효차의 주생산국과 생산업계로부터 기술을 도입하기가 매우 어려워지고 있다. 그러나 고품질 한국형 미생물발효차의 생산기술을 개발하기 위해서는 해당 기술의 충분한 이해가 필수적이다. 이를 위해서는 재외국의 선진기술을 보유하고 있는 선진 기술자를 국내로 초청하여 연구진과 함께 발효차를 제조하면서 기술을 전수받는 과정이 반드시 필요하다고 생각되었다.
- 특히, 현재 전 세계적으로 생산되고 있는 미생물발효차의 대부분이 숙병이며 그 핵심기술은 발효과정이라고 할 수 있다. 따라서 중국 유명 차장의 발효실 주임으로 근무하고 있는 발효기술자(吳 映波, 중국 운남오씨전익차업공사, 발효실 주임)를 초빙하여 연구진과 함께 발효차를 제조하면서 중국의 미생물발효차 기술 전수 및 국내의 환경(온도, 습도 등)에서의 발효차의 제조 가능성을 탐색하였다.
- 미생물발효차의 발효 과정에는 두 종류가 있는데, 옛날부터 내려오는 전통적인 발효공정으로 찻잎을 건조하고 동시에 습도가 낮은 곳에 보관하면서 찻잎이 계속하여 발효되도록 하는 것을 건식발효라 한다. 반면, 1973년 운남성 곤명의 차공장에서 개발한 속성발효법으로 수분과 온도를 조절하여 미생물발효차를 빨리 발효시키는 방법을 개발하였는데 이것을 습식발효라하며 현재 대부분의 미생물발효차는 단시간의 제조를 위해 습식발효를 이용하고 있다.
- 따라서 본 연구에서는 3종의 국내산 찻잎과 1종의 외국산 모차를 이용하여 습식발효를 통한 산차 및 긴압차를 제조하였다.

② 미생물발효차의 제조방법(습식발효법)

- 습식발효법은 모차에 퇴적(속성발효) 공정을 더하여 만들어 낸 것이다. 미생물발효차의 종류는 많고 모양이나 색깔도 여러 가지가 있지만 그 공통점은 제조과정 중의 퇴적작업, 즉 미생물에 의한 발효공정이다.



Fig. 2-3. Manufacturing process of microbial fermented tea.

- 이 발효과정에서는 우롱차, 홍차의 제조시의 발효과정(습관적으로 이렇게 부르고 있지만 산화효소, 당가수분해효소 등 찻잎 중의 효소가 활동한다)과는 달리 이 경우는 실제로 각종 미생물이 작용하는 것으로 알려져 있다.
- 일반적인 숙병의 제조방법은 모차 제조, 퇴적(발효)공정, 성형의 순으로 이루어지며. 모차의 제조공정은 살청 -> 유념 -> 건조의 순으로 만들어 지고 있는 것이 기본이다.
- 이렇게 제조된 모차를 원료로 퇴적(발효)공정을 거쳐 산차 형태의 미생물발효차를 제조하며 산차를 성형, 건조하여 긴압차를 제조한 후 숙성과정을 거친다. 미생물발효차의 제조과정을 Fig. 2-3에 나타냈다.

③ 미생물발효차의 제조 조건

- 본 연구를 통해 제조된 발효차의 품종 및 제조조건을 다음의 Table 2-11에 나타내었다. 국내 자생종(재래종), 도입 대엽종(대차12호), 도입 소엽종(야부키다) 등 3 종류의 찻잎과 중국에서 중국산 대엽종으로 제조된 모차를 원료로 아래의 조건에 의하여 미생물발효차를 제조하였다. 이 중 국내산 재래종은 4가지의 각각 다른 발효조건(1차, 2차, 3차, 증제)으로 미생물발효차를 제조하였다.

㉔ 살청 : 채취한 찻잎에 열을 가하여 효소의 활성을 정지시킴으로써 효소에 의한 산화 등을 방지하는 것이 목적이다. 일반적으로 채취한 찻잎을 150℃이상의 솥에서 5~10분간 덫어서 제조하며 본 연구에서는 180℃이상의 솥에서 8분간 덫어서 모차를 제조하였다.

㉕ 유념 : 찻잎을 비벼 조직 및 세포를 파괴시켜 음용 시 차의 성분이 쉽게 용출되도록 하는 과정이다. 보통 회전식 유념기를 사용하며 살청하고 난 찻잎이 완전히 식기 전에 행한다. 본 연구에서는 회전식 유념기를 사용하여 8분 또는 10분간 실시하였다.

Table 2-11. Cultivars and manufacturing conditions of microbial fermented tea

No	과 정	조 건	원료(찻잎)							
			중국 대엽종	국내 재래종 (1차)	국내 재래종 (2차)	국내 재래종 (3차)	국내 재래종 (증청)	대차 12호	야부기다	
1	모차 제조	원료 찻잎 채취시기	5월말~6월초	9월말~10월초	9월말~10월초	9월말~10월초	9월말~10월초	9월말~10월초	9월말~10월초	9월말~10월초
		살청 (°C/min)	180/8	180/8	180/8	180/8	증제	180/8	180/8	
		유념 (min)	8	8	8	10		8	8	
		햇빛건조	○	○	○	○	○	○	○	
		시료번호	CM	BIM	BIIM	BIIM	SM	JM	YM	
2	발효	모차량 (Kg)	164	200	200	200	200	45	200	
		加水량 (L/Kg)	80	80	64	80	80	80	80	
		뒤집기 (기간×횟수)	10일×5	10일×5	10일×5	7일×7	10일×5	10일×5	7일×7	
3	건조 (탄량)	기간(일)	50	50	50	49	50	50	49	
		수분함량 (%)	12	15	14	14	15	13	14	
4	체로 거르기- 큰잎, 작은잎, 가지, 분순물 분리									
5	증압	98~100°C (min)	2	3	3	3	3	3	3	
6	건조	30°C, 5~8일간								
7	포장	통기성이 있는 소재(한지)로 포장								
8	저장	25°C, 습도 75%전후 공기가 잘 통하는 실내								
9	제품	시료번호	CF	BIF	BIF	BIF	SF	JF	YF	

- ㉔ 햇빛건조 : 유념이 끝난 찻잎을 햇빛에 반나절 정도 건조시켜 모차로 제조하며 본 연구에서도 모든 시료에 대하여 모차 제조 과정 중 6시간 동안 햇빛에 건조하였다.
- ㉕ 발효 : 미생물발효차 특징을 결정하는 과정으로 미생물대사에 의하여 성분의 다양한 변화가 일어나 미생물발효차 고유의 특징이 형성된다. 발효과정에 영향을 주는 주요 인자로는 온도, 습도, 산소 등이 있으며 그 중에서도 수분의 양이 매우 중요하다. 일반적으로 미생물발효차 원료인 모차를 싹은 후에 면에 적당한 물을 첨가하고 습한 천으로 덮어 온도와 습기를 유지한다. 발효가 진행되면서 수분함량이 점점 감소하고 온도가 점점 증가하는데 보통 65℃ 이하로 유지해야 하는 것으로 알려져 있다.
- ㉖ 뒤집기 : 미생물발효차의 품질과 제다 효율에 매우 중요한 공정으로 발효과정 중 발효정도, 발효온도, 습도에 따라 뒤집어 주는 것을 의미한다. 이 작업을 통해서 온도를 감소시키고 발효 중인 찻잎이 서로 섞여 습도, 산소, 미생물의 작용이 균등하게 이루어지는 효과가 있다. 보통 5~10일 간격으로 뒤집어주는데 본 연구에서는 7일~10일 간격으로 실시하였다.
- ㉗ 건조 : 발효가 끝난 차의 발효 속도를 늦추기 위해 실시하는 작업으로 보통 실내에서 통풍 건조를 한다. 보통 찻잎의 수분함량이 12~15%가 될 때까지 건조를 하고 건조가 끝난 차는 채로 쳐서 선별한다. 선별이 끝난 차를 산차라고 하며 산차로 숙성시켜 음용하기도 하고 성형하여 긴압차로 제조하기도 한다.
- ㉘ 성형 : 긴압차를 만들기 위해 여러 가지 형태로 성형을 하는데 보통 먼저 산차를 찌고 난 후 성형기로 압력을 주어 일정한 모양을 만든다. 산차를 찌는 온도는 보통 90℃ 이상 유지해야 하는데 찌기가 과하면 건조가 어렵고 부족하면 압축시 점착성이 떨어져 품질에 영향을 미친다. 증기의 온도가 90℃ 이상이면 보통 2~5분간 찌고, 찻잎이 부드러워지면 압력을 가해 형태를 만든다.
- ㉙ 건조 : 성형이 끝난 차는 그늘 또는 실내에서 서서히 건조한다. 건조가 끝나면 적당한 포장재로 포장한다.

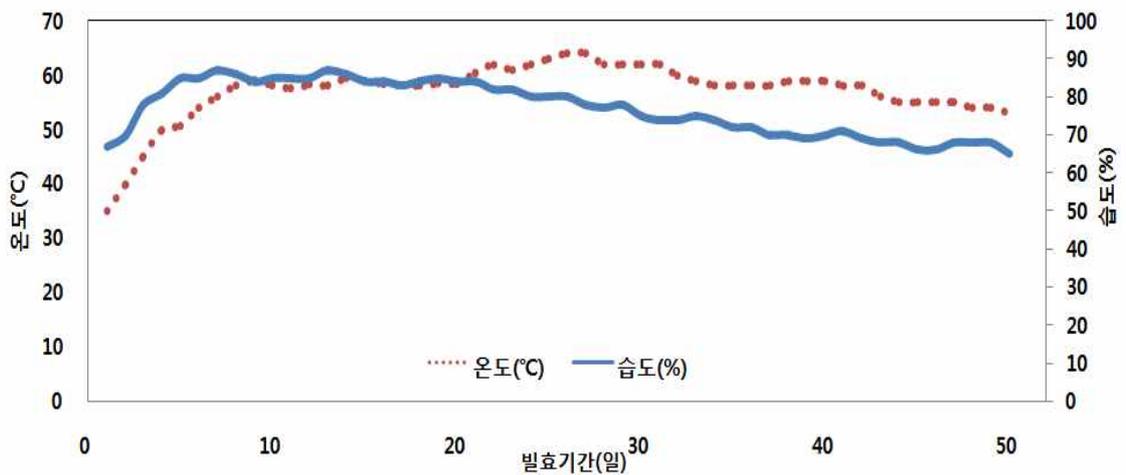
- ㉔ 저장숙성 : 미생물발효차 품질 형성에 중요한 과정으로 이 과정을 통해 찻잎의 성분이 서로 조화를 이루어 품질 향상과 풍미 생성에 도움을 준다. 일반적인 숙성조건은 습도 70%이하, 온도 25℃ 정도이며 통풍이 잘되는 깨끗한 곳에서 저장한다.

(나) 미생물발효차의 발효과정 중 온·습도 변화

- 미생물발효차의 제조 과정 중 발효 온도와 습도가 대단히 중요하다고 알려져 있다. 40℃이하에서는 발효가 충분히 일어나지 않으며, 65℃이상에서는 탄화현상이 일어나므로 발효온도는 항상 40℃이상 65℃이하를 유지하여야 한다고 보고되고 있다. 또한 습도를 충분히 보호해 주지 못하면 미발효가 일어날 가능성이 높다고 알려져 있다. 따라서 원료를 퇴적 시킨 후 인위적으로 부직포와 비닐을 덮어 발효과정 중 온·습도를 유지 하였다.

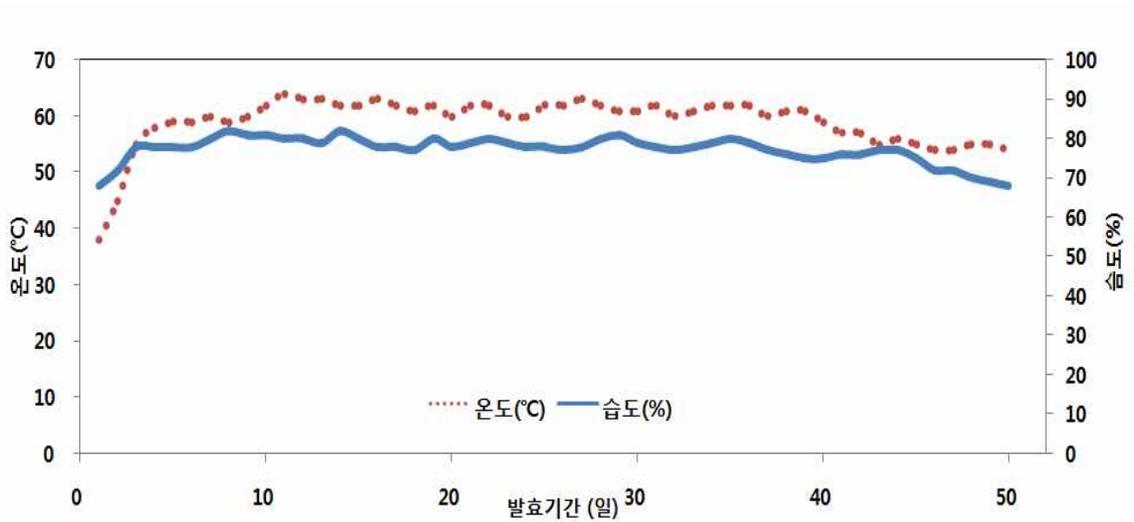
○ 중국 대엽종 모차(CM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- 모차의 양(164kg)은 비교적 작았으나 발효시작 일주일 후까지 온도가 급격히 상승하다가 10일 이후부터 60℃ 전후를 꾸준히 유지하였다. 발효 후 37일째부터 온도가 조금씩 하강하다 발효 완료시에는 54℃ 정도를 유지하였다. 습도도 발효 시작 10일째까지 증가하다가 그 이후로 완만한 감소 경향을 보였다.



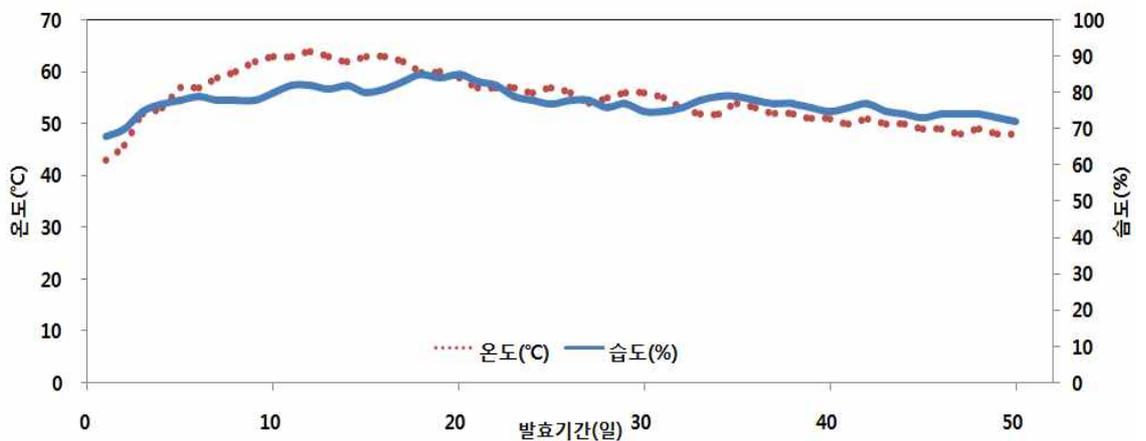
○ 국내 재래종 모차 1차(BIM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- 9월 말에 채취한 찻잎으로 잎이 크고 어린순이 적어 부피가 큰 경향을 보였다. 발효시작 온도는 34℃였으며 5일째 이후 55℃ 이상으로 꾸준히 상승되어 온도가 유지 되었다. 이후 40일째부터 점차 낮아지면서 발효 종료 시까지 50℃ 정도를 유지 하였다. 습도의 변화는 그리 크지 않았다.



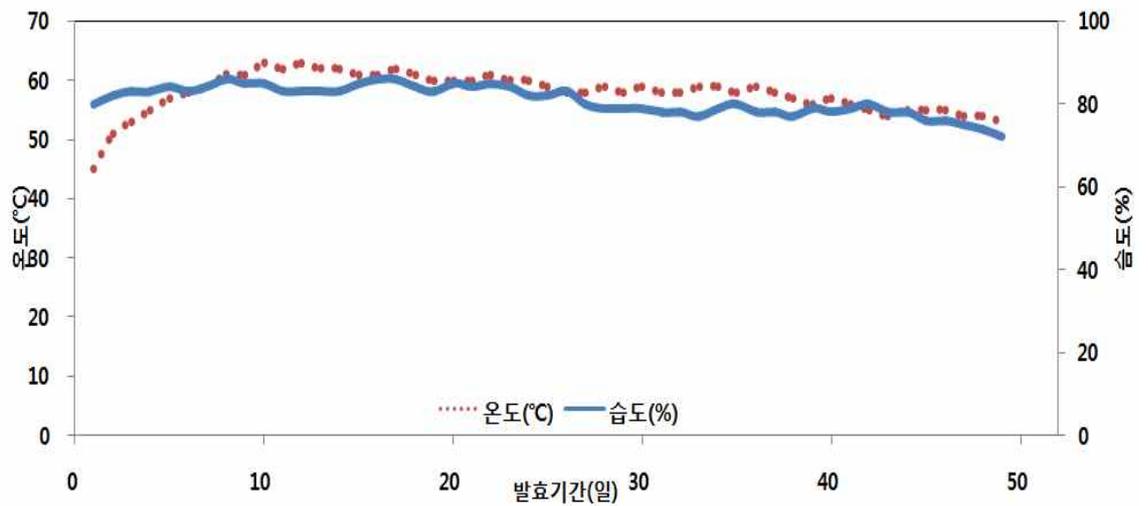
○ 국내 재래종 모차 2차(BIIM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- 국내 재래종 모차(200kg)의 발효 시 처음 온도는 45℃로 중국 대엽종 모차(CM)보다 높은 온도로 시작되어 발효 5일째 55℃, 17일째 62℃까지 꾸준히 증가한 후 향온상태에 이르렀다. 19일 이후부터 점차 하강하면서 40℃로 발효가 종료되었다. 습도는 중국 대엽종 모차(CM)와 비교하여 낮은 것으로 보아 적당한 습열 작용이 없었을 것으로 생각된다.



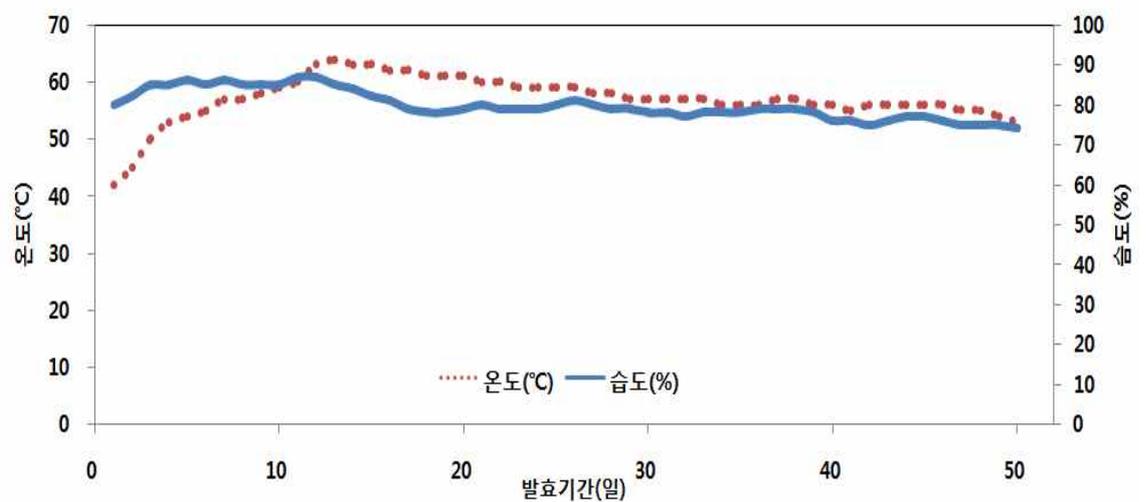
○ 국내 재래종 모차 3차(BIIM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- 10월 초에 채취 된 국내 재래종 모차 3차는 잎이 크고 거칠어 국내 재래종 모차 1, 2차보다 부피가 컸으며 후발효 온도는 45℃로 시작되어 13일째 61℃까지 상승하였다. 이후 항온상태로 발효가 진행되었으며 습도의 경우는 점차 감소하였다.



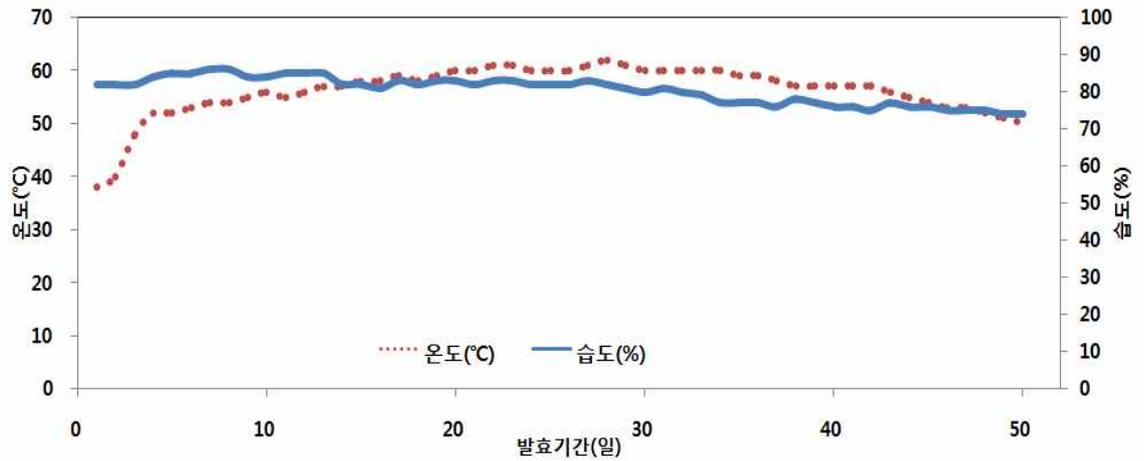
○ 증청녹차(SM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- 증청녹차(SM)는 증청 살청한 녹차로 발효 12일째까지 중심온도가 63℃로 증가된 후 점차적으로 감소되다 50℃에서 발효 종료되었다. 다른 품종의 시료에 비하여 비교적 습도가 낮았으며 증감폭도 적었다.



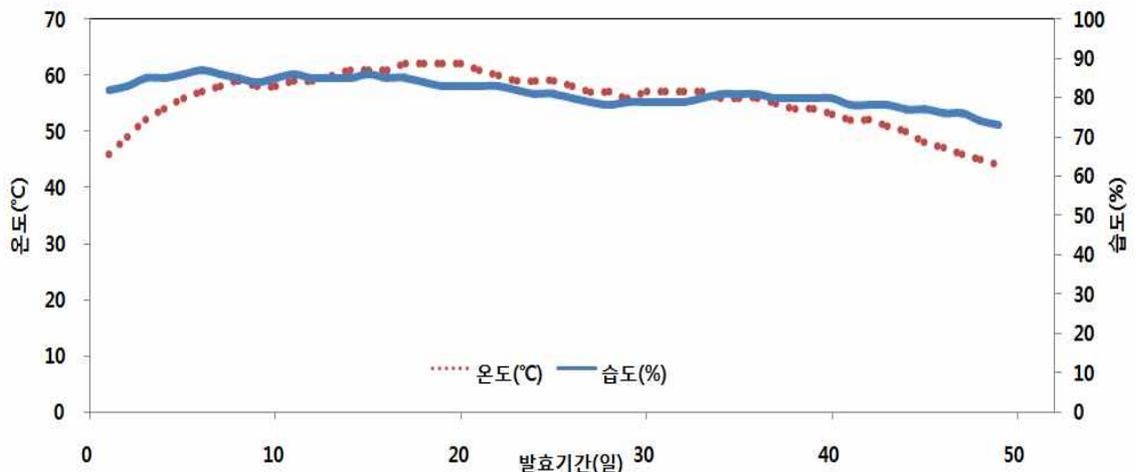
○ 대차12호(JM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- 대차12호(JM)는 10월 초에 나온 새순을 손 채취하여 어린잎이 많이 포함되어 부피가 작았다. 발효 시작 2일부터 온도가 증가되어 10일째 53℃가 되었고 28일째 62℃까지 상승하였다. 이후 완만하게 감소하다가 43일째부터 감소폭이 커지면서 50℃로 발효가 완료되었다.



○ Yabukida(YM)의 발효과정 중 온·습도 변화

- Yabukida(YM)는 10월 초에 채취한 찻잎으로 어린눈은 전혀 없고 굵은 가지와 큰잎으로 만들어 부피가 크고 무게가 무거운 경향을 보였다.
- 발효 2일째부터 8일째까지 57℃로 상승된 온도는 18일째 62℃까지 상승한 후 점차적으로 감소하였다. 35일째부터는 감소폭이 커지면서 발효 종료 시에는 45℃까지 낮아졌다.



- 전체적으로 발효초기에 온도와 습도가 상승하는 경향을 보였으며 원료 모차의 채취시기가 늦어질수록 발효온도 및 습도의 변화가 적은 것으로 보아 발효가 활발히 일어나지 않았을 가능성이 제시되었다. 또한 새순을 포함하지 않은 시료의 온, 습도 변화가 크지 않아 원료 찻잎의 채취시기 및 채취부위와 발효과정이 대단히 중요한 상호 연관성이 있을 가능성이 제시되었으며 5월말~6월초에 채취한 중국산 모차에 비하여 9월말~10월초에 채취한 국내산 찻잎이 성숙하고 거칠다는 사실로부터 성숙한 찻잎을 사용하였을 경우 유념과정을 보다 강하게 해야 할 필요성도 제시 되었다.

(다) 찻잎의 종류 및 발효조건에 따른 발효과정 중 주요 미생물의 거동

- 발효는 매우 복잡한 메커니즘을 통해 진행이 되기 때문에 이 발효에 관여하는 재료의 특성 및 온도, 습도, 시간 등의 다양한 발효 조건에 대한 과학적이고 정확한 고찰이 필수적이다. 이러한 정보는 문헌상이나 견학 등의 방법을 통해 일부 얻을 수도 있지만 이러한 수동적 방법을 통해서 얻어지는 정보는 한계가 있을 수밖에 없다.
- 때문에 재외국의 기술자와 함께 미생물발효차 제조하면서 발효조건 및 발효단계별 주요 미생물의 거동을 조사하였다. 또한 미생물발효차를 생산하고 있는 중국 현지의 공장 2곳에서 직접 미생물발효차를 제조하면서 각 발효단계별 시료를 채취하여 생육미생물을 분석하였다.

① 미생물발효차로부터 주요 미생물 분리 및 동정

- 각각의 미생물발효차 시료에 멸균수를 첨가하여 균질화 시킨 후 배지에 spreading한 후 28℃에서 4일 간격으로 배양하면서 각각의 미생물을 순수분리 하였다. 분리된 각각의 미생물은 위상차 현미경을 이용한 포자 형태 조사 및 18S rRNA primer를 이용한 PCR 수행 및 각각의 gene을 cloning하여 염기서열을 분석하였다.
- 외국 유통 미생물발효차와 발효차 제조과정 중 채취한 시료(총 896종)로부터 생육 미생물을 분리, 동정하였으며 이중에서 검출 빈도를 고려하여 주요 균주 15종을 선발, 발효시험 균주로 사용하였다.
- 그 결과, 기존 미생물발효차 시료에서 채취한 미생물인 *Aspergillus* sp. 2종

(*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*), *Penicillium* sp. 1종 (*Penicillium glabrum*), 효모 1종 (*Candida tropicalis*)를 제외한 *Aspergillus* sp. 3종 (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus tamarii*), *Penicillium* sp. 3종 (*Penicillium georgiense*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium commune*)과 털곰팡이 3종 (*Rhizopus stolonifer*, *Rhizomicor pusillus*, *Absidia ramosa*), 그리고 효모 2종 (*Debaryomyces hansenii*, *Rhodosporidium paludigenum*)으로 곰팡이 9종과 효모 2종이 새롭게 미생물발효차 발효 과정 중에서 추가적인 주요 미생물로 분리 및 동정되었다.

㉑ 곰팡이

- 미생물발효차의 발효과정에서 미생물을 분리한 결과 *Aspergillus* sp. 3종(*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus tamarii*) 및 *Penicillium* sp. 3종 (*Penicillium georgiense*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium commune*)과 털곰팡이 3종(*Absidia ramosa*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus stolonifer*)으로 총 9종을 분리 및 동정 하였다.

㉒ *Aspergillus niger*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Aspergillus* sp. 곰팡이로 추정되었다.



- 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

```

Querv: 10  ggtgaacctgcggaaggatcattaccgagtgcggtcctttggcccaa|           69
           |||
Sbjct:  7  ggtgaacctgcggaaggatcattaccgagtgcggtcctttggcccaa|           66

Querv: 70  tgtctattataccctgttgccttcggcgccgccgcttgcggccgcci|           129
           |||
Sbjct: 67  tgtctattataccctgttgccttcggcgccgccgcttgcggccgcci|           126
    
```


- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Aspergillus niger*와 98% 동일한 결과가 나타났으나 포자의 색이 *Aspergillus niger*는 검정색인 반면 이 균주는 상아색이 나타나기 때문에 최종적으로 *Aspergillus niger*로 명명하였다.

② *Aspergillus fumigatus*

- 균사 생장 형태: 포자의 형태로 보아 *Aspergillus sp.* 곰팡이로 추정되었다.



- 유전자 분석 결과

5.8S ribosomal RNA gene

Querv: 155	aagaccccaacatgaacgctgttctgaaagtatgcagtctgagttgatt;	214
Sbjct: 112	aagaccccaacatgaacgctgttctgaaagtatgcagtctgagttgatt;	171
Querv: 215	ttaaaactttcaacaacggatctcttgggtccggcatcgatgaagaacg;	274
Sbjct: 172	ttaaaactttcaacaacggatctcttgggtccggcatcgatgaagaacg;	231
Querv: 275	gataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaaatcatcgagtccttgaac;	334
Sbjct: 232	gataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaaatcatcgagtccttgaac;	291
Querv: 335	ccctggtattccgggggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccctc;	394
Sbjct: 292	ccctggtattccgggggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccctc;	351
Querv: 395	gtgtgttggcccccgtccccctctcccggggacgggcccgaaggca;	454
Sbjct: 352	gtgtgttggcccccgtccccctctcccggggacgggcccgaaggca;	411
Querv: 455	gcgtccggtcctcgagcgtatggggcttgtcacctgctctgtagggcc;	514
Sbjct: 412	gcgtccggtcctcgagcgtatggggcttgtcacctgctctgtagggcc;	471
Querv: 515	gccgacaccaactttatTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG;	574
Sbjct: 472	gccgacaccaactttatTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG;	531
Querv: 575	acttaagcatatcaataagcggaggaa 601	

Sbjct: 532 acttaagcatatcaataagcggaggaa 558

○ 동정 결과

- *Aspergillus fumigatus* isolate 15-F 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

Length = 559

Score = 886 bits (447), Expect = 0.0

Identities = 447/447 (100%)

Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Aspergillus* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Aspergillus fumigatus*와 100%동일한 결과가 나타났으나 포자의 색이 *Aspergillus fumigatus*는 푸른색인 반면 이 균주는 흰색이 나타나기 때문에 최종적으로 *Aspergillus fumigatus*로 명명하였다.

◎ *Aspergillus tamarii*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Aspergillus* sp. 곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Query: 4 tccgtaggggaacctgcggaaggatcattaccgagtgtagggttcctag

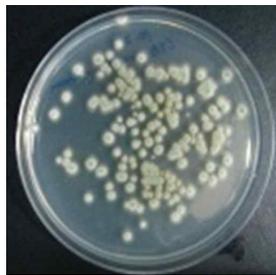
63

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Aspergillus* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Aspergillus tamarii*와 98%동일한 결과가 나타났다.

④ *Penicillium georgiense*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Penicillium* sp. 곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv: 34	tgaetgcaggccctctgggtctaacctcccaccctgtctattgtacct	93
Sbjct: 1	tgagtgcaggccctctgggtctaacctcccaccctgtctattgtacct	60
Querv: 94	tgggccccctgaccccaggtcggcagggggacactccccgggcgcgcgc	153
Sbjct: 61	tgggccccctgaccccaggtcggcagggggacactccccgggcgcgcgc	120
Querv: 154	accctggaactctgtctgtgagtggtgtctgagtaggatttgaatcaet	213
Sbjct: 121	accctggaactctgtctgtgagtggtgtctgagtaggatttgaatcaet	180
Querv: 214	acaacggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcg	273
Sbjct: 181	acaacggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcg	240
Querv: 274	gaattgcagaattcagtgatcatcgagctttgaaacgcacattgcgc	333
Sbjct: 241	gaattgcagaattcagtgatcatcgagctttgaaacgcacattgcgc	300
Querv: 334	cggggggcatgcctgtccgagcgtcattgcacccctcaagcccggcttg	393
Sbjct: 301	cggggggcatgcctgtccgagcgtcattgcacccctcaagcccggcttg	360
Querv: 394	tgtccctccgtccccgggggacagccctcaaatgcaatgcccgcaccgc	453

```

Sbjct: 361 tgtccctccgttccgggggacaggcctcaaatgcaatggcggcaccgc 420

Querv: 454 gagcgtatggggctttgtcaccgcgtttgtaggccggccggtcgcttgc 513
          |||
Sbjct: 421 gagcgtatggggctttgtcaccgcgtttgtaggccggccggtcgcttgc 479

Querv: 514 ccaacttcttatgttgacctcggatcaggtaggataaccgctgaactt 573
          |||
Sbjct: 480 -caacttcttatgttgacctcggatcaggtaggataaccgctgaactt 538

Querv: 574 taagcggaggaa 585
          |||
Sbjct: 539 taagcggaggaa 550

```

○ 동정 결과

- *Penicillium georgiense* isolate NRRL 35509 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 1126
Score = 999 bits (504), Expect = 0.0
Identities = 542/552 (98%), Gaps = 2/552 (0%)
Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Penicillium* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Penicillium georgiense*와 98%동일한 결과가 확인되었다.

㉠ *Penicillium citrinum*

- 균사 생장 형태: 포자의 형태로 보아 *Penicillium* sp.곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

```

Querv: 3   tccgtaggtgaacctgcggaaggatcattaccgaatgcggccccctcgg|      62
          |||
Sbjct: 1   tccgtaggtgaacctgcggaaggatcattaccgagtgcgggccccctcgg|      60

Querv: 63  ccacccgtgttgcgccgaacctatgttgctcggcgggccccgcgccccgc|      122
          |||
Sbjct: 61  ccacccgtgttgcgccgaacctatgttgctcggcgggccccgcgccccgc|      120

Querv: 123 ctgaacgctgtctgaagttgcagctctgagacctataacgaaattaagtta|      182
          |||
Sbjct: 121 ctgaacgctgtctgaagttgcagctctgagacctataacgaaattaagtta|      180

Querv: 183 aacggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgat|      242
          |||
Sbjct: 181 aacggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgat|      240

Querv: 243 attgcagaattcagtgaatcatcgagctcttgaacgcacattgcgcct|      302
          |||
Sbjct: 241 attgcagaattcagtgaatcatcgagctcttgaacgcacattgcgcct|      300

Querv: 303 gagggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcccggcttgtg|      362
          |||
Sbjct: 301 gagggcatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcccggcttgtg|      360

Querv: 363 gtntntntntnccggggggacgggccccgaaaggcagcggcgccaccgct|      422
          |||
Sbjct: 361 gtcccccccgccggggggacgggccccgaaaggcagcggcgccaccgct|      420

Querv: 423 gcgtatggggcttctgtcaccgctctagtagggccggccggcgccagcc|      482
          |||
Sbjct: 421 gcgtatggggcttctgtcaccgctctagtagggccggccggcgccagcc|      480

Querv: 483 ttttaattatctcaggttgacctcggatcaggtaggataaccgctgaac|      542
          |||
Sbjct: 481 ttttaattatctcaggttgacctcggatcaggtaggataaccgctgaac|      540

Querv: 543 aataagcggaggaa 556
          |||
Sbjct: 541 aataagcggaggaa 554

```

○ 동정 결과

- *Penicillium citrinum* strain FRR 1841 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

Length = 577

Score = 1057 bits (533), Expect = 0.0

Identities = 547/554 (98%)

Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Penicillium* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Penicillium citrinum*과 98%동일한 결과가 확인되었다.

① *Penicillium commune*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Penicillium* sp. 곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

```
Querv: 151 aagacaccctcgaactctgtctgaagattgaagtctgagtgaaaatata: 210
      !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct: 172 aagacaccctcgaactctgtctgaagattgaagtctgagtgaaaatata: 231

Querv: 211 actttcaacaacggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcg: 270
      !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct: 232 actttcaacaacggatctcttggttccggcatcgatgaagaacgcagcg: 291

Querv: 271 gtaatgtgaattgcaaattcagtgaaatcatcagatctttgaacgcacat 330
      !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct: 292 gtaatgtgaattgcaaattcagtgaaatcatcagatctttgaacgcacat 351

Querv: 331 gtattccggggggcatgcctgtccgagcgtcatttgcctcaagccc: 390
      !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
Sbjct: 352 gtattccggggggcatgcctgtccgagcgtcatttgcctcaagccc: 411

Query: 391 tgggccccgtccccgatctccgggggacgggcccgaaggcagcggcg: 450
```

```

Sbjct: 412 tgggccccgtccccgatctccgggggacgggcccgaaaggcagcggcgg
|||||
Querv: 451 ggtcctcgagcgtatggggctttgtcaccgcctctgtaggccccggccgg
|||||
Sbjct: 472 ggtcctcgagcgtatggggctttgtcaccgcctctgtaggccccggccgg
|||||
Querv: 511 caacccaaatttttatccaggttgacctcgatcaggtaggatacccg
|||||
Sbjct: 532 caacccaaatttttatccaggttgacctcgatcaggtaggatacccg
|||||
Querv: 571 catatcaataagcggaggaa 590
|||||
Sbjct: 592 catatcaataagcggaggaa 611

```

○ 동정 결과

- *Penicillium commune* isolate HF1 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 Length = 611
Score = 872 bits (440), Expect = 0.0
Identities = 440/440 (100%), Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Penicillium* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Penicillium commune*과 100%동일한 결과가 확인되었다.

㉔ *Lichtheimia ramosa*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Lichtheimia* sp. 과 *Absidia* sp. 곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv: 6	acctgcggaaggatcattactgagaggttaaaaaaccactaettggggg	65
Sbjct: 12	acctgcggaaggatcattactgagaggttaaaaaaccactagttggggg	71
Querv: 66	tctagtagttcctcacagttttgtgcaaagtcgggtcaacctggttggc	125
Sbjct: 72	tctagtagttcctcacagttttgtgcaaagtcgggtcaacctggttggc	131
Querv: 126	ccttggatctctggttggcatagagacctccttttaggagacttg	185
Sbjct: 132	ccttggatctctggttggcatagagacctccttttaggagacttg	191
Querv: 186	agatctaggctgcttgaacgagacgtatggaccttctttcaggagac	245
Sbjct: 192	agatctaggctgcttgaacgagacgtatggaccttctttcaggagac	251
Querv: 246	gtcaaaagcaagcaaggcaagcctttggggctctagtactaactatcco	305
Sbjct: 252	gtcaaaagcaagcaaggcaagcctttggggctctagtactaactatcco	311
Querv: 306	attcttctcgtgtaaacatgatgtacgaaaaagttagttgtaactt	365
Sbjct: 312	attcttctcgtgtaaacatgatgtacgaaaaagttagttgtaactt	371
Querv: 366	ttggcaatggatctcttgggtctcgcacatgatgaagagcgtagcaaaet	425
Sbjct: 372	ttggcaatggatctcttgggtctcgcacatgatgaagagcgtagcaaaet	431
Querv: 426	tgcgacttgcattcatagcgaatcatcgagttctcgaacgcaccttgcg	485
Sbjct: 432	tgcgacttgcattcatagcgaatcatcgagttctcgaacgcaccttgcg	491
Querv: 486	atctactaggcacagttgtttcagtatctgcaactaccaatcagttcaa	545
Sbjct: 492	atctactaggcacagttgtttcagtatctgcaactaccaatcagttcaa	551
Querv: 546	gaatctaagcgaactggaatgggcttgtgttgatggcattcagttgct	605
Sbjct: 552	gaatctaagcgaactggaatgggcttgtgttgatggcattcagttgct	611
Querv: 606	aaatacatttagtccttaggcaattggctttagtcattttgccgatgta	665
Sbjct: 612	aaatacatttagtccttaggcaattggctttagtcattttgccgatgta	671
Querv: 666	gcctgaggagcaacgacttgggttagtgagttcataattccaagtcaatc	725
Sbjct: 672	gcctgaggagcaacgacttgggttagtgagttcataattccaagtcaatc	731
Querv: 726	gaactaggtcttaatctttacggactagtgagaggatctaacttgggtc	785
Sbjct: 732	gaactaggtcttaatctttacggactagtgagaggatctaacttgggtc	791

Querv: 786 aaactcacatctagatctgaaatcaactgagatcacccgctgaacttaa: 845
 !!!
 Sbjct: 792 aaactcacatctagatctgaaatcaactgagatcacccgctgaacttaa: 851

Querv: 846 a 846
 |
 Sbjct: 852 a 852

○ 동정 결과

- *Lichtheimia ramosa* strain CNRMA/F 09-12 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 Length = 860
 Score = 1667 bits (841), Expect = 0.0
 Identities = 841/841 (100%), Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Lichtheimia* sp. 또는 *Absidia* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Lichtheimia ramosa*와 100%동일한 결과가 확인되었다.

④ *Rhizomucor pusillus*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Rhizomucor* sp. 곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

Querv: 13	gaacctgcggaaggatcattaaaaagtgtggaatcgtggtgacctc	72
Sbjct: 10	gaacctgcggaaggatcattaaaaagtgtggaatcgtggtgacctc	69
Querv: 73	gcgattctctcctttttgtgaaatgttctgaggattgctccagatctc	132
Sbjct: 70	gcgattctctcctttttgtgaaatgttctgaggattgctccagatctc	129
Querv: 133	ttttacatatattgattgactgttgtttaacaaattgaaagtttggatc	192
Sbjct: 130	ttttacatatattgattgactgttgtttaacaaattgaaagtttggatc	189
Querv: 193	aagacgataaaaatttcaaaacaactttaagcaatggatcacttggttct	252
Sbjct: 190	aagacgataaaaatttcaaaacaactttaagcaatggatcacttggttct	249
Querv: 253	agagcgtagcaaattgcgaaaagtaatgcgatctgcagcctttgcgaat	312
Sbjct: 250	agagcgtagcaaattgcgaaaagtaatgcgatctgcagcctttgcgaat	309
Querv: 313	cgaacgcaccttgaccctttggttcatccattgggtacgtctagtcca	372
Sbjct: 310	cgaacgcaccttgaccctttggttcatccattgggtacgtctagtcca	369
Querv: 373	aaccocctaaaggtttatTTTTGATAAACCTTTGATTTGCGGTGCTGA	432
Sbjct: 370	aaccocctaaaggtttatTTTTGATAAATCTTTGGATTTGCGGTGCTGA	429
Querv: 433	ccgttcaagctaccgaacaatttgtatgttggacccttgatatttc	492
Sbjct: 430	ccgttcaagctaccgaacaatttgtatgttggacccttgatatttc	489
Querv: 493	gcattggtatctaattttttaccagtgcttcgagatgatcaagtata	552
Sbjct: 490	gcattggtatctaattttttaccagtgcttcgagatgatcaagtata	549
Querv: 553	accacaaataaatttcaactatggatctgaacttagatgggattaccg	612
Sbjct: 550	accacaaataaatttcaactatggatctgaacttagatgggattaccg	609
Querv: 613	catatcaataag 624	
Sbjct: 610	catatcaataag 621	

○ 동정 결과

- *Rhizomucor pusillus* 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

Length = 628

Score = 1205 bits (608), Expect = 0.0

Identities = 611/612 (99%)

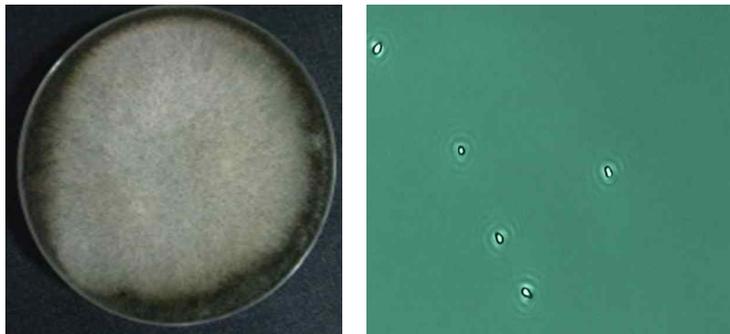
Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Rhizomucor* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Rhizomucor pusillus*와 99%동일한 결과가 확인되었다.

① *Rhizopus stolonifer*

- 균사 성장 형태: 포자의 형태로 보아 *Rhizopus* sp. 곰팡이로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

translation elongation factor(Tef)

Querv	3	GTGATTTTCATCAAGAACATGATTACCGGTACCTCTCAAGCCGATTGTGC	62
Sbjct	234	GTGATTTTCATCAAGAACATGATTACCGGTACCTCTCAAGCCGATTGTGC	293
Querv	63	TTGCTGGTGGTACTGGTGAATTCGAAGCTGGTATTTCCAAGGATGGTCA	122
Sbjct	294	TTGCTGGTGGTACTGGTGAATTCGAAGCTGGTATTTCCAAGGATGGTCA	353
Querv	123	ACGCTCTTTTGGCTTTCACCCTCGGTGTTTCGTC AATTGATTGTTGCTGT	182
Sbjct	354	ACGCTCTTTTGGCTTTCACCCTCGGTGTTTCGTC AATTGATTGTTGCTGT	413
Querv	183	ATACCACCAAGTGGTCCGAAGCTCGTTTCAACGAAATCGTCAAGGAAGT	242
Sbjct	414	ATACCACCAAGTGGTCCGAAGCTCGTTTCAACGAAATCGTCAAGGAAGT	473
Querv	243	TCAAGAAGATTGGTTACAACCCCAAGTCTGTTCCCTTTCGTC CCCCATCTC	302

Sbjct	474	TCAAGAAGATTGGTTACAACCCCAAGTCTGTTTCCTTTTCGTCATCTC	533
Querv	303	GTGACAACATGTTGGATGAATCCACCAACATGCCCTGGTACAAGGGATG 	362
Sbjct	534	GTGACAACATGTTGGATGAATCCACCAACATGCCCTGGTACAAGGGATG	593
Querv	363	CCAAAGCTGGTGCCAAGTCTGGTAAGACCCTTTTGGAAAGCCATTGATAA 	422
Sbjct	594	CCAAAGCTGGTGCCAAGTCTGGTAAGACCCTTTTGGAAAGCCATTGATAA	653
Querv	423	CTACCCGTCCTCCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAAGATGTTTA 	482
Sbjct	654	CTACCCGTCCTCCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAAGATGTTTA	713
Querv	483	GTATTGGTACGGTCCCGTCGGTTCGTGCGAAACTGGTGCATCAAGGC 	542
Sbjct	714	GTATTGGTACGGTCCCGTCGGTTCGTGCGAAACTGGTGCATCAAGGC	773
Querv	543	TTACCTTCGCTCCCCTGCTGTAACCACTGAAGTCAAGTCCGTTGAAAT 	602
Sbjct	774	TTACCTTCGCTCCCCTGCTGTAACCACTGAAGTCAAGTCCGTTGAAAT	833
Querv	603	CCCTTTCTGAAGGTGCTCCTGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTCAAGAA 	662
Sbjct	834	CCCTTTCTGAAGGTGCTCCTGGTGACAACGTTGGTTTCAACGTCAAGAA	893
Querv	663	AGGATATCCGTCGTGGTAACGTCTGTTCCGACTCCAAGAACGACCCCGC 	722
Sbjct	894	AGGATATCCGTCGTGGTAACGTCTGTTCCGACTCCAAGAACGACCCCGC	953
Querv	723	GTTCTTTACCGCTCAAGTCATTGTCTTGAACCAACCCCGGTCAAATTGG 	782
Sbjct	954	GTTCTTTACCGCTCAAGTCATTGTCTTGAACCAACCCCGGTCAAATTGG	1013
Querv	783	CTCCCGTTTTGGATTGTCACACCGCTCACATTGCCTGTAAGTTCTCTGA 	842
Sbjct	1014	CTCCCGTTTTGGATTGTCACACCGCTCACATTGCCTGTAAGTTCTCTGA	1073
Querv	843	AGATCGACAGACGTTCCGGTAAGTCTCTTGAAGCCGAACCCAAGTTCGT 	901
Sbjct	1074	AGATCGACAGACGTTCCGGTAAGTCTCTTGAAGCCGAACCCAAGTTCGT	1133
Querv	902	ACTCTGCTATCGTCAAGATGATTCCTCCAAGCCCATGTGTGTTGAAGC 	961
Sbjct	1134	ACTCTGCTATCGTCAAGATGATTCCTCCAAGCCCATGTGTGTTGAAGC	1193
Querv	962	ACCCTC 967 	
Sbjct	1194	ACCCTC 1199	

· *Rhizopus stolonifer* EF-1alpha gene for translation elongation factor 1-alpha, partial cds, strain: CBS 609.82 Length=1231

Score = 1777 bits (962), Expect = 0.0

Identities = 965/966 (99%), Gaps = 1/966 (0%) Strand=Plus/Plus

· *Rhizopus sexualis* EF-1alpha gene for translation elongation factor 1-alpha, partial cds, strain: CBS 336.39 Length=1231

Score = 1666 bits (902), Expect = 0.0

Identities = 945/966 (97%), Gaps = 1/966 (0%) Strand=Plus/Plus

- *Syzygites megalocarpus* translation elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) gene, partial CDs Length=1252

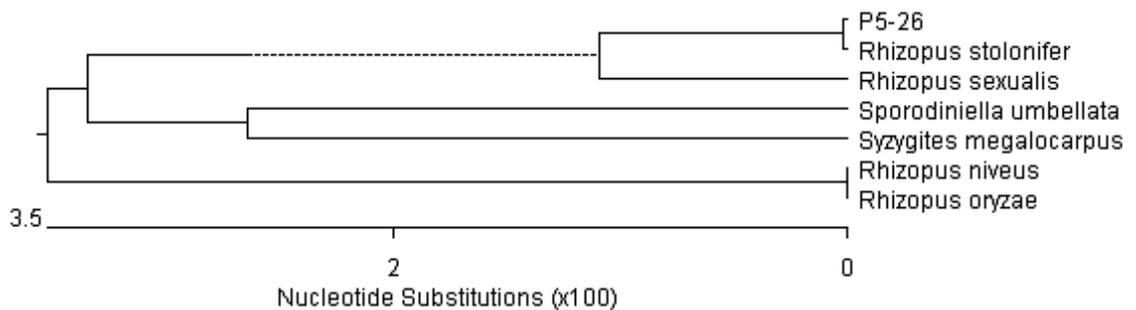
Score = 1533 bits (830), Expect = 0.0

Identities = 922/967 (95%), Gaps = 3/967 (0%) Strand=Plus/Plus

○ Gene identity 결과

		Percent Identity							
Divergence									P5-26
			94.4	94.4	97.8	99.9	94.6	95.3	Rhizopus niveus
		5.8		100.0	94.5	94.5	93.3	93.8	Rhizopus oryzae
		5.8	0.0		94.5	94.5	93.3	93.8	Rhizopus sexualis
		2.1	5.7	5.7		97.8	94.6	95.5	Rhizopus stolonifer
		0.0	5.8	5.8	2.2		94.7	95.4	Sporodiniella umbellata
		5.5	7.1	7.1	5.7	5.5		94.9	Syzygites megalocarpus
		4.8	6.6	6.6	4.6	4.8	5.3		

○ Phylogenic tree 결과



○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Rhizopus* sp. 곰팡이일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Rhizopus stolonifer*와 99%동일한 결과가 확인되었다.


```

                |||
Sbjct: 2184 aactaggcgtttgcttgaaatgtattggcatgagtggtactggatagtg 2243

                |||
Querv: 483 tcaatgtattaggtttatccaactcgttgaatagtttaatggtatattc 542
                |||
Sbjct: 2244 tcaatgtattaggtttatccaactcgttgaatagtttaatggtatattc 2303

                |||
Querv: 543 aggctcggccttacaatataacaaacaagtttgacctcaaatcaggtag 602
                |||
Sbjct: 2304 aggctcggccttacaatataacaaacaagtttgacctcaaatcaggtag 2363

                |||
Querv: 603 gaacttaagcatatcaataagccggaggaaa 633
                |||
Sbjct: 2364 gaacttaagcatatcaataag-cggaggaaa 2393

```

○ 동정 결과

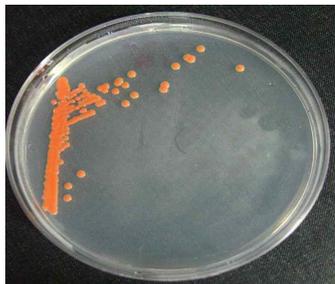
- *Debaryomyces hansenii* strain MA09-AK 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 2991
Score = 1235 bits (623), Expect = 0.0
Identities = 630/631 (99%), Gaps = 1/631 (0%), Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 생장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Debaryomyces* sp.의 효모일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Debaryomyces hansenii*와 99%동일한 결과가 확인되었다.

② *Rhodospiridium paludigenum*

- 균사 생장 형태: 포자의 형태로 보아 *Rhodospiridium* sp. 효모로 추정되었다.



○ 유전자 분석 결과

18S ribosomal RNA gene

```

Ouerv: 3   ctgcggaaggatcattagtgaaatattagggcgtccaa-cttaacttga: 61
          |||
Sbjct: 13  ctgcggaaggatcattagtgaaatattagggcgtccaaacttaacttga: 72

Ouerv: 62  cacttttctaaccctgtgcatctgttttctggtcagtagctctctcggag 121
          |||
Sbjct: 73  cacttttctaaccctgtgcatctgttttctggtcagtagctctctcggag 132

Ouerv: 122 cacttaaaacacaaaagtctatgaatgtataaaattataacaacacaaa: 181
          |||
Sbjct: 133 cacttaaaacacaaaagtctatgaatgtataaaattataacaacacaaa: 192

Ouerv: 182 cggatctcttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataa: 241
          |||
Sbjct: 193 cggatctcttggctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaatgcgataa: 252

Ouerv: 242 tgcagaattcagtgaaatcatcgaatcttgaacgcaccttgcgctctct: 301
          |||
Sbjct: 253 tgcagaattcagtgaaatcatcgaatcttgaacgcaccttgcgctctct: 312

Ouerv: 302 gagcatgcctgtttgagtgcatgaaatcttcaaccctctcttttctta: 361
          |||
Sbjct: 313 gagcatgcctgtttgagtgcatgaaatcttcaaccctctcttttctta: 372

Ouerv: 362 ggtgcttggatcctgagcgctgctggcttcggcctagctcgttcgtaat: 421
          |||
Sbjct: 373 ggtgcttggatcctgagcgctgctggcttcggcctagctcgttcgtaat: 432

Ouerv: 422 cgcaatcgaacttcggattgacttggcgtaatagactattcgctgagga 481
          |||
Sbjct: 433 cgcaatcgaacttcggattgacttggcgtaatagactattcgctgagga 492

Ouerv: 482 taccagagccgggttgggttaaaggaagcttctaatacctaaaagtctaa 541
          |||
Sbjct: 493 taccagagccgggttgggttaaaggaagcttctaatacctaaaagtctaa 552

Ouerv: 542 atctcaaatcaggtaggactaccgctgaacttaagcatatcaataagc 590
          |||
Sbjct: 553 atctcaaatcaggtaggactaccgctgaacttaagcatatcaataagc 601
  
```

○ 동정 결과

- *Rhodsporidium paludigenum* strain CBS 6567 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 Length = 611
Score = 1144 bits (577), Expect = 0.0
Identities = 587/589 (99%), Gaps = 1/589 (0%), Strand = Plus / Plus

○ 결론

- 배지내의 성장모습과 포자의 외부 형태학적 관찰을 한 결과 *Rhodosporidium* sp.의 효모일 것으로 추정되었다.
- 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Rhodosporidium paludigenum*과 99%동일한 결과가 확인되었다.

② 발효과정 중 주요미생물의 거동

- 각각의 찻잎으로 제조된 모차를 발효시키면서 주요 미생물인 *Aspergillus niger*, *Penicillium glabrum*, *Debaryomyces hansenii*를 counting하여 거동을 확인하였다.

○ 재외국 미생물발효차 제조과정 중 생육 미생물 거동

- 미생물발효차를 생산하고 있는 중국현지 공장 2곳에서 직접 미생물발효차를 제조하면서 각 발효단계별 시료를 채취하여 생육 미생물을 분석하였다.
- 그 결과, *Aspergillus niger*가 우점종으로 1~2차 뒤집기에서 최고 생육지점을 형성한 후, 차차 생육정도가 줄어들면서 발효 중후반부터 *Penicillium citrinum*와 *Debaryomyces hansenii*등 다른 미생물의 생육이 증가하는 양상을 보였다.

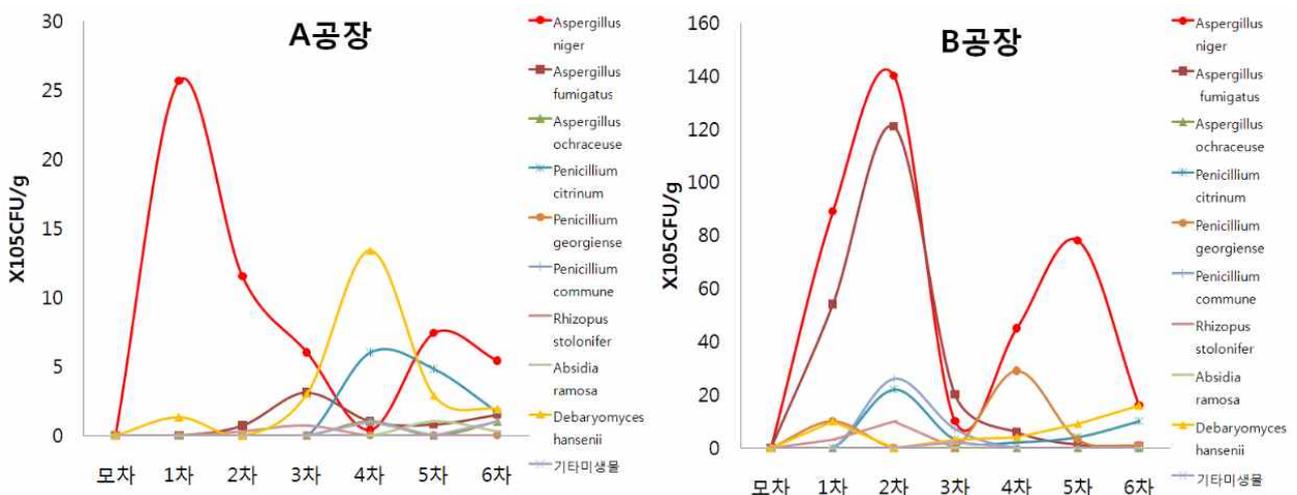


Fig. 2-4. Changes of microorganisms in tea leaves during the manufacturing of Foreign microbial fermented tea.

○ 국내 미생물발효차 제조과정 중 생육 미생물 거동

- 다양한 국산 차잎을 이용하여 미생물발효차를 제조하면서 발효과정 중 생육 미생물의 거동을 분석한 결과, *Aspergillus niger*, *Penicillium glabrum*, *Debaryomyces hansenii*의 순으로 발효과정 중 우점종이 변화되어 중국 현지 공장에서 제조된 미생물발효차와 비슷한 균주 거동의 경향이 확인되었다.

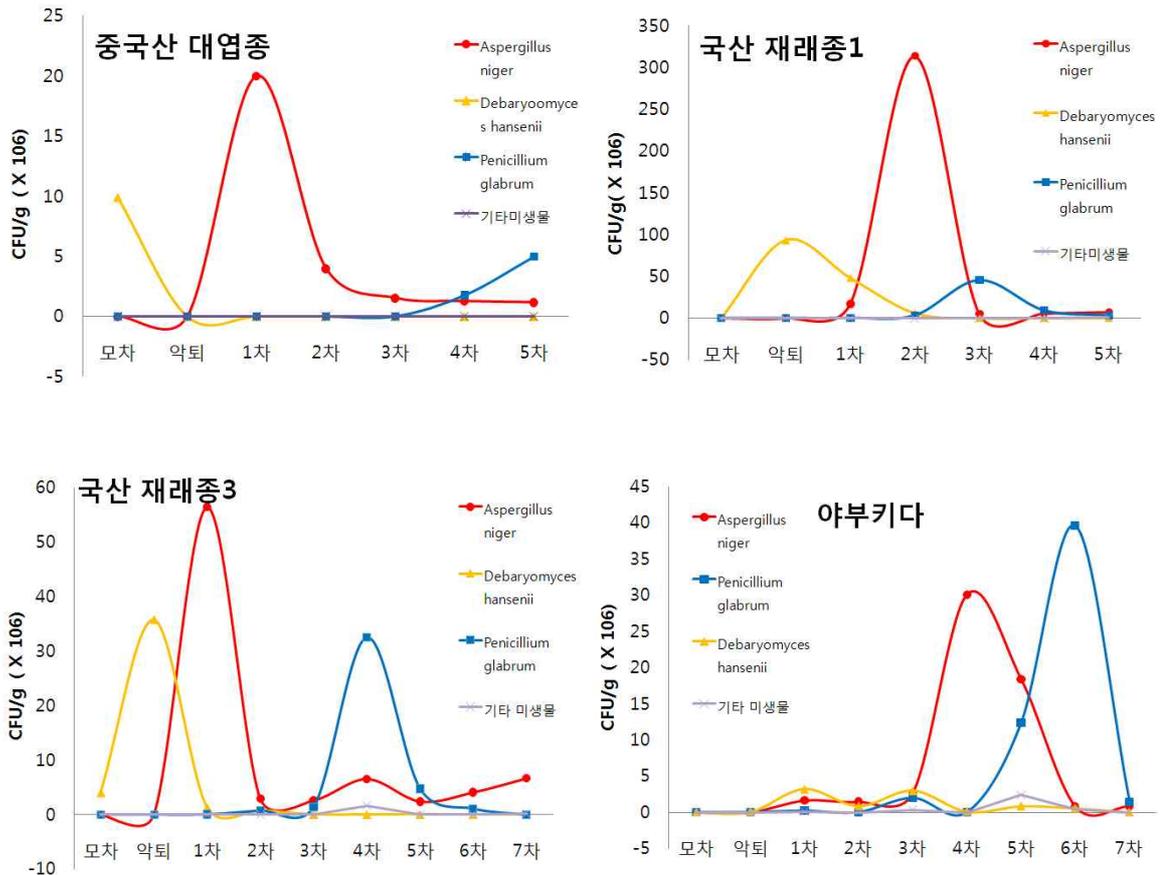


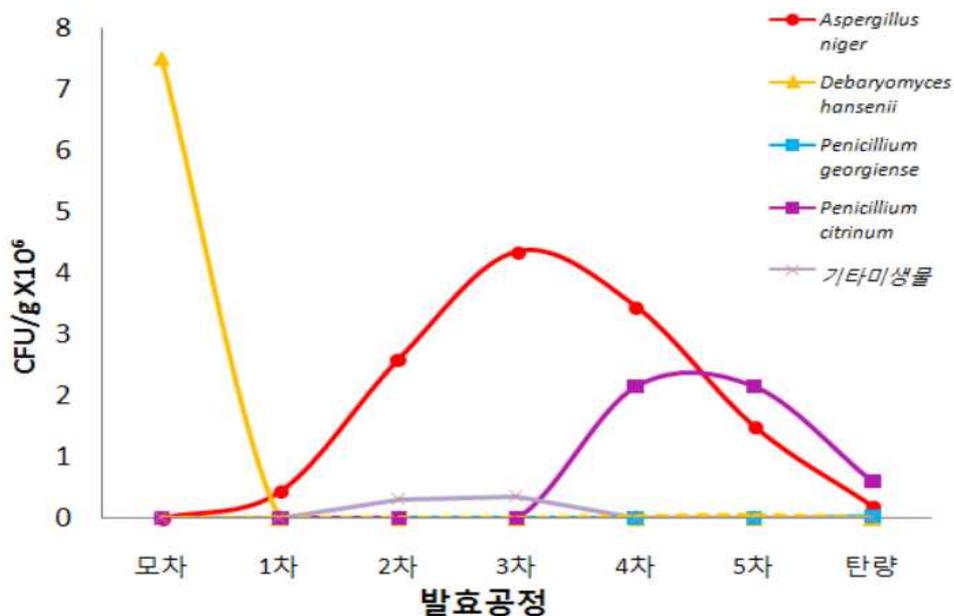
Fig. 2-5. Changes of microorganisms in tea leaves during the manufacturing of domestic microbial fermented tea.

㉠ 중국모차

- 모차에 처음 관찰되는 주요 미생물은 효모인 *Debaryomyces hansenii*이었으며 가장 많은 균수로(9.90×10^8 CFU/g) 존재하고 있었다. 발효가 진행되면서 *Debaryomyces hansenii* 성장률이 저하되고 *Aspergillus niger*의 수가 2.00×10^8 CFU/g으로 급격히 늘어나 발효과정 중 최고의 성장률을 나타내어 우점종임을

확인하였다. 또한 발효가 종료되면서 *Penicillium glabrum*가 증가하면서 *Aspergillus niger*의 수가 감소되는 경향을 보였는데 이는 *Penicillium glabrum*이 성장하면서 분비하는 물질에 의하여 *Aspergillus niger*이 저해를 받기 때문일 것으로 생각되었다.

- 또한, 동일한 중국산 모차를 사용하여 중국 현지의 발효차 제조 공장 2곳과 국내에서 동시에 미생물발효차를 제조하면서 생육 미생물의 거동을 분석한 결과(Fig. 2-4, 2-5), 3가지 과정 모두 발효 초기에는 *Aspergillus niger*가 우점종이었으나 발효가 진행 될수록 점차적으로 감소함을 알 수 있었다. 발효 중·후반에는 *Aspergillus niger*가 감소되면서 *Penicillium citrinum*의 증가가 관찰되었다.
- 이처럼 동일한 중국 모차를 원료로 국내에서 제조한 미생물발효차와 국외에서 제조한 미생물발효차의 발효관련 주요 균주의 성장패턴이 비교적 유사한 것으로 미루어 국내에서도 미생물발효차 제조 및 산업화가 가능하다고 판단되었다.
- 다만 국내에서 발효시키는 경우 중국 현지와는 다르게 발효 초기에 *Debaryomyces hansenii*가 일시적으로 성장하는 경향을 보여 여기에 대한 원인 및 품질에 미치는 영향에 대한 확인이 필요하다고 생각되었다.

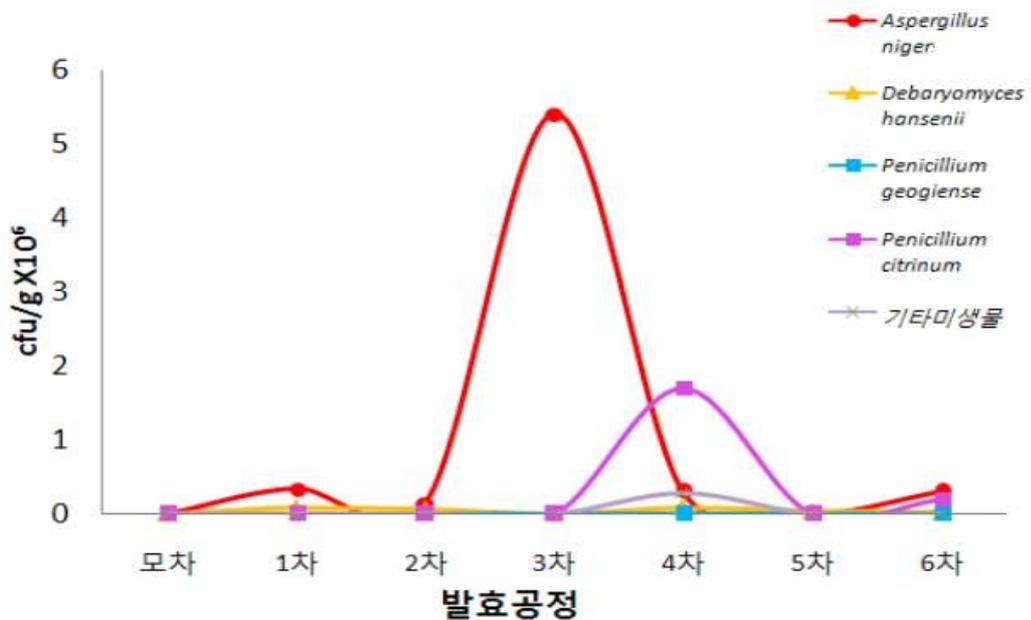


기타 미생물 : *Absidia ramosa*, *Aspergillus tamarii*,

Fig 2-6. Changes of main molds in tea leaves during the manufacturing of microbial fermented tea by using Chinese tea in Korea.

㉔ 국내재래종(1차)

- 국내산 재래종 찻잎을 이용하여 Table 2-11의 국내산 1차의 발효조건으로 발효를 진행하였을 때 주요미생물의 변화를 알아본 결과, 중국 모차의 발효의 경우와 비슷하게 *Debaryomyces hansenii*가 제일먼저 성장한 후 감소하면서 *Aspergillus niger*가 최대 생육지점 30×10⁶까지 급격히 생육하고 후에 다시 감소하면서 *Penicillium glabrum*이 나타났다. 중국산 모차의 발효보다 전체적으로 조금 늦게 시작해서 빨리 끝나는 경향을 보였다.

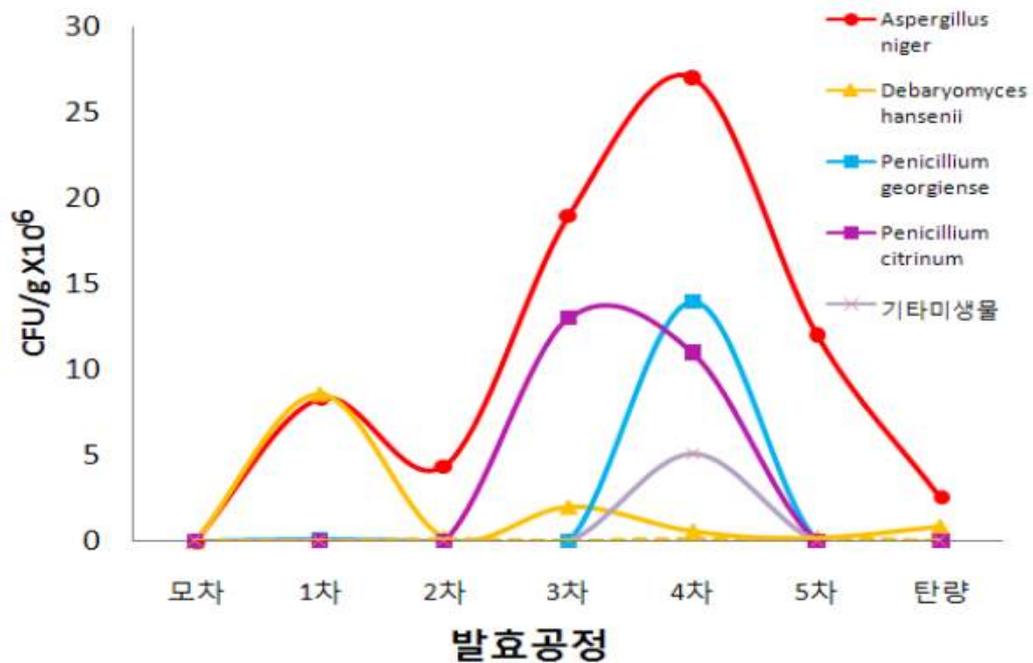


기타 미생물 : *Absidia ramosa*, *Dipodascus adstraliensis*, *Terametes corrugata*

Fig 2-7. Changes of main molds in tea leaves during the 1st manufacturing of microbial fermented tea using Korean traditional tea leaves.

㉔ 국내재래종(2차)

- 국내산 재래종 찻잎을 이용하여 Table 2-11의 국내산 2차의 발효조건으로 발효를 진행하였을 때 주요미생물의 변화를 알아본 결과, 전체적으로 미생물의 생육이 발효 초기에는 잘 이루어지지 않다가 후반에 이루어지는 경향이 나타났다. 또한 *Aspergillus niger*에 의한 발효가 충분히 진행되기 전에 *Penicillium citrinum*이 나타났다으며. 이 영향 때문인지 *Aspergillus niger*는 그 생육이 일단 억제되었다가 다시 생육이 진행되는 현상이 관찰되었다.

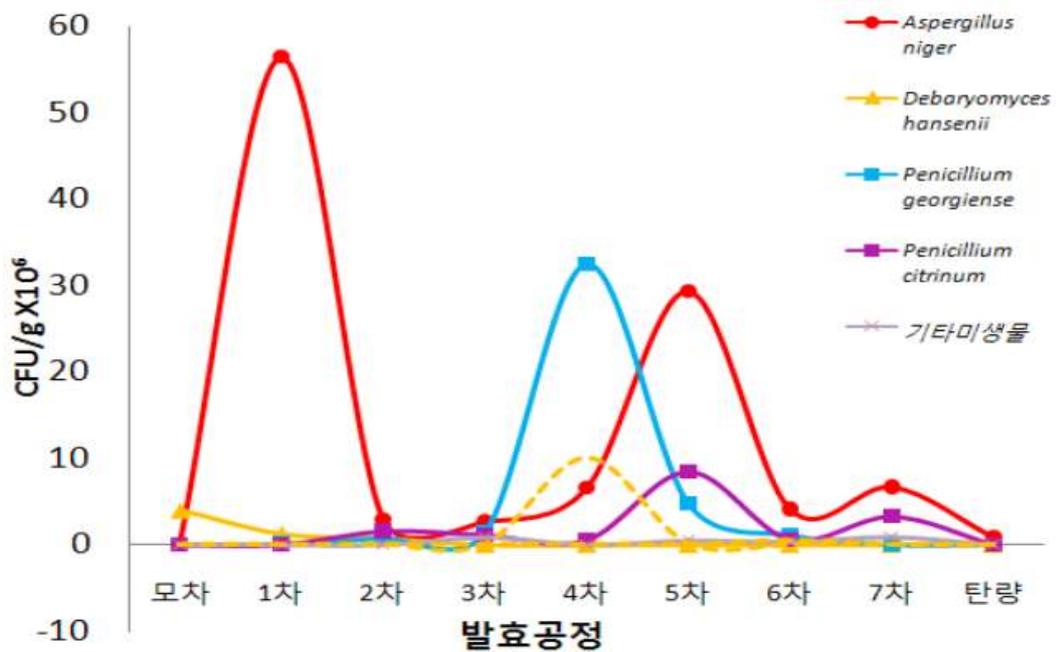


기타 미생물 : *Penicillium commune*, *Absidia ramosa*, *Terametes corrugata*

Fig 2-8. Changes of main molds in tea leaves during the 2nd manufacturing of microbial fermented tea using Korean traditional tea leaves.

㉔ 국내재래종(3차)

- 국내산 재래종 3차 발효과정 중의 특징은 *Penicillium glabrum*이 뒤집기 5번째에서 6.69×10^6 로 다른 샘플들에 비해 많은 수로 측정되었다. 제다조건을 확인했을 시 다른 샘플들은 대부분 10일에 한 번씩 뒤집기 했지만 이번의 경우 뒤집기를 7일에 한 번씩 뒤집은 것을 알 수 있었다.
- 짧은 기간으로 여러 번 뒤집어 다른 샘플들에 비해 더 호기적 조건이었다고 예상할 때 *Penicillium glabrum*이 산소요구량이 많아 이러한 결과가 도출되었을 가능성이 제시되었다. *Penicillium glabrum*의 생육을 제외하면 앞의 일반적인 경향들과 다르지 않아 *Debaryomyces hansenii*를 시작으로 *Aspergillus niger*가 다음 생육최고점에 이르고 다음 *Penicillium glabrum*의 생육이 관찰되었다.

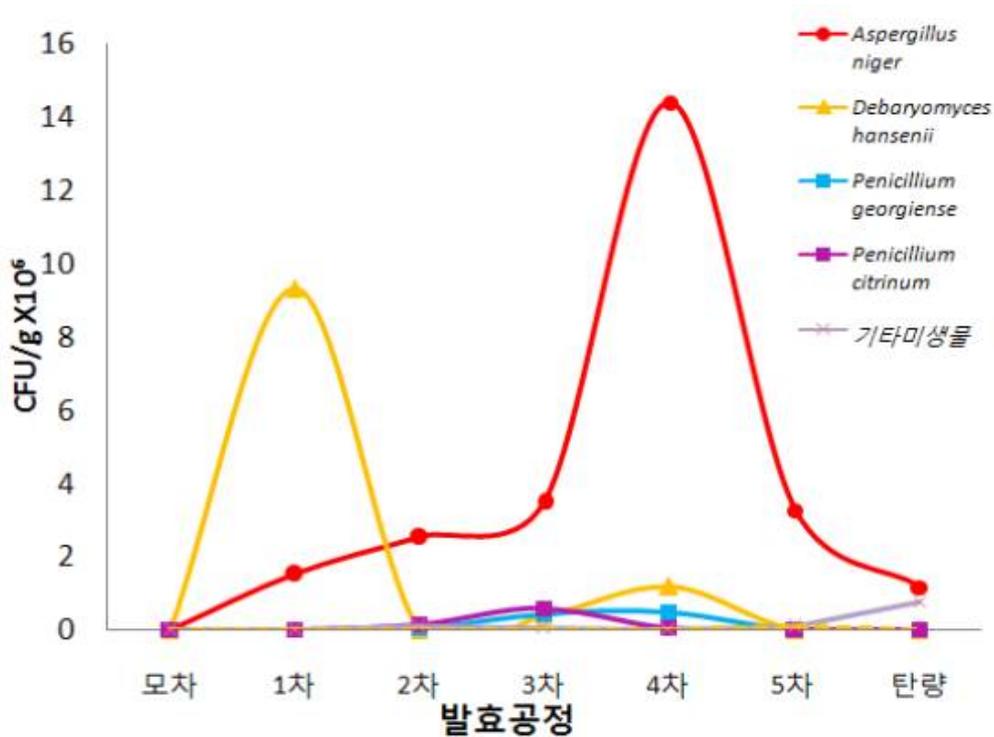


기타 : *Terametes corrugata*, *Dipodascus adstraliensis*, *Penicillium commune*

Fig. 2-9. Changes of main molds in tea leaves during the 3th manufacturing of microbial fermented tea using Korean traditional tea leaves.

㉞ 증제녹차

- 증제녹차를 이용한 발효과정의 특징은 발효초기에 효모인 *Debaryomyces hansenii*의 활성이 활발한 반면, 중국모차의 생육곡선처럼 발효초기 *Aspergillus niger*와의 생장은 관찰되지 않았으며 발효 후반기에 들어서 *Aspergillus niger*의 높은 생육이 관찰되었다. 기타 다른 미생물의 생육이 미비하였다.
- 이와 같은 현상은 품종에 따른 영향과 함께 증제녹차의 특유의 제다과정인 찌서 말리는 과정에 의한 성분 차이에도 관련이 있을 것으로 추정된다.

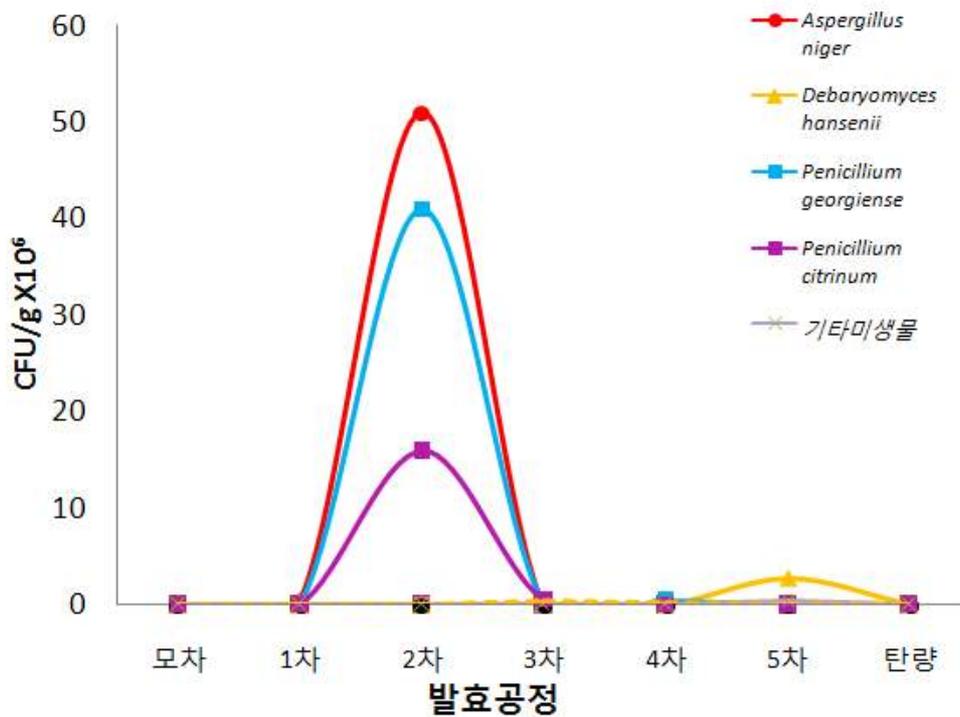


기타 미생물 : *Penicillium commune*, *Aspergillus tamarii*, *Terametes corrugata*

Fig. 2-10. Changes of main molds in tea leaves during the secondary manufacturing of microbial fermented tea using Korean traditional steamed green tea.

㉞ 대차 12호

- 대차 12호의 발효는 효모인 *Debaryomyces hansenii*의 활성이 미비한 반면 *Aspergillus niger*와 *Penicillium georgiense* 및 *Penicillium citrinum*의 생장이 활발하였다. 또한 중국 모차의 생육곡선과는 다르게 *Aspergillus niger*, *Penicillium georgiense*, *Penicillium citrinum* 등 3종의 곰팡이가 비교적 빠른 시기인 2차 발효에서 동시에 최고 성장을 나타냈으며 생육시기도 거의 동일하게 나타났다.

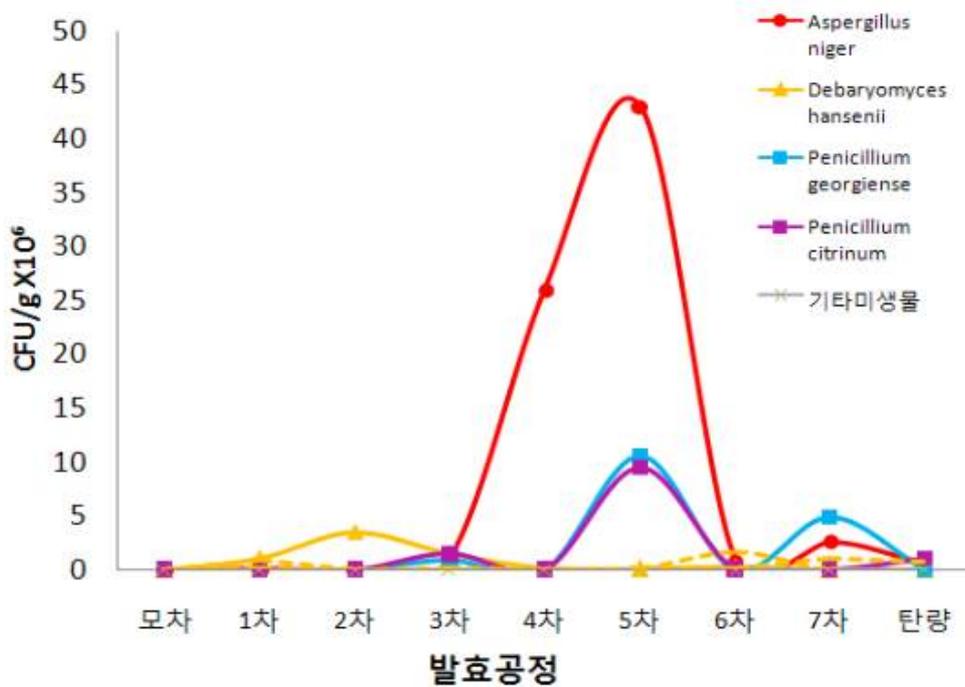


기타 미생물 : *Dipodascus adstraliensis*, *Terametes corrugata*

Fig. 2-11. Changes of main molds in tea leaves during the manufacturing of microbial fermented tea using Daecha 12 green tea.

㉔ 야부키다

- 야부키다의 발효특성은 거의 모든 미생물이 발효 초기보다 중기 이후로 성장하였다. *Aspergillus niger*, *Penicillium georgiense*, *Penicillium citrinum* 3종의 곰팡이가 동시에 최고 성장을 나타낸 점은 대차 12호와 비슷하였으나 대차 12호와는 다르게 *Penicillium* sp.의 생육이 *Aspergillus niger*에 비하여 상대적으로 활발하지 못한 경향을 나타냈다.



기타 미생물 : *Dipodascus adstraliensis*, *Terametes corrugata*

Fig. 2-12. Changes of main molds in tea leaves during the manufacturing of microbial fermented tea using Yabukita green tea.

㉕ 미생물발효차에서 존재가 확인된 미생물의 종류

- Main 미생물은 4종의 균주로 *Aspergillus niger*, *Debaryomyces hansenii*, *Penicillium georgiense*, *Penicillium citrinum* 임을 확인 하였고, Minor 미생물로는 *Dipodascus australiensis*, *Penicillium commune*, *Trametes corrugata*, *Aspergillus tamarii* 등이 확인되었다.

Table 2-12. List of microorganisms isolated from microbial fermented tea.

	scientific name	source	character
Main microorganism	<i>Aspergillus niger</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF, SF, B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 발효 전반적인 과정에서 관여. 	최적 성장조건 : 26℃ 중온균(20℃~45℃) 전분 분해효소 β-amylase 생성균 흑국균, 유기산 생성균
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF, SF, B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 모차에서 대부분 많은 콜로니로 검출. ● 발효가 진행되면서 수가 감소. 	최적 성장조건 : 24℃ 내염성 산막효모(NaCl 20-24% 생존) 영장 채소류에서 흔히 분리 베이컨, 소세지, 우유 등 육제품 부패에 관여
	<i>Penicillium georgiense</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF, SF, B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출. ● 대부분의 샘플내에서 2차이후(발효시작 20일후) 발효에 미생물이 관여. 	최근 동정된 균주-정보 없음
	<i>Penicillium citrinum</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF, SF, B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 대부분의 샘플이 2차이후(발효시작 20일후) 발효에 관여 	최적 성장조건 : 26℃ 저장 곡류에서 주로 발견 황백미균
Minor microorganism mold	<i>Dipodascus australiensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 대부분의 샘플이 3차이후(발효시작 30일후) 발효에 관여. 	최적 성장조건 : 28℃ 내염성 효모
	<i>Penicillium commune</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF,, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 대부분의 샘플이 3차이후(발효시작 30일후) 발효에 관여. 	최적 성장조건 : 24℃ ochratoxin 생성균주
	<i>Trametes corrugata</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 SF, B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 대부분의 샘플이 3차이후(발효시작 30일후) 발효에 관여. 	최적 성장조건 : 24℃ 나무 부패균
	<i>Aspergillus tamarii</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF, SF, YF에서 검출 ● 중국발효차에서만 3차부터 검출되었으나 SF, YF에서는 5차이후(발효시작 50일후) 검출 	최적 성장조건 : 27℃ 간장, 된장 발효에 사용 kojic acid 생산-미백, 향균 작용(동물-신장장애 발생 가능성.)
	<i>Absidia corymbifera</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물발효차 CF, SF, B I F, B II F, B III F, JF, YF에서 검출 ● 비우점종이나 시료 전반적으로 검출 	최적 성장 조건: 30℃ 간장, 된장에서 분리 접합균주로 단백질 분해능을 이용

(2) 한국산 미생물발효차의 발효과정 중 이화학적 성분 변화

(가) 일반성분 분석 결과

- 7종의 모차와 이 모차들을 발효시켜 제조한 발효차의 일반성분 분석결과
 - 수분함량은 발효 후 모두 증가하였는데 그 중에서도 증청으로 제조한 발효차가 다른 발효차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈다(Table 2-13).
 - 총 질소 함량 분석 결과는 Table 2-14에 나타내었는데 모차와 발효차간의 유의적인 차이는 없었으나 발효차 중 국내산 재래종 2로 제조한 발효차가 비교적 높은 함량을 나타내었다.
 - Table 2-15는 모차와 발효차의 조지방 함량을 나타낸 것인데 모든 샘플 중 조지방 함량은 1%미만으로 발효 전과 발효 후의 변화폭은 크지 않았다.
 - 그러나 발효차 중 중국산 모차로 제조한 발효차와 대차12호로 제조한 발효차가 다른 품종으로 제조한 발효차들과 비교했을 때보다 비교적 낮은 조지방 함량을 보였다.
 - 조섬유와 회분함량은 7가지 발효차 모두 발효에 의해 증가하는 경향을 나타냈다.
 - 국내산 재래종 2로 제조한 발효차가 발효 후 조섬유 함량이 가장 높았으나 시료들간의 차이는 크지 않았다.
 - 회분함량에 있어서는 국내산 재래종 3으로 제조한 발효차가 다른 발효차들에 비해 가장 큰 변화폭을 보였다.

Table 2-13. Water content of microbial fermented tea

Sample	(%)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	9.84±0.05 ^{BCb}	12.62±0.82 ^{Da}
BI	9.70±0.21 ^{Cb}	19.09±0.48 ^{Ba}
BII	10.48±0.15 ^{Ab}	19.79±0.05 ^{Ba}
BIII	10.11±0.16 ^{Bb}	11.94±0.18 ^{Da}
S	6.31±0.11 ^{Db}	23.52±0.18 ^{Aa}
J	10.65±0.21 ^{Ab}	19.59±0.54 ^{Ba}
Y	10.05±0.22 ^{Bb}	17.49±0.62 ^{Ca}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-14. Total nitrogen contents of microbial fermented tea

Sample	(%)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	4.57±0.31 ^{Ans}	4.16±0.12 ^{ABC}
BI	4.76±0.21 ^{Ans}	3.95±0.20 ^{BCD}
BII	4.49±0.19 ^{Ans}	4.74±0.18 ^A
BIII	4.23±0.20 ^{Ans}	3.59±0.47 ^{CD}
S	3.13±0.18 ^{Cns}	3.81±0.39 ^{BCD}
J	3.66±0.19 ^{Bns}	4.35±0.36 ^{AB}
Y	4.23±0.20 ^{Ans}	3.26±0.39 ^D

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-15. Crude lipid content of microbial fermented tea

Sample	(%)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	0.55±0.07 ^{Dns}	0.64±0.06 ^B
BI	0.70±0.01 ^{BCns}	0.78±0.04 ^A
BII	0.83±0.04 ^{Ans}	0.89±0.04 ^A
BIII	0.77±0.03 ^{ABns}	0.83±0.04 ^A
S	0.79±0.05 ^{ABns}	0.86±0.06 ^A
J	0.62±0.04 ^{CDns}	0.65±0.01 ^B
Y	0.78±0.08 ^{ABns}	0.86±0.04 ^A

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-16. Crude dietary fiber content of microbial fermented tea

Sample	(%)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	9.24±0.54 ^{Bb}	11.54±0.13 ^{Ba}
BI	10.11±0.77 ^{ABb}	13.15±0.70 ^{ABa}
BII	10.76±0.42 ^{ABb}	13.75±0.99 ^{Aa}
BIII	10.56±0.70 ^{ABb}	13.53±1.58 ^{ABa}
S	9.80±0.92 ^{ABb}	12.55±0.72 ^{ABa}
J	11.10±0.71 ^{Ab}	13.15±0.71 ^{ABa}
Y	9.25±0.49 ^{Bb}	12.81±0.35 ^{ABa}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-17. Crude ash content of microbial fermented tea

Sample	(%)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	5.58±0.24 ^{Ab}	6.44±0.15 ^{DEa}
BI	5.68±0.09 ^{Ab}	8.03±0.65 ^{ABa}
BII	4.90±0.26 ^{BCb}	6.03±0.23 ^{Ea}
BIII	4.40±0.18 ^{Cb}	8.07±0.12 ^{Aa}
S	6.04±0.31 ^{Ab}	6.94±0.43 ^{CDa}
J	5.48±0.28 ^{ABb}	7.51±0.26 ^{ABCa}
Y	5.54±0.66 ^{Ab}	7.43±0.24 ^{BCa}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

(나) 이화학적 특성 분석 결과

① 색도

- 찻잎 중의 식물성 색소는 외관과 수색에 직접적인 영향을 주며 맛과 향미에도 약간의 영향을 준다.
- 7종의 모차와 이 모차들로 발효시킨 미생물발효차들의 찻잎 및 차 추출액의 L, a, b 값을 각각 측정하였다.
- 그 결과 찻잎 표면의 밝기를 나타내는 L 값(Table 2-18)은 발효 전보다 발효 후가 더 낮아 발효에 의해 찻잎 표면이 점차 어두워진다는 것을 알 수 있었다.
- 그 중에서도 증청으로 제조한 발효차가 36.32에서 23.37로 가장 많은 감소량을 보였는데 이는 증청은 살청공정을 거치지 않아 지속적인 산화가 발생한 것으로 생각된다.
- Table 2-19에서 적색의 정도를 나타내는 a 값을 비교해 본 결과 7종의 발효차 모두 발효에 의해 a 값이 증가하여 찻잎의 색이 붉어진 것을 알 수 있었다.
- 황색의 정도를 나타내는 b 값은 Table 2-20에 나타내었는데 대부분의 발효차들은

- 발효 후 감소하는 경향을 보였으나 중국산 모차로 제조한 발효차 오히려 증가하는 경향을 보였다.
- 차 추출액의 L, a, b 값을 발효전과 발효 후의 변화폭을 대상으로 비교해본 결과 야부기다로 제조한 미생물발효차의 명도(Table 2-21)가 다른 발효차들보다 유의적으로 높은 값을 나타내 가장 밝은 색을 나타내었고 중국산 모차로 제조한 발효차의 변화폭이 가장 현저하여 다른 발효차 추출액들보다 어두운 색을 띄는 것을 알 수 있었다.
 - Table 2-22와 Table 2-23에서 차 종류수 추출액의 a, b 값은 모두 발효에 의해 증가하는 경향을 보였는데 이는 발효 시 차중의 색소성분이 산화 분해되어 오렌지 색의 theaflavin이나 적색의 thearubigin의 생성됨에 기인된 것으로 생각되었다.
 - 그 중에서 중국산 모차로 제조한 발효차가 유의적으로 높은 값을 나타내 가장 진한 적색, 황색으로 변해 감을 알 수 있었다.

Table 2-18. Hunter L value of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	28.17±1.80 ^{BCa}	24.60±0.31 ^{ABb}
BI	26.28±0.21 ^{Da}	22.39±2.26 ^{Bb}
BII	27.28±1.40 ^{CDa}	24.50±0.38 ^{ABb}
BIII	30.03±1.00 ^{Ba}	22.81±1.07 ^{ABb}
S	36.32±0.32 ^{Aa}	23.37±1.79 ^{ABb}
J	28.44±0.58 ^{BCa}	23.06±0.85 ^{ABb}
Y	29.04±0.81 ^{BCa}	25.10±0.69 ^{Ab}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-19. Hunter a value of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	2.11±0.27 ^{BCb}	4.07±0.34 ^{ABa}
BI	1.24±0.83 ^{Db}	3.18±0.39 ^{Ca}
BII	2.94±0.23 ^{Ab}	4.82±0.17 ^{Aa}
BIII	2.74±0.12 ^{ABb}	3.62±0.32 ^{BCa}
S	1.53±0.13 ^{CDb}	4.23±0.49 ^{ABa}
J	1.39±0.29 ^{CDb}	4.05±0.20 ^{ABCa}
Y	0.99±0.70 ^{Db}	4.61±0.86 ^{Aa}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-20. Hunter b value of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	7.87±0.56 ^{Eb}	9.72±0.81 ^{Aa}
BI	10.14±0.98 ^{Da}	6.07±0.83 ^{Db}
BII	13.67±1.79 ^{BCa}	7.92±0.47 ^{BCb}
BIII	14.74±1.64 ^{Ba}	6.37±0.49 ^{Db}
S	18.72±0.32 ^{Aa}	6.58±0.79 ^{CDb}
J	12.43±0.20 ^{Ca}	8.54±0.94 ^{ABb}
Y	11.81±1.19 ^{CDb}	8.81±0.99 ^{ABa}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-21. Hunter L value of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	92.88±0.04 ^{Da}	46.39±0.13 ^{Fb}
BI	97.24±0.02 ^{Ba}	65.24±0.17 ^{Eb}
BII	96.89±0.28 ^{Ca}	65.25±0.02 ^{Eb}
BIII	97.73±0.09 ^{Aa}	69.56±0.04 ^{Db}
S	96.98±0.08 ^{BCa}	70.90±0.02 ^{Cb}
J	97.60±0.22 ^{Aa}	74.08±0.10 ^{Bb}
Y	97.10±0.03 ^{BCa}	77.83±0.03 ^{Ab}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-22. Hunter a value of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	-0.52±0.00 ^{Ab}	42.39±0.04 ^{Aa}
BI	-6.44±0.04 ^{Fb}	24.64±0.11 ^{Ca}
BII	-3.36±0.01 ^{Bb}	25.94±0.02 ^{Ba}
BIII	-3.45±0.04 ^{Cb}	15.64±0.04 ^{Fa}
S	-7.13±0.06 ^{Gb}	20.19±0.02 ^{Da}
J	-3.99±0.03 ^{Db}	16.44±0.03 ^{Ea}
Y	-4.66±0.02 ^{Eb}	11.67±0.05 ^{Ga}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-23. Hunter b value of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	26.77±0.02 ^{Ab}	77.36±0.23 ^{Aa}
BI	21.73±0.07 ^{Cb}	66.21±0.11 ^{Ba}
BII	17.75±0.12 ^{Eb}	65.51±0.05 ^{Ca}
BIII	14.35±0.04 ^{Gb}	57.59±0.02 ^{Ea}
S	24.91±0.15 ^{Bb}	55.89±0.03 ^{Fa}
J	16.30±0.07 ^{Fb}	59.13±0.05 ^{Da}
Y	19.74±0.02 ^{Db}	51.36±0.06 ^{Ga}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

② pH와 산도

- 7종의 미생물발효차의 pH와 산도 측정 결과는 각각 Table 2-24와 Table 2-25에 나타내었다. 측정 결과 미생물발효차의 pH는 발효 전 5.52~5.65에서 발효 후 6.18~7.77로 현저하게 증가하였다.
- 재래종 3으로 제조한 모차와 이 모차로 제조한 미생물발효차의 pH가 다른 차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타낸 반면, 중국산 모차로 제조한 발효차는 pH 6.18로 다른 미생물발효차들과 비교해 볼 때 그 pH가 현저히 낮다는 것을 알 수 있었다.
- 미생물발효차의 산도는 pH와 밀접한 연관이 있는데 Table 2-25에서 나타난 바와 같이 산도는 발효에 의해 감소하는 경향을 볼 수 있었다.
- 그러나 중국산 모차로 제조한 발효차의 경우에는 1.56~1.38%로 다른 발효차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈다.

Table 2-24. pH of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	5.52±0.04 ^{Eb}	6.18±0.01 ^{Ga}
BI	5.64±0.01 ^{Cb}	7.51±0.01 ^{Da}
BII	5.59±0.01 ^{Bb}	7.65±0.01 ^{Ba}
BIII	5.65±0.01 ^{Ab}	7.77±0.01 ^{Aa}
S	5.54±0.02 ^{Cb}	7.56±0.01 ^{Ca}
J	5.63±0.01 ^{Db}	7.41±0.02 ^{Ea}
Y	5.62±0.01 ^{Db}	7.36±0.02 ^{Fa}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test)

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-25. Total acidity of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	1.56±0.05 ^{Aa}	1.38±0.09 ^{Ab}
BI	0.90±0.05 ^{Ba}	0.19±0.02 ^{Bb}
BII	0.42±0.05 ^{Ca}	0.12±0.01 ^{Bb}
BIII	0.66±0.39 ^{BCa}	0.20±0.04 ^{Bb}
S	0.95±0.08 ^{Ba}	0.14±0.02 ^{Bb}
J	0.53±0.05 ^{Ca}	0.21±0.02 ^{Bb}
Y	0.69±0.09 ^{BCa}	0.14±0.02 ^{Bb}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

③ 가용성 고형분

- 가용성분은 차탕에 용출되는 성분, 예를 들면 아미노산, 차 폴리페놀, 카페인, 당류 펙틴, 가용성 비타민과 무기질 등이 있고 차탕의 맛을 좌우한다. 가용성분이 많은 경우 맛은 진해지고 풍부해지나 가용성분이 적어지면 맛은 얇아진다.
- Table 2-26는 미생물발효차의 가용성 고형분 함량 변화를 나타낸 것인데 모차보다 발효차의 가용성 고형분 함량이 더 높은 것을 알 수 있다.
- 특히 중국산 모차로 제조한 미생물발효차가 29.33 Brix로 가장 높은 값을 나타내었다.

④ 수분활성도

- 미생물발효차의 수분활성도는 수분함량과 아주 밀접한 관계가 있다는 것을 Table 2-27을 통해 알 수 있다. 미생물발효차의 수분활성도 측정 결과는 수분함량과 유사한 경향을 보였는데 샘플 모두 발효 후 증가하는 경향을 나타내었다.
- 특히 증청으로 제조한 미생물발효차는 수분함량에 이어 수분활성도 역시 다른 미생물발효차보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다.

Table 2-26. Soluble solid content of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	(Brix)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	25.00±1.00 ^{Ab}	29.33±1.15 ^{Aa}
BI	20.67±1.53 ^{Cb}	24.67±0.58 ^{Da}
BII	18.33±0.58 ^{Cb}	25.00±1.00 ^{Ea}
BIII	18.67±0.58 ^{Cb}	23.67±0.58 ^{Ea}
S	21.33±0.58 ^{Cb}	24.00±1.00 ^{CDa}
J	23.00±1.00 ^{Bb}	27.33±0.58 ^{BCa}
Y	23.33±1.53 ^{Bb}	26.67±0.58 ^{Ba}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different (p<0.05, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-27. Water activity of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	(%)	
	Before fermentation (M)	After fermentation (F)
C	0.580±0.011 ^{Ab}	0.712±0.001 ^{Da}
BI	0.503±0.004 ^{Cb}	0.791±0.003 ^{Ca}
BII	0.512±0.021 ^{Cb}	0.784±0.014 ^{Ca}
BIII	0.499±0.018 ^{Cns}	0.447±0.034 ^E
S	0.399±0.020 ^{Db}	0.863±0.010 ^{Aa}
J	0.542±0.007 ^{Bb}	0.822±0.012 ^{Ba}
Y	0.508±0.014 ^{Cb}	0.725±0.018 ^{Da}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

(다) 영양성분 분석 결과

① 유기산

- 미생물발효차에 함유된 주요 유기산을 분석한 결과 maleic acid가 주요 유기산으로 나타났고
- oxalic acid, citric acid, succinic acid 및 benzoic acid는 소량이거나 일부에서만 나타났다.
- Table 2-28에서와 같이 대부분의 유기산은 발효 중 그 함량이 증가하여 발효 전보다 발효 후에 현저히 높은 함량을 나타낸 반면, 모차에서 소량 함유된 benzoic acid는 발효 후에는 검출되지 않았다.

Table 2-28. Organic acid content of hot water extract of microbial fermented tea

		mg/L				
	Formic	Succinic	Maleic	Oxalic	Citric	Benzoic
CM	N.D	28.05±3.31 ^{AB}	26.05±13.65 ^B	97.36±14.55 ^{NS}	16.77±8.60 ^B	0.39±0.24 ^{NS}
BIM	N.D	45.39±7.50 ^{AB}	77.90±18.67 ^A	76.37±10.97	29.71±3.90 ^{AB}	0.29±0.08
BIIM	N.D	22.79±9.43 ^B	67.50±18.87 ^A	82.90±5.52	24.84±2.67 ^{AB}	0.17±0.07
BIIIIM	N.D	37.14±6.81 ^{AB}	63.90±4.32 ^{AB}	80.23±13.82	27.57±8.10 ^{AB}	0.14±0.03
SM	N.D	47.22±9.67 ^A	86.02±18.38 ^A	96.49±25.94	29.01±2.63 ^{AB}	0.34±0.08
JM	N.D	40.00±14.14 ^{AB}	54.20±8.37 ^{AB}	74.11±19.74	40.69±14.40 ^A	0.16±0.04
YM	N.D	40.82±10.34 ^{AB}	52.79±20.07 ^{AB}	83.13±7.81	30.13±4.13 ^{AB}	0.15±0.04
CF	N.D	203.70±63.36 ^C	1865.88±417.36 ^D	5044.26±460.16 ^D	197.75±17.95 ^B	N.D
BIF	N.D	3067.20±250.03 ^A	7285.33±425.97 ^A	10150.38±287.89 ^A	825.70±93.39 ^B	N.D
BIIF	N.D	391.50±12.24 ^C	6960.88±158.01 ^A	N.D	2996.20±283.75 ^A	N.D
BIIIIF	N.D	245.15±56.41 ^C	7146.83±468.21 ^A	N.D	2968.95±566.35 ^A	N.D
SF	N.D	3393.10±315.00 ^A	4733.13±229.13 ^B	7960.43±234.27 ^B	839.45±207.08 ^B	N.D
JF	N.D	2584.40±105.05 ^B	3568.75±585.20 ^C	6103.55±299.39 ^C	470.18±105.75 ^{BC}	N.D
YF	N.D	198.50±142.27 ^C	2941.60±438.58 ^C	2632.65±527.72 ^E	164.40±35.61 ^C	N.D

* N.D: Not Detected

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

② 유리아미노산

- 아미노산은 차의 감칠맛을 나타내는 성분으로 카페인의 쓴맛, 카테킨의 떫은 맛과 더불어 차의 맛을 형성하는 중요한 요소이다.
- 7종의 모차와 이 모차로 제조된 발효차의 유리아미노산 분석 결과는 Table 2-29와 Table 2-30에서 보는 바와 같다.
- 모차에서는 aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine 등 총 17종의 유리아미노산이 검출되었고
- 발효차에서는 aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, alanine 등 총 11종의 유리아미노산이 검출되었는데 모차와 발효차 모두 glutamic acid와 alanine이 주

요한 유리아미노산으로 나타났다.

- 또한 기능성 물질로 알려진 GABA의 함량 역시 다른 유리 아미노산에 비해 높은 것을 알 수 있었는데 중국산 모차로 제조한 발효차 보다는 보성재래종, 증청, 대차 12호나 야부기다로 제조한 발효차의 GABA함량이 좀 더 많은 것으로 나타났다. 모차의 총 유리아미노산 함량은 중국산 모차가 69.72 mg/100 g으로 가장 높은 반면, 증청은 19.23 mg/100 g으로 가장 낮은 값을 나타냈다.
- 발효차는 모차에 비해 현저히 감소하는 경향을 보였는데 그 중에서도 중국산 발효차가 가장 많이 감소한 것을 알 수 있었다.

Table 2-29. The contents of free amino acids in microbial fermented teas.

	mg/100 g						
	CM	BIM	BIIM	BIIM	SM	JM	YM
Asp	5.93±0.17 ^a	4.44±0.30 ^b	1.01±0.01 ^e	2.81±0.12 ^c	1.16±0.05 ^e	1.53±0.48 ^{de}	1.96±0.15 ^d
Thr	3.22±0.23 ^a	1.59±0.02 ^c	0.81±0.05 ^d	1.46±0.06 ^c	0.76±0.05 ^d	2.43±0.27 ^b	0.86±0.07 ^d
Ser	5.23±0.23 ^a	2.35±0.02 ^c	1.19±0.03 ^d	2.50±0.01 ^c	1.47±0.04 ^d	4.41±0.29 ^b	1.45±0.07 ^d
Glu	14.23±0.41 ^b	17.66±0.41 ^a	6.18±0.04 ^e	10.89±1.14 ^c	7.54±0.59 ^{de}	15.07±0.77 ^b	8.22±0.06 ^d
Pro	2.66±0.43 ^a	0.83±0.02 ^c	0.59±0.05 ^c	0.55±0.02 ^c	0.55±0.07 ^c	1.42±0.27 ^b	0.55±0.06 ^c
Gly	0.35±0.02 ^a	0.26±0.01 ^{ab}	0.18±0.03 ^{bc}	0.13±0.01 ^c	0.13±0.04 ^c	0.24±0.10 ^{abc}	0.18±0.05 ^{bc}
Ala	4.57±0.02 ^{de}	7.60±0.04 ^b	3.75±0.20 ^e	5.31±0.07 ^d	2.53±0.13 ^f	9.73±0.80 ^a	6.60±0.45 ^c
Val	5.15±0.16 ^a	1.29±0.00 ^d	1.18±0.03 ^{de}	1.49±0.02 ^c	1.07±0.03 ^e	4.02±0.07 ^b	1.20±0.08 ^{de}
Cys	0.41±0.07 ^a	0.11±0.01 ^b	-	-	-	0.19±0.09 ^{ab}	-
Ile	3.20±0.09 ^a	0.77±0.05 ^{cd}	0.68±0.06 ^d	0.93±0.04 ^c	0.58±0.03 ^d	2.76±0.21 ^b	0.59±0.03 ^d
Leu	3.49±0.48 ^a	1.40±0.00 ^b	1.19±0.02 ^b	1.20±0.01 ^b	0.43±0.04 ^c	3.79±0.03 ^a	1.45±0.07 ^b
Tyr	3.56±0.00 ^a	0.84±0.04 ^c	0.78±0.02 ^c	0.75±0.05 ^c	0.57±0.03 ^c	2.81±0.35 ^b	0.60±0.02 ^c
Phe	6.60±0.26 ^a	1.57±0.01 ^c	1.18±0.03 ^c	1.16±0.07 ^c	1.24±0.03 ^c	4.66±0.35 ^b	1.18±0.12 ^c
GABA	3.62±0.24 ^d	6.53±0.06 ^b	3.43±0.24 ^d	4.22±0.07 ^c	0.55±0.06 ^e	8.29±0.35 ^a	6.22±0.38 ^b
His	0.35±0.04 ^a	0.12±0.01 ^{bc}	-	-	0.08±0.01 ^c	0.17±0.04 ^b	-
Lys	0.82±0.03 ^a	0.35±0.02 ^b	0.34±0.03 ^b	0.07±0.00 ^e	0.19±0.01 ^d	0.15±0.00 ^d	0.27±0.03 ^c
Arg	6.34±0.04 ^a	0.93±0.06 ^b	0.05±0.05 ^f	0.22±0.03 ^e	0.38±0.02 ^d	0.60±0.13 ^c	0.72±0.06 ^c
Total	69.72±0.24 ^a	48.63±0.56 ^c	22.52±0.38 ^e	33.66±1.66 ^d	19.23±1.21 ^f	62.26±1.19 ^b	32.04±0.79 ^d

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

Table 2-30. Free amino acid content of hot water extract of microbial fermented tea

	mg/100 g						
	CF	BIF	BIIF	BIIF	SF	JF	YF
Asp	0.17±0.04 ^b	0.29±0.09 ^a	0.05±0.01 ^b	-	-	0.07±0.01 ^b	0.09±0.01 ^b
Ser	0.06±0.00 ^b	0.13±0.05 ^b	0.08±0.01 ^b	0.31±0.09 ^a	-	0.16±0.07 ^b	0.16±0.06 ^b
Glu	0.59±0.02 ^d	1.59±0.14 ^c	1.92±0.16 ^b	4.43±0.15 ^a	0.43±0.10 ^d	1.90±0.04 ^b	2.07±0.00 ^b
Gly	0.07±0.02 ^{ns}	0.08±0.02	0.04±0.02	-	-	-	-
Ala	0.35±0.06 ^b	0.41±0.07 ^b	0.44±0.10 ^b	0.41±0.08 ^b	0.09±0.00 ^c	0.65±0.17 ^a	0.80±0.02 ^a
Val	0.07±0.01 ^b	0.16±0.05 ^b	0.09±0.00 ^b	-	0.07±0.03 ^b	0.20±0.09 ^b	0.36±0.07 ^a
Ile	0.08±0.01 ^{bc}	0.16±0.05 ^b	0.06±0.02 ^{bc}	0.06±0.01 ^{bc}	0.04±0.03 ^c	0.16±0.07 ^b	0.31±0.07 ^a
Leu	0.10±0.00 ^{bc}	0.16±0.03 ^{abc}	0.09±0.01 ^{bc}	0.20±0.09 ^{ab}	0.05±0.01 ^c	0.16±0.04 ^{abc}	0.25±0.06 ^a
Tyr	0.18±0.01	-	-	-	-	-	-
Phe	0.15±0.02	-	-	-	-	-	-
GABA	0.06±0.01 ^b	0.33±0.18 ^a	0.23±0.05 ^{ab}	0.24±0.07 ^{ab}	0.18±0.04 ^{ab}	0.30±0.01 ^a	0.30±0.01 ^a
Total	1.96±0.22 ^d	3.32±0.68 ^{bc}	3.00±0.37 ^c	5.65±0.48 ^a	0.86±0.20 ^e	3.59±0.50 ^{bc}	4.34±0.30 ^b

Dissimilar small alphabets within the same row are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

③ 무기성분 함량

- 미생물발효차의 찻잎 속에는 생체대사에 필수불가결한 칼륨, 인, 칼슘, 마그네슘, 철, 나트륨 등의 여러 가지 무기염류 성분이 함유되어 있어 있는데 이들은 뜨거운 물에 용출되어 인체의 신진대사 및 차의 맛에 영향을 미친다.
- 미생물발효차의 무기성분 분석 결과 Ca, P, K, Mg이 미생물발효차의 주요한 무기성분이었고 Zn, Na, Cu, Fe, Mn, Si는 소량 존재하였다.
- Table 2-31은 7종의 모차와 발효차 중에 들어있는 무기성분들의 함량을 나타내었는데 모차와 발효차 시료들간에는 차이가 거의 없었고 중국산 모차와 이로 제조한 발효차가 다른 품종의 모차와 이 모차들로 제조한 발효차들보다 Zn, P, Fe 및 K 함량이 유의적으로 높은 값을 나타냈다.

Table 2-31. Mineral content of hot water extract of microbial fermented tea

	mg/100 g									
	Zn	P	Fe	Si	Mn	Mg	Ca	Cu	Na	K
CM	0.060± 0.005 ^A	7.848± 0.431 ^A	0.394± 0.025 ^A	0.448± 0.073 ^A	0.627± 0.055 ^D	3.739± 0.168 ^B	5.491± 0.434 ^B	0.022± 0.002 ^{NS}	0.223± 0.141 ^{NS}	34.125± 1.280 ^A
BIM	0.025± 0.001 ^B	4.897± 0.166 ^B	0.175± 0.019 ^B	0.313± 0.029 ^B	1.080± 0.077 ^D	3.652± 0.366 ^B	10.896± 1.675 ^{AB}	0.010± 0.001	0.055± 0.003	26.990± 0.198 ^B
BII	0.029±	4.195±	0.190±	0.130±	3.412±	3.740±	10.420±	0.015±	0.086±	22.600±
M	0.000 ^B	0.024 ^C	0.040 ^B	0.054 ^C	1.049 ^B	0.684 ^B	1.486 ^{AB}	0.001	0.012	1.570 ^C
BIII	0.038±	3.996±	0.190±	0.186±	3.362±	3.978±	9.375±	0.019±	0.251±	27.785±
M	0.010 ^B	0.226 ^{Cb}	0.024 ^B	0.029 ^C	0.543 ^B	0.712 ^{AB}	3.783 ^{AB}	0.003	0.116	0.191 ^B
SM	0.033± 0.001 ^B	5.129± 0.166 ^B	0.101± 0.019 ^C	0.201± 0.016 ^C	2.988± 0.802 ^{BC}	4.972± 0.712 ^A	12.990± 1.824 ^A	0.015± 0.002	0.154± 0.086	24.855± 2.001 ^{BC}
JM	0.031± 0.003 ^B	4.931± 0.252 ^B	0.149± 0.031 ^{BC}	0.449± 0.000 ^A	5.731± 0.846 ^A	5.020± 0.080 ^A	14.845± 1.379 ^A	0.015± 0.001	0.058± 0.004	23.665± 1.534 ^C
YM	0.024± 0.001 ^B	3.979± 0.034 ^C	0.189± 0.034 ^B	0.179± 0.057 ^C	1.580± 0.462 ^{CD}	3.718± 0.041 ^B	11.925± 3.444 ^A	0.010± 0.000	0.119± 0.081	23.140± 1.485 ^C
CF	0.060± 0.001 ^A	6.742± 0.010 ^A	0.442± 0.005 ^A	0.532± 0.001 ^{NS}	0.847± 0.005 ^F	3.603± 0.047 ^B	6.025± 0.006 ^B	0.027± 0.000 ^A	0.467± 0.004 ^B	33.855± 0.205 ^A
BIF	0.032± 0.002 ^B	5.153± 0.424 ^{C D}	0.174± 0.021 ^C	0.776± 0.739	1.233± 0.092 ^{E F}	3.702± 0.204 ^B	10.920± 1.146 ^{AB}	0.011± 0.000 ^C	0.407± 0.099 ^{B C}	30.320± 0.354 ^{AB}
BIIF	0.035± 0.002 ^B	4.018± 0.169 ^E	0.220± 0.007 ^B	0.248± 0.020	3.647± 0.327 ^B	3.540± 0.059 ^B	10.217± 0.980 ^{AB}	0.019± 0.000 ^B	0.320± 0.008 ^C	27.740± 0.679 ^{B C}
BIIIF	0.032± 0.005 ^B	5.248± 0.081 ^C	0.223± 0.029 ^B	0.378± 0.058	1.965± 0.221 ^D	4.362± 0.571 ^B	12.770± 0.651 ^A	0.015± 0.000 ^{B C}	0.532± 0.037 ^{AB}	25.490± 2.15 ^C
SF	0.036± 0.004 ^B	4.485± 0.505 ^{D E}	0.191± 0.011 ^{B C}	0.245± 0.027	2.725± 0.402 ^C	3.579± 0.353 ^B	12.505± 0.827 ^A	0.017± 0.002 ^B	0.592± 0.050 ^A	23.950± 3.479 ^{C D}
JF	0.036± 0.000 ^B	5.034± 0.100 ^{C D}	0.110± 0.018 ^D	0.232± 0.084	1.437± 0.057 ^E	4.179± 0.575 ^B	12.305± 5.579 ^A	0.018± 0.001 ^B	0.188± 0.062 ^D	19.375± 1.987 ^E
YF	0.032± 0.001 ^B	6.055± 0.184 ^B	0.163± 0.006 ^C	0.379± 0.040	4.544± 0.030 ^A	5.439± 0.083 ^A	13.545± 0.318 ^A	0.015± 0.001 ^{B C}	0.438± 0.034 ^{B C}	19.900± 1.259 ^{D E}

Dissimilar capital alphabets within the same column are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

* Initial C: Chinese Tea; B: Boseong Tea; S: Steamed Tea; J: Taiwan Tea No. 12; Y: Yabukita.

(라) 미생물발효차의 특수성분 분석

① HPLC 분석에 의한 구성당의 정량

- 본 연구 그룹에 의해 제조된 미생물발효차들을 대상으로 HPLC를 이용하여 당 함량을 분석하였다(Table 2-32).
- Galactose의 경우, CM으로부터는 검출되지 않았으며(검출한계, 0.001 ppm), 나머지 26종에서는 미량 검출되었다. 그리고 BIIIM과 BIIIM에서는 100 g 당 323.0 mg과 129.0 mg으로 다른 시료들에 비해 상대적으로 매우 높은 함량을 보였다. 그러나 그들 모차로부터 제조된 미생물발효차 BIIIF과 BIIIF로부터는 매우 미량만이 존재함을 알 수 있었다. 이것은 galactose가 미생물 발효를 통해 감소되었음을 의미하는 결과라 판단되었다.
- Fructose의 경우, 본 연구그룹에 의해 제조된 국내산 미생물발효차의 시료 모두 모차에 비해 동일 시료를 발효시킨 것에서 fructose의 함량이 감소되는 특징을 보였다.
- Mannose의 경우, 분석한 모든 시료에서 검출되지 않거나 매우 극미량만이 함유되어 있었다.
- Glucose의 경우, 국내산 모차로 제조한 미생물발효차에 100 g 당 최대 2411.9 mg에서 최소 8.0 mg으로 폭 넓은 함량차이를 보였다. 그러나 흥미롭게도 fructose 경우와 마찬가지로 모차로부터 각각 제조된 미생물발효차에 있어서 glucose는 검출되지 않을 정도로 감소되어 있음을 알 수 있었다.
- Ribose의 경우, 대부분의 시료로부터 검출되지 않았다. B I F와 BIIIF로부터 미량이 검출되기는 하였으나, 신뢰하기 어려운 정도의 피크가 검출되어 data로 제시하지 않았다.
- Lactose의 경우, B I F, BIIIF, YF, 그리고 SF 4 종으로부터는 100 g 당 약 50 mg 정도가 검출되었으나, 나머지 시료들로부터는 검출되지 않았다. 즉 lactose의 경우에는 fructose와 glucose의 경우와 반대로 국내산 모차에서는 검출되지 않았으나 국내산 모차를 발효하여 제조한 미생물발효차(모두가 해당되는 사항은 아니지만)로부터 검출되는 경향을 보였다.

Table 2-32. Sugar content of microbial fermented tea prepared by domestic microorganism

	(mg/100 g)					
	Carbohydrates					
	Galactose	Mannose	Glucose	Fructose	Ribose	Lactose
CM	N.D	N.D	94.3	219.7	N.D	N.D
BIM	trace	N.D	1992.7	1970.7	N.D	N.D
BIIM	323	N.D	1899.3	618.4	N.D	N.D
BIIM	129	N.D	1142.3	760	N.D	N.D
SM	trace	N.D	990.4	1970.7	N.D	N.D
JM	trace	N.D	2075.1	2569.6	N.D	N.D
YM	trace	N.D	2411.9	2919.5	N.D	N.D
CF	trace	N.D	trace	trace	N.D	N.D
BIF	trace	N.D	trace	333.6	trace	50
BIIF	trace	N.D	trace	255.5	N.D	N.D
BIIF	trace	N.D	trace	trace	trace	50
SF	trace	N.D	trace	42.3	trace	51
JF	trace	N.D	trace	595.6	N.D	N.D
YF	trace	N.D	trace	226.2	N.D	52

- 이상의 당분석 결과들을 종합해보면, 일반적으로 모차로부터 제조된 미생물발효차에 있어 당 함량은 발효 후에 감소되는 경향을 보였으며, 특히 fructose와 glucose에 있어서 그 경향이 명확함을 알 수 있었다.
- 반면, lactose는 모차에서 검출되지 않았던 것이 발효 후에 검출되는 특징을 보였다. 이것은 발효과정 중에 미생물에 의해 생성된 성분이거나 차에 함유되었던 어떤 당이 미생물의 작용 등에 의해 lactose로 변환되었기 때문일 가능성 등이 추측된다.
- 차의 관능검사 등을 통해 품질 우수성이 인정된 차에 있어 glucose, fructose, lactose등 3종의 당 간의 상관성이 확보된다면 미생물발효차의 품질평가에 유용한 수단이 될 가능성이 시사된다.
- 그러나 1차년도에 분석하였던 중국으로부터 구입된 시료들이 1년 이상의 보존기간을 거친 시료인 반면 본 실험에서 이용한 국내산 미생물발효차가 제조된 직후의 시료이며, 중국산 시료에서는 국내산 미생물발효차에서 관찰된 당 함량의 특

징을 보이지 않았음을 연관 지어 판단할 때, 발효방법, 발효에 관여한 미생물의 종류, 보존기간 등이 당 함량 패턴에 영향을 미칠 가능성이 높을 것으로 시사된다. 이러한 부분들과 본 실험 결과들간에 보다 자세한 검토들이 추후 보충될 필요가 있다고 판단된다.

② 카테킨 관련 성분 분석

- 7종의 미생물발효차와 원료가 되는 모차의 카테킨 관련 성분(Fig. 2-13)과 카테킨 산화물의 함량(Fig. 2-14)을 조사 비교한 결과, 카테킨 성분은 발효가 진행되면서 전체적으로 감소한 반면 카테킨 산화물은 전체적으로 증가하는 경향을 보였다.

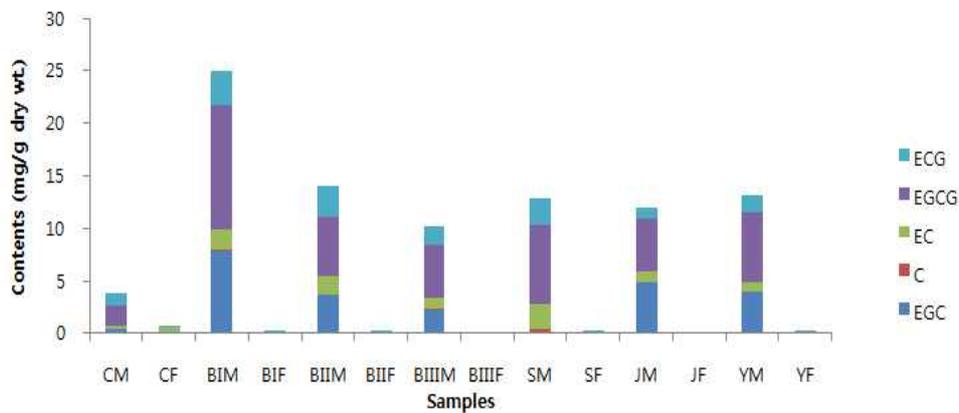


Fig. 2-13. Changes of catechins in tea leaves during the manufacturing of microbial fermented tea.

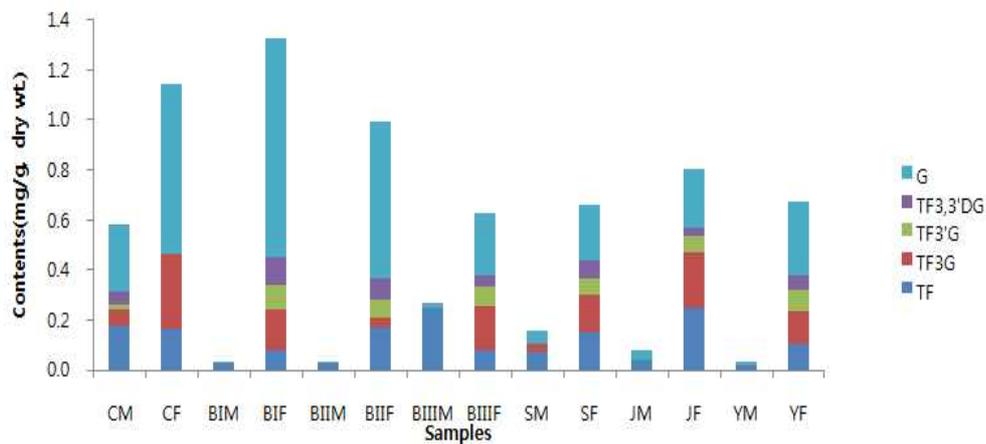


Fig. 2-14. Changes of theaflavins in tea leaves during the manufacturing of microbial fermented tea

③ 미생물발효차의 Vitamin E (Tocopherol) 분석

- 국내에서 생산된 차 중에 JM, B I M, B II M의 경우에는 검화 후에 α -tocopherol 이 다른 시료들에 비해서 상대적으로 함량이 많이 증가되는 것을 확인하였다. 그리고 CM, YM의 경우 검화를 하지 않은 시료에서 함량이 높은 것이 관찰되었고, SM, B III M의 경우에는 함량이 증가되지 않음을 확인하였다.
- β and/or γ -Tocopherol의 경우에도 국내에서 제조한 차(Fig. 2-16) 대부분이 검화 후 증가하는 경향을 보였으며 특히 CM, CF는 β and/or γ -tocopherol의 함량이 현저히 많았다.
- 국내에서 제조한 미생물발효차에 α -tocopherol의 경우, 거의 대부분 시료들이 검화하지 않은 시료에 비해 검화를 행한 시료에서 함량이 증가됨을 확인하였다.
- 또한, 국내에서 제조한 차의 경우에 모차와 발효차의 함량의 차이가 많지 않음을 볼 때, 위에서 언급한 다른 tocopherol류에 비해 산화 속도가 느림을 재확인 할 수 있었다.

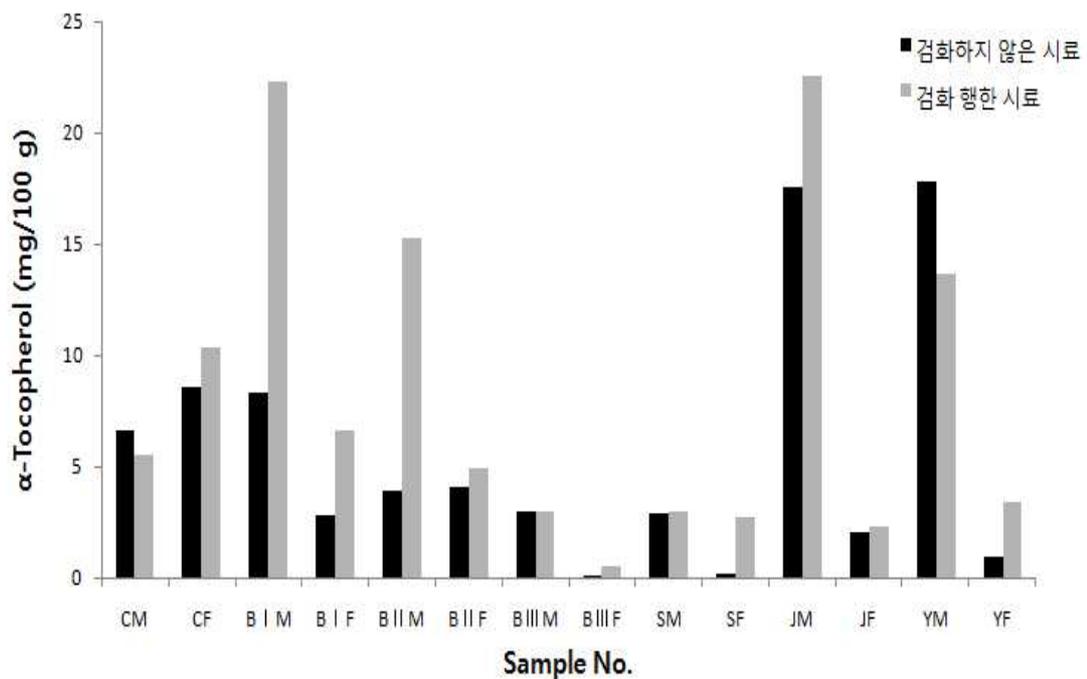


Fig. 2-15. α -Tocopherol content of microbial fermented tea.

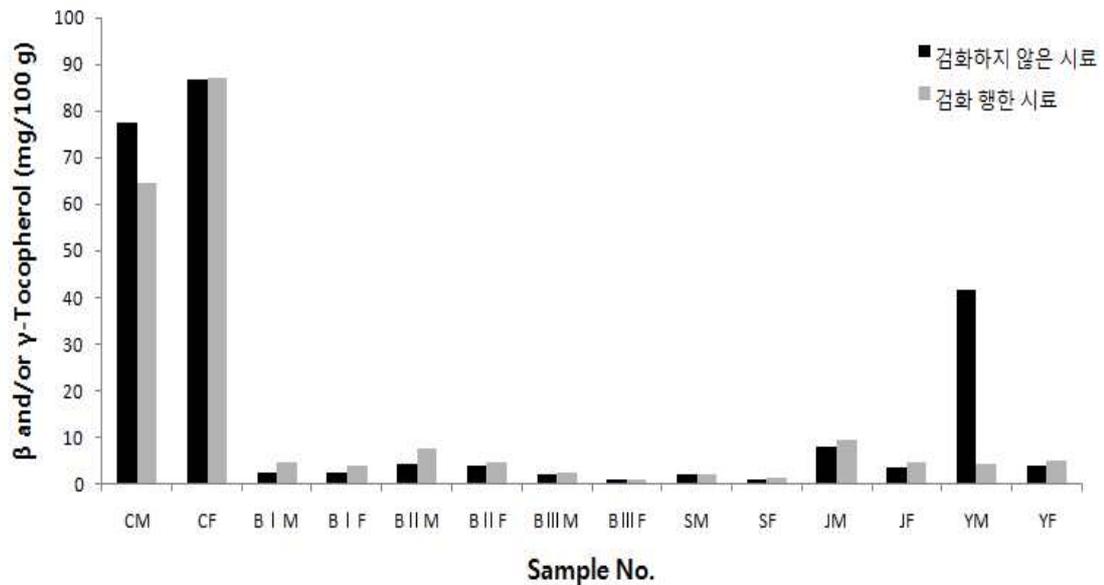


Fig. 2-16. The contents of β and/or γ -tocopherol in microbial fermented teas.

(마) 미생물발효차의 생리활성 평가

① 쥐 혈장의 동이온 유도 산화에 대한 차추출물의 Cholesteryl Ester Hydroperoxide (CE-OOH) 생성 억제능 평가

- 합성 CE-OOH를 1~300 nmol의 범위에서 HPLC로 분석하여 얻어진 peak area를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과, R 값($R^2=0.999$)이 1에 가까운 직선상의 그래프가 얻어졌다.
- 차추출물(신선중량 5 μ g 상당량)을 쥐 혈장에 첨가하여 동이온에 의해 유도된 산화반응 6시간 후의 CE-OOH 생성농도를 측정하였다. 미생물발효차의 종류에 따른 CE-OOH 생성 농도를 Fig. 2-17에 나타냈다.
- 국내에서 제조한 미생물발효차의 CE-OOH 생성농도를 비교한 결과, 중국 차잎으로 제조한 차의 경우 발효차(CF)가 모차(CM)보다 CE-OOH 생성 농도가 높게 나타났다.
- 국산 차잎으로 제조한 시료군의 경우 모차가 발효차보다 비교적 CE-OOH 생성 농도가 높게 나타났으나 제조방법에 따른 일관성 있는 결과는 나타나지 않았다.
- 증청녹차의 경우 모차(SM)가 발효차(SF)보다 CE-OOH 생성 농도가 높게 나타났으며 Yabukita로 제조한 차의 경우 모차(YM)가 발효차(YF)보다 CE-OOH 생성

농도가 높게 나타났다.

- 국내에서 제조한 미생물발효차의 CE-OOH 생성농도를 비교한 결과, 찾잎에 따른 모차와 발효차 간의 일관성 있는 결과는 나타나지 않았다.
- 쥐 혈장을 이용한 생리활성 평가의 결과 녹차가 미생물발효차보다 생리활성 측면에서 더 우수한 것으로 사료되나, 본 실험은 단회 실험을 통한 결과이므로 재현성 평가 및 추가된 새로운 샘플들의 분석을 통해 보다 정확하고 객관적인 결과를 얻을 수 있을 것이라 판단된다.

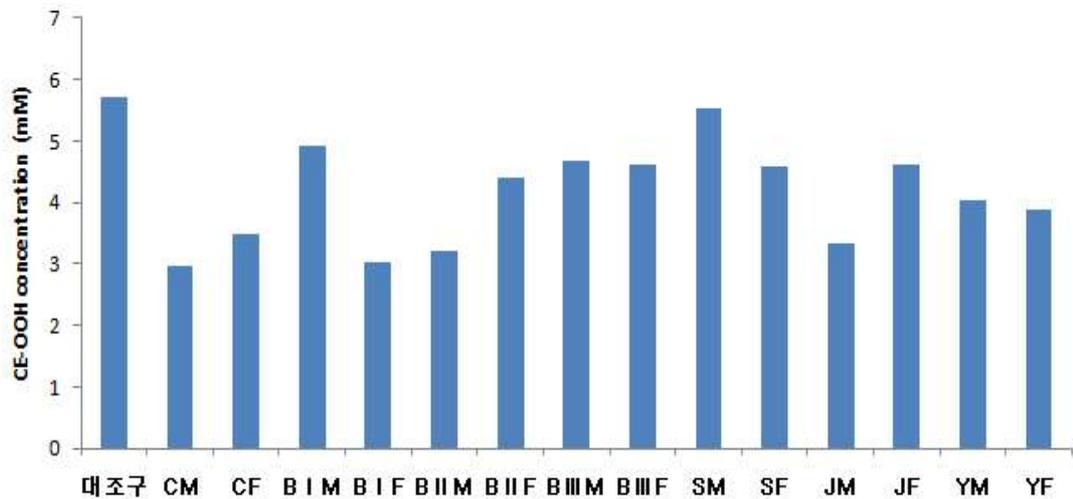


Fig 2-17. Inhibition effect against CE-OOH formation by the extracts of microbial fermented teas during copper ion-induced oxidation of diluted rat blood plasma.

② 항산화(L-citrulline 생성 억제) 작용 검증

- 국산(BFI, BFII, BFIII, SF, YF, JF) 및 중국산(CF) 미생물발효차의 항산화 활성은 iNOs의 생성 기전을 통한 L-Citrulline 생성억제활성을 측정한 결과(Fig. 2-18), 7종의 미생물발효차 모두 시료 무처리군에 비하여 농도 의존적으로 L-citrulline 생성능을 억제하였으며, 7종의 미생물발효차 중 국산 미생물발효차(BFI, BFII, BFIII, YF)가 중국산 미생물발효차(CF)보다 높은 억제활성을 보였다. 국산 미생물발효차 중에서는 BFII 발효차가 가장 높은 L-citrulline 생성억제활성을 나타냈다. 이상의 결과로부터 국내 재래종을 원료로 미생물발효차를 개발하였을 때 L-citrulline 생성억제 작용이 우수한 발효차로 개발할 수 있는 가능성이 제시되었다.

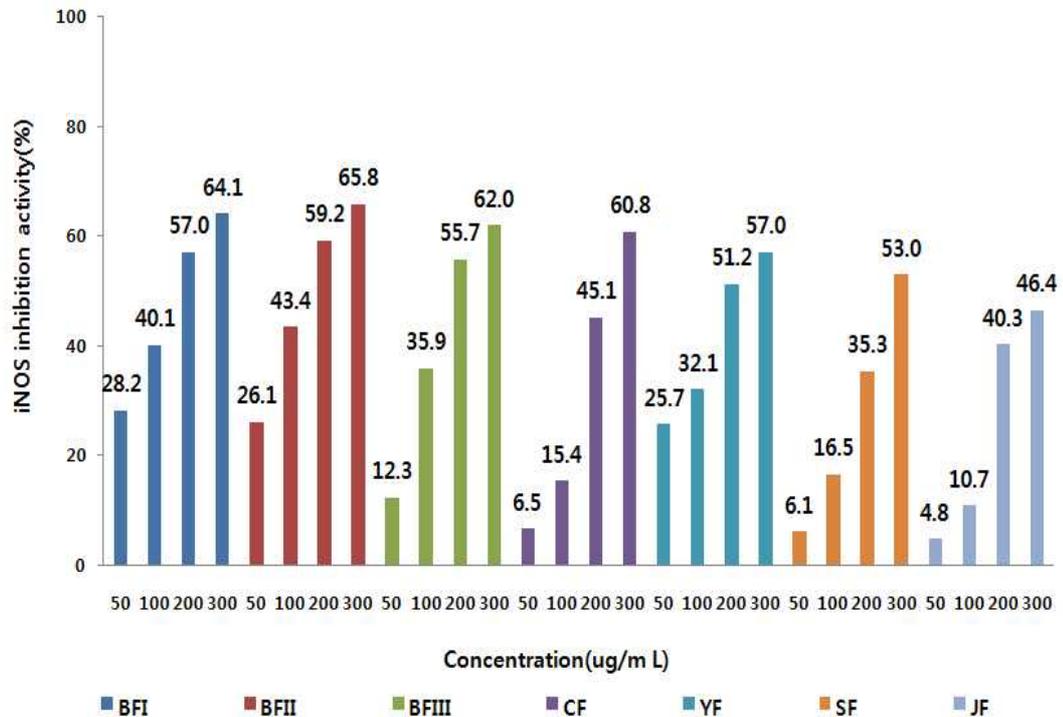


Fig. 2-18. iNOS inhibition activities of microbial fermented teas.

③ Statin 화합물 탐색

- Statin 화합물은 미생물에 의해 생성되는 항고혈압 기능성분으로 알려져 있으며 HMG-CoA 환원효소 억제제(HMG CoA reductase inhibitor, Statin)로서 콜레스테롤 합성의 속도조절 단계인 HMG CoA reductase를 경쟁적으로 억제하여 간세포(Hepatocyte)에서 콜레스테롤 합성을 감소시키고, 간세포의 LDL수용체의 활성도를 증가시키므로써 혈중 LDL-콜레스테롤의 제거를 촉진하여 혈중 콜레스테롤의 농도를 감소시킨다고 알려져 있다.
- 1차년도 연구결과, 미생물발효차의 심혈관계 효과를 갖는 기능성분으로 존재할 가능성이 제시된 statin 화합물에 대하여 직접 제조한 미생물발효차 안에서의 존재 여부를 확인하였다.
- 그 결과(Table 2-33), 모든 시료에서 Compactin-H와 Lovastatin-H의 존재를 확인했으며, 중국모차(CF)로 제조된 미생물발효차보다 우리나라 재래종으로 제조된 미생물발효차에 전반적으로 다양한 종류의 statin 화합물이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 2-33. The contents of statins in of microbial fermented teas

Sample	mg/g (d.w.)								Total
	Prava statin-H	Atova statin-H	Comp actin-H	Comp actin-L	Lova statin-H	Lova statin-L	Simva statin-H	Simva statin-L	
CF	N.D.	N.D.	0.120	N.D.	0.082	N.D.	N.D.	N.D.	0.202
YF	0.127	0.087	0.018	N.D.	0.037	N.D.	N.D.	N.D.	0.270
SF	N.D.	N.D.	0.203	N.D.	0.133	N.D.	0.007	0.038	0.380
BIF	N.D.	N.D.	0.202	0.066	0.068	N.D.	0.021	N.D.	0.357
BIIF	N.D.	0.218	0.113	N.D.	0.148	0.10	0.007	0.005	0.499
BIIF	0.090	0.087	0.035	0.044	0.049	N.D.	0.002	N.D.	0.307

(바) 향기성분의 GC-MS 분석

① 향기성분의 분석

- 미생물발효차의 향기성분을 분석한 최 등²⁴⁾의 논문에 검출된 성분들을 참고로 32종의 표준품들을 구입하여 GC-MS 분석을 행한 결과, Fig. 2-19와 같은 GC chromatogram을 얻었다. 표준품들의 분석을 통하여 1종의 내부표준물질인 ethyl carprate를 포함한 총 30종 표준품들(hexanal, 1-ethylbenzene, 1-penten-3-ol, heptanal, *trans*-2-hexenal, 1-pentanol, nonyl aldehyde, *trans*, *trans*-2,4-heptadienal, benzaldehyde, 4-ethylanisole, linalool, naphthalene, 1,2-dimethoxybenzene과 1,4-dimethoxybenzene, α -ionone, geraniol, 2-phenylethanol, β -ionone, phytol, 2-phenylacetaldehyde, α -cresol, 4-ethyl-2-methoxyphenol, 3,4,5-trimethoxytoluene, *p*-xylenol, acenaphthylene, 3-ethylphenol, methyl palmitate, dibenzofuran, indole, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde)의 retention time (t_R)을 확인할 수 있었으며, 그 MS data 확보 및 내장 library와의 비교를 통해 각 성분의 동정을 행하였다.
- 그 결과, Table 2-35과 같이 1종의 내부표준물질과 30종의 표준품들이 동정되었으나, 2종 표준품들(3-methylpentan-2-one과 1-penten-3-one)은 용매와 겹쳐서 검출되는 것으로 생각되어지며, 그 성분들의 분석을 위해서는 추후 개선된 분석조건

의 검토가 필요하다고 판단된다.

- 또한 외국산 미생물발효차와 국내에서 본 연구그룹에 의해 생산된 차들을 대상으로 내부준법을 이용하여 GC-MS 분석을 행하였다.
- 그 대표적인 data들로서 중국산 시판 발효차(Fig. 2-20)와 CM(Fig. 2-21)의 GC chromatogram들을 제시하였다.
- 중국산 시판 발효차와 본 연구그룹에 의해 생산된 미생물발효차 시료의 GC chromatogram들로부터 주요 피크들로 약 20여종 이상의 향기성분들이 검출됨을 확인할 수 있었다.

② 향기성분의 동정

- 각각의 peak들에 대한 향기성분에 대해 표준품 분석과 MS data의 library검색을 통해 내부표준물질을 포함한 21종의 화합물들을 동정(Fig. 2-22)하였다.
- 상세한 동정 내용은 생략하나 검출된 주요 화합물들의 동정 결과만을 Table 2-35에 정리하였다.

③ 향기성분의 정량

- 본 연구 수행 결과 제조된 미생물발효차의 향기분석에 앞서 중국으로부터 입수된 미생물발효차들의 향기성분 함량을 분석하였다(Table 2-35).
- 그 결과, 동정된 성분들 모두가 미생물발효차의 품종과 함량간에 특정 관련성을 보인 것은 아니었다. 그러나 methyl caprate의 함량(Fig. 2-23)을 비교해 보면, 매우 흥미롭게도 같은 해에 제조된 미생물발효차들로서 시료 5(고급), 6(중저급) 및 9(아주저급)와 같이 고급에서 저급으로 갈수록 methyl caprate의 함량이 급격히 증가됨을 알 수 있었다. 또 고급인 시료 3과 저급인 시료 4에 있어서도 methyl caprate의 함량은 시료 5, 6 및 9와 동일한 경향을 보였다.
- 본 연구 수행 결과 제조된 미생물발효차의 경우, 대부분의 모차에서는 methyl caprate가 미량 존재하거나 검출되지 않았음에 비해, 그들을 원료로 하여 제조된 미생물발효차 모두에서는 methyl caprate가 모차보다 증가되어 검출되었으며(Table 2-37, Fig. 2-24), 국내 재래종으로 발효한 경우 methyl caprate의 생성이 가

장 적게 생성되는 경향을 보여 국내 재래종을 이용한 고품질 미생물발효차의 개발 가능성이 제시되었다. 추후 methyl caprate와 미생물발효차의 품질과의 관계는 숙성기간에 따른 methyl caprate의 변화를 고찰한다면 더욱 명확해질 수 있을 것으로 생각되어 의미있는 검토 대상으로 여겨진다.

- 또한, 1차년도 연구결과에서 저급 미생물발효차의 이취 원인 향기성분 가능성분으로 제시한 바 있는 methoxy- 및 methyl- 화합물의 본체가 methoxylated benzene과 methyl caprate일 가능성이 시사되었다.
- 미생물발효차의 바람직하지 못한 이취로 보고된 바 있는 methoxylated benzene류²⁵⁾ 이외에 methyl caprate가 미생물발효차의 품질과 상관성이 있음이 제시된 결과는 처음으로 사료된다.

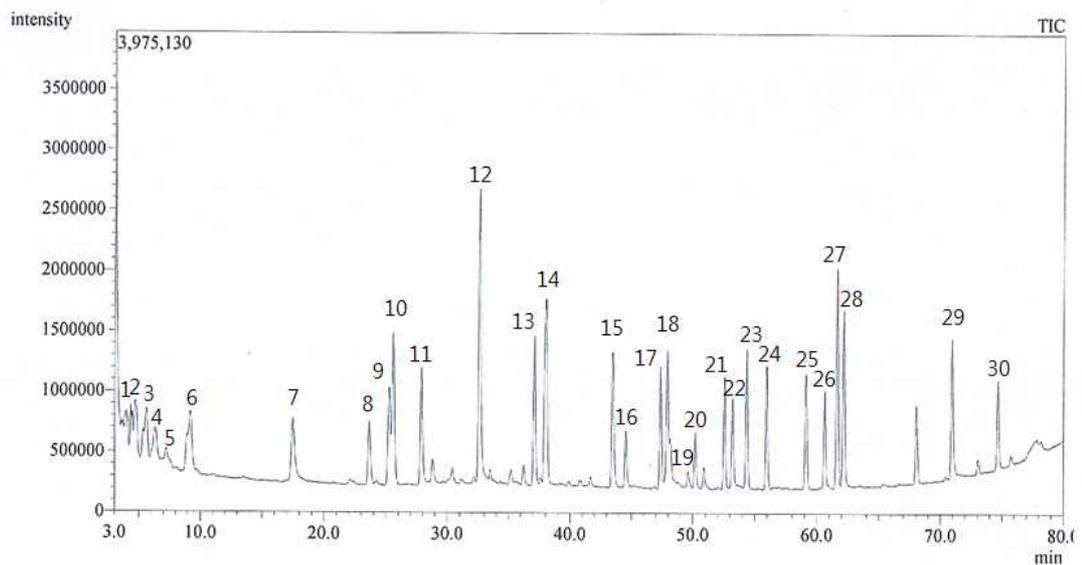


Fig. 2-19. GC chromatogram of standard volatiles.

1, Hexanal; 2, 1-Ethylbenzene; 3, 1-Penten-3-ol; 4, Heptanal; 5, *trans*-2-Hexenal; 6, 1-Pentanol; 7, Nonyl aldehyde; 8, *trans, trans*-2,4-Heptadienal; 9, Benzaldehyde; 10, 4-Ethylanisole; 11, Linalool; 12, Ethyl caprate (내부표준물질); 13, Naphthalene; 14, 1,2-Dimethoxybenzene과 1,4-Dimethoxybenzene; 15, α -Ionone; 16, Geraniol; 17, 2-Phenylethanol; 18, β -Ionone; 19, Phytol; 20, 2-Phenylacetaldehyde; 21, *o*-Cresol; 22, 4-Ethyl-2-methoxyphenol; 23, 3,4,5-Trimethoxytoluene; 24, *p*-Xylenol; 25, Acenaphthylene; 26, 3-Ethylphenol; 27, Methyl palmitate; 28, Dibenzofuran; 29, Indole; 30, 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde.

Table 2-34. Volatiles identified from microbial fermented teas

Peak No.	Retention time (min)	Compounds
1	3.9	Hexanal
2	4.7	1-Ethylbenzene
3	5.6	1-Penten-3-ol
4	6.3	Heptanal
5	7.5	<i>trans</i> -2-Hexenal
6	9.1	1-Pentanol
7	17.4	Nonyl aldehyde
8	23.6	<i>trans, trans</i> -2,4-Heptadienal
9	25.2	Benzaldehyde
10	25.5	4-Ethylanisole
11	27.8	Linalool
12	32.6	Ethyl carprate (internal standard)
13	37.1	Naphthalene
14	38.0	1,2- & 1,4-Dimethoxybenzene
15	43.4	α -Ionone
16	44.5	Geraniol
17	47.4	2-Phenylethanol
18	47.9	β -Ionone
19	49.6	Phytol
20	50.2	2-Phenylacetaldehyde
21	52.5	α -Cresol
22	53.2	4-Ethyl-2-methoxyphenol
23	54.3	3,4,5-Trimethoxytoluene
24	55.9	<i>p</i> -Xylenol
25	59.1	Acenaphthylene
26	60.6	3-Ethylphenol
27	61.6	Methyl palmitate
28	62.1	Dibenzofuran
29	70.9	Indole
30	74.6	3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde

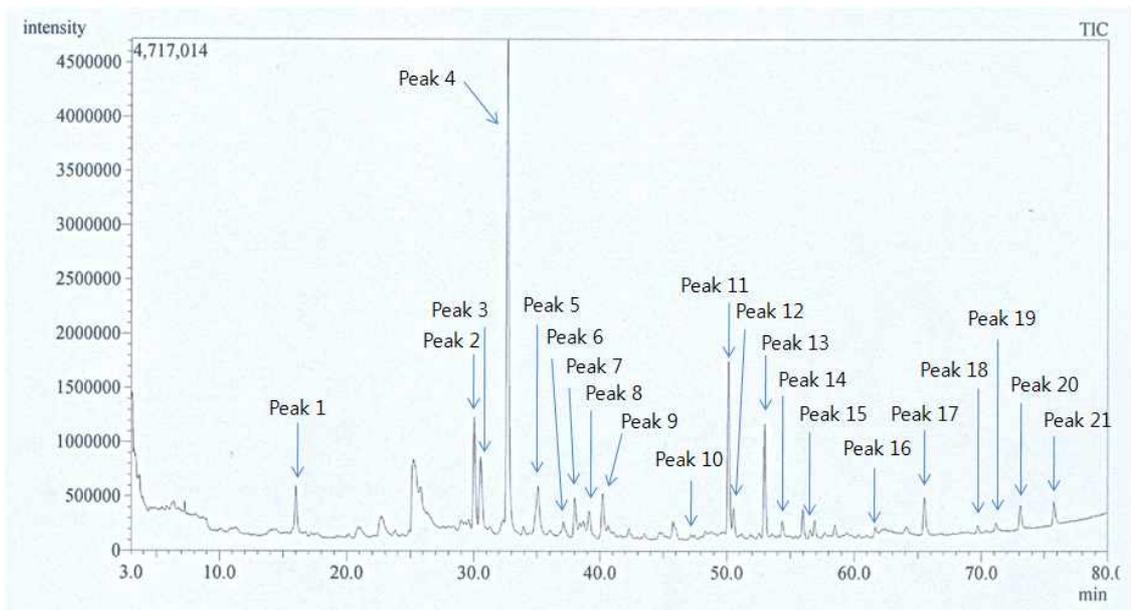


Fig. 2-20. GC chromatogram of Chinese microbial fermented tea.

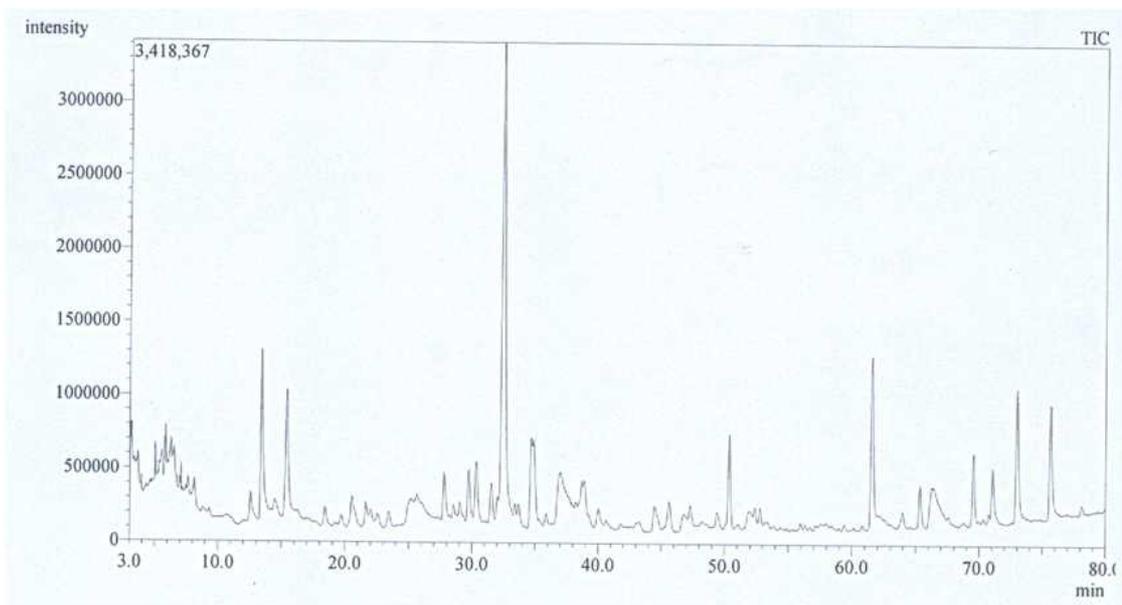


Fig. 2-21. GC chromatogram of CM in microbial fermented tea.

Table 2-35. The identification of volatiles in of microbial fermented tea

Peak No.	t_R (min)	Fragment ion (m/z)	Compounds
1	16.0	74 (M^+), 56, 43	1-Hydroxy-2-propanoe
2	30.0	186 (M^+), 155, 143, 129, 101, 87, 74, 59, 41	Methyl caprate
3	30.5	123 (M^+), 108, 94, 80, 66, 53, 40	3-Methoxyaniline
4	32.6	200 (M^+), 171, 155, 143, 129, 115, 101, 88, 73, 70, 60, 41	Ethyl caprate
5	35.0	98 (M^+), 81, 69, 54, 41	2-Furanmethanol
6	37.1	128 (M^+), 87, 75, 51	Naphthene
7	38.0	138 (M^+), 123, 107, 95, 77, 65, 52, 41	1,4-Dimethoxybenzene
8	39.1	84 (M^+), 55	2(5H)-Furanone
9	40.2	155, 143, 137, 112, 102, 94, 79, 68, 59, 43	Epoxylinalol
10	47.4	122 (M^+), 104, 91, 77, 65, 51, 40	2-Phenylethanol
11	50.1	168 (M^+), 153, 138, 125, 110, 95, 93, 77, 65, 51	1,2,3-Trimethoxybenzene
12	50.5	109 (M^+), 94, 80, 66, 43, 40	2-Acetylpyrrole
13	52.9	95 (M^+), 66, 52, 40	2-Formylpyrrole
14	54.3	182 (M^+), 167, 139, 124, 107, 91, 79, 65, 53	3,4,5-trimethoxy-toluene
15	56.5	154 (M^+), 139, 125, 111, 96, 93, 79, 65, 55	2,6-Dimethoxyphenol
16	61.6	270 (M^+), 239, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 87, 74, 57, 41	Methyl palmitate
17	65.5	180 (M^+), 165, 152, 124, 95, 79, 67, 43	Dihydroactinidiolide
18	69.7	120 (M^+), 105, 91, 77, 65, 51, 40	2,3-Dihydrobenzofuran
19	71.1	296 (M^+), 264, 222, 180, 137, 123, 110, 98, 87, 69, 55, 41	Methyl oleate
20	73.0	294 (M^+), 262, 164, 150, 136, 124, 109, 95, 81, 67, 55, 41	Methyl linoleate
21	75.7	292 (M^+), 149, 135, 121, 108, 93, 79, 67, 55, 41	Methyl linolenate

Table 2-36. Volatile content of foreign microbial fermented teas.

(mg/100 g)

Peak No.	Couponds	1	3	4	5	6	8	9	10	12
1	1-Hydroxy-2-propanoe	0.47	0.00	0.49	0.00	0.04	0.00	0.00	0.50	0.00
2	Methyl caprate	0.00	0.38	1.29	0.00	4.41	0.93	5.25	4.66	0.15
3	3-Methoxyaniline	2.62	0.62	1.02	0.74	0.44	0.97	0.84	0.20	0.44
5	2-Furanmethanol	0.91	0.11	0.89	0.12	0.11	0.87	0.32	0.58	0.54
6	Naphthene	0.07	0.00	0.19	0.08	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00
7	1,4-Dimethoxybenzene	0.72	0.07	0.45	0.45	0.23	0.12	0.24	0.05	0.08
8	2(5H)-Furanone	1.18	0.06	0.32	0.37	0.02	0.84	0.15	0.37	0.01
9	Epoxylinolol	0.82	0.80	0.57	0.04	0.00	0.71	0.12	0.27	0.32
10	2-Phenylethanol	0.90	0.13	0.02	0.19	0.22	0.55	0.08	0.07	0.15
11	1,2,3-Trimethoxybenzene	1.90	1.20	1.74	5.07	2.80	1.10	1.11	0.61	0.04
12	2-Acetylpyrrole	0.93	0.28	0.28	0.37	0.22	0.24	0.26	0.18	2.60
13	2-Formylpyrrole	4.47	1.19	1.15	1.87	0.97	1.55	1.75	1.50	0.36
14	3,4,5-trimethoxy-toluene	0.02	0.39	0.17	0.87	0.35	0.25	0.11	0.12	0.00
15	2,6-Dimethoxyphenol	0.27	0.06	0.07	0.28	0.14	0.04	0.05	0.04	0.03
16	Methyl palmitate	0.00	0.06	0.08	0.06	0.07	0.06	0.06	0.07	0.27
17	Dihydroactinidiolide	0.74	0.29	0.45	0.69	0.39	0.50	0.30	0.56	0.47
18	2,3-Dihydrobenzofuran	0.22	0.07	0.06	0.15	0.08	0.09	0.07	0.06	1.49
19	Methyl oleate	0.00	0.05	0.06	0.09	0.14	0.10	0.08	0.36	0.38
20	Methyl linoleate	0.00	0.24	0.26	0.22	0.47	0.14	0.18	0.73	0.61
21	Methyl linolenate	0.00	0.25	0.23	0.20	0.48	0.15	0.18	0.75	0.46

Table 2-37. Volatile content of domestic tea as the material of microbial fermented tea.
(mg/100 g)

Peak No.	Couponds	CM	BIM	BIIM	YM
1	1-Hydroxy-2-propanoe	0.00	0.05	0.25	0.23
2	Methyl caprate	0.74	0.95	0.00	1.50
3	3-Methoxyaniline	0.91	0.48	0.60	0.36
5	2-Furanmethanol	0.18	0.33	2.27	3.65
6	Naphthene	0.18	0.06	0.05	0.02
7	1,4-Dimethoxybenzene	0.02	0.00	0.00	0.00
8	2(5H)-Furanone	0.00	0.33	0.68	0.11
9	Epoxylinolol	0.26	0.00	0.00	0.11
10	2-Phenylethanol	0.00	0.17	0.71	1.13
11	1,2,3-Trimethoxybenzene	0.03	0.01	0.03	0.03
12	2-Acetylpyrrole	1.14	2.21	1.10	1.03
13	2-Formylpyrrole	0.19	0.23	0.20	0.29
14	3,4,5-trimethoxy-toluene	0.00	0.00	0.00	0.00
15	2,6-Dimethoxyphenol	0.03	0.00	0.03	0.07
16	Methyl palmitate	2.12	0.05	0.06	0.08
17	Dihydroactinidiolide	0.51	0.57	0.73	0.48
18	2,3-Dihydrobenzofuran	0.79	0.23	0.14	0.06
19	Methyl oleate	0.71	0.03	0.07	0.35
20	Methyl linoleate	1.78	0.04	0.06	0.20
21	Methyl linolenate	1.47	0.09	0.04	0.06

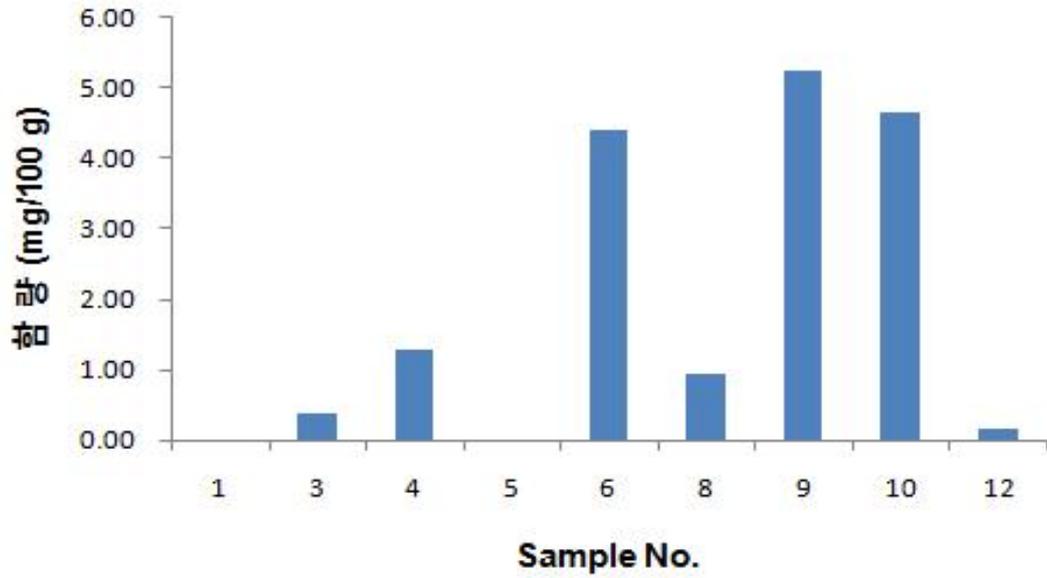


Fig. 2-22. Methyl caprate content of Chinese microbial fermented tea and green tea.

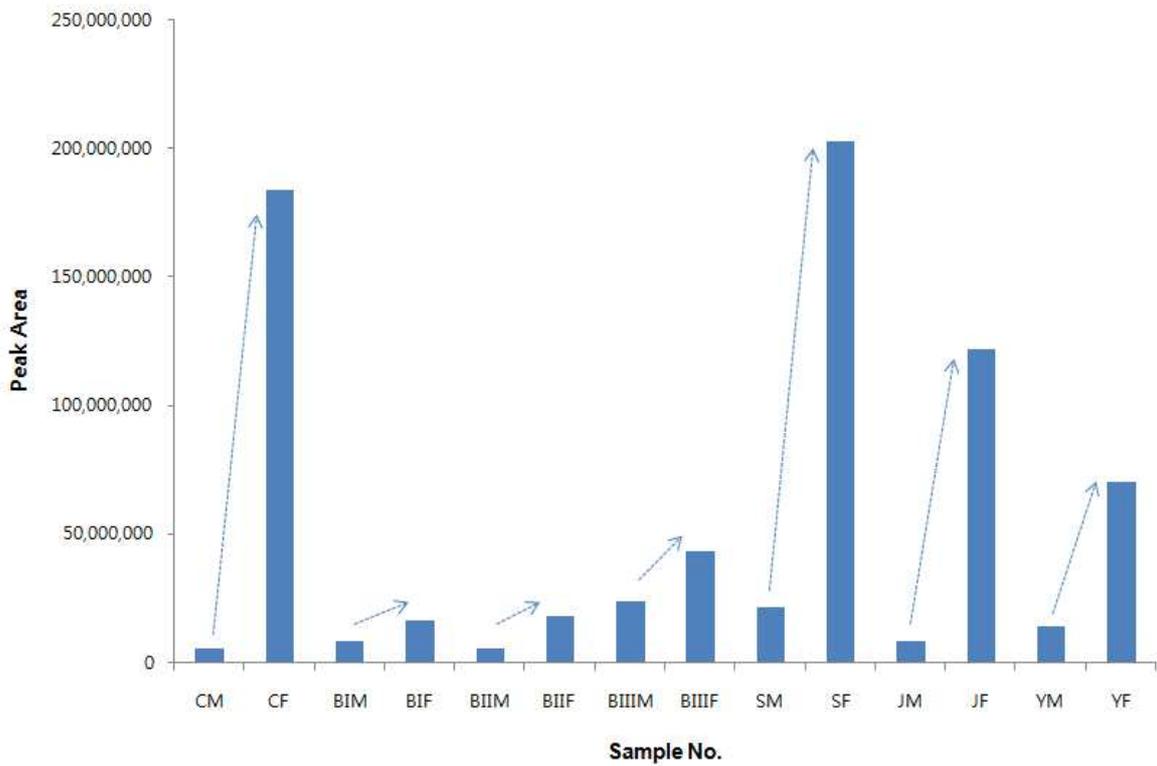


Fig. 2-23. Comparison of TIC peak area of methyl caprate in domestic tea (the material of microbial fermented tea) and microbial fermented tea.

(사) 미생물발효차의 미생물 독소 분석

- 미생물발효차는 주요 미생물이 *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속 곰팡이가 밝혀짐에 따라 이 균주가 생성할 수 있는 독소인 aflatoxin 과 ochratoxin의 분석법을 확립하고 제조된 미생물발효차를 대상으로 aflatoxin 과 ochratoxin의 존재 여부를 모니터링 하였다.
- 그 결과(Table 2-38), 국내산 찻잎과 외국산 찻잎으로 제조된 미생물발효차 7종 모두 aflatoxin 과 ochratoxin모두가 검출되지 않았다.

Table 2-39. The detection of microtoxins in microbial fermented tea

Sample	Contents($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	Aflatoxin	Ochlatoxin
CF	N.D.	N.D.
YF	N.D.	N.D.
SF	N.D.	N.D.
JF	N.D.	N.D.
BIF	N.D.	N.D.
BIIF	N.D.	N.D.
BIIF	N.D.	N.D.

다. 요약

- 1차년도 결과를 바탕으로 당해연도인 2차년도(2010년)에서는 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 국내 생산 환경 적용시험을 실시하였다. 즉, 국내에서 재배되고 있는 자생종과 도입종 찻잎 및 재외국 발효차의 원료잎을 이용하여 국내에서 발효차를 제조한 후, 발효과정 중 생육 미생물 거동, 생리활성 성분, 향기성분, 영양성분 및 이화학적 특성을 조사, 비교함으로써 국내에서의 미생물발효차의 생산 가능성을 검토하였다.
- 국내 자생종(재래종), 도입 대엽종(대차12호), 도입 소엽종(야부키다) 등 3종류의 찻잎과 중국에서 중국산 대엽종으로 제조된 모차를 원료로 다양한 조건의 발효공정을 거쳐 총 7종의 미생물발효차를 제조하였다.
- 외국의 미생물발효차 기술자를 초청하여 기술자와 함께 미생물발효차 제조하면서 발효

조건 및 발효단계별 주요 미생물의 거동을 조사한 결과, 대부분의 조건에서 발효 초기 과정에 *Aspergillus niger*가 우점종으로 성장율이 높았으며 발효가 진행 될수록 점차적으로 감소되면서 *Penicillium*의 증가가 관찰되는 경향을 보였다. 또한, 동일한 중국 모차를 원료로 국내에서 본 연구진이 제조한 미생물발효차와 국외의 미생물발효차 제조 공장에서 제조한 미생물발효차의 발효관련 주요 균주의 성장패턴이 유사한 것으로 보아 국내 미생물발효차제조 공정의 산업화 적용이 가능함을 확인하였다.

- 원료 찻잎의 채취시기 및 채취부위와 미생물 발효과정이 대단히 중요한 상호 연관성을 가지고 있을 가능성이 제시되었으며 찻잎의 상태에 따라 유념의 강도를 조절해야 필요성도 제시 되었다.
- 찻잎의 L 값은 발효 후 감소, a 값은 증가하는 경향을 보였고 b 값은 대부분의 발효차들은 발효 후 감소하는 경향을 보였으나 중국산 모차로 제조한 발효차는 오히려 증가하는 경향을 보였다.
- 차 증류수 추출액의 L값은 발효 후 감소하고 a와 b 값은 모두 발효에 의해 증가하는 경향을 보였는데 중국산 발효차가 유의적으로 높은 값을 나타내 가장 진한 적색, 황색으로 변해 감을 알 수 있었다.
- pH는 발효 후 현저하게 증가하였고 국내 재래종으로 제조한 모차와 이 모차로 제조한 미생물발효차의 pH가 다른 차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타낸 반면, 중국산 모차로 제조한 발효차는 다른 미생물발효차들과 비교해 볼 때 현저히 낮은 값을 나타냈다.
- 산도는 발효에 의해 감소하는 경향을 볼 수 있었는데 중국산 모차로 제조한 발효차가 다른 발효차들에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈다.
- 미생물발효차의 가용성 고형분 함량은 발효 후 증가하는 경향을 볼 수 있었는데 중국산 모차로 제조한 발효차가 가장 높은 함량을 나타내었다.
- 미생물발효차의 수분활성도는 발효 후 증가하는 경향을 나타내었는데 특히 국내 재래종 증청녹차로 제조한 미생물발효차는 수분함량에 이어 수분활성도 역시 다른 미생물발효차보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다.
- 미생물발효차에 함유 된 주요 유기산을 분석한 결과 maleic acid가 주요 유기산으로 나타났고 대부분의 유기산은 발효 중 그 함량이 증가하여 발효 전보다 발효 후에 현저히 높은 함량을 나타내었다.
- 모차에서는 총 17종의 유리아미노산이 검출되었고 발효차에서는 총 11종의 유리아미노

산이 검출되었는데 모차와 발효차 모두 glutamic acid와 alanine이 주요한 유리아미노산으로 나타났다.

- 발효차의 총 유리아미노산 함량은 모차에 비해 현저히 감소하는 경향을 보였는데 그 중에서도 중국산 모차로 제조한 발효차가 가장 많이 감소한 것을 알 수 있었다.
- 본 연구 그룹에 의해 제조된 차에 있어 모차로부터 제조된 미생물발효차의 당 함량은 발효 후에 감소되는 경향을 보였으며, 특히 fructose와 glucose에 있어서 그 경향이 명확함을 알 수 있었다.
- 본 연구 그룹에 의해 제조된 차에 있어 lactose는 모차에서 검출되지 않았으나 발효 후에 검출되는 특징을 보였다.
- 중국산 모차로 제조한 발효차의 경우 성숙한잎(저급)보다 어린잎(고급)으로 제조한 미생물발효차의 rat blood plasma의 CE-OOH 생성 억제능이 더 높았다. 즉 미생물발효차는 성숙한 잎보다 어린잎을 이용하는 것이 기능성 측면에서 바람직하다고 판단된다.
- 미생물발효차의 보존기간은 rat blood plasma의 CE-OOH 생성 억제능에 일관성 있는 경향이 관찰되지 않았다.
- 차에 함유된 tocopherol류들은 그 chroman환의 수산기에 미지의 화합물이 ester 결합되어 있을 가능성이 시사되었다.
- 미생물발효차의 보존기간이 오래된 차일수록 tocopherol류의 함량이 감소됨을 알 수 있었다.
- 국내산 미생물발효차 대부분에 있어 tocopherol류 및 tocopherol ester 결합형 모두 모차에 비해 낮은 함량을 보였다.
- 중국산 미생물발효차의 경우 저급차는 보존기간이 오래될수록 δ -tocopherol 함량이 낮아짐에 반해, 고급차는 보존기간이 오래되어도 δ -tocopherol의 함량이 거의 감소되지 않았다. 즉 δ -tocopherol 함량은 미생물발효차의 보존기간 평가의 지표로의 응용가능성이 높다고 시사되었다.
- 미생물발효차 모두 시료 무처리군에 비하여 농도 의존적으로 L-citrulline 생성능을 억제하였으며, 본 연구그룹에 의해 제조된 7종의 미생물발효차 중 국내 재래종으로 제조된 미생물발효차가 중국산 모차로 제조한 발효차보다 높은 억제활성을 보였으며 국내 재래종을 원료로 미생물발효차를 개발하였을 때 L-citrulline 생성억제 작용이 우수한 발효차로 개발할 수 있는 가능성이 제시되었다.

- 1차년도 연구결과, 미생물발효차의 심혈관계 효과를 갖는 기능성분으로 존재할 가능성이 제시된 statin화합물에 대하여 본 연구그룹이 직접 제조한 미생물발효차 안에서의 존재 여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 Compactin-H와 Lovastatin-H의 존재가 확인되었으며 중국 모차로 제조된 미생물발효차보다 우리나라 재래종으로 제조된 미생물발효차가 statin 화합물의 함량이 높음을 확인할 수 있었다.
- 다양한 중국산 미생물발효차 완제품의 분석 결과, 고급차일수록 methyl caprate 함량이 낮고 저급차일수록 높은 경향을 보였다. 즉 methyl caprate는 미생물발효차의 품질평가지의 활용가능성이 매우 높다고 판단되었다.
- 대부분의 모차에서는 methyl caprate가 미량 존재하거나 검출되지 않았음에 비해, 그들을 원료로 하여 제조된 미생물발효차 모두에서는 methyl caprate가 모차보다 증가되어 검출되었으며 국내 재래종으로 발효한 경우 methyl caprate의 생성이 가장 적게 생성되는 경향을 보여 국내 재래종을 이용한 고품질 미생물발효차의 개발 가능성이 제시되었다. 또한 추후 미생물발효차를 산업화 할 경우 methyl caprate가 생성되지 않거나 미량인 차가 제조되도록 하는 것이 바람직 할 것으로 생각되었다.
- 미생물발효차는 식품위해 요소 가능성이 높은 aflatoxin과 ochratoxin의 분석법을 확립하고 본 연구과정에서 제조된 미생물발효차를 대상으로 aflatoxin과 ochratoxin의 존재 여부를 모니터링 한 결과, 국내산 찻잎과 외국산 찻잎으로 제조된 미생물발효차 7종 모두 aflatoxin과 ochratoxin이 검출되지 않았다.

3. 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조기술 확립 및 이화학적 특성 분석

가. 재료 및 방법

(1) 실험재료

- 국내산 찻잎으로는 국내 자생종인 재래종(소엽종) 품종의 찻잎을 보성군 일대 다원에 서 5월말, 6월말, 7월말에 직접 채취하여 미생물발효차 제조 원료로 사용하였다. 채취한 찻잎은 전통적인 모차 제조 방식인 살청, 유념, 건조과정을 거쳐 모차를 제조한 후 통기가 잘되는 창고에 보관하면서 실험재료로 사용하였다.
- 비교구로 사용된 중국산 모차는 중국 운남성에서 5월말 대엽종 찻잎을 채취하여 일반적인 모차 제조법으로 가공한 것을 중국 현지로부터 구입하여 사용하였다.
- 미생물 거동을 측정하기 위한 시료는 발효를 진행시키면서 각 단계별로 상부, 중심부, 하부에서 골고루 채취하여 바로 사용하였으며 성분변화 및 관능평가 측정용 시료는 -80℃에 저장하면서 실험에 이용하였다. 실험에 사용된 미생물발효차의 제조 조건은 Table 3-1에 나타내었다.

Table 3-1. Manufacturing conditions of microbial fermented teas used in this study.

Sample	Material	Fermentation Conditions		
		Types	Conditions	Periods
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회

SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+,35	7일×4회
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+,45	7일×4회
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회

(2) 실험방법

(가) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조

- 미생물발효차의 최적 발효조건을 탐색하기 위해 소엽종 및 대엽종 찻잎으로 제조한 모차를 이용하여 다양한 발효조건(Table 3-2)에 따른 각각 미생물발효차를 제조하였다.
- 발효온도는 온도가 조절되는 밀폐형 항온상자를 사용하여 조절하였으며 수분함량은 모차 자체의 수분함량을 측정한 후 부족한 수분을 계산하여 물을 첨가하여 섞어 주었다.
- 발효시킬 모차의 양(건조중량)은 항온상자 부피의 발효를 2000분의 1 중량(항온상자 부피가 6L 일 때 건조된 모차 300g을 사용)진행하면서 3일 또는 5일 또는 7일에 한번씩 3회 또는 5회 또는 7회 또는 10회 뒤섞기를 수행하여 발효를 진행하였다.

Table 3-2. Fermentation conditions for microbial fermented tea

품종 : 소엽종(<i>C. sinensis</i> var. <i>sinensis</i>), 대엽종(<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>)			
발효 조건			
채엽시기	5월, 6월, 7월	뒤섞기 기간(일)	4, 5, 7
온도(°C)	35, 45, 50, 55	뒤섞기 횟수(회)	3, 5, 7, 10
수분(%)	35, 40, 45, 50	발효기간(일)	20, 21, 25, 28, 35, 42, 50

(나) 제조된 미생물발효차의 관능평가

- 미생물발효차의 관능평가는 국내 미생물발효차 애호가 중 선발하여 훈련시킨 12 명의 패널에 의하여 실시되었다. 중국의 미생물발효차 관능평가 프로토콜에 의거 시료 3 g을 150 mL의 품평배에 넣고 90°C의 물로 한번 세척한 다음, 다시 90°C의 물로 5분간 우린 다음 품평컵에 옮겼다.
- 각각의 패널들에게 당색, 향기, 맛 등의 항목에 대하여 매우 좋지 않다 1점, 매우 좋다를 10점으로 한 10점법으로 채점하게 하였다. 각 점수의 통계적 처리는 SPSS V.12 로 하였으며, P-value < 0.05을 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means ± S.D 로 하였다⁵⁾.

(다) 미생물발효차의 발효과정 중 주요 미생물의 거동

① 차액도말 및 균수 Counting

- 각각의 찻잎을 이용하여 발효를 진행시키면서 채취한 검체 시료 1 g에 멸균수 10 mL을 첨가하여 균질화 시킨 시료액을 분리원으로 하여 10배, 100배, 1000배 이상으로 희석한 후 200 µL씩 배지에 도말 및 접종 하였다.
- 분리 배지로는 potato dextrose agar (PDA, Potato Starch (from infusion) 4 g/L, Dextrose 20 g/L, Agar 17 g/L, pH 5.6 ± 0.2)를 사용하였으며, 28°C에서 4 일간 배양 후 형성된 주요 생육미생물을 각각 Counting하였다.

(라) 이화학적 특성 및 일반성분 분석 방법

① 총질소

- 미생물발효차의 총 질소 함량은 변형한 AOAC 법⁴⁾을 이용하여 측정하였다. 즉 발효차 시료 0.5 g과 분해촉진제 2 g을 분해튜브에 넣고 황산 15 mL를 가하여

405°C에서 1시간 40분간 분해한 후 킬달질소측정기구 (PRO-Nitro II, J.P. Selecta, Spain)를 이용하여 증류하였다. 증류액은 0.1 N-H₂SO₄로 적정하여 계산하였다.

② 색도

- 미생물발효차의 찻잎과 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후 여과한 추출액을 Color spectrophotometer (CM-3500d, Minolta Co Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 L*, a*, b*값을 각각 측정하였다.

③ pH 및 총산도

- 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후 여과한 여액을 pH meter (Model 8000, ORION, USA)를 이용하여 pH를 측정하였고 적정산도는 pH를 측정한 추출액 중 20 mL를 취하여 중화에 필요한 0.1 N-NaOH용액 소비량을 측정한 후 malic acid로 환산하여 나타내었다.

④ 가용성 고형분

- 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후 여과한 차 증류수 추출액을 Refractometer(PR-1, ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

⑤ 총당

- 미생물발효차의 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후 여과한 추출액 2 mL를 취하여 5% phenol 1 mL을 첨가하고, 95% H₂SO₄ 5 mL을 가하여 강하게 혼합시킨 후 30분 동안 상온 발색하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 25~100 µg/mL 농도의 glucose standard curve로부터 총당을 환산하여 glucose 농도로 시하였다.

⑥ 총유리아미노산

- 미생물발효차의 찻잎 시료 2 g을 증류수 100 mL로 80°C에서 5분간 추출한 후 여과한 추출액 100 µL를 96-well plate에 취하여 75 µL의 ninhydrin color reagent를 가하고 80°C의 Incubate에서 30분간 발색시켰다. 실온으로 방냉한후

100 μ L의 50% ethanol을 가하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 0~200 μ M 농도의 glycine standard curve로부터 총유리아미노산을 환산하여 실험하였다.

⑦ 불소

- 차 분말 1 g을 삼각플라스크에 넣고 증류수 50 mL를 가하여 80°C의 항온수조에서 4시간 동안 추출한 후 Whatman filter paper (Whatman No. 1)로 여과하였다. 여과한 추출액은 감압회전농축기 (WB 1200, Heidolph, Germany)로 대량 날려 보내 농축한 뒤 10 mL로 정용하여 이온크로마토그래피 (DX-600 IC system Dionex Co., USA)를 이용하여 분석하였다. Column은 IonPac AS18 Analytical, 4×250 mm (Dionex, Sunnyvale, USA)을 이용하였고 용매는 28 mM KOH를 사용하였으며 분당 1.0 mL의 흐름 속도를 유지시켰다.

⑧ 데아닌

- 차 분말 1 g을 삼각플라스크에 넣고 증류수 50 mL를 가하여 80°C의 항온수조에서 4시간 동안 추출한 후 Whatman filter paper (Whatman No. 1)로 여과하였다. 여과한 추출액은 감압회전농축기 (WB 1200, Heidolph, Germany)로 대량 날려 보내 농축한 뒤 10 mL로 정용하여 액체크로마토그래피 (LC-10 Avp Shimadzu Co., JAPAN)를 이용하여 분석하였다. Column은 Phenomenex Luna 5 μ C18, 150×4.6 mm을 이용하였고 용매는 Water/Acetonitrile = 95:5 (v/v) 사용하였으며 분당 1.0 mL의 흐름 속도를 유지시켜 205 nm에서 검출하였다.

⑨ 통계처리

- 가공방법을 달리하여 제조한 미생물발효차의 총질소 함량 분석은 2회 반복하여 측정하였고, 영양성분인 불소와 데아닌 함량에 있어서는 1회 반복하여 측정하였으며 그 외의 모든 실험은 3회 반복실험을 실행하였다. 이상의 실험에서 얻어진 실험 결과는 SPSS 통계프로그램 ver 17.0을 이용하여 One Way ANOVA분석을 하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's mutiple test를 통해 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

(마) 특수 성분 분석

① Gallic acid 분석

- 시료 1 g에 60% MeOH 20 mL를 첨가한 후, 5분간 초음파 추출을 행한 다음, 얻어진 추출액을 여과(Millipore, 0.45 μ m)하여 HPLC 분석을 행하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

Table 3-3. HPLC conditions for analysis of gallic acid

Items	Conditions
Instrument	Shim-pack PREP-ODS (H) KIT, 4.6 \varnothing \times 250 mm (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Detector	SPD-20A (Shimadzu)
Wavelength	270 nm
Column temp.	40 $^{\circ}$ C
Flow rate	1 mL/min
Mobile phase	2% MeOH (containing 1% AcOH)

② Tocopherol류 분석 시료 조제 및 HPLC를 이용한 Tocopherol류 분석

- 시료 0.5 g을 취한 후 1% NaCl 0.5 mL와 3% pyrogallol 10 mL를 가하여 5분 동안 초음파 추출하였다. 다음 60% KOH 1 mL를 첨가한 후, 70 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 검화하였다. 검화가 끝난 후 실온으로 냉각하고, 1% NaCl 22.5 mL를 가한 다음, EtOAc/*n*-hexane = 1:9 (v/v) 혼합 용액 15 mL를 첨가하여 2회 반복하여 용매분획을 행하였다. 상층액을 취해 농축 후, *n*-hexane 4 mL에 용해시켜 20 μ L를 HPLC로 분석하였다. Silica-column (Kromasil 100-5SIL, 4.6 \varnothing \times 250 mm, Kromasil)이 장착된 HPLC (LC-20AD, Shimadzu)에 의하여 ex 290 nm, em 330 nm (Detector, fluorescence, RT-10AXL Shimadzu)에서 분석하였다. 그 분석 조건은 다음과 같다.

Table 3-4. HPLC conditions for analysis of tocopherols

Items	Conditions
Instrument	Kromasil 100-5SIL, 4.6 \varnothing \times 250 mm, Kromasil
Detector	fluorescence, RT-10AXL (Shimadzu)
Wavelength	ex 290 nm, em 330
Flow rate	1.6 mL/min
Mobile phase	<i>n</i> -hexane/EtOAc/AcOH=97.3:1.8:0.9 (v/v)

③ 휘발성 성분 분석(methyl caprate 분석)

- 분쇄한 각각의 차 시료 1 g에 내부표준물질(butyl benzene, 180 µg/60 µL MeOH)을 첨가한 다음, headspace가 장착된 GC-MS를 사용하여 다음 에 나타낸 바와 같은 분석조건을 이용하여 휘발성 성분을 분석하였다. 시판 휘발성 성분 32종의 표준품들을 MeOH에 각각 용해하여 각 성분 10 µg 상당량을 취하여 혼합한 다음, 표준품들의 GC-MS 분석에 이용하였다. GC-MS 분석조건은 다음 에 나타내었다.

Table 3-5. GC-MS conditions for analysis of methyl caprate

Items	Conditions
Instrument	GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column	HP-INNOWAX (Crosslinked Polyethylene Glycol) 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm (Agilent, USA)
Carrier gas	He (1.0 mL/min)
Temperature	60°C (10 min) → 200°C, 2°C/min
Ionizing voltage	70 eV
Accelerating voltage	1.21 kV
Scanning range	<i>m/z</i> 40-500
Headspace	HT3 Dynamic Headspace (Teledyne instruments, USA), heating temp. 250°C (2 min)

(바) 기능성 평가

① 항산화 (L-citrulline 생성 억제) 작용

- L-citrulline의 측정은 chromogenic reagent를 이용한 Boyde & Rahmatullah 등⁸⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, 배양액 450 µL와 chromogenic reagent 용액 450 µL를 섞고 heating blot에서 heating(100°C, 10min)한 후 방냉하여 UV/VIS Spectrophotometer 530nm에서 absorbance를 측정하였다.

② Statin 화합물 (항콜레스테롤 기능성분) 탐색

- 2차년도 연구 결과인 국내산 차잎을 이용한 한국산 미생물발효차 제조공정 검토 및 이화학적 특성 분석 연구에서 구입 및 합성하여 얻은 Statin 유도체를 이용하여 전년도 연구와 동일한 방법으로 분석하였다.

- 즉, 시료 50 g에 100% MeOH 1 L를 넣고 homogenization (12,000 rpm, 5 min) 한 후 1 hr 동안 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 2로 여과한 후 감압농축하여 100% MeOH 추출물을 얻었다. 이 추출물 중 시료 10 g에 해당하는 MeOH 추출물을 2 mL의 MeOH로 용해하여 Sep-pak (Waters C₁₈ Cartridge, 12 cc)에 charge한 후 solid-phase extraction 정제하였다. Sep-pak내에 추출물을 전부 흡착시킨 후 질소가스를 이용해 Sep-pak 내의 MeOH 증발시켰다. 여기에 100% H₂O를 흘려보내주어 흡착되지 않는 성분을 세척하였다. Sep-pak에 흡착된 성분은 100% MeOH을 가하여 색의 변화가 없을 때까지 충분히 용출하였다. 용출된 100% MeOH 획분을 감압농축 한 후 MeOH 1 mL로 용해하고, 0.20 µm syringe filter로 여과한 후 HPLC 분석을 실시하였다. Statin 분석에 사용된 시료의 양은 전체 volume의 1/20 (50 µL)을 injection하였다.

Table 3-6. HPLC conditions for analysis of Statins

Item	Conditions
Instrument	Waters Autosampler(LC module I plus)
Column	Waters C ₁₈ Bondapak TM 3.9×150mm
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile Phase	Acetonitrile/1%Acetic acid (55:45, v/v)
UV detector	237 nm

(사) 곰팡이 독소 분석

① Aflatoxin 분석

- 시료 20 g를 취하여 70% methanol 100 ml(1% NaCl포함)를 넣고 진탕기로 3분간 교반하여 얻은 추출액을 여과지(Whatman paper NO.1)로 여과하였다. 여액에 동량의 증류수를 첨가한 다음 10 mL를 취해 immunoaffinity column에 2drop/sec의 유속으로 용출시켰다. 증류수 10 mL로 세척하고, acetonitrile 3 mL로 용출시킨 후 질소로 농축하였다. 이 농축액에 Trifluoroacetic acid 100 µL를 넣어 aflatoxin를 유도체화 시킨 후 HPLC 이동상 용매(25% acetonitrile) 1.9 mL

를 주입하여 용해시키고 0.45 μ m필터를 통과시켜 HPLC 분석조건용 시료 용액으로 사용하였다.

Table 3-7. HPLC conditions for analysis of aflatoxin

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Phenomenex Luna 5u C ₁₈
Flow late	1.0 mL/min
Mobile Phase	25% acetonitrile
Detector	Fluorescence detector (Ex 360 nm, Em 418 nm)

② Ochratoxin 분석

- 시료 20 g에 70% aetonitrile 100 mL에 넣고 3분간 균질화하여 얻은 추출액을 여과하였다. 여과액 4 mL을 PBS용액 44 mL과 혼합한 후 immunoaffinity column에 통과시켰다. column을 증류수 10 mL로 세척한 후 methanol 2 mL로 용출시키고 질소로 농축하였다. 이 시료를 500 μ L boron trifluoride methanol을 넣어 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 유도체화 한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

Table 3-8. HPLC conditions for analysis of ochratoxin

Item	Conditions
Instrument	SHIMADZU HPLC
Column	Phenomenex Luna 5u C ₁₈
Flow late	1.0 mL/min
Mobile Phase	water/acetonitrile/acetic acid=5:5:0.1(v/v)
Detector	Fluorescence detector (Ex 333 nm, Em 460 nm)

나. 결과 및 고찰

(1) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조

- 현재 미생물발효차의 제조에 주로 사용되는 일반적인 발효법은 습식발효이며 과정은 다음과 같다.
- 보통 10톤 정도의 모차를 쌓아놓고 물을 적당히 뿌린 후 물에 적신 천으로 덮는다(약퇴, 퇴적). 발효가 진행되면서 내부 온도가 60℃ 이상이 되면 쌓아놓은 찻더미의 내부와 외부로 서로 섞어서 발효 온도를 내려주고 통기를 시킨다(번퇴, 뒤섞기). 이러한 조작을 반복하면서 보통 1달에서 3달 정도 발효시킨 후 수분함량이 10~15% 정도가 될 때까지 건조하여 완성한다.
- 이러한 발효법은 시간이 단축된다는 장점이 있지만 발효 온도와 습도를 컨트롤 하기 어렵고 이마저 기술자의 감각에 의하여 조절한다는 단점이 있다. 또한 온도와 습도를 유지하기 위하여 수톤 이상의 대량의 모차를 한꺼번에 쌓아서 발효를 진행하기 때문에 소규모의 미생물발효차의 제조가 불가능하며 품질 균일화를 이루기 어렵다는 단점이 있다. 또한 중국의 보이차를 비롯한 대부분의 미생물발효차는 대엽종 찻잎(*Camellia sinensis* var. *assamica*)을 원료로 제조되고 있으나 우리나라의 거의 대부분 소엽종의 찻잎(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)이다.
- 따라서 여기에서는 우리나라에서 생산되는 소엽종 찻잎을 원료로 하면서도 중국을 비롯한 대부분의 미생물발효차 생산국에서 사용하고 있는 발효방법의 문제점을 해결하기 위하여 발효온도, 수분함량, 발효기간, 뒤섞기 기간 및 횟수 등을 달리한 다양한 조건에서 발효를 진행한 후 제조한 미생물발효차를 대상으로 관능평가 및 가능성을 확인함으로써 미생물발효차의 최적 발효조건을 확립하고자 하였다.
- 즉, 살청(뒤음)->유념(비비기)->햇빛건조 제조과정을 통해 가공한 모차(원료)에 원하는 수분함량이 되도록 증류수를 첨가하고 포(布)로 덮은 다음 적정한 온도와 습도가 유지된 발효기에서 발효 하였다. 발효가 완료된 미생물발효 산차의 수분함량은 10%이하가 되도록 실내에서 건조(탄량)한 후 체를 이용하여 미생물 포자 및 부서진 차, 차 덩어리 등을 분리 하였다.



Fig. 3-1. Manufacturing process for Korean microbial fermented tea

(2) 관능평가단 구성 및 제조된 미생물발효차의 관능평가(관능평가단 구성)

- 관능평가 방법 : 차의 특성을 미각, 시각, 후각으로 측정
- 관능평가 횟수 : 5회(2010. 09. ~ 2011. 04.)
- 관능평가 장소 : 혜산초당(서울 인사동)
- 패널 선정 : 미생물발효차에 대한 전문지식과 경험이 있는 12명



Fig. 3-2. Pictures of microbial fermented tea show and discussion meeting

Table 3-9. members of sensory evaluation team

No.	Name	Career and Social activity
1	강○○	<ul style="list-style-type: none"> · 동양화가: 개인전 9회 · 난과 생활, 월간다도 발행인
2	김○○	<ul style="list-style-type: none"> · (사)한국차문화협회 사무처장 · 한국 차학회 상임이사
3	김○○	<ul style="list-style-type: none"> · 저서)중국차의 이해,중국차의 세계 · 명가원 및 혜산초당 대표
4	강○○	<ul style="list-style-type: none"> · 차(茶)동호회 차사랑 대표 · 제주 다드림 대표
5	김○○	<ul style="list-style-type: none"> · 사)한국전례연구원 부원장 · Tea world 위원장
6	안○○	<ul style="list-style-type: none"> · 조계사 문화강좌 다도반 원장
7	추○○	<ul style="list-style-type: none"> · 중국 광둥성 동방명주학교, 한림자마학교 유학생 생활관리 이사 · 다도반 강사
8	오○○	<ul style="list-style-type: none"> · 한국차문화협회사법과정, 중국차 강사 · 동양 차예 연구소 소장
9	박○○	<ul style="list-style-type: none"> · 보이차 전문가 · 보이차, 운남보이차 등 역자
10	관 ○	<ul style="list-style-type: none"> · 전남 고흥 재석사 주지 · 보이차 전문가
11	장 ○	<ul style="list-style-type: none"> · 중국 운남농업대학 보이차학과 석사 · 미생물발효차 연구자
12	손○○	<ul style="list-style-type: none"> · 목포대학교 국제차문화학과 박사과정 · 미생물발효차 연구자

(3) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 발효조건 탐색

- 국내산 소엽종 찻잎을 이용하여 발효온도, 모차의 수분함량, 발효 균주, 발효방식 등을 달리한 다양한 조건에서 미생물발효차를 제조한 후 관능평가단에 의한 관능적 평가를 지표로 하여 미생물발효차를 제조하기 위한 최적의 발효조건을 탐색하였다.

(가) 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효온도 및 수분함량 탐색

- 발효 factor 중 최적 발효온도와 수분함량을 탐색하기 위해 6월에 채취한 국내산 소엽종(*C. sinensis* var. *sinensis*) 찻잎으로 제조한 원료(모차)를 발효 온도 35℃에서 55℃ 까지(35, 45, 50, 55℃), 수분함량 30%에서 50% 까지(30, 40, 45, 50%) 각각 조건을 다르게 하여 35일(뒤집기 기간 7일 × 뒤집기 횟수 5회)동안 발효하여 관능평가 하였다.
- 그 결과, 색, 맛, 향 모두 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 발효하였을 때 가장 우수하였다.

Table 3-10. Sensory evaluation result of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by variable temperatures and water contents

Sample	발효조건	Sensory characters		
		Color	Taste	smell
SF-10	35℃,30%, 7일×5회	4.00±1.76 ^{ab}	4.40±1.71 ^{ab}	4.00±2.00 ^{ab}
SF-11	35℃,40%, 7일×5회	3.90±2.13 ^{ab}	4.00±1.89 ^a	3.70±2.26 ^a
SF-12	35℃,50%, 7일×5회	3.10±2.18 ^a	3.50±1.78 ^a	3.70±2.06 ^a
SF-13	45℃,30%, 7일×5회	5.70±1.34 ^b	6.00±1.49 ^c	3.70±2.06 ^a
SF-14	45℃,40%, 7일×5회	8.80±1.14 ^d	7.20±1.14 ^c	7.10±1.10 ^c
SF-15	45℃,50%, 7일×5회	7.60±1.58 ^c	6.30±1.64 ^c	5.50±1.84 ^b
SF-16	55℃,30%, 7일×5회	5.50±1.65 ^b	5.80±2.20 ^b	6.10±1.45 ^c
SF-17	55℃,40%, 7일×5회	6.30±1.89 ^{bc}	6.70±1.34 ^c	6.40±1.26 ^c
SF-18	55℃,50%, 7일×5회	5.20±1.55 ^b	6.60±1.90 ^c	6.10±1.79 ^c

* All value are mean±SD

** Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c<d

(나) 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효기간 탐색

- 발효 factor 중 최적의 발효기간을 탐색하기 위해 Table 3-10, Fig. 3-2에서 선택된 발효온도 및 수분함량 조건인 발효온도 45℃, 수분함량 40%으로 고정시키고 6월 채취한 한국산 소엽종(*C. sinensis* var. *sinensis*) 원료(모차)를 발효 기간 및 뒤섞기 횟수를 달리하여 제조한 발효차의 관능평가를 실시하였다.
- 그 결과, 색은 5일×4회(20일)가 8.95로 가장 좋았으며 그 다음으로 7일×5회(35일)이 8.60으로 좋았다. 맛은 7일×5회(35일)이 6.30으로 가장 좋았으며 그 다음으로 7일×4회(28일)이 6.50으로 좋았다. 향은 7일×4회(28일)이 6.80으로 가장 좋았으며 그 다음으로 7일×5회(35일)이 6.50으로 좋았다.
- 이상의 결과를 볼 때, 색, 맛, 향의 최고점수를 받은 발효차는 각각 달랐지만 7일×5회(35일)의 조건으로 발효한 발효차의 경우 각 분야에서 최고점을 받거나 최고점을 받은 발효차와 큰 차이 없이 고르게 높은 평가를 받는 것으로 확인되어 7일×5회(35일)의 조건이 가장 바람직한 것으로 판단되었다.

Table 3-11. Sensory evaluation result of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by various fermentation periods and overturn pill

Sample		Sensory characters		
		Color	Taste	smell
SIN-1	45℃,40%, 5일×4회	8.95±1.51 ^c	5.87±1.84 ^a	6.00±1.41 ^a
SIN-2	45℃,40%, 5일×5회	7.52±1.70 ^b	5.97±1.96 ^a	5.60±1.56 ^a
SIN-7	45℃,40%, 7일×3회	8.00±1.15 ^{bc}	5.90±1.66 ^a	6.30±1.16 ^a
SIN-8	45℃,40%, 7일×4회	7.40±1.17 ^b	6.20±1.48 ^a	6.80±1.14 ^a
SF-14	45℃,40%, 7일×5회	8.60±1.26 ^c	6.30±1.57 ^a	6.50±0.97 ^a
SIN-9	45℃,40%, 7일×6회	5.50±1.25 ^a	4.00±1.82 ^a	5.70±1.21 ^a
SF-20	45℃,40%, 10일×5회	8.24±1.15 ^{bc}	6.40±1.49 ^a	6.10±1.10 ^a

* All value are mean±SD

** Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c

(다) 중국산 대엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 제조

- 한국산 소엽종(*sinensis* 종) 찻잎을 이용하여 미생물발효차를 제조하기 위한 발효 factor 중 최적 발효온도와 수분함량을 탐색하기 위해 대조구로써 중국산 대엽종 (*C. sinensis* var. *sinensis*) 찻잎으로 제조한 원료(모차)를 소엽종의 경우와 동일하게 발효 온도 35℃에서 55℃ 까지(35, 45, 50, 55℃), 수분함량은 30%에서 50% 까지(30, 40, 45, 50%) 조건을 각각 다르게 하여 35일(뒤집기 기간 7일 × 뒤집기 횟수 5회)동안 자연 발효하여 관능평가 하였다.
- 그 결과, 대엽종 찻잎을 사용하는 경우에도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 비교적 좋은 평가를 받았으나 색의 경우를 제외한 맛, 향 부분에서 다른 조건의 경우가 뛰어난 평가를 받아 소엽종 찻잎으로 제조한 경우와 같은 확실한 경향이 나타나지 않았다.

Table 3-12. Sensory evaluation result of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *assamica* manufactured by variable temperatures and water contents

Sample	발효조건	Sensory characters		
		Color	Taste	smell 1
SF-01	35℃,30%, 7일×5회	4.00±1.94 ^a	3.40±2.46 ^a	3.40±1.78 ^a
SF-02	35℃,40%, 7일×5회	3.50±1.78 ^a	3.20±2.57 ^a	3.20±1.40 ^a
SF-03	35℃,50%, 7일×5회	3.30±2.00 ^a	2.90±2.18 ^a	3.40±1.51 ^a
SF-04	45℃,30%, 7일×5회	6.40±1.78 ^b	6.00±2.36 ^b	6.20±2.20 ^b
SF-05	45℃,40%, 7일×5회	8.50±1.58 ^c	6.10±1.73 ^b	6.60±2.55 ^b
SF-06	45℃,50%, 7일×5회	7.20±1.62 ^{bc}	5.90±1.91 ^b	5.60±1.96 ^b
SF-07	55℃,30%, 7일×5회	4.80±1.62 ^{ab}	6.00±2.00 ^b	6.10±2.18 ^b
SF-08	55℃,40%, 7일×5회	5.00±1.56 ^{ab}	6.00±2.11 ^b	6.60±1.84 ^b
SF-09	55℃,50%, 7일×5회	6.10±1.52 ^b	6.30±2.41 ^b	6.50±1.51 ^b

* All value are mean±SD

** Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c<d

(라) 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성 탐색

- 이상의 실험결과 한국산 소엽종을 사용하여 미생물발효차를 제조하는 경우, 발효 온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 발효시키는 것이 가장 바람직한 것으로 나타났다. 그러나 모차 및 공기 중에 자연적으로 존재하는 미생물을 이용하는 자연 발효의 경우 항상 똑 같은 제품을 생산하기 어려워 산업화에 문제가 될 수 있다고 판단되었다.
- 따라서 확보된 다양한 균주를 접종하여 발효 시킨 후 제조된 발효차를 대상으로 관능평가 및 이화학적 분석을 실시하여 균주 접종에 의한 미생물발효차의 생산 가능성을 탐색하였다.

- 1차, 2차년도 연구기간 동안 국내외 다양한 미생물발효차 완제품, 미생물 발효과정 및 저장과정 중 시료(총 896 종)로부터 총 57종의 미생물을 분리, 동정하였으며 이 중 검출빈도수를 고려하여 미생물 발효차 발효시험 후보균주로 15종을 선택하였다.

분류	저장기간	시료수
청병 (자연발효)	10년이하	4
	10년~20년	3
	20년~40년	2
	40년이상	4
숙병 (속성발효)	10년이하	36
	10년~20년	4
	20년~40년	2
	40년이상	3
발효공정	발효 초기	298
	발효 중기	260
	발효 후기	280
총시료수		896

- 발효 후보균주 15종 중, 중국의 미생물 발효차 제조과정 중 검출되는 미생물(MFT-36, 7종, *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Penicillium* G051, *Penicillium* G121, *Penicillium* C091, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011), 중국의 제조과정 및 국내 제조과정 중에 주로 검출되는 미생물(MFT-37, 4종, *Aspergillus* N091, *Penicillium* G121, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011), 중국의 제조과정 및 국내 제조과정 중에 비교적 높은 빈도로 검출되는 미생물(MFT-39, 15종, *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Aspergillus* T011, *Penicillium* G051, *Penicillium* C151, *Penicillium* G121, *Lichtheima* R011, *Penicillium* C091, *Rhizopus* S201, *Debaryomyces* H011, *Candida* T181, *Rhodospiridium* P011, *Eurotium* C081, *Eurotium* C181), 논문상에 미생물발효차의 주요 미생물로 보고된 미생물(MFT-40, 4종, *Aspergillus* N091, *Penicillium* G051, *Rhizopus* S201, *Rhodospiridium* P011) 그리고 미생물발효차의 대표적 발효균주로 널리 알려져 있는 미생물(MFT-41, 1종, *Aspergillus* N091) 등을 선택하여 각각 접

종하였다.

- 국내산 소엽종 6월 모차를 가지고 균수(1, 4, 7, 15)를 다르게 하여 발효온도 45℃, 수분함량 40%, 발효기간 35일(뒤섞기 기간 7일, 뒤섞기 횟수 5회) 동안 발효하여 관능평가 하였다.
- 그 결과, 균주접종 없이 자연 발효 시켜 제조한 발효차(MFT-34) 보다 균주를 접종하여 제조한 발효차가 전반적으로 더 좋은 평가를 얻었으며 접종한 균주의 수가 많을수록 좋은 평가를 얻었다.
- 특히, 15종의 균주를 함께 접종하여 제조한 발효차(MFT-39)는 다른 발효차보다 월등히 좋은 평가를 얻어 발효차를 제조하는 경우 선발된 15종의 균주를 혼합하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

Table 3-12. Informations of selected microorganisms

scientific name	Picture	Source	Character
<i>Aspergillus</i> N091		중국산 숙병(6종)에서 검출 중국산 청병(1종)에서 검출 중국 미생물 발효과정(59종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(417종)에서 검출	최적 성장조건: 26℃ 중온고온균(45~50℃) 토양, 퇴비더미에서 발견
<i>Aspergillus</i> N092		국내 미생물 발효과정(201종)에서 검출	최적 성장조건: 27℃ 중온균(20~45℃) 유기산 생성균.
<i>Aspergillus</i> F211		중국산 숙병(6종)에서 검출 중국산 청병(1종)에서 검출 중국 미생물 발효과정(59종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(417종)에서 검출	최적 성장조건: 26℃ 중온고온균(45~50℃) 토양, 퇴비더미에서 발견
<i>Aspergillus</i> F212		국내 미생물 발효과정(5종)에서 검출	최적 성장조건: 26℃ 중온고온균(45~50℃)
<i>Penicillium</i> G051		중국 미생물 발효과정(11종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(105종)에서 검출	최근 동정된 균주 균주정보 없음

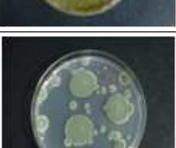
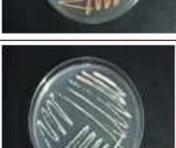
scientific name	Picture	Source	Character
<i>Rhizomucor</i> P211		국내 미생물 발효과정(417종)에서 검출	최적 성장조건: 25℃ 고온균(45~70℃ 생육가능)
<i>Absidia</i> R011		중국산 숙병(6종)에서 검출 중국 미생물 발효과정(13종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(164종)에서 검출	최적 성장조건: 24℃ 고온균(45℃ 이상에서 성장가능)
<i>Debaryomyces</i> H011		중국 미생물 발효과정(52종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(119종)에서 검출	최적 성장조건: 24℃ 내염성 산막효소(NaCl 20~24℃ 생육가능) 흙, 건조, 곡류 등
<i>Penicillium</i> G121		중국산 숙병(19종)에서 검출 중국 미생물 발효과정(5종)에서 검출	최적 성장조건: 24℃ 식물, 식품 부패균
<i>Penicillium</i> C091		중국 미생물 발효과정(35종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(82종)에서 검출	최적 성장조건: 26℃ 저장곡류에서 주로발견
<i>Rhizopus</i> S201		국내 미생물 발효과정(70종)에서 검출	검은빵곰팡이 15~80℃에서 생육.
<i>Aspergillus</i> T011		국내 미생물 발효과정(8종)에서 검출	최적 성장조건: 27℃ 간장, 된장 발효에 사용 Kojic acid 생산
<i>Penicillium</i> C151		중국 미생물 발효과정(21종)에서 검출 국내 미생물 발효과정(47종)에서 검출	최적 성장조건: 24℃ Ochratoxin 생성균주
<i>Rhodospori.</i> P011		국내 미생물 발효과정(7종)에서 검출	최적 성장조건: 24℃ Urea 생성균, 해양효모
<i>Candida</i> T181		국내 미생물 발효과정(4종)에서 검출	최적 성장조건: 27℃ 사람의 피부, 동물의 비강, 기도, 소화관에 많이 분포

Table 3-13. Sensory evaluation result of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by inoculation of various microorganisms

Sample	Sensory characters		
	Color	Taste	smell
MFT-36(7) ¹	6.750 ^b ± 2.121	6.000 ^a ± 2.204	7.000 ^b ± 2.449
MFT-37(4) ²	5.50 ^{ab} ± 1.604	5.250 ^a ± 2.053	5.750 ^{ab} ± 1.909
MFT-39(15) ³	8.625 ^c ± 1.506	6.525 ^a ± 1.126	7.000 ^b ± 2.138
MFT-40(4) ⁴	4.250 ^a ± 1.753	3.875 ^a ± 1.642	4.625 ^a ± 1.996
MFT-41(1) ⁵	4.250 ^a ± 1.282	4.250 ^a ± 1.389	3.750 ^a ± 2.315
MFT-34 ⁶	3.750 ^a ± 1.669	4.00 ^a ± 2.390	4.265 ^a ± 1.768

* All value are mean±SD

** Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c<d

1 : *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Penicillium* G051,

Penicillium G121, *Penicillium* C091, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011

2 : *Aspergillus* N091, *Penicillium* G121, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011

3 : *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Aspergillus* T011, *Penicillium*

G051, *Penicillium* C151, *Penicillium* G121, *Lichtheima* R011, *Penicillium*

C091, *Rhizopus* S201, *Debaryomyces* H011, *Candida* T181, *Rhodospordium*

P011, *Eurotium* C081, *Eurotium* C181

4 : *Aspergillus* N091, *Penicillium* G051, *Rhizopus* S201, *Rhodospordium*

P011

5 : *Aspergillus* N091

6 : Natural fermentation

(마) 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 원료 적합성 탐색

- 한국산 소엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 생산조건에서의 찻잎의 원료에 따른 차이를 알아보기 위하여 5월, 6월, 7월에 채취하여 제조한 국내산 모차(*C. sinensis* var. *sinensis*)와 중국에서 5월말에 채취한 찻잎으로 제조한 중국산 모차(*C. sinensis* var. *assamica*)를 이용하여 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 15종의 균주의 조합하여 접종하고 발효시켜 미생물발효차를 제조한 후 관능평가단에 의뢰하여 평가를 실시하였다.

- 그 결과, 7월에 찻잎을 채취하여 제조한 미생물발효차가 다른 시기에 채취한 찻잎을 원료로 한 미생물발효차보다 관능적으로 좋은 평가를 얻었다. 7월 이외의 찻잎으로 제조한 발효차들 사이에는 큰 차이가 없었다.
- 따라서 한국산 찻잎을 이용하여 미생물발효차를 제조하는 경우 5월에 채취한 고가의 어린 순을 이용하지 않고 상대적으로 저가인 7월말~8월초의 성숙한 찻잎을 이용하여 제조해도 관능적으로 우수한 발효차를 제조할 수 있을 것으로 판단되었다.
- 따라서 5월에 채취한 찻잎은 현재와 마찬가지로 녹차로 제조하고 현재 싼값의 티백차 또는 차음료로 가공되고 있는 7월 이후에 채취한 찻잎은 미생물발효차로 제조한다면 국내 찻잎의 활용성 증대와 부가가치에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되었다.
- 다만, 일부의 관능평가 위원들은 5월에 채취한 찻잎으로 제조한 발효차가 보다 순하고 고급스러운 맛이 난다는 의견을 제시하여 5월에 채취한 국내 찻잎을 이용하여 고급 미생물발효차를 제조하는 것도 시도해 볼 가치가 있다고 생각되었다.

Table 3-14. Sensory evaluation result of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by various harvest times

Sample	발효조건	Sensory characters		
		Color	Taste	smell
NFT-1	5월,45℃,40%,7일*5회	6.44 ^a ± 1.42	5.67 ^a ± 2.29	5.67 ^a ± 1.00
NFT-4	6월,45℃,40%,7일*5회	6.56 ^a ± 2.40	5.67 ^a ± 1.23	6.78 ^a ± 1.86
NFT-8	7월,45℃,40%,7일*5회	8.78 ^b ± 1.09	7.22 ^a ± 1.79	6.22 ^a ± 2.33
SF-05	중국,45℃,40%,7일*5회	7.20 ^{ab} ± 2.25	5.50 ^a ± 2.07	5.50 ^a ± 2.17

* All value are mean±SD ** Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c

(바) 국내산 차잎의 최적 발효방법 탐색

① 제조방법 및 관능평가

- 국내산 소엽종(*C. sinensis* var. *sinensis*) 6월 모차(원료)를 균주 15종 접종한 후 온도 변화하지 않고 35℃, 45℃ 각각의 발효온도 에서 계속 발효(SIN-13, 14)와 매주 35℃ 와 45℃ sample 을 섞어 35℃ 와 45℃에서 각각 발효(SIN-15, 16), 35℃ 와 45℃ 각각의 발효온도 에서 2주째 35℃ 와 45℃를 섞은 후 각각의 온도에서 28일 (뒤섞기 기간 7일, 뒤섞기 횟수 4회)동안 발효(SIN-17, 18)하여 제조한 6개의 sample 를 관능평가 하였다.
- 그 결과, 45℃에서 2주째 35℃ 와 섞은 후 45℃에서 1주, 35℃에서 1주 발효하여 28일 동안 발효된 경우 색(7.60)과 향(6.70)이 가장 좋았으며 매주 섞어 45℃에서 28일 동안 발효된 경우 향(6.20)이 가장 좋았다.
- 그러나 비교적 낮은 온도 35℃에서 28일 동안 발효된 경우 색(4.20), 향(4.90), 미(4.30)에서 낮은 평가를 받아 결과적으로 발효온도 45℃에서 발효된 미생물발효차 의 관능적 선호도가 가장 높은 것으로 판단되었다.

Table 3-15. Sensory evaluation result of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by different fermentation process

샘플명	원료	방식	조건	Sensory charactics		
				Color	Taste	smell
SIN-13	6월	접종(15종)	35-35	4.20 ^a ±2.14	4.90 ^a ±1.79	4.30 ^a ±1.83
SIN-14	6월	접종(15종)	45-45	6.10 ^{bc} ±1.66	5.70 ^{ab} ±1.42	4.90 ^{ab} ±2.08
SIN-15	6월	접종(15종)	+,+,+,35	5.80 ^b ±1.03	5.20 ^a ±1.75 ^a	5.00 ^{ab} ±1.70
SIN-16	6월	접종(15종)	+,+,+,45	7.40 ^c ±1.78	6.20 ^{ab} ±1.14	6.20 ^b ±1.87
SIN-17	6월	접종(15종)	35,+,35,45	7.30 ^c ±1.83	5.90 ^{ab} ±1.29	5.70 ^{ab} ±2.00
SIN-18	6월	접종(15종)	45,+,45,35	7.60 ^c ±0.96	6.70 ^b ±1.64	6.00 ^{ab} ±1.49

* All value are mean±SD

** Values within a column with different superscripts are significantly each groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test =a<b<c<d

(4) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차의 특수성분 분석

- 앞에서 기술한 지난 1, 2년차 연구결과인 1. 외국산 미생물발효차의 제조공정 및 이화학적 특성 분석과 2. 국내산 찻잎을 이용한 한국산 미생물발효차의 제조공정 검토 및 이화학적 특성 분석에서 외국산 미생물발효차 및 국내산 찻잎으로 제조한 미생물 발효차를 대상으로 다양한 성분 및 생리활성을 검토한 결과, gallic acid, tocopherol 류 및 저분자 휘발성 성분으로써 methyl caprate가 미생물발효차의 품질평가 지표로 활용될 수 있다고 판단하였다. 이에 본 연구에서는 다양한 발효조건에 의하여 제조된 국내산 미생물발효차의 품질 평가를 위해 미생물발효차의 gallic acid, tocopherol류 및 methyl caprate 분석을 행하였다.

(가) 미생물발효차의 gallic acid 분석

- 미생물발효차에 함유된 gallic acid를 분석한 전형적인 HPLC chromatogram의 예를 Fig. 3-3에 나타냈다. 미생물발효차에 있어서 gallic acid는 미생물 발효가 진행되어짐에 따라 다량 생성되어지는 대표적인 성분 중 하나이다⁶⁾. 또 본 연구의 1, 2년차 성과에 있어서도 gallic acid 함량이 미생물발효차의 품질과 상관성이 있음이 제시되었다. 따라서 여기에서는 국내산 찻잎을 이용하여 제조된 미생물발효차의 품질을 평가하기 위한 한 수단으로써 미생물발효차에 함유된 gallic acid 함량을 검토하였다.
- Gallic acid의 표준물질과 시료 SF-19의 chromatogram을 Fig. 3-3에 제시하였다. 시료들 중에는 gallic acid가 거의 검출되지 않은 것도 있었으며, 그와는 반대로 시료 100 g당 100~200 mg으로 다량 함유되어져 있는 것도 있었다. 1, 2차년도에 의하면, 중국에서 생산된 고급 보이차의 경우, gallic acid의 함량이 100 g 당 약 500 mg 이상 함유되어 있는 경우도 있었다²⁸⁾.
- 하지만 이는 차 재배지의 환경 및 재배 조건 등의 차이에 따른 현상일수도 있다고 판단되며, 특히 그들 시료는 차 제조 후 1년 또는 5년이 경과된 것들이었음을 고려하였을 때, 저장기간의 경과에 따라 gallic acid의 함량이 급격히 증가되어졌을 가능성이 이미 시사된 바 있다²⁸⁾.
- 그래서 본 연구로부터 제조된 차들에 있어 gallic acid의 함량이 중국산 발효차에

함유된 gallic acid의 함량보다 낮았던 것은 제조 후 저장 기간을 거치지 않았기 때문일 가능성도 고려되어야 할 것으로 판단되었다. 이와 같은 점들을 고려사항에 포함시켜 판단하더라도 본 연구에 의해 조제된 미생물발효차들에 있어 gallic acid의 함량 차이는 대단히 다양한 경향을 보였다(Table 3-16).

- 1, 2차년도의 성과에서도 제시하였듯이 미생물발효차의 gallic acid 함량은 차의 발효 정도를 나타내는 지표로 어느 정도 의미를 부여할 수 있다고 판단되었으며 gallic acid의 함량이 낮은 미생물발효차는 미생물에 의한 발효가 충분히 이루어지지 않았을 가능성이 있다고 판단되어 진다.

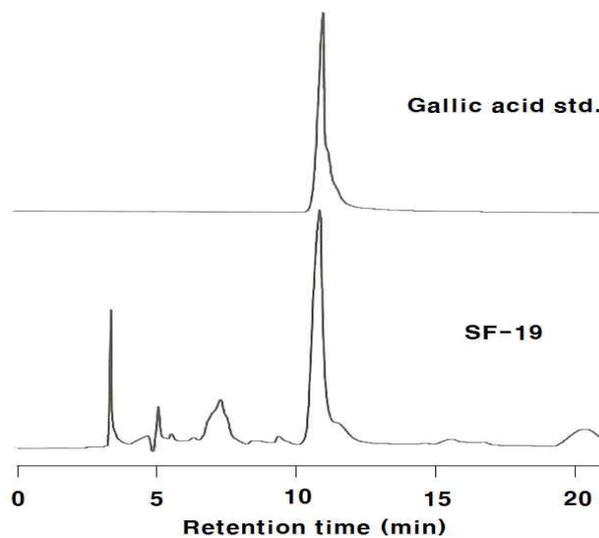


Fig. 3-3. HPLC chromatograms of gallic acid-like substance and sample(SF-19)

Table 3-16. Contents of gallic acid in microbial fermented tea

Gallic acid content (mg/100 g)	List of samples
~ 20 mg	SF-06, SF-10, SF-11, SF-12, SF-14, SF-15, SF-20, SIN-1, SIN-2, SIN-7, SIN-8, SIN-9, SIN-13, SIN-14, SIN-15, SIN-16, SIN-17, SIN-18
20~40 mg	NFT-4, MFT-26, MFT-37, MFT-39, MFT-41, SF-13, SF-16, SF-18
40~100 mg	NFT-1, MFT-40, SF-01, SF-03, SF-05, SF-07, SF-08, SF-09, SF-17
100~200 mg	NFT-8, SF-02, SF-04

- 시료 중에 함유된 gallic acid의 함량을 기준으로 시료들을 분류하여 Table 3-16에 제시하였다. Table 3-16에서 볼 수 있는 바와 같이 시료 100 g 당 40 mg 이상의 gallic acid가 검출된 시료는 12종으로써, 전체의 32%를 차지하였다. 즉 32%에 해당되는 시료들이 다른 시료들에 비해 상대적으로 비교적 미생물 발효가 양호하게 이루어진 것으로 판단되었다. 그리고 시료 100 g 당 100 mg 이상의 gallic acid 함량을 보인 시료는 총 3종으로 전체 시료의 8%에 해당되었다(Table 3-16). 즉 이 시료들은 gallic acid 함량을 기준으로 판단하였을 때 비교적 발효가 활발히 이루어진 차들로 분류되어질 수 있을 것인 반면 시료 100 g 당 20 mg 이하의 gallic acid 함량을 보인 시료는 총 14종으로, 전체 시료의 37%에 해당되었다. 즉 이 시료들은 gallic acid 함량을 기준으로 판단하였을 때, 발효 정도 낮은 차들일 가능성이 시사되었다.
- 이하, 제조된 시료들의 제조 방법과 차의 품질을 gallic acid 함량을 기준으로 검토하였다.

① 국내산 소엽종 찻잎을 원료로 발효온도 및 수분함량, 발효기간을 달리하여 제조한 미생물발효차의 gallic acid 함량

- 6월에 채취한 국내산 소엽종 찻잎을 원료를 이용하여 다양한 온도(35, 45, 55℃)와 다른 수분함량 (30, 40, 50%) 조건으로 발효시킨 시료(SF-10~18)에서는 45℃, 30% 조건으로 발효된 시료(SF-13)와 55℃에서 발효된 시료(SF-16, 17, 18)에서 100 g 당 40 mg 이상의 gallic acid 함량을 나타내어 미생물에 의한 발효가 신속히 진행되었음이 시사되었다(Fig. 3-4).
- 반면, 35℃에서 발효된 시료(SF-10, 11, 12)에서는 gallic acid가 거의 검출되지 않아 발효가 충분히 진행되지 않았던 것으로 생각되었다. 또한 관능적 기호도가 높았던 45℃, 40%의 조건과 45℃, 50%에서 조건에서 발효된 시료(SF-14, 15)의 경우 35℃에서 발효된 시료(SF-10, 11, 12)보다는 gallic acid 함량이 높았으나 55℃에서 발효된 시료(SF-16, 17, 18)보다는 함량이 낮아 gallic acid의 함량이 지나치게 높거나 낮을 경우 관능적으로 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 것으로 생각되었다(Fig. 3-4).

- 국내산 소엽종 차잎의 최적의 발효기간을 탐색하기 위해 6월에 채취한 국내산 소엽종 차잎을 원료를 이용하여 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 기간 및 뒤섞기 횟수를 달리한 시료(SIN-1, 2, 7, 8, 9, 14, SF-14, 20)를 분석한 결과, 45℃, 30%의 조건으로 발효된 시료(SF-13)와 55℃에서 발효된 시료(SF-16, 17, 18)에서 100 g 당 40 mg 이상의 gallic acid 함량을 나타내어 미생물에 의한 발효가 활발히 진행되었음이 시사되었다.
- 반면, 35℃에서 발효된 시료(SF-10, 11, 12)에서는 gallic acid가 거의 검출되지 않아 발효가 충분히 진행되지 않았던 것으로 생각되었다. 또한 관능적 기호도가 높았던 45℃, 40%의 조건과 45℃, 50%에서 조건에서 발효된 시료(SF-14, 15)의 경우 35℃에서 발효된 시료(SF-10, 11, 12)보다는 gallic acid 함량이 높았으나 55℃에서 발효된 시료(SF-16, 17, 18)보다는 함량이 낮아 gallic acid의 함량이 지나치게 높거나 낮을 경우 관능적으로 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 것으로 생각되었다(Fig. 3-4, 3-5).

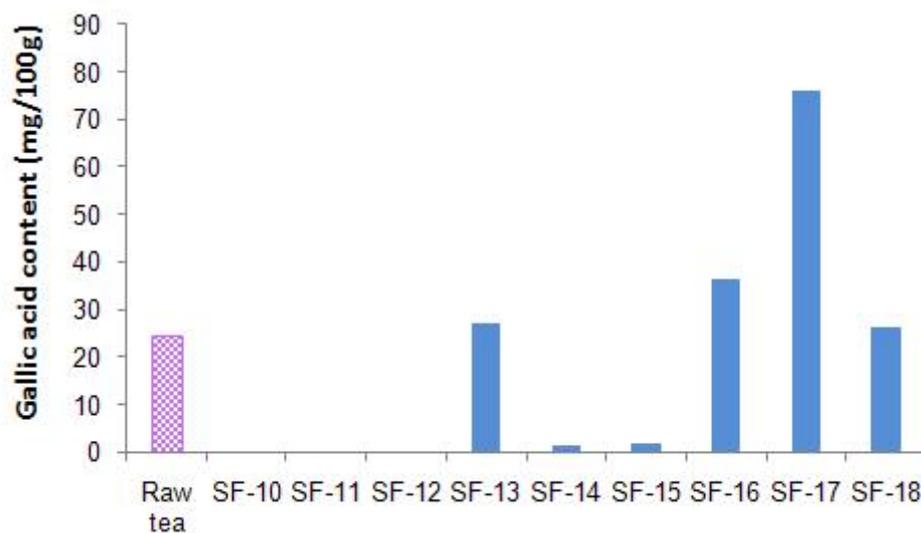


Fig. 3-4. Gallic acid contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by variable temperatures and water contents

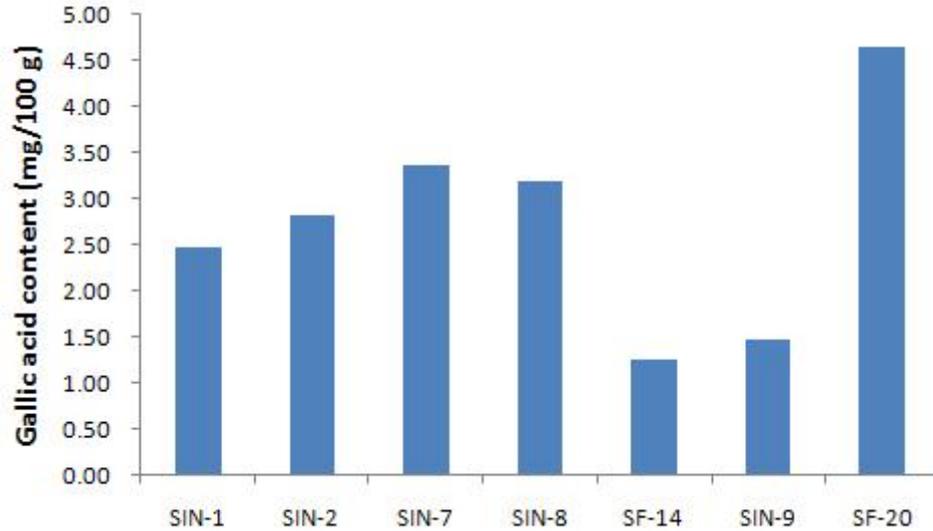


Fig. 3-5. Gallic acid contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by various fermentation periods and overturn pill

② 중국산 대엽종 찻잎을 원료로 발효온도 및 수분함량을 달리하여 제조한 미생 물발효차의 gallic acid 함량

- 중국산 대엽종 찻잎을 이용하여 다양한 온도(35, 45, 55℃)와 수분함량(30, 40, 50%) 조건으로 발효시킨 시료(SF-01~09)에서는 45℃, 50%의 조건에서 제조된 시료(SF-06)를 제외하고 모두 국내산 소엽종 찻잎으로 발효했을 때 보다 많은 양의 gallic acid가 검출되었다(Fig. 3-6).
- 또한 국내산 소엽종 찻잎의 경우 gallic acid의 함량이 낮았던 35℃의 조건에서 발효된 시료(SF-01~03)에서도 높은 함량이 검출되어 소엽종과 대엽종의 찻잎을 발효시켰을 때 서로 다른 양상을 보였다.

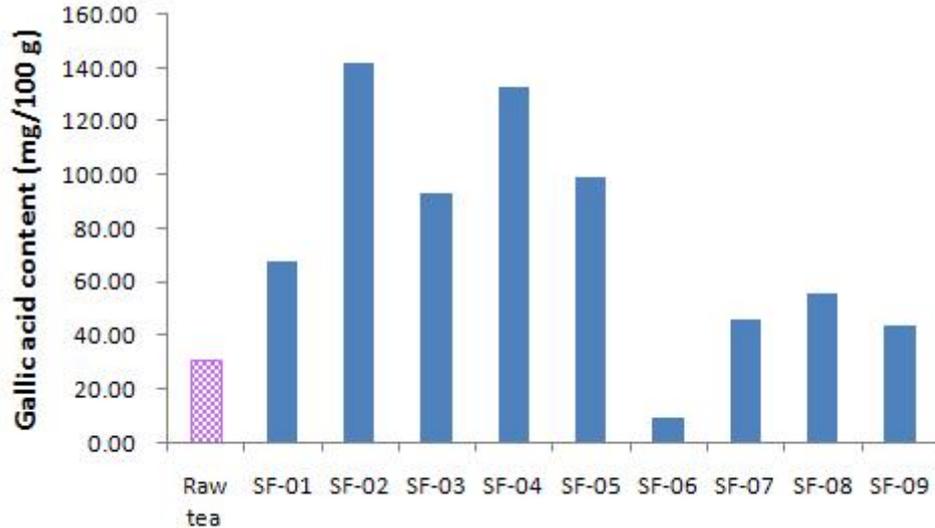


Fig. 3-6. Gallic acid contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *assamica* manufactured by variable temperatures and water contents

③ 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 gallic acid 함량

- 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성 탐색하기 위하여 접종한 미생물을 달리하여 제조된 시료(MFT-36, 37, 39, 40, 41)를 분석한 결과, *Aspergillus* N091, *Penicillium* G051, *Rhizopus* S201, *Rhodospiridium* P011 등의 4종의 미생물을 접종하여 제조된 시료(MFT-40)에서 100 g 당 63.63 mg의 gallic acid가 검출되어 발효가 가장 활발히 진행된 것으로 판단되었다(Fig. 3-7).
- 반면 관능적으로 좋은 평가를 얻은 시료인 MFT-39는 100 g 당 20.53 mg의 gallic acid가 함유되어있는 것으로 조사되어 gallic acid의 함량은 발효의 진행을 판단할 수 있는 척도의 가능성이 인정되었다.



Fig. 3-7. Gallic acid contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by inoculation of various microorganisms

④ 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 gallic acid 함량

- 채취시기가 다른 국내 소엽종 찻잎(5월, 6월, 7월에 채취)과 5월에 채취한 중국 대엽종 찻잎을 원료를 15종의 균주를 접종 발효시켜 제조된 발효차 시료(MFT-1, 4, 8)의 gallic acid 함량을 분석한 결과, 모든 시료에서 100 g 당 20 mg 이상의 gallic acid가 검출되어 발효가 충분히 진행된 것으로 판단되었다.

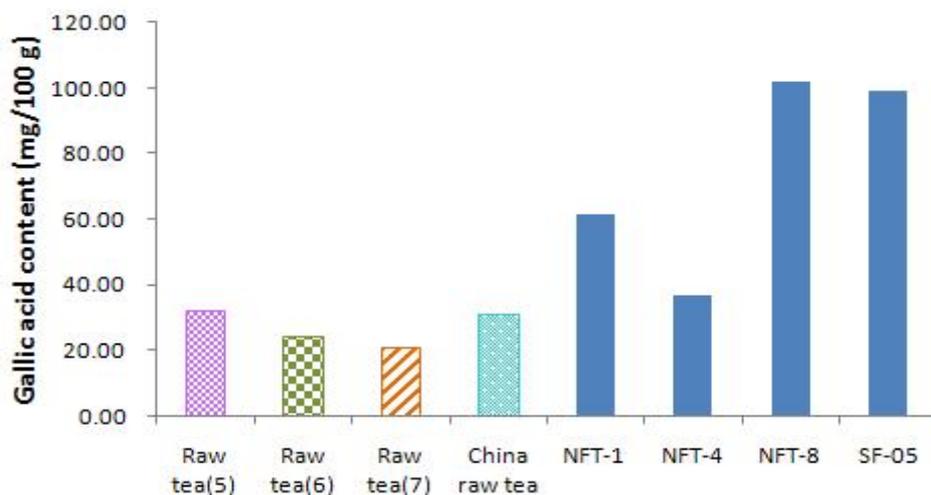


Fig. 3-8. Gallic acid contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by various harvest times

- ⑤ 소엽종 찻잎을 원료로 발효조건을 달리하여 제조한 미생물발효차의 gallic acid 함량

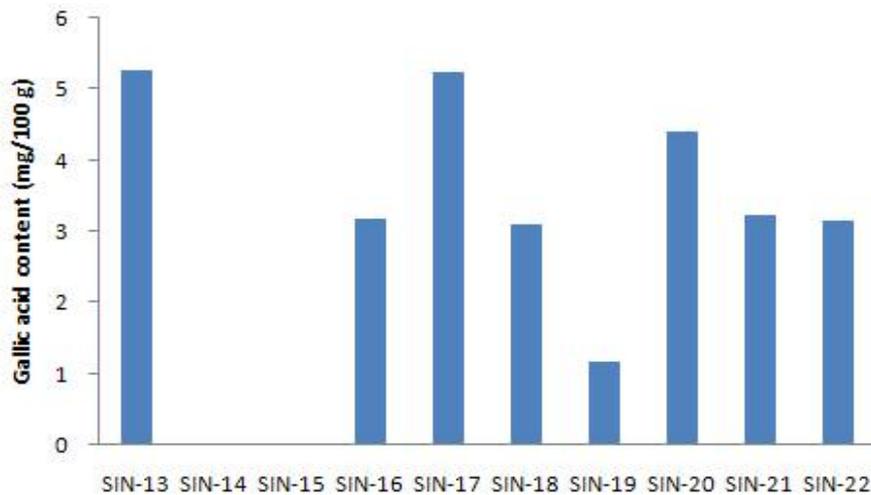


Fig. 3-9. Gallic acid contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by different fermentation process

- 위의 결과들을 종합하여 보았을 때, 발효가 충분히 진행되지 않은 시료의 경우 gallic acid의 함량이 매우 낮은 경향을 보여 gallic acid의 함량이 발효의 진행을 판단하는 척도의 하나가 될 수 있음이 시사되었다. 또한 관능적으로 비교적 좋은 평가를 받은 발효차의 경우 100 g 당 5~40 mg 정도의 gallic acid가 함유되어 있었으며 이 함량이 지나치게 높거나 낮을 경우 관능적으로 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 것으로 판단되었다. 분석 결과 45°C의 온도에서 수분함량 40% 조건에 의하여 제조된 시료들의 경우, 대부분 이 범위내의 gallic acid의 함량을 나타내었으며, 이는 미생물에 의한 발효가 45°C, 수분함량 40% 조건에서 잘 이루어졌음을 의미하는 결과로 판단된다.

(나) 휘발성 향기(methyl caprate 성분) 분석

- 2년차 연구성과에 있어 미생물발효차에 함유된 저분자 휘발성 성분 중 methyl caprate가 저급차 및 저장기간이 오래된 시료로부터 다량 검출되어 methyl caprate의 함량이 높을수록 질이 낮은 발효차일 가능성이 확인되었다. 이에 차별화된 국산 미생물발효차의 개발에 있어 그 품질을 평가하는 하나의 지표성분으로서 본 연구에

의해 제조된 미생물발효차들의 methyl caprate 함량을 분석하였다. 시료들을 분석한 GC chromatogram들 중 methyl caprate의 함량이 매우 낮은 시료(SF-08)와 매우 높은 시료(SIN-18) 각각을 Fig. 3-10에 제시하였다.

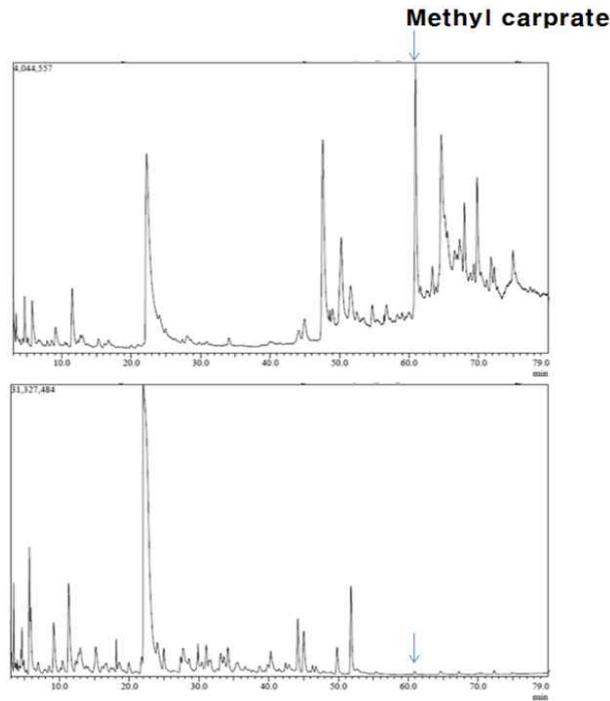


Fig. 3-10. GC chromatograms of sample(SIN-18, SF-08)

- Methyl caprate는 GC chromatogram 상에서 retention time 61분에서 검출됨을 MS 분석을 통해 확인하였다. 그리고 methyl caprate의 시료별 함량을 구분하여 Table 3-17에 제시하였다.
- Methyl caprate의 함량이 매우 낮은 시료에서부터 매우 높은 시료까지 다양한 경향이 관찰되었다. 총 32종 시료 중 시료 1 g 당 300 μ g 이상의 함량을 보인 시료는 4종이었으며, 이는 32종 시료 중 13%에 해당하였다. 즉 이들 4종 시료는 methyl caprate의 함량을 기준으로 평가하였을 때 다른 시료들에 비하여 품질이 매우 낮은 것으로 판단된다.
- 한편 시료 1 g 당 50 μ g 이하의 methyl caprate 농도를 보인 시료는 32종 중 총 10종이었다. 즉 이들 시료는 타 시료들에 비하여 methyl caprate의 함량을 기준으로 하였을 때, 상대적으로 매우 우수한 품질의 미생물발효차라 평가된다. 이어 제조 방법에 따른 휘발성 성분 중 methyl caprate 함량의 변화를 검토하였다.

Table 3-17. Classification of samples by methyl caprate contents

Methyl caprate content($\mu\text{g/g}$)	List of samples
~50 μg	MFT-8, MFT-36, MFT-39, SF-08, SF-10, SF-11, SF-12, SF-13, SF-14, SF-18
50~100 μg	MFT-34, MFT-37, SF-09, SIN-13
100~200 μg	NFT-4, MFT-19, MFT-20, MFT-40, SF-01, SF-02, SF-03, SF-04, SF-05, SF-06, SF-07, SF-15, SF-16, SF-17, SIN-1, SIN-2, SIN-3, SIN-7, SIN-8, SIN-9, SIN-14, SIN-17
200~300 μg	NFT-1, MFT-18, SF-20, SIN-15, SIN-16
300~400 μg	MFT-33, MFT-35, MFT-41, SIN-18

① 국내산 소엽종 찻잎을 원료로 발효온도 및 수분함량, 발효기간을 달리하여 제조한 미생물발효차의 methyl carprate 함량

- 국내산 소엽종 찻잎을 이용하여 다양한 발효온도 및 수분함량으로 발효시켜 미생물발효차를 제조한 후 methyl carprate 함량을 분석한 결과, 비교적 높은 온도와 습도에서 발효된 시료(SF-15~18)에서 methyl carprate 함량이 높은 것으로 나타났다. 이는 methyl caprate의 생성 기전과도 관련이 있을 것으로 생각되며, 미생물의 작용하기 좋은 정도와도 관계가 있을 것으로 추측된다. 반면 관능적으로 높은 등급을 받았던 발효온도 45 $^{\circ}\text{C}$, 수분함량 40%에서 발효된 시료(SF-14)와 낮은 온도에서 발효된 시료(SF-10~12)의 methyl carprate 함량이 낮게 나타났다 (Fig. 3-11).
- 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효기간 탐색하기 위해 제조된 시료의 methyl carprate 함량을 측정한 결과, 관능평가에서 좋은 평가를 받았던 발효온도 45 $^{\circ}\text{C}$, 수분함량 40%에서 35일간(7일 \times 5회) 발효시킨 시료에서 가장 낮은 methyl carprate 함량이 검출되어 관능평가 결과와 정확히 일치하였다(Fig. 3-12).

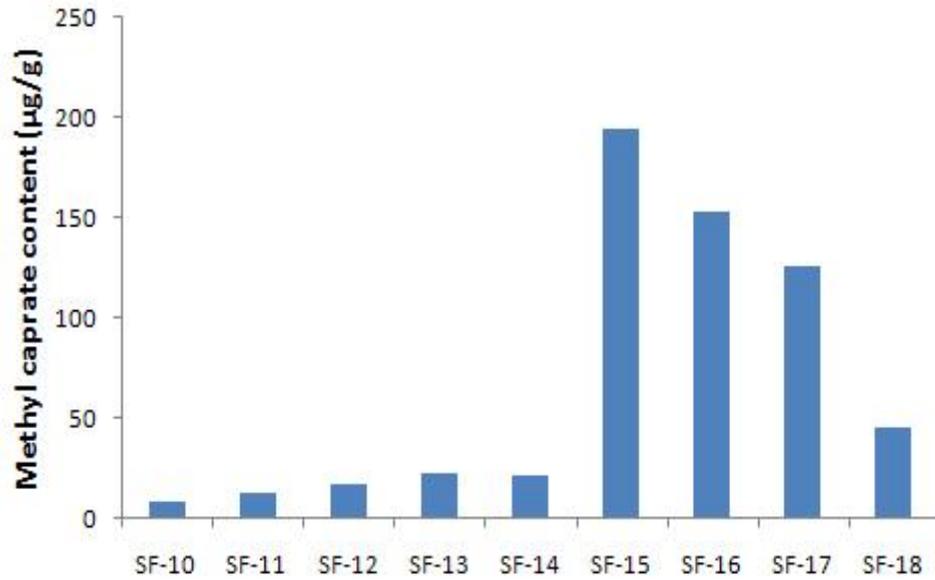


Fig. 3-11. Methyl caprate contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by variable temperatures and water contents

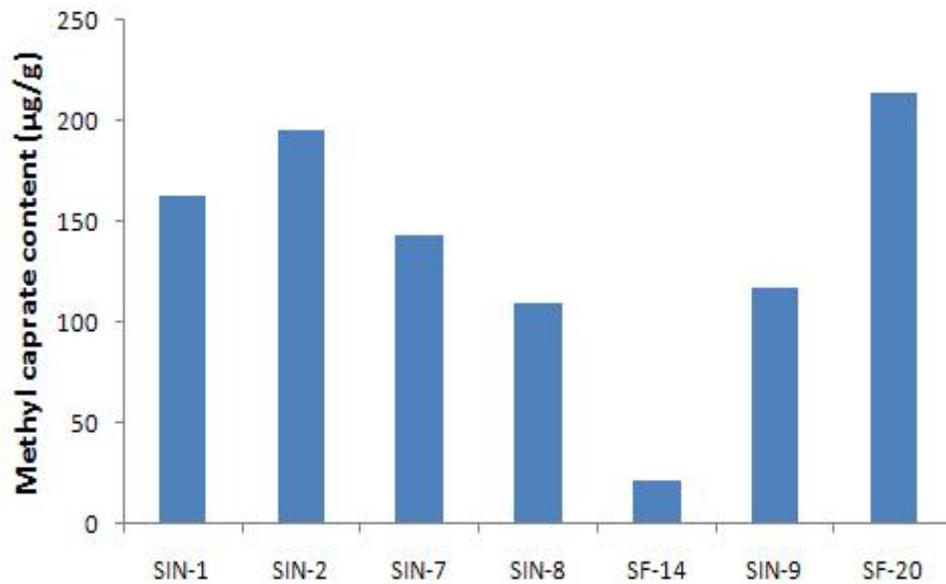


Fig. 3-12. Methyl caprate contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by various fermentation periods and overturn pill

③ 중국산 대엽종 차잎을 원료로 발효온도 및 수분함량을 달리하여 제조한 미생 물발효차의 methyl caprate 함량

- 중국산 대엽종 차잎을 원료로 하여 다양한 발효조건에서 제조한 발효차 (SF-01~09)에서는 국내산 소엽종으로 제조한 발효차에 비하여 비교적 높은 함량의 methyl caprate가 검출되었으며, 관능평가 결과 우수한 평가를 얻었던 SF-08 시료(발효온도 55℃, 수분함량 40%)에서 가장 낮은 함량의 methyl caprate가 검출되었다(Fig. 3-13).

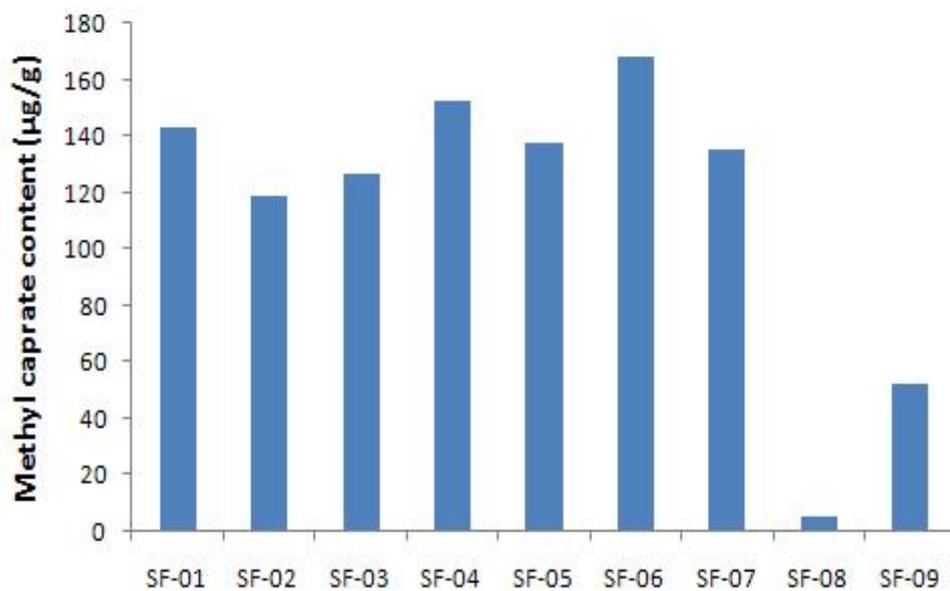


Fig. 3-13. Methyl caprate contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *assamica* manufactured by variable temperatures and water contents

④ 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 methyl caprate 함량

- 다양한 종류의 미생물을 접종시켜 발효시킨 시료 (MFT-36~41)에서는 접종한 균주의 수가 가장 많았던 시료(MFT-39, 균주 15종 접종)에서 가장 낮은 함량의 methyl caprate가 검출되었으며 *Aspergillus* N091 단일 균주만을 접종하였던 시료(MFT-41)에서 대단히 높은 함량의 methyl caprate가 검출되어 또한 관능평가 결과와 methyl caprate 함량과의 관계가 정확히 일치함을 확인할 수 있었다.

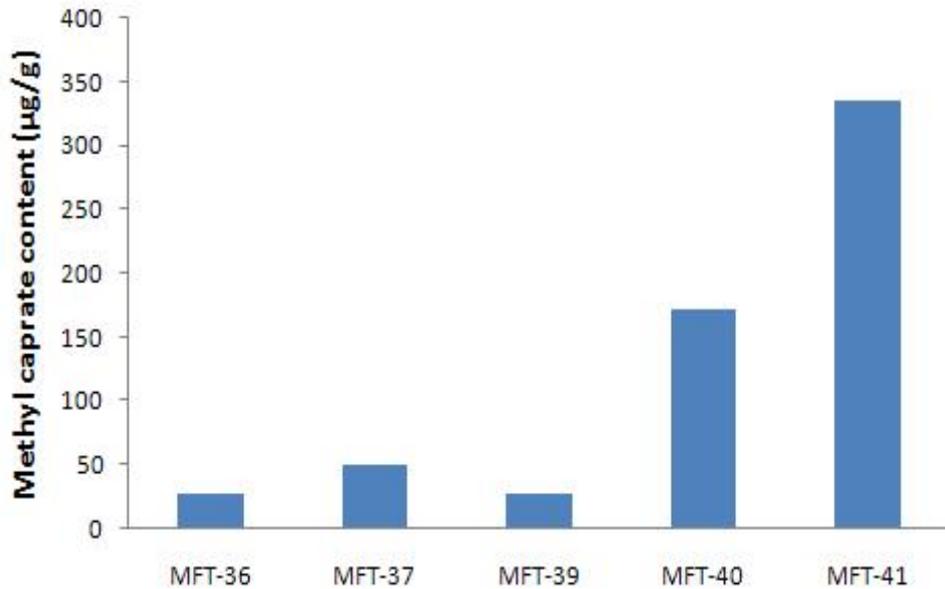


Fig. 3-14. Methyl caprate contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by inoculation of various microorganisms

⑤ 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 methyl carprate 함량

- 찻잎의 채취시기별 미생물발효차의 원료 적합성을 탐색하기 위하여 5월, 6월, 7월에 채취된 국내산 소엽종 찻잎 및 중국산 대엽종 찻잎을 원료를 이용하여 발효된 시료들(NFT-1, 4, 8, SF-05)에서는 국내산 찻잎의 경우 채취 시기가 늦은 찻잎으로 제조한 시료일수록 methyl carprate 함량이 낮은 경향을 보였으며 관능평가의 결과와도 일치하였다.
- 중국산 찻잎으로 제조한 시료의 경우 국내산의 5월 찻잎과 6월 찻잎의 중간 정도의 함량을 보였는데 이는 중국의 따뜻한 기온에 의한 찻잎의 성숙도와도 관련이 있거나 대엽종의 특성에 의한 것으로 생각되나 어떠한 영향인지 보다 구체적인 검토가 필요할 것으로 사료된다.

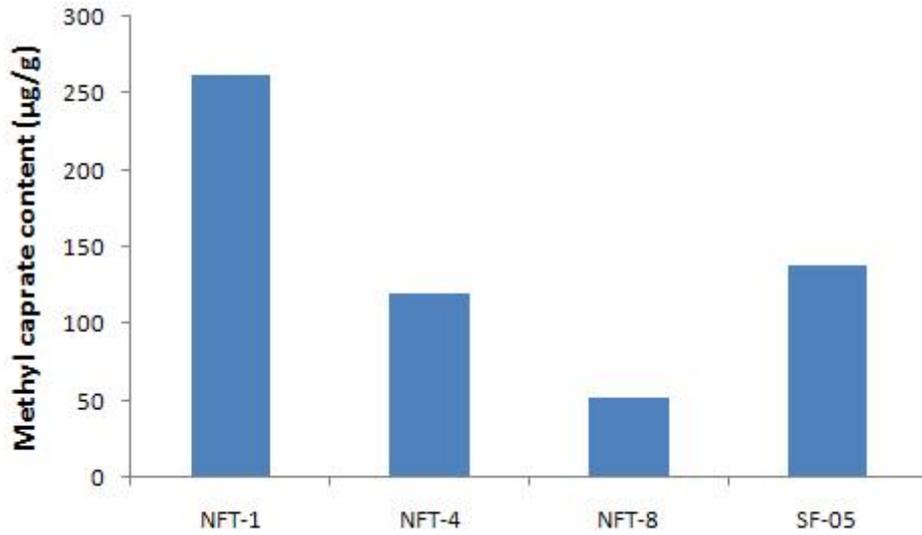


Fig. 3-15. Methyl caprate contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by various harvest times

⑥ 소엽종 찻잎을 원료로 발효조건을 달리하여 제조한 미생물발효차의 methyl caprate 함량

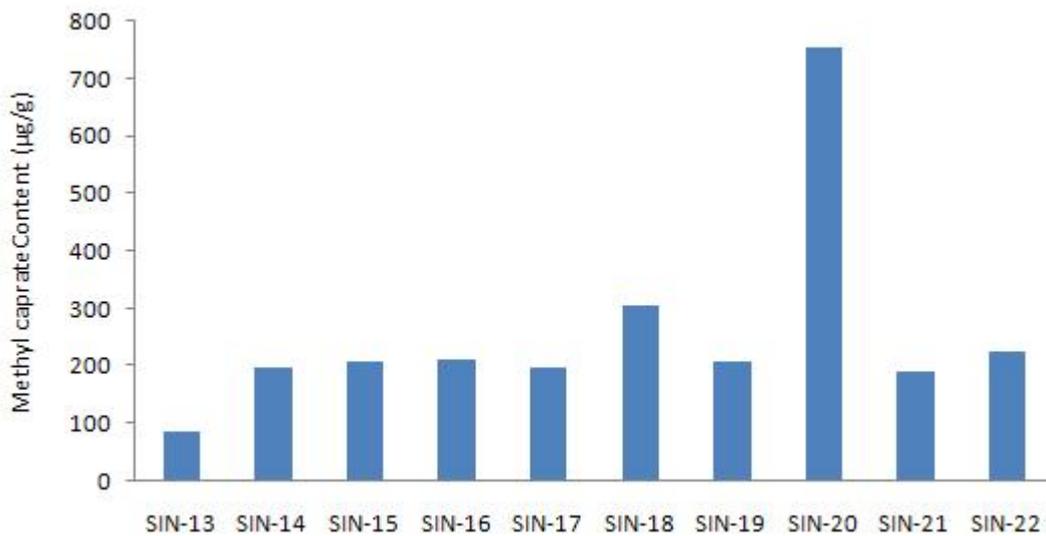


Fig. 3-16. Methyl caprate contents of microbial fermented tea using *Camellia sinensis* var. *sinensis* manufactured by different fermentation process

(다) 미생물발효차의 Tocopherol류 분석

- 본 연구과제의 1, 2년차 성과에서, 토코페롤이 산화에 민감함에도 불구하고, 보존기간이 5년이 지난 미생물발효차에서 상당량 검출됨이 확인되었다. 그리고 보존기간이 진행될수록 토코페롤 함량이 감소했으나 그 감소 속도는 매우 늦었다. 이처럼 보존기간이 오래된 차에서도 산화에 매우 민감한 토코페롤이 잔존해 있으며, 보존기간의 진행에도 불구하고 그 함량이 매우 낮은 속도로 감소되는 이유는 tocopherol의 차엽 중에 있어서의 localization의 영향가능성 또는 차엽중의 tocopherol이 유리형이 아닌 ester형으로 존재되어 있기 때문일 것으로 시사되었다(28).
- 따라서 본 연구에서는 차가 미생물에 의해 발효되었을지라도 미생물발효차 제조 직후에는 tocopherol 함량이 높을수록 고급차로 평가될 수 있다고 판단하였다. Tocopherol류의 표준물질과 시료의 HPLC chromatogram은 Fig. 3-17에 제시하였다.

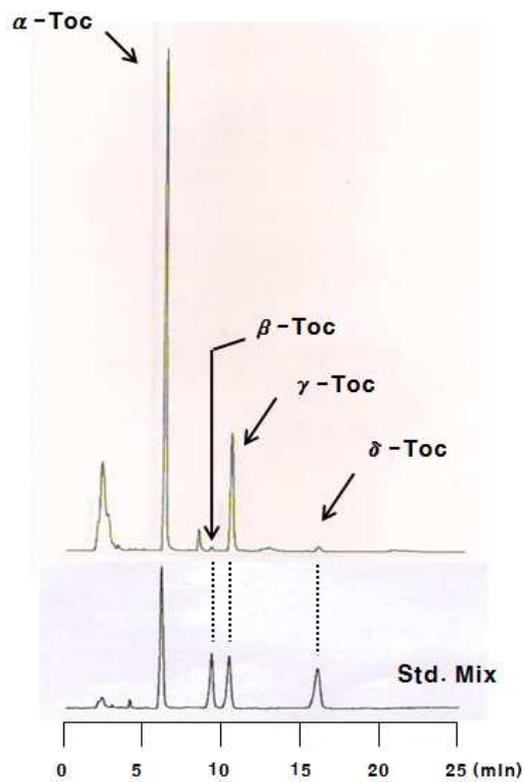


Fig. 3-17. HPLC chromatogram of tocopherols in samples.

- 먼저 α -tocopherol은 36종의 시료 중, 시료 100 g 당 3 mg 이상의 함량을 보인 차는 총 21종이었다(Table 3-18). 이것은 총 21종 중 51%에 해당한다. 이들 21종 시료들은 다른 시료들에 비해 α -tocopherol 함량을 기준으로 했을 때, 상대적으로 우수한 차로 평가될 수 있다고 판단되었다.
- 반면에 시료 100 g 당 1 mg 이하의 α -tocopherol 함량을 보인 시료는 3종이었다. 이들은 발효가 지나치게 행해졌거나 과도한 산화 스트레스에 노출되었기 때문일 것으로 추측되었다.

Table 3-18. Classification of samples by α -Tocopherol contents

α -Toc. content (mg/100 g)	List of samples
~1 mg	SF-06, SF-08, SF-11
1~2 mg	NFT-4, NFT-8, SF-01, SF-02, SF-03, SF-04, SF-05, SF-07, SF-09, SF-17, SIN-7, SIN-9
2~3 mg	NFT-1, MFT-36, SF-10, SF-20, SIN-1, SIN-18
> 3 mg	MFT-37, MFT-39, MFT-40, MFT-41, SF-12, SF-13, SF-14, SF-15, SF-18, SIN-2, SIN-8, SIN-13, SIN-14, SIN-15, SIN-16, SIN-17, SIN-19, SIN-20, SIN-21, SIN-22, SIN-3

- 다음 β -tocopherol 함량을 기준으로 한 결과를 Table 3-19에 제시하였다. 100 g 당 0.02 mg 이하의 함량을 보인 시료들은 총 9종(21%)이었으며 0.06 mg 이상이 2종(5%)이었으며 나머지 30종(74%)이 0.02~0.06 mg의 함량을 보여 시료들 전반에 걸쳐 β -tocopherol 함량은 큰 변동 폭을 보이지 않았다.
- 그러나 관능평가 결과 좋은 평가를 보인 시료(SF-14)가 높은 함량을 보이는 것을 볼 때 관능평가 결과와 상당히 밀접한 관계가 있음이 시사되었다.

Table 3-19. Classification of samples by β -Tocopherol contents

β -Toc. content (mg/100 g)	List of samples
~0.02 mg mg	NFT-1, NFT-4, NFT-8, MFT-36, MFT-37, MFT-39, MFT-40, MFT-41, SF-16
0.02~0.04mg	SF-01, SF-04, SF-05, SF-06, SF-07, SF-08, SF-10, SF-17, SF-18, NFT407-15-2, SIN-2, SIN-7, SIN-8, SIN-9, SIN-14, SIN-16, SIN-19
0.04~0.06 mg	SF-02, SF-03, SF-11, SF-12, SF-13, SF-15, SF-19, SIN-1, SIN-13, SIN-15, SIN-17, SIN-18, SIN-20, SIN-21, SIN-22
> 0.06 mg	SF-14, SF-16

- 이어 각 시료에 함유된 γ -tocopherol 함량을 구하고 그들을 함량별로 구분하여 Table 3-20에 제시하였다. 시료 100 g 당 0.3 mg 이하의 γ -tocopherol 함량을 보인 시료가 총 38종 중 4종(11%)이었으며 이들은 상대적으로 낮은 품질의 차일 가능성이 시사되었다. 반면 1 mg 이상의 함량을 보인 시료는 13종(34%)로 이들은 상대적으로 품질이 높은 차일 가능성이 제시되었다. 이들의 결과는 관능평가 결과와 거의 비슷한 경향을 보여 γ -tocopherol 함량을 기준으로 하여 품질평가로 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.
- 이하 제조된 시료들의 제조 방법과 차의 품질을 tocopherol류의 함량을 기준으로 검토하였다.

Table 3-20. Classification of samples by γ -Tocopherol contents

γ -Toc. content (mg/100 g)	List of samples
~0.3 mg	NFT-4, SF-10, SF-16, SF-18
0.3~0.7 mg	NFT-1, NFT-8, MFT-36, MFT-37, MFT-39, MFT-40, MFT-41, SF-17, SF-20, SIN-9, SIN-14
0.7~1 mg	SF-11, SIN-1, SIN-8, SIN-13, SIN-15, SIN-18, SIN-19, SIN-20, SIN-22
> 1 mg	SF-01, SF-02, SF-03, SF-04, SF-05, SF-06, SF-07, SF-08, SF-09, SIN-2, SIN-16, SIN-17, SIN-21

① 국내산 소엽종 찻잎을 원료로 발효온도 및 수분함량, 발효기간을 달리하여 제조한 미생물발효차의 tocopherol류 함량

- 국내산 소엽종 찻잎을 이용하여 다양한 발효온도 및 수분함량으로 발효시켜 미생물발효차를 제조한 후 tocopherol류의 함량을 분석한 결과, 관능적으로 높은 등급을 받았던 발효온도 45℃, 수분함량 40%에서 발효된 시료(SF-14)에서 높은 수준의 tocopherol함량이 확인되었다. 특히 γ -tocopherol은 다른 시료와 월등한 차이를 보여 관능적 품질 지표로의 사용가능성이 제시되었다(Fig. 3-18~3-20).
- 국내산 소엽종 찻잎의 최적 발효기간 탐색하기 위해 제조된 시료의 tocopherol류의 함량을 측정된 결과, 관능평가에서 좋은 평가를 받았던 발효온도 45℃, 수분함량 40%에서 35일간(7일×5회) 발효시킨 시료(SF-14)에서 가장 높은 α -tocopherol과 β -tocopherol의 함량이 확인되었다. γ -tocopherol 역시 SF-14에서 높은 함량이 확인되었으나 다른 tocopherol 만큼의 확실한 차이는 발견되지 않았다(Fig. 3-21~3-23).

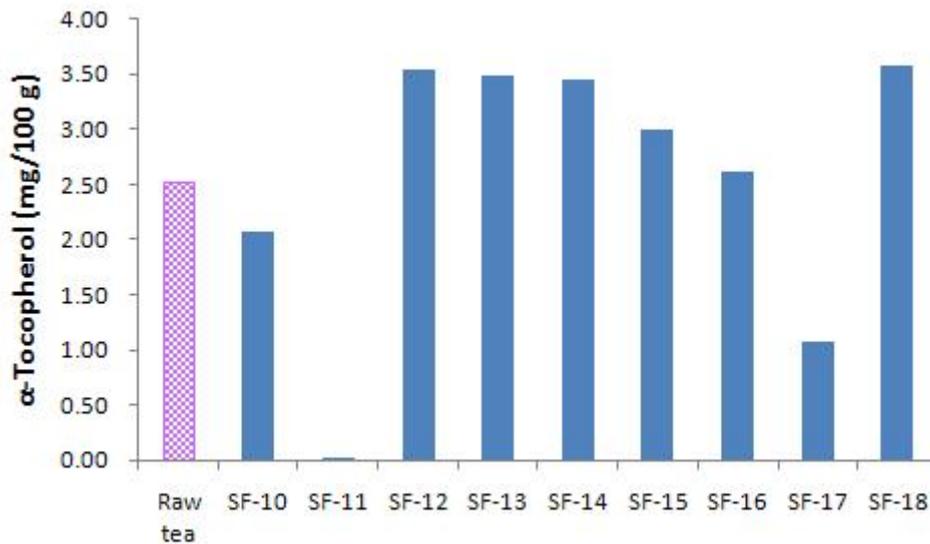


Fig. 3-18. Comparison of α -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by variable temperatures and water contents

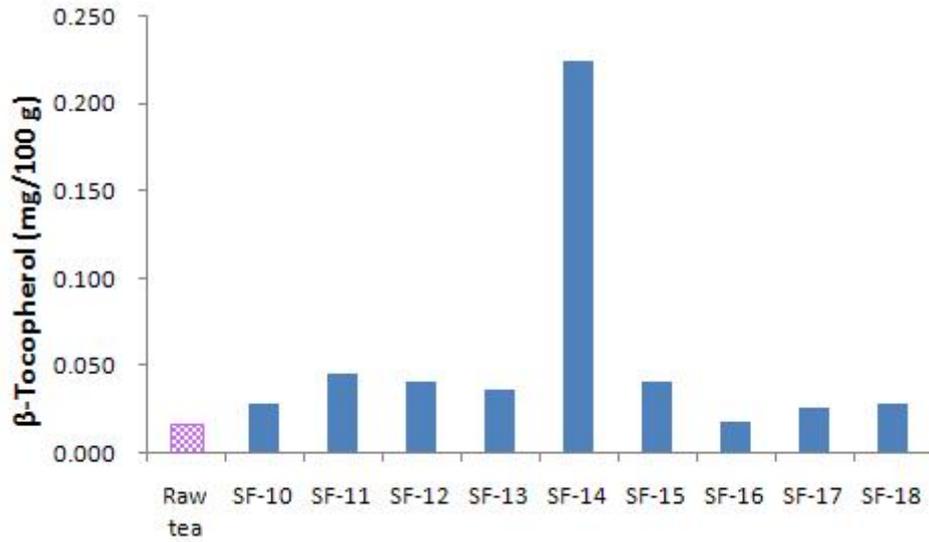


Fig. 3-19. Comparison of β -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by variable temperatures and water contents

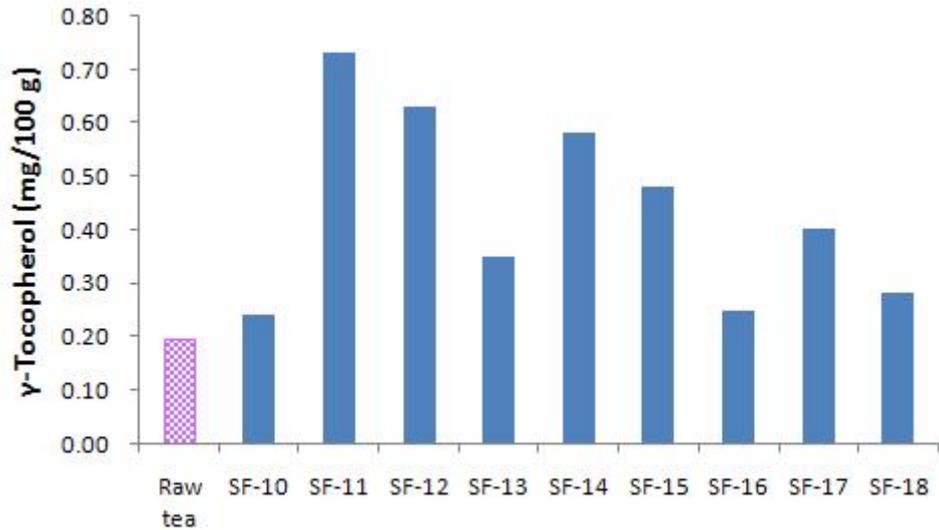


Fig. 3-20. Comparison of γ -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by variable temperatures and water contents

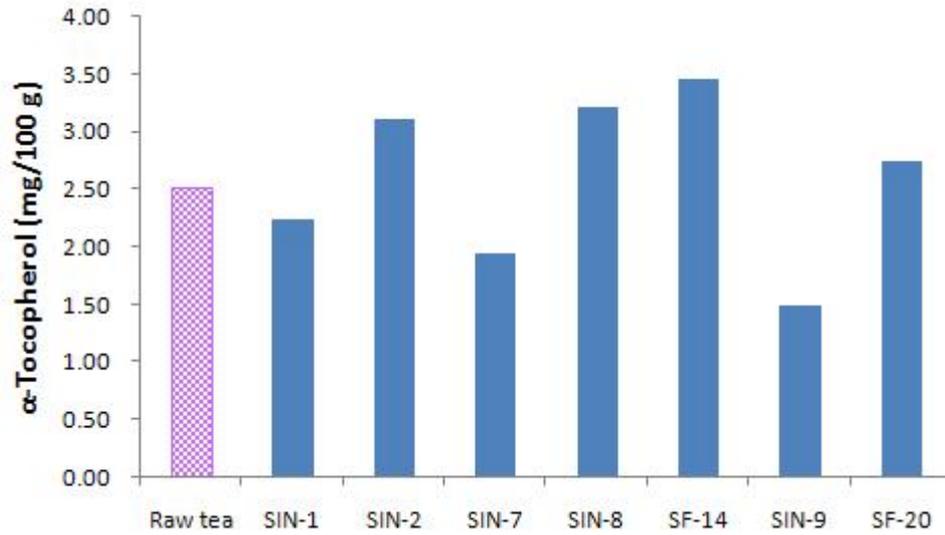


Fig. 3-21. Comparison of α -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by various fermentation periods

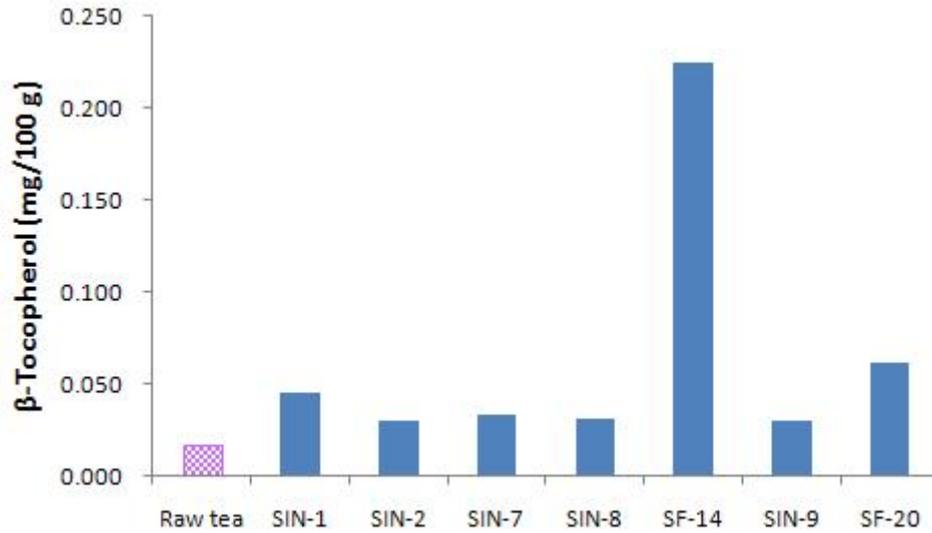


Fig. 3-22. Comparison of β -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by various fermentation periods



Fig. 3-23. Comparison of γ -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by various fermentation periods

② 중국산 대엽종 찻잎을 원료로 발효온도 및 수분함량을 달리하여 제조한 미생물발효차의 tocopherol류 함량

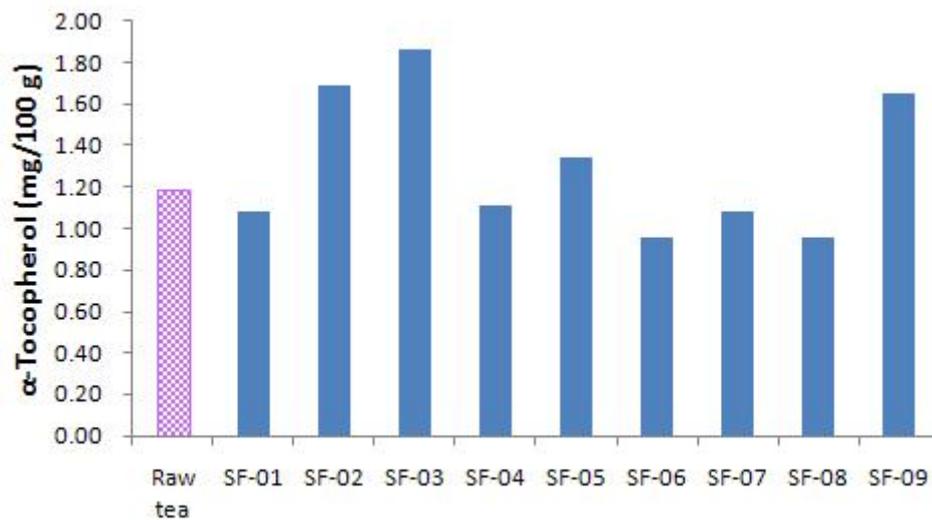


Fig. 3-24. Comparison of α -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by variable temperatures and water contents

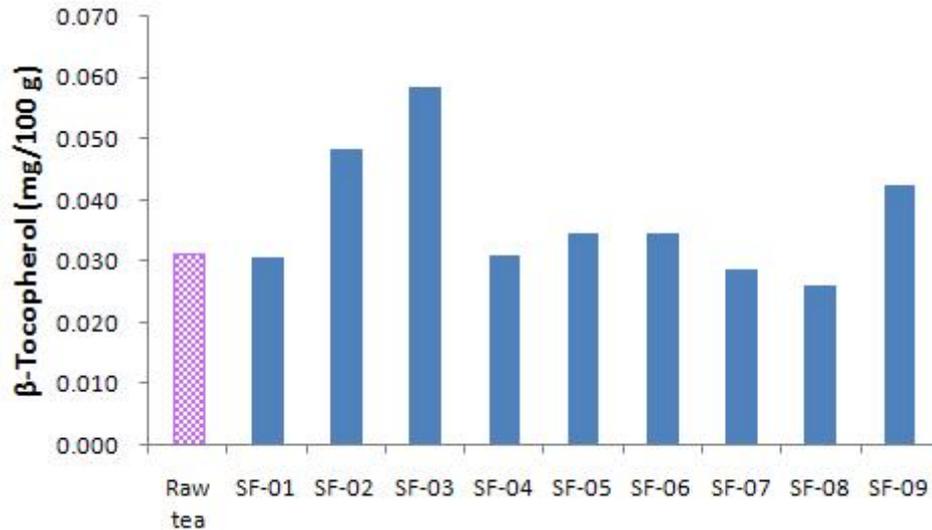


Fig. 3-25. Comparison of β -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by variable temperatures and water contents

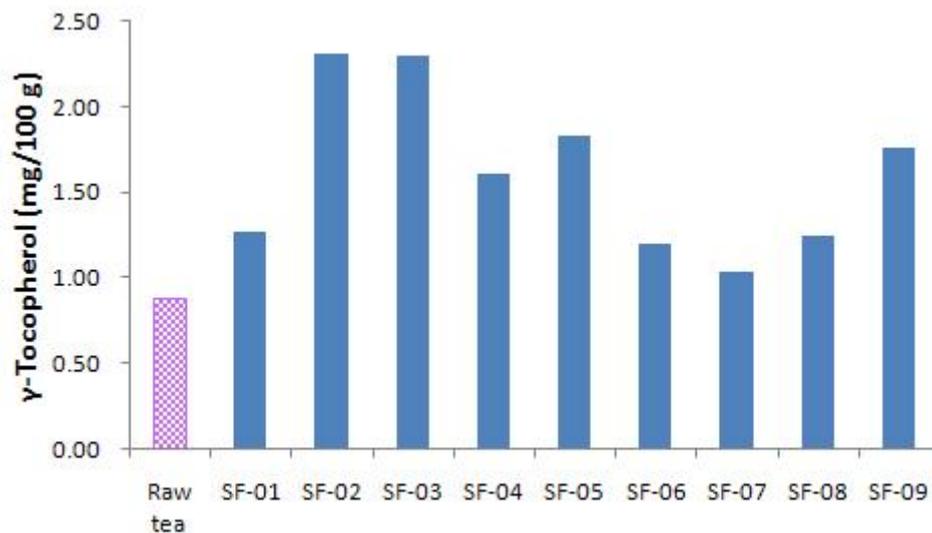


Fig. 3-26. Comparison of γ -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by variable temperatures and water contents

③ 균주접종 발효에 의한 미생물발효차의 tocopherol류 함량

- 다양한 종류의 미생물을 접종시켜 발효시킨 시료 (MFT-36~41)에서는 접종한 균주의 수가 가장 많았던 시료(MFT-39, 균주 15종 접종)에서 가장 높은 수준의 β

-tocopherol과 γ -tocopherol의 함량이 확인되었다. α -tocopherol 역시 MFT-39에서 높은 함량이 확인되었으나 다른 tocopherol 만큼의 확실한 차이는 발견되지 않았다(Fig. 3-27~3-29).

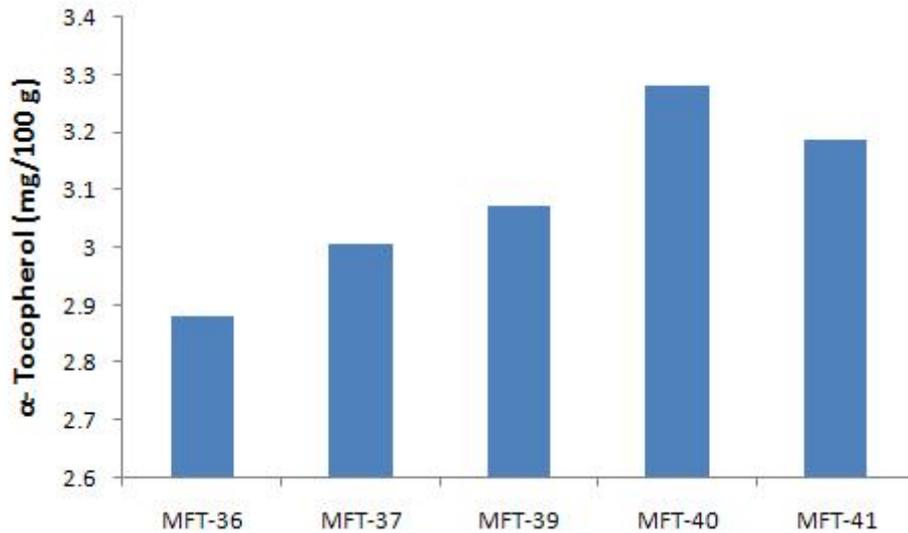


Fig. 3-27. Comparison of α -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by inoculation of various microorganisms

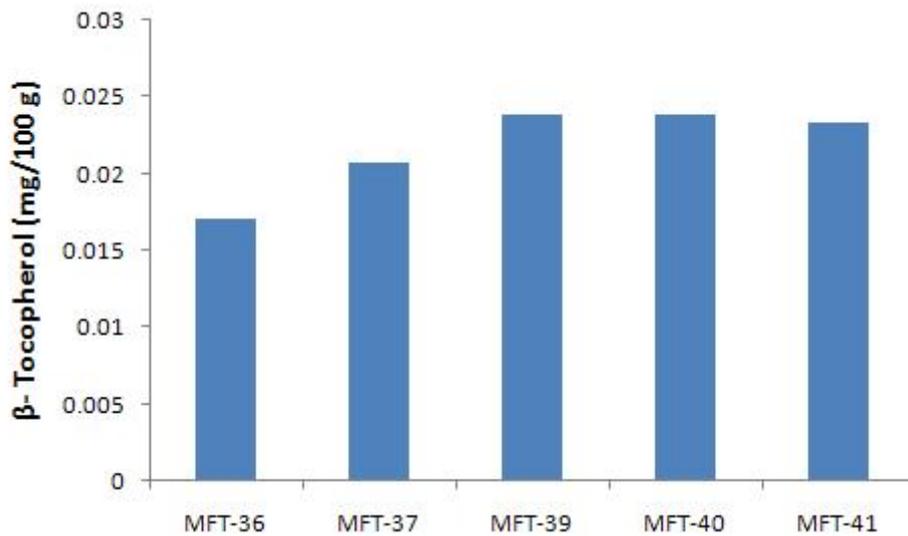


Fig. 3-28. Comparison of β -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by inoculation of various microorganisms

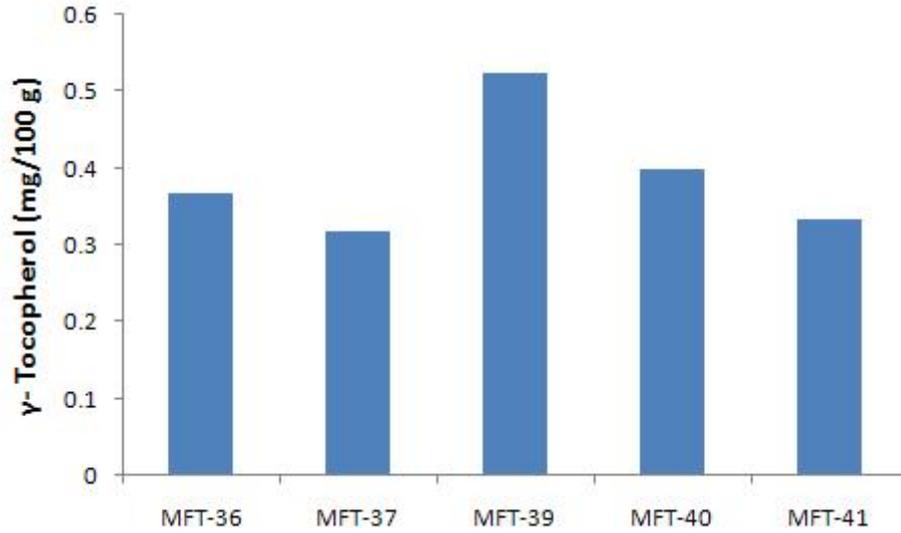


Fig. 3-29. Comparison of γ -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by inoculation of various microorganisms

④ 채취시기별 미생물발효차의 tocopherol류 함량

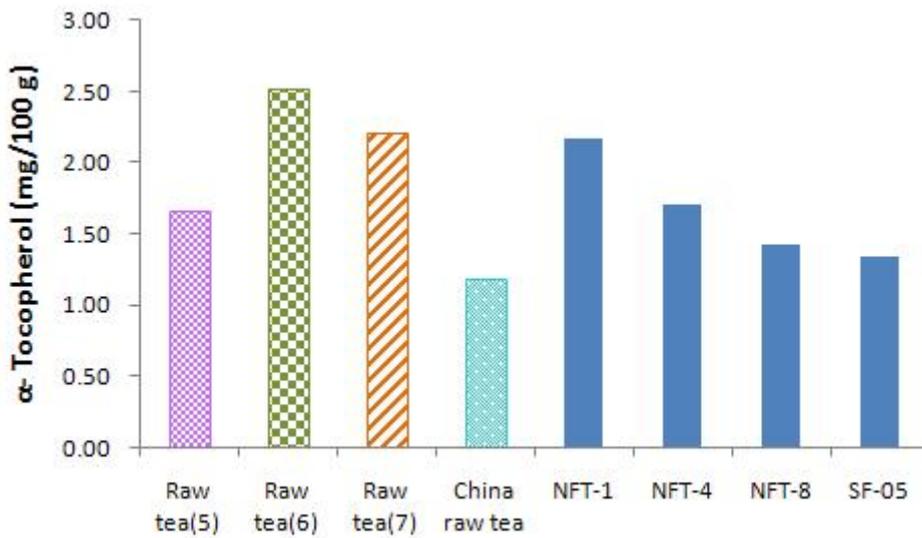


Fig. 3-30. Comparison of α -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by different harvest periods

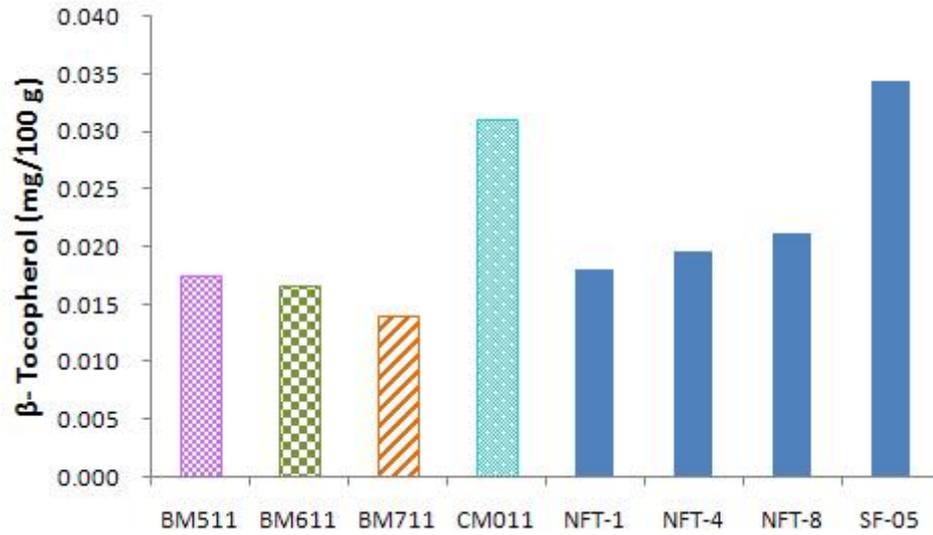


Fig. 3-31. Comparison of β -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by different harvest periods

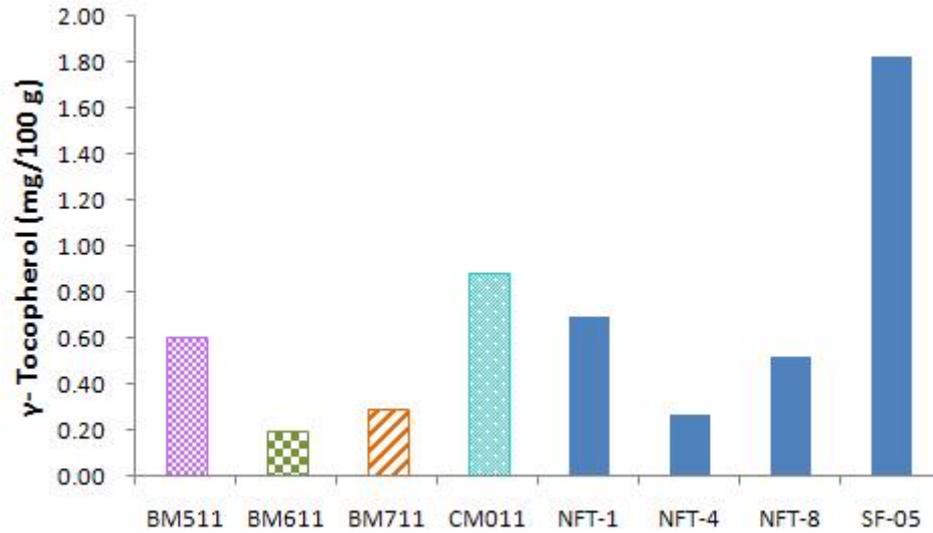


Fig. 3-32. Comparison of γ -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by different harvest periods

- ⑤ 소엽종 찻잎을 원료로 발효조건을 달리하여 제조한 미생물발효차의 tocopherol류 함량

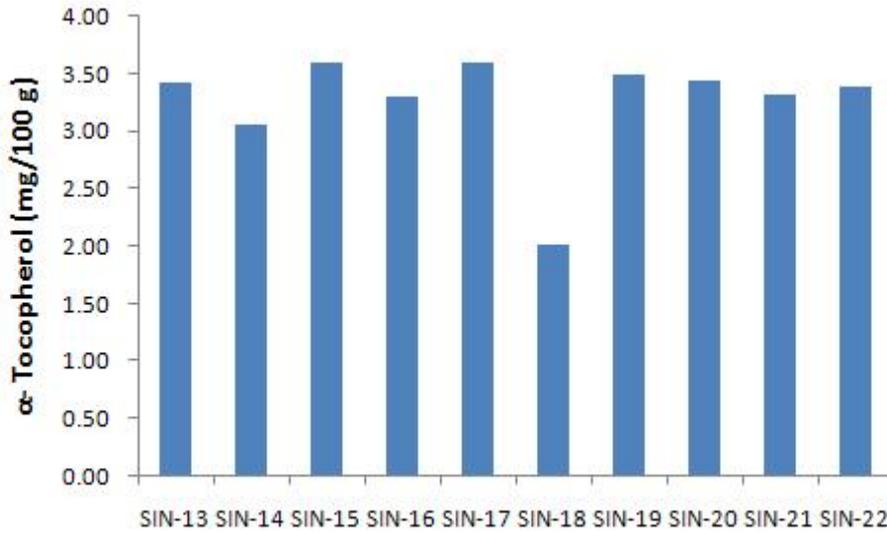


Fig. 3-33. Comparison of α -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by different fermentation process

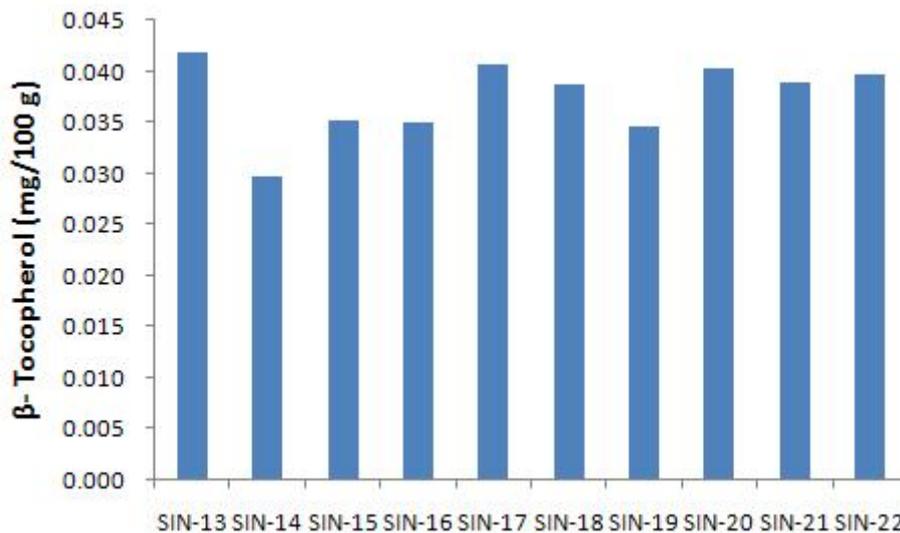


Fig. 3-34. Comparison of β -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by different fermentation process

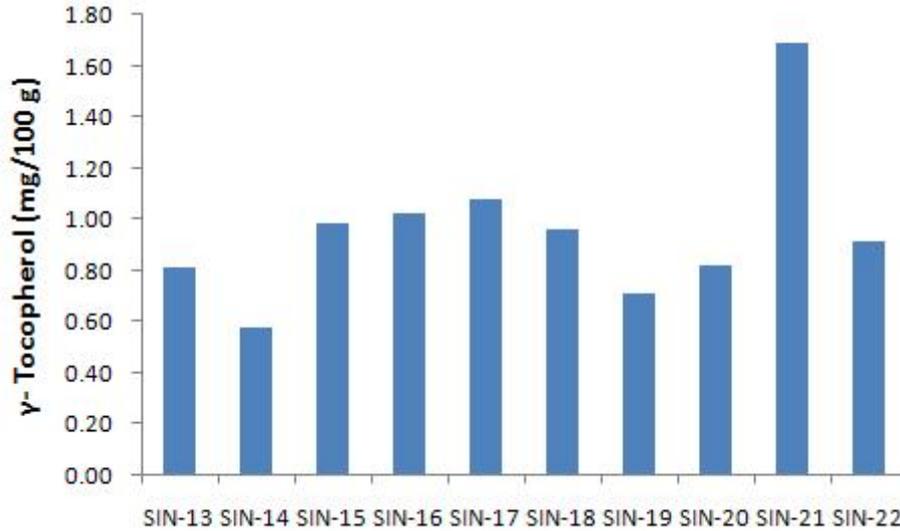


Fig. 3-35. Comparison of γ -tocopherol content in raw tea and microbial-fermented teas manufactured by different fermentation process

(5) 국내산 차잎을 이용한 미생물발효차의 이화학적 특성 및 일반성분 분석

(가) 총질소

- 차 잎의 성분 중 총질소 함량은 전통적으로 아미노산과 더불어 차의 품질을 결정하는 중요 인자이다. 차 잎의 총질소 중 약 20%는 카페인 성분이며, 그 외 질소화합물로 아미노산, 아미드, 단백질, 핵산 등이 있다³⁰⁾.
- 미생물발효차의 총 질소 함량을 측정해본 결과 45°C, 40%의 수분으로 자연 발효시킨 미생물발효차(SF-14)가 다른 조건의 차에 비해 비교적 높은 함량을 보였다..
- 또한 발효 기간에 따른 차이를 알아본 결과, 7일×5회(35일), 7일×6회(42일) 발효 시킬 때 (SF-14, SIN-9) 높은 질소 함량을 나타냈다(Table 3-21). 4종의 모차중 함유된 총 질소 함량은 중국산 대엽종 차잎이 가장 높은 함량을 보였고 시기별로 채취한 국내산 차잎중 총 질소 함량은 3.7%에서 3.9%로 거의 비슷한 것을 알 수 있었다.
- 또한 국내산 차잎보다 중국산 차잎으로 발효시켰을 때, 높은 질소 함량을 보였는데 이는 원료 차잎에 기인한 것으로 생각되었다.
- 자연발효시킨 미생물발효차 중에서 6월에 채취한 차잎으로 제조한 미생물발효차가 5월 및 7월에 채취한 차잎으로 제조한 미생물발효차보다 낮은 함량을 보였고 그 중

5월에 채취한 찻잎으로 제조한 미생물발효차중 총 질소 함량이 가장 높게 나타났다.

- 균주접종에 의해 발효된 찻잎의 경우 발효시의 수분함량이 높아짐에 따라 총 질소 함량도 많아지는 것을 알 수 있었다. 여러 가지 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 *Aspergillus* N091, *Penicillium* G051, *Rhizopus* S201, *Rhodospiridium* P011 등의 4가지 균주를 접종한 미생물발효차가 다른 발효차에 비해 총 질소 함량이 높은 것으로 측정 되었고 발효온도와 습도를 달리하여 자연발효시킨 미생물발효차들의 총 질소 함량은 발효온도가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 보였다. 또한 15종의 균주들을 접종한 미생물발효차들은 총 질소 함량은 4~5%로 측정되어 비교적 많은 함량을 나타내었다.
- 따라서 이러한 결과로 미생물발효차의 총 질소 함량은 원료의 채취시기 및 제조과정중의 발효온도나 습도에 따라서 차이를 보이기 때문에 미생물발효차의 품질평가 지표로 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

Table 3-21. Total nitrogen contents of microbial fermented tea

Sample	Material	Types	Conditions	Periods	Total nitrogen (%)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	4.13±0.07
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	4.10±0.36
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	4.76±0.21
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	3.83±0.34
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	4.34±0.17
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	4.08±0.13
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	2.62±1.30
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	3.37±0.38
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	3.09±0.78
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	3.92±0.22
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	4.16±0.07
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	3.66±0.17
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	3.54±0.08
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	4.34±0.17
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	4.22±0.34
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	3.11±0.48
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	5.84±0.85
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	3.23±0.63
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	6.04±0.72
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	5.11±0.00

SF-05	중국	자연발효	45°C,40%	7일×5회	5.68±0.54
SF-06	중국	자연발효	45°C,50%	7일×5회	5.45±1.02
SF-07	중국	자연발효	55°C,30%	7일×5회	4.80±0.18
SF-08	중국	자연발효	55°C,40%	7일×5회	2.44±1.35
SF-09	중국	자연발효	55°C,50%	7일×5회	5.30±0.00
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45°C,40%	7일×5회	3.63±0.09
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45°C,40%	7일×5회	3.46±0.06
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45°C,40%	7일×5회	3.42±0.13
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45°C,40%	7일×5회	3.89±0.03
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45°C,40%	7일×5회	3.38±0.13
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45°C,40%	7일×5회	4.40±0.14
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45°C,40%	7일×5회	3.56±0.09
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45°C,40%	7일×5회	4.12±0.09
SF-05	중국	접종발효(15종)	45°C,40%	7일×5회	5.68±0.54
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	4.85±0.09
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	4.39±0.15
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+35	7일×4회	4.39±0.16
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+45	7일×4회	4.22±0.18
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	4.44±0.26
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	4.07±0.05
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	4.91±1.07
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	4.21±0.10
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	4.88±0.03
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	4.20±0.19

(나) 색도

- 찻잎 중의 식물성 색소는 외관과 수색에 직접적인 영향을 주며 맛과 향미에도 약간의 영향을 준다³¹⁾. 4종의 모차와 92종의 미생물발효차들의 찻잎 및 차 증류수 추출액의 L, a, b 값을 각각 측정해본 결과는 Table 3-22와 Table 3-29에 나타내었다.
- 찻잎 면의 밝기를 나타내는 L값은 20.30~31.68로 국내에서 채취한 소엽종 찻잎을 높은 온도로 발효 시킬 때 이 가장 낮은 값을 보여 제일 어두운 것을 알 수 있었고 a값은 중국산 대엽종 찻잎으로 발효온도 45°C, 50% 수분함량으로 발효시킨 미생물 발효차가 가장 높은 a값을 보였다.
- b값을 측정한 결과는 국내에서 채취한 소엽종 찻잎으로 낮은 온도에서 발효시킨 차가 가장 낮은 b값 보였으며 중국산 대엽종 찻잎으로 높은 수분함량 조건에서 발효시킨 미생물발효차가 12.38로 가장 높은 b값을 보였다.
- 비교적 중국산 대엽종 찻잎이 국내에서 채취한 찻잎보다 더 높은 L값과 b값을 보

여 색이 좀 더 밝고 녹색에 가까운 것을 알 수 있었다.

- 그러나 원료의 채취시기 및 제조과정중의 발효온도나 습도, 접종한 미생물의 종류에 따라서 차이를 보이지 않기 때문에 미생물발효차의 품질평가지으로서 부적절한 것으로 생각되었다.
- 차의 열수 추출액에서 L값은 42.38~92.84, a값은 -1.44~43.12, b값은 5.12~12.38으로 측정되었는데 35℃, 50%의 수분으로 국내에서 6월에 채취한 찻잎으로 자연 발효시킨 미생물발효차의 추출액이 35.14로 가장 낮은 L값을 보였다, 반면, 중국산 찻잎의 추출액이 93.05로 가장 높은 L값을 보였고 a값은 국내에서 6월에 채취한 찻잎이 다른 미생물발효차 추출액에 비해 낮은 것을 알 수 있었다. b값에 있어서는 35℃, 30%의 수분으로 중국산 찻잎을 발효시킨 미생물발효차의 추출액이 92.99로 가장 높은 값을 보였다.
- 그러나 차 종류수 추출액 역시 원료의 채취시기나 제조과정중의 발효온도나 습도, 접종한 미생물의 종류에 따라서 차이를 보이지 않기 때문에 미생물발효차의 품질평가지표로 부적절한 것으로 판단되었다.

Table 3-22. Hunter value of microbial fermented tea

Sample	Material	Types	Conditions	Periods	L*	a*	b*
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	20.92±0.86	3.50±0.34	7.06±0.88
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	27.82±1.42	4.37±0.32	9.50±0.72
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	28.61±0.86	5.60±0.06	11.12±0.54
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	27.23±0.58	2.68±0.10	7.27±0.40
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	26.71±1.32	3.97±0.34	8.41±0.81
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	25.67±0.86	4.45±0.20	8.43±0.39
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	20.45±1.29	3.27±0.55	5.92±0.59
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	20.67±0.28	2.59±0.15	4.78±0.19
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	20.02±0.28	2.64±0.44	4.42±0.36
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	28.75±0.01	4.40±0.02	8.60±0.02
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	25.65±0.01	3.96±0.03	7.48±0.04
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	29.71±0.02	4.46±0.01	8.74±0.02
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	29.56±0.01	4.68±0.01	8.94±0.02
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	26.71±1.32	3.97±0.34	8.41±0.81
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	29.61±0.01	4.27±0.02	8.27±0.02
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	28.97±0.02	3.92±0.01	8.26±0.08
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	24.52±0.17	3.12±0.23	7.99±0.36
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	28.96±0.13	4.26±0.33	11.90±0.39
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	30.22±0.41	4.84±0.27	12.38±0.49

SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	27.08±0.40	2.60±0.24	7.67±0.48
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	28.65±1.67	4.50±0.55	9.26±0.51
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	25.27±0.38	5.76±0.10	9.66±0.20
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	23.84±0.51	2.47±0.23	6.24±0.21
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	24.32±0.65	2.59±0.17	6.39±0.58
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	24.68±0.82	2.18±0.09	6.07±0.37
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	27.94±0.46	3.80±0.16	8.62±0.32
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	26.33±0.36	3.27±0.26	7.66±0.37
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	26.86±0.85	3.72±0.40	8.48±0.52
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	27.74±0.49	2.96±0.25	7.89±0.12
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	25.91±0.82	3.10±0.25	7.37±0.20
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	29.25±0.02	3.09±0.27	7.99±0.08
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	28.18±1.00	3.26±0.10	8.19±0.47
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	28.47±0.70	2.98±0.27	8.02±0.27
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	28.65±1.67	4.50±0.55	9.26±0.51
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	25.43±0.01	4.64±0.02	8.15±0.02
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	28.05±0.02	3.75±0.02	7.51±0.01
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+35	7일×4회	29.13±0.02	4.37±0.01	8.99±0.03
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+45	7일×4회	26.45±0.01	3.16±0.03	6.20±0.03
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	25.28±0.00	5.03±0.04	8.07±0.03
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	29.45±0.01	3.40±0.01	7.74±0.01
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	26.28±0.01	3.36±0.01	6.79±0.05
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	26.02±0.01	3.93±0.00	6.96±0.01
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	25.40±0.01	4.56±0.01	7.13±0.05
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	27.75±0.02	3.36±0.03	6.49±0.06

Table 3-23. Hunter value of hot water extract of microbial fermented tea

Sample	Material	Types	Conditions	Periods	L*	a*	b*
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	67.91±0.04	24.67±0.04	86.57±0.03
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	42.38±0.03	41.60±0.14	70.47±0.13
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	35.14±0.02	42.38±0.03	58.72±0.05
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	88.26±0.13	3.86±0.05	41.71±0.09
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	71.81±0.19	24.27±0.41	72.61±1.55
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	76.33±0.14	19.29±0.12	57.93±0.20
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	88.41±0.12	3.76±0.08	41.64±0.17
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	74.29±0.19	18.95±0.14	68.02±0.27
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	85.85±0.30	7.64±0.01	40.44±0.07
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	67.99±1.16	29.79±0.01	79.63±0.05
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	60.31±0.03	34.25±0.04	88.36±0.16
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	57.80±0.01	37.14±0.01	91.45±0.19
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	67.61±0.02	28.17±0.01	79.40±0.11
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	71.81±0.19	24.27±0.41	72.61±1.55

SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	65.94±0.02	28.46±0.01	79.73±0.10
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	57.78±0.01	37.43±0.07	89.89±0.11
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	57.62±0.11	33.83±0.10	92.99±0.21
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	47.60±0.50	39.53±0.08	79.00±0.86
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	44.59±0.20	41.20±0.09	74.26±0.34
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	85.13±0.07	7.10±0.03	51.55±0.07
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	59.88±0.32	35.91±0.13	84.95±1.83
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	53.07±0.20	39.16±0.09	83.84±0.29
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	91.03±0.33	1.90±0.01	31.32±0.14
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	93.05±0.32	1.37±0.03	23.94±0.04
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	88.53±0.18	4.96±0.09	34.02±0.29
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	79.72±0.03	15.68±0.13	70.44±0.33
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	81.37±0.02	11.98±0.16	61.10±0.43
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	73.89±0.16	23.69±0.10	82.34±0.14
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	75.32±0.20	19.48±0.17	78.61±0.30
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	77.66±0.02	16.22±0.01	68.56±0.02
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	70.05±0.03	25.72±0.06	87.33±0.01
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	75.94±0.06	17.52±0.05	75.04±0.06
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	70.43±0.03	23.56±0.03	84.48±0.08
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	59.88±0.32	35.91±0.13	84.95±1.83
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	43.69±0.01	43.12±0.01	72.89±0.10
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	74.61±0.01	18.03±0.01	71.99±0.05
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+35	7일×4회	60.15±0.01	33.61±0.02	82.07±0.03
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+45	7일×4회	64.78±0.04	30.45±0.02	80.02±0.06
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+35,45	7일×4회	59.66±0.01	33.58±0.01	78.82±0.06
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+45,35	7일×4회	71.93±0.02	26.37±1.51	70.99±0.02
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	69.43±0.02	27.43±0.01	74.25±0.03
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	51.86±0.02	37.77±0.01	82.05±0.11
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+35,45,35	7일×4회	61.62±0.02	31.17±0.01	75.16±0.10
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+45,35,45	7일×4회	79.37±0.01	16.65±0.01	53.18±0.04

(다) pH 및 총산도

- Table 3-24는 미생물발효차의 pH와 총 산도를 나타낸 것인데 전체적으로 4.50~6.81의 pH를 나타내었다.
- 온도, 수분 발효기기, 균주접종 등을 달리한 발효조건에서 제조한 발효차 중 관능평가 등급이 좋았던 시료들의 pH는 대체로 5.5~6.5 사이를 나타내었다.
- 45℃, 40%의 수분으로 자연 발효시킨 미생물발효차중 국내에서 6월에 채취한 찻잎으로 발효시킨 미생물발효차가 5월, 7월에 채취한 찻잎으로 발효시킨 미생물발효차보다 pH가 더 낮은 것으로 나타나 관능평가 결과와 일치하였다. 45℃에서 수분함

량을 달리하여 발효시킨 미생물발효차들은 수분함량이 높아짐에 따라 pH가 증가하는 경향을 보였다.

- 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Aspergillus* T011, *Penicillium* G051, *Penicillium* C151, *Penicillium* G121, *Penicillium* C091, *Lichtheima* R011, *Rhizopus* S201, *Debaryomyces* H011, *Rhodospiridium* P011, *Candida* T181, *Eurotium* C081, *Eurotium* C181 등 15종의 균주들을 혼합하여 접종한 미생물발효차에서 가장 높게 나타났고 *Aspergillus* N091, *Penicillium* G121, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011를 접종한 발효차의 pH가 가장 낮은 것을 알 수 있었다. 이상으로 pH는 발효 시 수분 함량과 밀접한 관계가 있어 수분함량이 높을수록 pH가 높아지는 경향을 보였다. 또한 관능적 등급이 높은 시료의 pH는 5.5~6.5 사이이며 대체로 pH가 높을수록 관능적 등급이 높은 경향을 보였다³²⁾.
- 반면, 산도는 0.010~.05%의 범위를 나타내니 그 차이가 크지 않았으며 일정한 경향을 보이지 않아 품질평가 사용하기에 부적합 하다고 판단되었다.

Table 3-24. pH and total acidity of microbial fermented teas

Sample	Material	Types	Conditions	Period	pH	Total acidity (%)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	5.60±0.02	0.02±0.00
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	5.97±0.01	0.03±0.00
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	6.02±0.00	0.03±0.00
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	5.95±0.01	0.02±0.00
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	6.00±0.00	0.01±0.00
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	6.52±0.02	0.00±0.00
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	4.56±0.01	0.04±0.00
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	4.53±0.02	0.04±0.00
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	4.50±0.26	0.02±0.00
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	6.13±0.01	0.01±0.00
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	5.03±0.02	0.02±0.00
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	4.80±0.01	0.02±0.00
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	5.14±0.01	0.01±0.00
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	6.00±0.00	0.01±0.00
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	5.36±0.01	0.01±0.00
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	6.05±0.01	0.02±0.00
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	5.96±0.00	0.04±0.00
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	5.94±0.01	0.05±0.00
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	5.95±0.01	0.04±0.00
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	4.72±0.01	0.04±0.00
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	6.10±0.01	0.03±0.00
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	6.62±0.00	0.00±0.00
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	4.75±0.04	0.05±0.00

SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	4.62±0.01	0.04±0.00
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	4.64±0.02	0.03±0.00
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	5.22±0.01	0.02±0.00
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	4.98±0.01	0.02±0.00
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	5.48±0.01	0.02±0.00
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	5.03±0.01	0.04±0.00
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	5.22±0.01	0.03±0.00
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	5.39±0.01	0.05±0.00
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	5.06±0.01	0.05±0.00
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	5.22±0.01	0.06±0.00
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	6.10±0.01	0.03±0.00
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	6.13±0.01	0.02±0.00
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	5.47±0.01	0.01±0.00
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+35	7일×4회	6.41±0.01	0.01±0.00
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+45	7일×4회	6.19±0.01	0.01±0.00
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	6.71±0.01	0.01±0.00
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	6.33±0.01	0.01±0.00
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	6.26±0.01	0.01±0.00
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	6.01±0.01	0.01±0.00
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	6.81±0.01	0.01±0.00
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	6.22±0.01	0.01±0.00

(라) 가용성 고형분

- 가용성분은 차탕에 용출되는 성분, 예를 들면 아미노산, 차 폴리페놀, 카페인, 당류, 펙틴, 가용성 비타민과 무기질 등이 있고 차탕의 맛을 좌우한다. 가용성분이 많은 경우 맛은 진해지고 풍부해진다³³⁾. 거꾸로 가용성분이 적어지면 맛은 얇아진다.
- Table 3-25는 미생물발효차의 가용성 고형분 함량을 나타낸 것인데 5.67~30.67 Brix로 45℃에서 50%의 수분으로 자연발효 시킨 한국 미생물발효차가 가장 낮은 가용성 고형분 함량을 보였다. 반면, 45℃에서 40%의 수분으로 균주를 접종하여 발효시킨 미생물발효차의 가용성 고형분 함량이 가장 높은 것을 알 수 있었다.
- 국내에서 시기별로 채취한 차잎으로 발효시킨 미생물발효차중 6월에 채취한 차잎으로 제조한 발효차가 다른 차잎에 비해 가장 낮은 함량을 보였고 국내산 소엽종 차잎에 비해 중국산 대엽종 차잎으로 발효시킬 때, 높은 함량을 보였다.
- 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 *Aspergillus* N091, *Penicillium* G051, *Rhizopus* S201, *Rhodosporidium* P011 이 4가지 균주를 접종한 미생물발효차가 다른 발효차에 비해 가장 높은 가용성 고형분 함량을 보였다.
- 또한 온도와 수분함량을 달리하여 자연발효시킨 한국 및 중국 미생물발효차들은 수분함량이 증가함에 따라 가용성 고형분 함량이 감소하는 경향을 보였다. 따라서

보다 심도있는 연구가 진행된다면 가용성 고형분 함량을 미생물발효차의 품질 평가 지표로 이용 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

Table 3-25. Contents of soluble solid in microbial fermented teas

Sample	Material	Types	Conditions	Periods	Soluble solid content (Brix)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	14.00±0.00
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	21.33±0.58
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	22.67±0.58
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	16.67±0.58
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	7.00±1.00
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	5.67±0.58
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	16.67±0.58
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	22.33±0.58
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	10.67±0.58
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	6.67±0.58
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	14.67±0.58
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	11.67±0.58
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	9.67±0.58
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	7.00±1.00
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	15.67±0.58
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	11.67±0.58
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	29.00±0.00
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	29.00±0.00
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	25.33±2.89
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	29.33±0.58
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	25.67±0.58
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	17.00±0.00
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	29.67±0.58
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	30.00±0.00
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	27.33±0.58
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	11.33±0.58
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	10.00±0.00
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	10.33±1.15
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	21.33±0.58
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	12.00±0.00
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	15.33±0.71
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	11.00±0.00
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	16.33±0.58
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	25.67±0.58
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	23.67±0.58
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	14.00±0.00
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+35	7일×4회	13.00±0.00
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+45	7일×4회	14.00±0.00
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+35,45	7일×4회	13.33±0.58
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+45,35	7일×4회	14.67±0.58
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	13.00±0.00
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	17.00±0.00
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	16.67±0.58
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	13.00±0.00

(마) 총당

- 발효방법을 달리하여 제조한 미생물발효차의 총당 함량을 분석해본 결과 579.73~1189.69 mg/L 수준으로 함유되어있다(Table 3-26).
- 채취시기별 미생물발효차의 총당은 5월에 채취한 차잎으로 제조한 미생물발효차에서 가장 높은 함량을 보였고 6월에 채취한 차잎을 이용하여 제조한 미생물발효차일 경우에는 수분함량이 증가함에 따라 총당함량이 감소하는 것을 알 수 있었다.
- 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 *Aspergillus* N091, *Penicillium* G121, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011를 접종한 발효차가 가장 높은 함량을 보인 반면, *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Penicillium* G051, *Penicillium* G121, *Penicillium* C091, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011등 7종의 미생물을 혼합하여 접종한 미생물발효차가 가장 낮은 총당함량을 보였다. 그러나 발효온도나 원료에 따라서 일정한 패턴을 보이지 않아 미생물발효차의 품질지표로 사용하기에는 역부족이라는 결론을 얻을 수 있었다.

Table 3-26. Contents of total sugar in microbial fermented teas

Sample	Material	Types	Conditions	Periods	Total sugar (mg/L)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	865.17±70.79
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	938.35±44.40
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	937.97±11.57
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	622.26±2.89
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	732.22±5.18
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	579.73±4.04
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	886.25±32.44
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	785.86±31.25
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	1189.69±65.83
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	1354.06±41.46
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	765.17±9.41
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	806.93±56.15
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	773.22±2.30
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	732.22±5.18
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	653.30±5.18
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	672.07±1.15
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	937.20±32.76
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	987.39±4.79
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	1157.89±9.22
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	733.75±15.61
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	765.56±12.82

SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	696.59±14.78
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	750.61±16.15
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	701.95±14.36
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	1096.21±26.34
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	607.70±3.04
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	1046.78±21.29
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	658.28±24.00
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	872.84±19.14
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	669.39±62.76
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	733.75±8.13
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	644.48±6.99
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	688.93±1.76
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	765.56±12.82
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	816.13±46.47
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	653.30±10.04
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+,35	7일×4회	777.43±4.79
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+,45	7일×4회	734.14±5.27
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	1021.88±10.04
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	672.07±13.55
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	1234.52±165.60
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	606.17±4.65
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	640.65±2.89
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	656.36±4.04

(바) 총 유리아미노산

- 아미노산은 차의 감칠맛을 나타내는 성분으로 카페인의 쓴맛, 카테킨의 떫은 맛과 더불어 차의 맛을 형성하는 중요한 요소이다³⁴⁾. 총 41종의 미생물발효차의 유리아미노산 분석 결과는 Table 3-27과 같다.
- 일반적으로 미생물발효차는 발효가 진행됨에 따라 총 유리아미노산의 함량이 감소되는데 본 실험에서 측정된 미생물발효차의 총 유리아미노산의 함량은 17.09~316.14 mg/100 mL로 중국산 대엽종 차잎으로 발효한 차가 가장 높은 함량을 보임을 알 수 있었다.
- 총당에 이어 총 유리아미노산 역시 5월에 채취한 국내산 차잎으로 제조한 미생물발효차가 60.87 mg/100 mL로 6월 및 7월에 채취한 차잎으로 제조한 미생물발효차보다 높은 함량을 보임을 알 수 있었다.
- 또한 45℃에서 6월에 채취한 국내산 차잎으로 발효시킨 미생물발효차들은 수분함량이 높을수록 총 유리아미노산 함량은 감소하는 경향을 보였다.
- 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차의 총 유리아미노산 함량에 있어서는 *A. niger*, *P. glabrum*, *A. ramosa*, *D. hansenii*를 접종한 발효차가 가장 높은 함량을 보인 반면, 혼합하여 접종한 미생물발효차는 낮은 총 유리아미노산 함량을 보였다.

- 또한 45℃, 40%의 수분으로 발효기간을 달리하여 제조한 미생물발효차들에서는 발효기간이 길어짐에 따라 총 유리아미노산의 함량이 감소함을 알 수 있었다.
- 이러한 결과 총 유리아미노산은 미생물발효차의 가공방법, 발효조건 및 발효기간에 따라 시료들간의 차이를 확인할 수 있었으나 미생물발효차의 품질평가 지표로 사용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각되었다.

Table 3-27. Contents of total free amino acid in microbial fermented teas

Sample	Material	Types	Conditions	Periods	Total free amino acid (mg/100 mL)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	90.70±33.54
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	115.53±37.07
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	127.00±44.76
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	41.82±19.62
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	34.07±14.04
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	150.47±56.19
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	110.09±28.72
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	44.62±19.47
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	15.52±7.41
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	66.81±22.22
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	40.70±15.36
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	49.97±16.90
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	24.79±11.78
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	34.07±14.04
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	22.17±9.19
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	17.09±5.09
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	316.14±87.37
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	296.33±58.22
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	238.73±64.66
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	224.78±32.85
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	59.75±22.42
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	36.80±16.72
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	33.45±16.98
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	240.89±42.54
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	117.06±36.42
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	24.61±10.18

MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	244.58±55.58
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	26.89±8.74
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	45.62±19.90
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	23.38±10.25
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	60.87±15.41
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	30.03±8.74
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	43.89±13.31
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	59.75±22.42
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	91.31±22.26
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	29.51±12.51
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+,35	7일×4회	74.20±24.79
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+,45	7일×4회	41.31±13.68
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	43.71±21.94
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	48.49±16.86
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	25.00±10.28
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	60.64±26.80
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	59.04±24.36
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	61.41±17.06

(6) 미생물발효차의 영양성분 분석

(가) 불소

- 차에 풍부하게 함유되어 있는 불소는 치아 면을 코팅하여 산으로부터 치아를 보호해주는 효능을 갖고 있다³⁵⁾. 본 실험에서 제조된 미생물발효차의 불소함량을 측정해본 결과 198.20~1378.29 mg/L로 발효차들간의 차이가 심한 것으로 나타났다 (Table 3-28). 55℃에서 30%의 수분으로 적은 양으로 발효시킨 미생물발효차가 1378.29 mg/L로 가장 높은 불소 함량을 보였고 또한 시기별로 채취한 첫잎으로 제조한 미생물발효차에서는 5월에 채취한 첫잎으로 제조한 미생물발효차가 815.64 mg/L로 가장 높은 함량을 나타냈다.
- 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 *Aspergillus* N091만 접종한 미생물발효차가 가장 낮은 불소함량을 보였고 *Aspergillus* N091, *Penicillium* G051, *Rhizopus* S201, *Rhodosporidium* P011 이 4가지 균주를 접종한 미생물발효차가 다른 발효차에 비해 가장 높은 불소함량을 보였다.
- 온도와 습도를 달리하여 6월에 채취한 국내산 첫잎으로 제조한 미생물발효차 경우 자연발효와 접종발효 모두 수분함량이 증가함에 따라 불소함량이 감소하는 경향을

볼 수 있었다.

- 따라서 발효차종 함유된 불소는 미생물발효차의 가공방법에 따라 일정한 패턴을 보였으나 품질평가 지표로 사용하기 위해서는 보다 깊은 연구가 필요하다고 생각되었다.

Table 3-28. Contents of fluoride in microbial fermented teas

Sample	Material	Types	Conditions	Period	Fluoride (mg/L)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	370.79
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	475.46
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	339.35
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	892.82
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	361.02
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	240.63
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	1378.29
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	1272.44
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	348.89
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	259.10
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	592.77
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	525.30
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	345.20
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	361.02
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	273.18
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	291.66
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	705.42
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	403.50
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	631.68
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	764.04
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	315.48
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	815.64
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	539.87
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	652.80
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	198.20
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	333.09
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+,35	7일×4회	414.14
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+,45	7일×4회	498.65
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	212.82
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	419.19
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	265.76
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	326.58

(나) 데아닌

- 차는 다른 기호음료에 비해 질소화합물, 폴리페놀, 당, 유기산, 비타민 및 무기질 등을 많이 함유하고 있는 것이 특징이며, 아미노산은 차의 맛과 깊은 관계가 있고 데아닌과 같은 특정 아미노산은 차의 품질에 크게 영향을 미치며, 실제 이들 아미노산 성분들이 가공된 녹차 제품의 가격과도 상관이 있다고 알려져 있다³⁶⁾.
- 차에는 약 25종의 아미노산이 함유되어 있는 것으로 보고되는데, 이중 데아닌은 달고 감칠맛을 나타내는 감미의 주체이다. 차 잎의 아미노산 중 가장 많이 존재하는 성분으로 함유 아미노산 중 약 60%를 차지하는 것으로 알려져 있고, 함량이 높을수록 고급 녹차로 평가된다.
- 32종의 미생물발효차중 데아닌 함량을 조사한 결과 Table 3-29에서와 같이 1452.63~3438.00 mg/100 g 범위를 나타냈다. 4종의 모차에서는 7월에 보성에서 채취한 찻잎에 데아닌이 가장 적게 함유된 것으로 나타났고 5월에 채취한 찻잎의 데아닌 함량이 가장 높은 것을 알 수 있었다.
- 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 *Aspergillus* N091, *Aspergillus* F211, *Penicillium* G051, *Penicillium* G121, *Penicillium* C091, *Lichtheima* R011, *Debaryomyces* H011 등 7종의 미생물을 혼합하여 접종한 미생물발효차가 가장 높은 것으로 나타난 반면, 15종의 균주들을 모두 접종한 미생물발효차가 가장 낮은 데아닌 함량을 보였다. 그러나 가공방법이나 원료 및 발효조건에 따른 일정한 차이를 보이지 않아 미생물발효차의 품질평가 지표로 사용하기에는 어려움이 있을 것으로 판단되었다.

Table 3-29. Contents of theanine in microbial fermented teas

Sample	Material	Types	Conditions	Period	Theanine (mg/100g)
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	1777.59
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	3219.36
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	3438.00
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	2229.35
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	1705.98
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	1842.83
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	2145.59
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	1591.83
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	1906.94
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	1974.15
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	1578.68

SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	2141.61
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	2185.61
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	1705.98
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	1831.38
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	2283.86
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	2284.35
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	1770.38
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	1452.63
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	2186.48
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	1916.31
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	1311.87
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	1825.22
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	1563.18
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	2252.16
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	2051.76
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,+,35	7일×4회	1686.80
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,+,45	7일×4회	2538.75
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	2177.78
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	2125.61
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	2121.75
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	1485.42

(7) 미생물발효차 제조과정 중 생육 미생물의 거동

- 6월 모차를 이용하여 접종 균수를 달리한 후 45℃, 수분함량 40%의 발효조건으로 35일간 미생물의 거동을 관찰한 결과, 관능적으로 우수한 MFT39, MFT36의 시료에서 *Rhizomucor* P211의 수가 적으며 *Aspergillus* F211가 우점종으로 자라난 것을 확인할 수 있었다. 이 사실에 근거하여 *Aspergillus* F211가 관능적으로 우수한 맛을 생성하는데 관여 하며 반대로 *Rhizomucor* P211는 관능적인 면에서 좋지 않은 영향을 줄 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

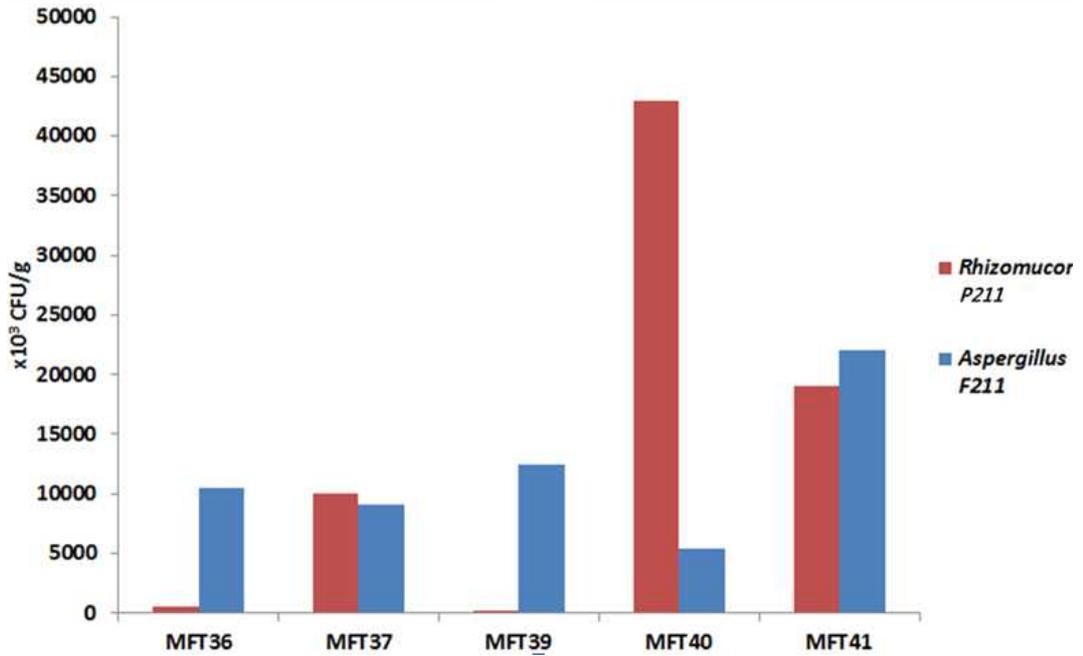


Fig. 3-36. Behaviors of microorganisms in microbial fermented tea during fermentation

- 5월 생산 모차(NFT1), 6월 생산 모차(NFT4), 7월 생산 모차(NFT8)를 이용하여 발효시키면서 각 모차별 생육미생물의 차이를 관찰 한 결과 채취시기가 늦어질수록 *Aspergillus* N091, *Aspergillus* N092가 생육이 더 활발하다는 것을 확인 할 수가 있다.

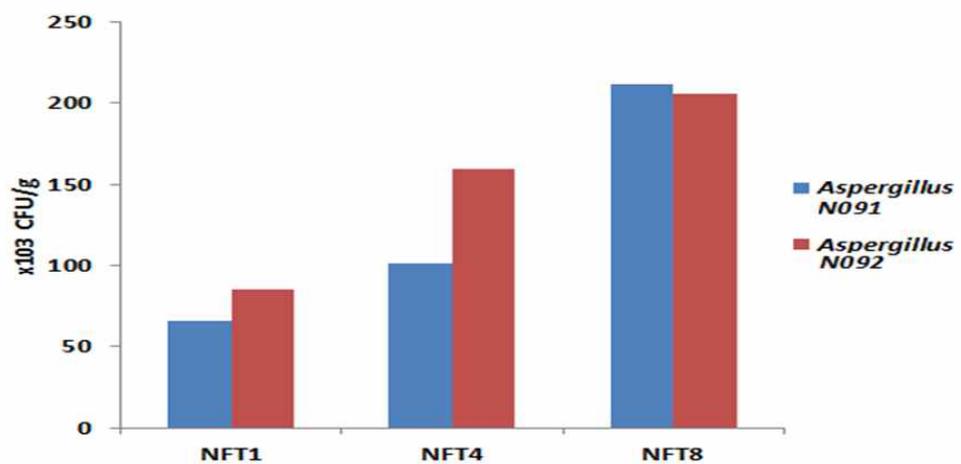


Fig. 3-37. Behaviors of microorganisms in microbial fermented tea during fermentation by different harvest period of raw tea

(8) 제조된 미생물발효차의 기능성 및 기능성분 평가

(가) L-citrulline 생성억제 활성 측정

- 온도와 습도 조건을 달리하여 제조한 한국산 미생물발효차(SF10~17)의 항산화 활성은 iNOs의 생성 기전을 통한 L-citrulline 생성억제활성을 측정한 결과, 발효온도와 습도가 높은 조건에서 발효 할수록 L-citrulline 생성을 억제함을 알 수 있었다. 또한, 관능적으로 좋지 않은 시료인 SF-10(35℃, 30%)와 SF-15(45℃, 50%)에서 가장 높은 L-citrulline 생성억제능을 보였으나 관능평가 면에서 우수 하였던 SF-14(45℃, 40%)시료에서도 상당한 정도의 활성을 나타냈다.
- 이상의 결과로 보아 선별된 15균주를 이용하여 한국산 미생물발효차를 개발하였을 때 L-citrulline 생성억제 작용이 우수한 발효차로 개발할 수 있는 가능성이 제시되었으나 발효조건과 접종미생물에 대한 보다 심도 있는 고찰과 연구가 필요하다고 생각되었다.

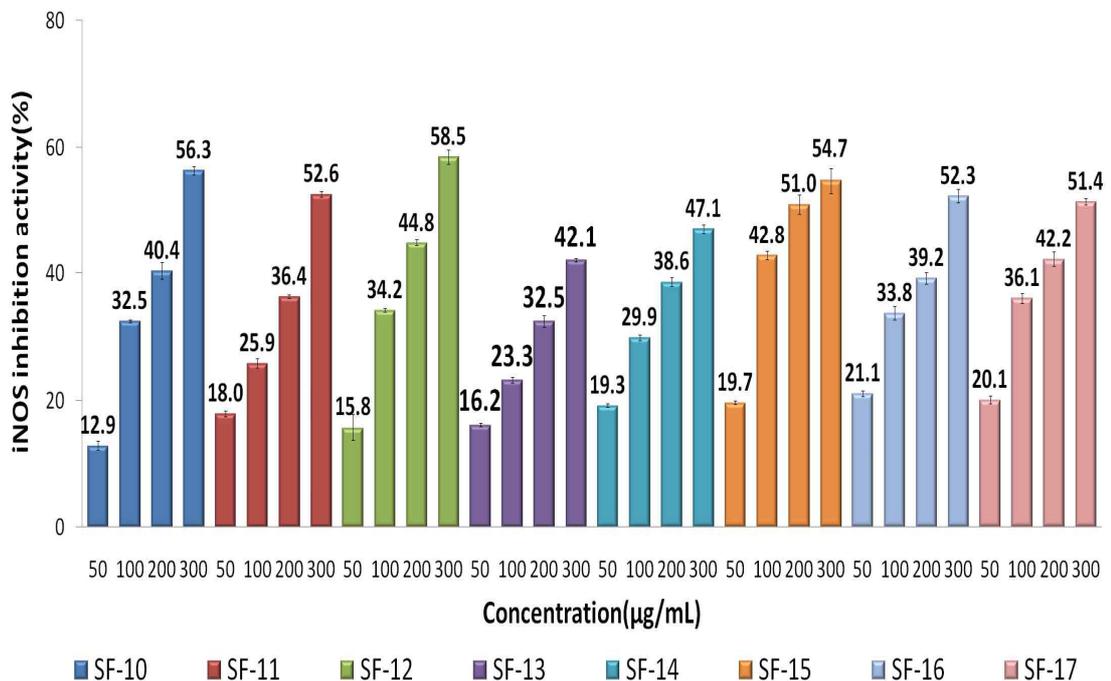


Fig. 3-38. Nitric oxide inhibitory activities of microbial fermented tea

(나) Statin 화합물 분석

- 6월 모차를 이용하여 다양한 조건에서 발효시킨 후 얻어진 각각의 발효차에 함유되어 있는 statin화합물의 양을 측정하였다.
- 모차에 접종 균주의 수를 다르게 하여 발효시킨 경우, 균을 접종하지 않은 시료(MFT-34)와 1종의 균을 접종한 시료(MFT-41)에 비하여 다수의 균을 접종시킨 시료(MFT-39)의 statin화합물 함량이 가장 높게 측정되었다(Table 3-30).
- 원료의 채취 시기별 접종방법에 따른 statin화합물 함량 변화를 측정한 결과, 접종 발효 시료(NFT-1, NFT-4, NFT-8)의 statin화합물 함량이 자연발효에 비해 전반적으로 높았으며, 5월모차 > 7월모차 > 6월 모차의 순으로 statin화합물 함량이 나타났다. 5월 모차를 사용하여 발효 시킨 경우 statin화합물 함량이 월등히 높은 결과로 보아 미생물발효차 제조 시 5월에 수확한 찻잎을 이용해 제조한 모차를 사용하는 것이 건강 기능성에 유리할 것으로 생각되었다(Table 3-31)
- 혼합발효에 따른 statin화합물 함량 변화를 측정한 결과, 단일온도(35℃, 45℃)에서 자연 발효한 시료보다 발효온도 조절 시료(SIN-19, SIN-20) 및 발효과정 중 다른 온도에서 배양된 시료를 혼합하여 발효시킨 시료(SIN-17, SIN-18)가 높은 statin 화합물 함량을 나타냈다(Table 3-32).
- 혼합발효 시료 중 SIN-19의 statin화합물 함량이 가장 높았으며 35℃에서 발효를 시작한 SIN-19 및 SIN-17의 경우 45℃에서 발효를 시작한 다른 시료들보다 높은 statin화합물 함량을 보여 발효 시 35℃로 시작하여 중간에 45℃로 온도 조절을 주는 발효방법이 statin화합물 생성에 유용하다고 판단되었다.

Table 3-30. Comparison of statins contents in microbial fermented teas manufactured by inoculation of various microorganisms

Sample	mg/g(d.w.)								Total
	Prava statin-H	Atova statin-H	Com pactin-H	Com pactin-L	Lova statin-H	Lova statin-L	Simva statin-H	Simva statin-L	
MFT-34 ^a	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
MFT-40 ^b	N.D	N.D	N.D	N.D	0.030	N.D	N.D	N.D	0.030
MFT-41 ^c	N.D	N.D	N.D	N.D	0.019	N.D	N.D	N.D	0.019

a : 6월모차/자연발효 b : 6월모차/접종발효(15종) c : 6월모차/접종발효(1종)

Table 3-31. Comparison of statins contents in microbial fermented teas manufactured by different harvest time and inoculating method

Sample	mg/g(d.w.)								Total
	Prava statin-H	Atova statin-H	Com pactin-H	Com pactin-L	Lova statin-H	Lova statin-L	Simva statin-H	Simva statin-L	
NFT-1 ^a	N.D	0.233	N.D	N.D	0.015	N.D	0.001	0.005	0.254
NFT-4 ^b	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.000
NFT-8 ^c	N.D	0.040	N.D	0.004	0.003	N.D	N.D	N.D	0.047

a : 5월모차/접종발효/45°C, 40%/7일X5회 b : 6월모차/접종발효/45°C, 40%/7일X5회
c : 7월모차/접종발효/45°C, 40%/7일X5회

Table 3-32. Comparison of statins contents in microbial fermented teas manufactured by different fermentation process

Sample	mg/g(d.w.)								Total
	Prava statin-H	Atova statin-H	Com pactin-H	Com pactin-L	Lova statin-H	Lova statin-L	Simva statin-H	Simva statin-L	
SIN-17 ^a	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.017	N.D	0.017
SIN-18 ^b	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
SIN-19 ^c	0.116	N.D	N.D	N.D	N.D	0.008	0.019	N.D	0.142
SIN-20 ^d	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.045	N.D	0.045

a : 6월모차/접종발효/35, +, 35, 45°C, 40% b : 6월모차/접종발효/45, +, 45, 35°C, 40%
c : 6월모차/접종발효/35, 45, 35, 45°C, 40% d : 6월모차/접종발효/45, 35, 45, 35°C, 40%

(9) 제조된 미생물발효차의 식품위해 요소 분석

- 미생물발효차는 주요 미생물이 *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속 곰팡이임이 밝혀짐에 따라 이 균주가 생성할 수 있는 독소인 aflatoxin과 ochratoxin의 분석법을 확립하고 제조된 미생물발효차를 대상으로 aflatoxin과 ochratoxin의 존재 여부를 모니터링 하였다. 그 결과 모든 시료에서 aflatoxin과 ochratoxin이 검출되지 않았다.

Table 3-33. Microtoxin contents in microbial fermented teas manufactured by different fermentation process

Sample	Material	Fermentation Conditions			Mycotoxins(ppb)	
		Manner	Condition	Period	Aflatoxin	Ochlatoxin
SF-10	6월	자연발효	35℃,30%	7일×5회	N.D	N.D
SF-11	6월	자연발효	35℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-12	6월	자연발효	35℃,50%	7일×5회	N.D	N.D
SF-13	6월	자연발효	45℃,30%	7일×5회	N.D	N.D
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-15	6월	자연발효	45℃,50%	7일×5회	N.D	N.D
SF-16	6월	자연발효	55℃,30%	7일×5회	N.D	N.D
SF-17	6월	자연발효	55℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-18	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	N.D	N.D
SIN-1	6월	자연발효	45℃,40%	5일×4회	N.D	N.D
SIN-2	6월	자연발효	45℃,40%	5일×5회	N.D	N.D
SIN-7	6월	자연발효	45℃,40%	7일×3회	N.D	N.D
SIN-8	6월	자연발효	45℃,40%	7일×4회	N.D	N.D
SF-14	6월	자연발효	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SIN-9	6월	자연발효	45℃,40%	7일×6회	N.D	N.D
SF-20	6월	자연발효	45℃,40%	10일×5회	N.D	N.D
SF-01	중국	자연발효	35℃,30%	7일×5회	N.D	N.D
SF-02	중국	자연발효	35℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-03	중국	자연발효	35℃,50%	7일×5회	N.D	N.D
SF-04	중국	자연발효	45℃,30%	7일×5회	N.D	N.D
SF-05	중국	자연발효	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-06	중국	자연발효	45℃,50%	7일×5회	N.D	N.D
SF-07	중국	자연발효	55℃,30%	7일×5회	N.D	N.D
SF-08	중국	자연발효	55℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-09	중국	자연발효	55℃,50%	7일×5회	N.D	N.D
MFT-36	6월	접종발효(7종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
MFT-37	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
MFT-39	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
MFT-40	6월	접종발효(4종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
MFT-41	6월	접종발효(1종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
NFT-1	5월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
NFT-4	6월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
NFT-8	7월	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SF-05	중국	접종발효(15종)	45℃,40%	7일×5회	N.D	N.D
SIN-13	6월	접종발효(15종)	35-35	7일×4회	N.D	N.D
SIN-14	6월	접종발효(15종)	45-45	7일×4회	N.D	N.D
SIN-15	6월	접종발효(15종)	+,+,35	7일×4회	N.D	N.D
SIN-16	6월	접종발효(15종)	+,+,45	7일×4회	N.D	N.D
SIN-17	6월	접종발효(15종)	35,+,35,45	7일×4회	N.D	N.D
SIN-18	6월	접종발효(15종)	45,+,45,35	7일×4회	N.D	N.D
SIN-19	6월	접종발효(15종)	35,45,35,45	7일×4회	N.D	N.D
SIN-20	6월	접종발효(15종)	45,35,45,35	7일×4회	N.D	N.D
SIN-21	6월	접종발효(15종)	+,35,45,35	7일×4회	N.D	N.D
SIN-22	6월	접종발효(15종)	+,45,35,45	7일×4회	N.D	N.D

(10) 국내산 찻잎을 이용한 미생물발효차 시제품 제작

- 본 연구의 결과 개발된 미생물발효차 제조기술을 이용하여 우리나라 재래종(소엽종) 찻잎을 이용하여 미생물발효차 시제품(산차)를 제작하였다.



다. 요약

- 국내산 소엽종 찻잎을 이용하여 발효온도, 모차의 수분함량, 발효 균주, 발효방식 등을 달리한 다양한 조건에서 미생물발효차를 제조한 후 관능평가단에 의한 관능적 평가를 지표로 미생물발효차를 제조하기 위한 최적의 발효조건을 탐색하였다.
- 국내산 찻잎의 최적 발효온도와 수분함량을 탐색하기 위해 국내산 소엽종 찻잎으로 제조한 모차를 발효 온도 35℃에서 55℃ 까지(35, 45, 50, 55℃), 수분함량 30%에서 50% 까지(30, 40, 45, 50%) 각각 조건을 다르게 하여 35일(뒤집기 기간 7일 × 뒤집기 횟수 5회) 동안 발효하여 관능평가 하였다. 그 결과, 색, 맛, 향 모두 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 발효하였을 때 가장 우수하였다.
- 국내산 찻잎의 최적 발효기간을 탐색하기 위해 발효온도 45℃, 수분함량 40%으로 고정

시키고 발효 기간 및 뒤섞기 횟수를 달리하여 제조한 발효차의 관능평가를 실시하였다. 그 결과, 7일×5회(35일)의 조건으로 발효한 발효차의 경우 각 분야에서 최고점을 받거나 최고점을 받은 발효차와 큰 차이 없이 고르게 높은 평가를 받는 것으로 확인되어 7일×5회(35일)의 조건이 가장 바람직한 것으로 판단되었다.

- 균주의 접종발효에 의한 미생물발효차의 생산 가능성을 탐색하기 위하여 각각의 균주를 다양하게 조합하여 접종하고 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 발효시켜 미생물 발효차를 제조한 후 관능평가단에 의뢰하여 평가를 실시하였다. 그 결과, 자연 발효 시켜 제조한 발효차 보다 균주를 접종하여 제조한 발효차가 전반적으로 더 좋은 평가를 얻었으며 접종한 균주의 수가 많을수록 좋은 평가를 얻었다.
- 국내외 다양한 미생물발효차의 완제품, 미생물발효과정 중의 시료로부터 총 34종의 미생물을 분리, 동정하였으며 이 중 검출빈도를 고려하여 주요 균주로 15종을 선별하였다.
- 선택된 15종의 균주를 함께 접종하여 제조한 발효차는 다른 발효차보다 월등히 좋은 평가를 얻어 발효차를 제조하는 경우 선발된 15종의 균주를 혼합하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.
- 한국산 소엽종 찻잎을 이용한 미생물발효차의 최적 생산조건에서의 찻잎의 원료에 따른 차이를 알아보기 위하여 5월, 6월, 7월에 채취하여 제조한 국내산 모차와 중국에서 5월말에 채취한 중국산 모차를 이용하여 발효온도 45℃, 수분함량 40%의 조건에서 15종의 균주의 조합하여 접종하고 발효시켜 미생물발효차를 제조한 후 관능평가를 실시하였다. 그 결과, 7월에 찻잎을 채취하여 제조한 미생물발효차가 다른 시기에 채취한 찻잎을 원료로 한 미생물발효차보다 관능적으로 좋은 평가를 얻었다. 따라서 한국산 찻잎을 이용하여 미생물발효차를 제조하는 경우 5월에 채취한 고가의 어린 순을 이용하지 않고 상대적으로 저가인 7월말~8월초의 성숙한 찻잎을 이용하여 제조해도 관능적으로 우수한 발효차를 제조할 수 있을 것으로 판단되었다.
- 미생물발효차의 특수성분 중 gallic acid 함량은 발효가 충분히 진행되지 않은 시료의 경우 그 함량이 매우 낮은 경향을 보여 gallic acid의 함량이 발효의 진행을 판단하는 척도의 하나가 될 수 있음이 시사되었다. 또한 관능적으로 비교적 좋은 평가를 받은 발효차의 경우 100 g 당 5~40 mg 정도의 gallic acid가 함유되어 있었으며 이 함량이 지나치게 높거나 낮을 경우 관능적으로 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 것으로 판단되었다.
- 미생물발효차의 특수성분 중 methyl caprate 함량은 기호도가 높은 차일수록 적은 함

량을 나타내 methyl caprate 함량은 관능적 기호도의 척도로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

- 특히, 발효온도 45℃, 수분함량 40% 조건에서 균주접종에 의해 발효시켜 제조한 미생물 발효차의 경우 gallic acid 함량은 100 g 당 5~40 mg 정도이며 methyl caprate 함량이 낮은 값을 갖는 경향이 관찰되어 이 발효조건에서 발효가 잘 이루어졌음을 의미하는 결과로 판단되었다.
- 미생물발효차의 이화학적 성분분석 및 품질평가의 결과, 미생물발효차의 품질평가지표로 총질소, pH, 가용성 고형분 함량, 총유리아미노산 등의 함량을 사용할 수 있는 가능성이 제시 되었다. 그러나 미생물발효차의 등급 판별과 개별 기준치 설정을 확립하기 위해서는 추후 체계적인 보완연구가 수행 되어야할 것으로 생각되었다.
- 색도, 산도 총당, 불소, 데아닌 함량 등을 가공방법 원료 및 발효조건에 따른 일정한 패턴이 보이지 않아 미생물발효차의 품질 지표로 사용하기에 어려움이 있을 것으로 판단되었다. 총 질소 함량을 측정해본 결과 2.44~6.04%로 발효시의 수분함량이 높아짐에 따라 총 질소 함량도 많아지는 것을 알 수 있었다. 발효온도와 습도를 달리하여 자연발효시킨 미생물발효차들의 총 질소 함량은 45℃, 40% 수분일 때 비교적 높은 경향을 보였다. 또한 15종의 균주들을 접종한 미생물발효차들은 총 질소 함량은 4~5%로 측정되어 비교적 많은 함량을 나타내었다. 따라서 이러한 결과로 미생물발효차의 총 질소 함량은 원료의 채취시기 및 제조과정중의 발효온도나 습도에 따라서 차이를 보이기 때문에 미생물발효차의 품질평가지표로 가능성을 확인할 수 있었다.
- 온도, 수분 발효기기, 균주접종 등을 달리한 발효조건에서 제조한 발효차 중 관능평가 등급이 좋았던 시료들의 pH는 대체로 5.5~6.5 사이를 나타내었다. 45℃에서 수분함량을 달리하여 발효시킨 미생물발효차들은 수분함량이 높아짐에 따라 pH가 증가하는 경향을 보였다. 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차에서는 15종의 균주들을 혼합하여 접종한 미생물발효차에서 가장 높게 나타났다
- 가용성 고형분은 45℃에서 50%의 수분으로 자연발효 시킨 한국 미생물발효차가 가장 낮은 가용성 고형분 함량을 보였다. 반면, 45℃에서 40%의 수분으로 균주를 접종하여 발효시킨 미생물발효차의 가용성 고형분 함량이 가장 높은 것을 알 수 있었다. 또한 온도와 수분함량을 달리하여 자연발효시킨 한국 및 중국 미생물발효차들은 수분함량이 증가함에 따라 가용성 고형분 함량이 감소하는 경향을 보였다. 따라서 보다 심도있는

연구가 진행된다면 가용성 고형분 함량을 미생물발효차의 품질 평가 지표로 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

- 일반적으로 미생물발효차는 발효가 진행됨에 따라 총 유리아미노산의 함량이 감소되는데 본 실험에서 측정된 미생물발효차의 총 유리아미노산의 함량은 17.09~316.14 mg/100 mL로 중국산 대엽종 찻잎으로 발효한 차가 가장 높은 함량을 보임을 알 수 있었다. 45°C에서 6월에 채취한 보성산 찻잎으로 발효시킨 미생물발효차들은 수분함량이 높을수록 총 유리아미노산 함량은 감소하는 경향을 보였다. 또한 45°C, 40%의 수분으로 발효기간을 달리하여 제조한 미생물발효차들에서는 발효기간이 길어짐에 따라 총 유리아미노산의 함량이 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과 총 유리아미노산은 미생물발효차의 가공방법, 발효조건 및 발효기간에 따라 시료들간의 차이를 확인할 수 있었으나 미생물발효차의 품질평가 지표로서 사용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각되었다.
- 색도, 산도 총당, 불소, 데아닌 함량 등을 가공방법 원료 및 발효조건에 따른 일정한 패턴이 보이지 않아 미생물발효차의 품질 지표로 사용하기에 어려움이 있을 것으로 판단되었다.
- 이상의 결과들은 한국산 미생물발효차의 이화학적 품질평가에 있어서 중요한 참조기준으로 될 것이며 차의 품종 및 가공 방법에 따른 품질평가지표로 총질소, pH, 가용성 고형분 함량, 총유리아미노산 등의 함량을 사용할 수 있는 가능성이 제시 되었다. 그러나 미생물발효차의 등급 판별과 개별 기준치 설정을 확립하기 위해서는 추후 체계적인 보완연구가 수행 되어야할 것으로 생각되었다.
- 미생물발효차는 식품위해 요소 가능성이 높은 aflatoxin과 ochratoxin의 분석법을 확립하고 본 연구과정에서 제조된 미생물발효차를 대상으로 aflatoxin과 ochratoxin의 존재 여부를 모니터링 한 결과, 국내산 찻잎과 외국산 찻잎으로 제조된 미생물발효차 59종 모두 aflatoxin과 ochratoxin이 검출되지 않았다.

제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

○ 사업화

- 사업화명: 한국산 찻잎 이용 미생물발효차 제조
- 제품명: 미생물발효차
- 업체명: 보성차생산자조합
- 고용창출인원: 3명
- 당해연도 매출액: 30백만원
- 사업화형태: 보성차생산자조합에서 미생물발효차 생산을 위한 별도의 회사 창업, 기존 녹차, 홍차, 우롱차 등과 차별화된 미생물발효차 생산

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 성과 및 계획

○ 교육 및 지도

- 인력양성명: 미생물발효차의 이화학적, 기능적 연구
- 인력양성년도: 2009~2011년
- 인력양성대상수: 4명

○ 기술확산 실적

- 인력양성명: 한국산 찻잎을 이용한 미생물발효차 제조 기술 전수
- 인력양성년도: 2011년
- 인력양성대상수: 4명

○ 기술확산 계획

- 인력양성명: 한국산 찻잎을 이용한 미생물발효차 제조 기술 전수
- 인력양성년도: 2011~2012년
- 인력양성대상수: 8명

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보 성과 및 계획

○ 특허

- 미생물발효차의 제조방법, 출원번호 10-2011-0058972, 목포대학교산학협력단, 대한민국, 2011.6.17 특허출원
- 발효 우수 균주를 이용한 관능적, 기능적 품질이 우수한 미생물발효차의 제조기술, 대한민국/외국, 특허출원예정

○ 국내 및 국제학술발표

- 박성화, 이형재, 마승진, 박근형, 문제학. 미생물발효차의 품질 정도 판별을 위한 평가지표 도출 가능성 검토. 한국차학회 (2009)
- WEN YIHWA, 은종방. 중국산 미생물발효차의 영양성분. 한국차학회 (2009)
- WEN YIHUA, 은종방. 중국산 미생물발효차(보이차)의 영양성분 및 이화학적 특성. 한국차학회 (2009)
- 홍희철, 최정연, 손영란, 마승진. 미생물발효차의 미생물 및 기능성 대사물질 탐색. 한국차학회 (2009)
- WEN YIHUA, 신경미, 신기호, 마승진, 문제학, 은종방. 보성산 차잎을 이용하여 제조한 국산 미생물발효차의 영양성분. 한국차학회 (2010)
- WEN YIHUA, 은종방. 가압 및 방사선 살균 후 *Asperigillus niger*, *Penicillium glabrum* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 를 접종한 미생물발효차의 이화학적 특성 조사. 한국차학회 (2010)
- WEN YIHUA, 신경미, 신기호, 마승진, 문제학, 은종방. 한국산 미생물발효차의 이화학적 특성. 한국식품과학회 (2010)
- 김수희, 김기안, 정종훈, 김귀덕, 이형재, 마승진, 박근형, 문제학. 미생물발효차의 화학성분 분석과 생리활성 평가. 한국식품과학회 (2010)
- 윤하얀, 손영란, 고기봉, 정재천, 최정연, 천길용, 마승진. 미생물발효차의 발효관련 미생물 및 기능성 분석. 한국식품과학회 (2010)
- WEN YIHUA, 마승진, 황수정, 은종방. 균주를 달리하여 접종한 미생물발효차의 이화학적 특성. 한국차학회 (2011)

- 왕승진, 이형재, 김수로, 이기훈, 마승진, 강성구, 박근형, 문제학. 미생물발효차(보이차)의 품질 평가 지표 설정을 위한 휘발성 성분 분석. 한국식품과학회 (2011)
- Y.-L. Son, L. Zhang, P.-L. Jung, G.-Y Cheon, H.-K. Kim, S.-H. Park, S.-J. Ma. Sensory Evaluations and Biological Activities of the Microbial Fermented Tea Manufactured by Various Fermentation Conditions with Korean Native Tea Cultivar. Korean Society of Food Science and Technology (2011)

○ 논문발표

• 국내논문

- 박성화, 이형재, 마승진, 박근형, 문제학. 보이차의 품질 및 보존기간 판별을 위한 평가지표. 한국차학회지. 15(3): 59-67 (2009)
- 강대진, 문예화, 최강현, 오덕환, 은종방. *Aspergillus niger* 이용 미생물 발효차의 발효 중 미생물학적, 물리적 및 관능적 품질특성. 한국차학회지. 15(2): 107-113 (2010)
- 강대진, 이성희, 마승진, 은종방. *Aspergillus niger*를 이용하여 제조한 미생물발효차의 발효 중 화학적 특성 변화. 한국차학회. 16(3): 81-87 (2010)
- 한선경, 송연상, 이준설, 방진기, 서세정, 조정용, 문제학, 박근형. 미생물발효차 (*Camellia sinensis* L.) 제조과정 중의 품질 특성 변화. 한국식품과학회지. 42(1): 21-26 (2010)

• 국외논문

- Change of microbial floras and biochemical components during the fermentation process of microbial fermented tea, Journal of Food Chemistry (2011), 투고예정

4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획

○ 전시회 참여 계획

1. 전시회

- 행사명칭: 보성차 다향제
- 전시품목: 한국산 미생물발효차
- 장소: 보성군 일대
- 주최기관: 보성군
- 활용년도: 2012년

2. 전시회

- 행사명칭: 2012 광주국제식품전
- 전시품목: 한국산 미생물발효차
- 장소: 김대중컨벤션센터
- 주최기관: 광주광역시
- 활용년도 2012년

3. 전시회

- 행사명칭: 2012 국제차문화대전
- 전시품목: 한국산 미생물발효차
- 장소: 코엑스 전시장
- 주최기관: Tea World
- 활용년도 2012년

제 5 장 참고문헌

1. Sakata, K., et. al., The dark tea, food style 21(6), 106-141 (2002)
2. Sano, M., et. al., , Effects of pu-erh tea on lipid metabolism in rats, Chem. Pharm., Bull 34, 221-228 (1986)
3. Medina, A., et. al., Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. Environmental Microbiology, 4696 -4702 (2005)
4. AOAC. *Official methods of analysis*. 18th ed. Association of official analytical Chemists. Washington DC. USA (2005)
5. SPSS. SPSS for Windows. Rel. 17.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA (2008)
6. Kuhr, S., et. al., Determination of flavoanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Z Lebensm Unters Forsch.*, 192 (6), 526-529 (1991)
7. Green, et al., Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrite in biological fluids. *Biochem.*, 126: 131-138 (1982)
8. Mohammed, R., et. al., Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation, *Clinica Chimica Acta*, 107, 1-2(23) 3-9 (1980)
9. Michiharu, A., et. al., Characteristic fungi observed in the fermentation process for puer tea. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 199-203 (2008)
10. Terao, J., et. al., HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of goods by 1,1-diphenyl-2-2picrylhydrazyl. *Biosci. Biothch. Biochem.*, 62(6), 1201-1204 (1998)
11. Duh, P.-D., et. al., Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. *J. Agric. Food Chem*, 52, 8169-8176 (2004)
12. Brown, M.C., et. al., Clinical and laboratory phenotype of patients experiencing statin intolerance due to myalgia, *J. of Investigative Medicine*, 49(2), 1081-5589 (2001)
13. Seong Hwa, P., et. al., An Investigation on establishment of index for estimation of quality and preservation period of pu-erh tea. *J. Kor. Tea Soc.*, 15(3), 59-67 (2009)
14. Abellana, M., et. al., Water activity and temperature effects on growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 97 - 103 (1999)

15. Ranci'c, A., et. al., Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, 80 - 4 (2006)
16. Guoxiang, X., et. al., Characterization of pu-erh tea using chemical and metabolic profiling approaches. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 3046 - 054 (2009)
17. Giancarlo, P., et. al., Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in italy. *Environmental Microbiology*, Jan., 680 - 85 (2006)
18. Ventra, M., et. al., Determination of aflatoxin B1, G1, B2 and, G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1048, 25-29 (2004)
19. Timperio, A. M., et. al., Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 832, 127-133 (2006)
20. SK, P., et. al., Survey of ochratoxin A in cereal-based korean traditional foods by HPLC, *Korean J. Food SCI. Technol.*, 36(1), 158-161 (2004)
21. Kee-Ching, J., et. al., Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in pu-erh tea. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8787 - 8792 (2007)
22. Lin-Cheng, C., et. al., Production by *Clonostachys compactiuscula* of a lovastatin esterase that converts lovastatin to monacolin J. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1051-1059 (2006)
23. Arai., et. al., *Free Rad. Biol. Med* 20, 365-361 (1996)
24. 최성희, 추출법을 달리한 운남 보이산차의 향기성분, *한국차학회지*, 6, 103-110 (2000)
25. *농예화학회지(일)*, 61(4), 457 (1987)
26. 김영찬 외 5명, 수삼의 증숙횟수에 따른 페놀산 함량 변화와 라디칼 소거활성, *J. Ginseng Res*, 31, 230-236 (2007)
27. 김용재 외 3명, 향산화성분의 분리, *한국식품과학회지*, 29. 38-43 (1997)
28. 박성화 외 4명, 보이차의 품질 및 보존기간 판별을 위한 평가지표 검토. *J. Kor. Tea Soc.*, 15 (3), 59-67 (2009)
29. 박성화 미생물발효차의 품질 및 보존기간 판별을 위한 평가지표 검토. *전남대학교 석사학위논문* (2010)
30. 정영희 외 1명, 국내산 발효차의 이화학적 성분에 관한 연구. *한국식품영양학회지*, 18(1), 94-101 (2005)
31. 한선경 외 7명, 미생물발효차(*Camellia sinensis* L.) 제조과정 중의 품질특성 변화. *한국식품과학회지*, 42(1), 21-26 (2010)

32. 조은자 외 2명, 발효 시간에 따른 소엽종(*Camellia sinensis* var. *sinensis*) 차의 아미노산 함량 변화 및 관능 특성, 17(6), 911-918 (2007)
33. 황경아 외 3명, 제조방법에 따른 생강나무(*Lindera obtusiloba* BL.) 잎차의 특성변화. 한국식품영양학회지, 16(4), 365-371 (2009)
34. 김종숙 외 4명, 동충하초 균사체로 발효시킨 백련잎차의 품질특성. 한국식품영양과학회지, 38(5), 594-600 (2003)
35. 은종방 외 2명, 식인성질병원인균에 대한 녹차추출물의 항균작용. 한국차학회지, 15(1), 1-11 (2009)
36. 이민석 외 9명, 한국 재래종 차나무(*Camellia sinensis*)의 작물학적 특성 및 품질관련 성분 변이. 한국작물학회, 53(3), 333-338 (2008)