

Article

한국 전통 미생물발효차(청태전)의 미생물 군집분석

김병혁¹ · 장종옥¹ · 강시온² · 좌재호¹ · 문두경^{1*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원, ²바이오시네틱스

The microbial diversity analysis of the Korea traditional post-fermented tea (Chungtaejeon)

Byung-Hyuk Kim¹, Jong-Ok Jang¹, Zion Kang², Jae Ho Joa¹, and Doo-Gyung Moon^{1*}

¹National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Jeju 63240, Republic of Korea

²BioSynectics, Seoul 08501, Republic of Korea

(Received August 4, 2017; Revised September 11, 2017; Accepted September 21, 2017)

Tea is the most popular beverage in the world. In fact, there are mainly three different kinds of tea (Green tea, black tea, and post-fermented tea). Post-fermented tea is produced by the microbial fermentation process using sun-dried green tea leaves (*Camellia sinensis*) as the raw material. Chungtaejeon was a traditional tea introduced in the age of the ancient three states and is the only “Ddeok-cha or Don-cha” culture in the world that survived on the southwestern shore of Republic of Korea. In this study, the structures of the bacterial community involved in the production of oriental traditional post-fermented tea (Chungtaejeon) were investigated using 16S rRNA gene analysis. The 16S rRNA gene analysis of dominant microbial bacteria in post-fermented tea confirmed the presence of *Pantoea* sp., and *Klebsiella oxytoca*. Phylogenetic analysis suggested that the taxonomic affiliation of the dominant species in the post-fermented tea was γ -proteobacteria. As a result of the microbial community size analysis, it was confirmed that the size of the microbial communities of Chungtaejeon was the largest compared to other teas.

Keywords: chungtaejeon, DG-DGGE, microbial community, post-fermented tea

차나무(*Camellia sinensis* L.)는 동백나무과에 속하는 아열대성 다년생 상록관목으로 한국, 중국, 일본을 비롯한 아시아, 아프리카, 러시아 등의 아열대 지역과 온대 지역에 걸쳐 넓게 재배되며, 잎을 가공하여 제조한 것만을 차(茶)로 정의한다. 차잎 추출물에는 caffeine, amino acid, polyphenol (catechin) 등의 성분을 함유하고 있다(Ho *et al.*, 2008). 차에 함유된 유용 성분들에 대한 보건학적 효과(암예방, 심혈관계, 신경계 등)가 알려지면서 차에 대한 관심과 소비가 증가되고 있다(Zaveri, 2006; Basu and Lucas, 2007; Weinreb *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). 차는 세계적으로 넓게 음용되는 음료로서 거의 모든 나라에서 소비되고 있으며, 한국, 중국, 일본에서 오랜시간동안 음용되어 왔다. 일반적으로 차는 제조방법에 따라 녹차(green tea), 반발효차(semi-oxidation tea), 발효차(oxidation tea)로 구분되며, 제조시 발효방법과 발효강도에 의해 추출물내의 성분과 맛의 차이가 난다(Shon *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2015). 위 분류법에 따른 발효는 미생물의 작용여부 및 작용 정도를 기준으로 한 것이 아니라 생업 중에 존재하는 내생효소(endogenous enzymes)의 산화작용(oxidation) 정도를 발효라 정의되어 관행적으로 사용되고 있다. 차의 분류에서 발효라는 용어는 과학적인 정의에는 부합하지 않으나 관련분야에서 오랫동안 사용된 용어로 부정확성을 인지하고 있음에도 불구하고 관용적으로 사용되고 있는 실정이다(Moon *et al.*, 2015).

실제로 미생물의 작용에 의해 제조된 차는 미생물발효차

*For correspondence. E-mail: dgmoon@korea.kr;
Tel.: +82-64-741-2590; Fax: +82-64-749-2066

(post-fermented tea, 후발효차 or dark tea, 흑차)로 구분되고 있다. 일반적으로 미생물발효차는 불발효차인 녹차에 비해 맛이 부드럽고 미생물 발효를 통하여 gallic acid, methoxy phenolic compound, poly-flavonoids가 증가되어 항균작용, 혈중 콜레스테롤 감소효과, 항산화 활성 등이 보고되었다(Heo *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2015). 대표적인 미생물발효차는 중국의 Yunnan pu-erh tea, Hunan Fu-zhuan tea, Hubei Qing-zhuan tea, Sichuan Bian-xiao tea, Guangxi Liu-bio tea와 일본의 Goishicha, Awaban-cha, Babata-cha와 한국의 청태전 등의 많은 미생물발효차가 생산되고 있으며, 미생물발효차는 동아시아에서 제한적으로 생산되고 있다(Kato *et al.*, 1993, 1994). 이중에 Yunnan pu-erh tea는 세계적인 관심을 받고 있고 다양한 연구를 통해 미생물발효차 중 가장 널리 알려졌다(Lv *et al.*, 2013).

한국 전통 미생물발효차인 청태전은 중국의 미생물발효차와 다르게 매우 독특하게 발전되었다. 청태전은 장흥, 강진, 해남 등의 남해안 지역에서 생산되던 한국의 전통 미생물발효차로 엽전 모양으로 차를 만들어 저장 및 이동이 편리하며, 끓는 물에 우려먹는 차문화가 현재까지 전해지고 있다. 청태전의 제다방법은 매우 독창적으로 찻잎을 시루에 찌 후, 절구에 찧어 찻잎덩이를 엽전모양으로 찍어낸 다음 양지의 건조대에서 하루정도 건조 시킨후 찻잎덩이 중앙에 구멍을 뚫어 새끼에 꿰어 처마에 걸어두며 발효를 시켰다(Jung, 2001; Park and Cho, 2011). 미생물발효차는 미생물의 발효 정도에 따라서 차의 맛과 향이 결정되기 때문에, 미생물의 역할이 매우 크다. 그러나, 현재 우리나라 차에 관한 연구는 불발효차인 녹차가 주를 이루고 있으며, 미생물발효차에 대한 연구는 미미한 실정이다. 한국 전통차인 청태전의 후발효에 관여하는 미생물에 관한 연구는 더욱 부족한 상태이다(Abe *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016).

실제 환경에서 미생물들은 주변 환경에 따라 다른 미생물들과 상호작용을 통해 군집을 형성하며, 미생물군집의 특성은 개별적으로 존재하는 미생물과는 다른 특성을 가지며, 미생물간의 상호작용을 통해 발현적 특성을 가진다. 따라서 미생물 각 개체로 이해하는 것보다 미생물군집을 이해하는 것이 매우 중요하다. 이러한 미생물 군집 구조를 조사하는 방법으로 16S rRNA gene 염기서열분석을 통한 분자생태학적 기법을 이용한 생태학적인 관계를 규명하기 위해 사용되고 있다(Kim *et al.*, 2010, 2014).

한국의 전통 미생물발효차 청태전의 발효과정에 관여하는 미생물을 규명하는 것은 청태전의 특성을 파악하고 품질을 향상시키기 위해 꼭 필요한 연구이다. 본 연구에서는 청태전의 숙성에 관여하는 미생물군집분석을 분자생태학적 기법을 통

해 분석하였다. 본 연구를 통한 미생물 생태학적 기초 지식은 미생물간의 발효과정에서 상호작용을 이해하는데 기여할 것으로 판단된다.

재료 및 방법

시료

한국 전통발효차인 청태전은 2015년 5월에 D다원에서 제조된 청태전을 분석하였다. 청태전의 미생물 군집크기 분석을 위해 2015년 제조된 알가차(A), 단차(D), 중국 O사와 T사의 보이차 4종(puer 1~4)을 대조구로 비교·분석에 사용하였다.

DNA extraction

청태전의 발효미생물 군집분석은 분자생태학적 기법을 이용하였다. 이에, 청태전 0.5 g으로부터 Fast DNA Spin kit for Soil (MP bio)을 이용하여 total DNA를 추출하였다. 추출된 total DNA의 농도와 순도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific)을 이용하여 결정하였다.

16S rRNA gene clone library를 통한 미생물 군집분석

16S rRNA gene clone library 분석을 위한 PCR은 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 사용하였다(Forney *et al.*, 2004). 각각의 primer를 이용하여 50 µl 안에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 µM), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 pre-denaturation 시켜, 94°C에서 1 min denaturation, 60°C에서 1 min annealing, 72°C에서 1 min 30 sec extension하고 72°C에서 5 min 동안 final extension을 수행하였다. 16S rRNA gene clone library 구축을 위해 PCR 증폭산물을 1.2% agarose gel에 loading한 후 약 1,500 bp 크기의 band를 잘라, HiGene™ Gel & PCR Purification Solution Kit (Biofact)를 이용하여 정제한 후, All-in-one PCR cloning kit (Biofact)를 이용하여 ligation하고, *E. coli* DH5α (RBC Korea)에 형질전환 후 LB + kanamycin 배지에서 키워 생성된 colony들을 16S rRNA gene 분석에 이용하였다.

미생물군집 분석을 위한 PCR

미생물 다양성을 확인하기 위하여 시료로부터 얻은 DNA

를 주형으로 1차 PCR과 nested-PCR 반응을 수행하였다 (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer, 1999). 1차 PCR은 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541R (5'- AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA -3')을 이용하여 50 µl 안에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 µM), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 반응조건은 우선 94°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 45 sec denaturation, 56°C에서 45 sec annealing, 72°C에서 45 sec extension을 25 cycles을 수행한 후 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. PCR products는 ethidium bromide 염색 후 1.2% agarose gel에서 확인하였다. Double Gradient-Denaturing gradient gel electrophoresis (DG-DGGE) 분석을 위하여, 1차 PCR의 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행하였으며, 이때 16S rDNA를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 40개의 GC-clamp가 붙은 341F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 786R (5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC-3')을 이용하였다(Ishii and Fukui, 2001; Jaspers *et al.*, 2001; Forney *et al.*, 2004). 2차 PCR을 위한 PCR mixture는 1차 PCR에 사용된 것과 동일하며, 사용된 PCR 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 45 sec denaturation, 60°C에서 45 sec annealing, 72°C에서 45 sec extension하고 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. Annealing 온도는 초기에는 60°C에서 시작해서 1 cycle 당 0.5°C 감소하게 20 cycles 수행하였고, 그 후 50°C에서 15 cycles을 수행하여 touch-down PCR을 완료하였다. 얻어진 2차 PCR의 산물을 이용하여 DG-DGGE를 수행하였다(Muyzer *et al.*, 1993).

DG-DGGE 운전조건

PCR 산물은 Dcode™ System (Bio-Rad)을 이용하여 DG-DGGE를 수행하였다(Muyzer *et al.*, 1993). Double gradient-denaturing gradient gel은 8~12% polyacrylamide (37.5:1 = acrylamide:bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 40~70% 농도구배가 형성되도록 첨가하여 제작하였다. 그리고, 제작된 DG-DGGE gel에 PCR 증폭산물을 30 µl씩 loading하여 1× TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 110 V로 21시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 DG-DGGE gel은 ethidium bromide (1:10,000)에서 염색한 후, UV로 확인하였다(Kim *et al.*, 2014, 2017).

염기서열분석

Denaturing gradient gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 band를 선택한 후, 잘라내어 3차 DW 50 µl를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 상등액을 취하였다. Band에서 회수한 DNA를 주형으로 nested PCR에 사용한 primer를 이용하여 재증폭을 수행했으며, PCR 산물은 agarose gel에서 전기영동하여 HiGene™ Gel & PCR Purification Solution Kit (Biofact)로 정제한 후 cloning 하였다. Cloning은 All-in-one PCR cloning kit (Biofact)를 이용하였고, manufacturer's protocol을 따라 수행하여 16S rRNA gene의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다.

또한, Phylogenetic tree는 ClusterX를 이용하여 분석된 미생물간의 상동성을 분석하고, MEGA 5.0의 neighbor-joining method를 이용하여 유전적 계통분류를 수행하였다(Tamura *et al.*, 2011).

미생물 군집 비교를 위한 정량 Real time PCR

각 시료별 미생물의 군집의 크기를 정량적으로 평가하기 위해 qPCR을 수행하였다. 미생물 군집을 정량하기 위해서 27F와 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') primer를 이용하였고(Murray *et al.*, 1996), *E. coil* DH5α의 total DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 491 bp의 PCR 산물을 얻었다. 곰팡이 군집의 정량을 위해 SR-4F (5'-AG CCG CGG TAA TTC CAG CT-3')와 SR-7R (5'-TCC TTG GGC AAA TGC TTT CGC-3')을 이용하였고, *Aspergillus* total DNA를 주형으로 하여 388 bp의 PCR 산물을 얻었다(Nakayama *et al.*, 1996). 또한, 고세균 군집의 정량을 위해서는 arch-21F (5'-TCC GGT TGA TCC YGC CGG-3')와 arch-516R (5'-GGT DTT ACC GCG GCK GCT G-3')을 이용하였고, 청태전 total DNA를 이용하여 496 bp의 PCR 산물을 확보하였다(Gantner *et al.*, 2011). 각각의 PCR 산물은 All-in-one vector (Biofact)에 cloning하였으며, plasmid DNA는 HiGene™ Plasmid Mini Prep Kit (Biofact)를 이용하여 추출하였다. 염기서열분석은 M13-20F와 M13-20R (All-in-one Vector Systems manual)을 이용하여 분석하였고, BLAST search를 통해 확인하였다. 염기서열이 확인된 plasmid DNA는 real-time PCR기기를 이용하여 melting curve (Bio-Rad) 분석 후 정량분석을 위한 표준 유전자(artificial standard clone)로 사용하였다.

정량 PCR을 위해 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection

System (Bio-Rad)과 iTaq™ SYBR® Green Supermix with ROX (Bio-Rad)를 이용하였다. 미생물 16S rRNA 유전자 정량 PCR은 각각의 primer를 이용하였으며 반응조건은 95°C에서 15 min 동안 pre-denaturation 시켜, 95°C에서 30 sec denaturation, 67°C에서 30 sec annealing, 72°C에서 30 sec extension 후 fluorescence를 측정하고 45 cycles을 수행하였다. 그리고 final extension은 72°C에서 5 min 동안 수행하였다. Melting curve 분석은 65°C부터 95°C까지 0.2°C씩 증가시키면서 fluorescence를 측정하였다. 곰팡이 군집과 고세균 군집의 정량을 위해서 앞서 사용된 PCR program을 이용하였으며, annealing 온도는 69°C와 68°C에서 각각 수행하였다.

정량을 위해서 표준 유전자를 serial dilutions하여 Real time-PCR을 수행하였으며, DNA 농도는 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific)을 이용하여 1 ng/ul를 분석에 이용하였다(Kim *et al.*, 2017).

결과 및 고찰

미생물발효차는 한국, 일본, 중국 등의 동아시아지역에서 제한적으로 생산되고 있으며, 녹차와 홍차 등과 차별되는 독특한 맛, 색, 향을 갖는다. 또한, 청태전은 한국의 대표적인 미생물발효차로서 중국과 일본의 미생물발효차와는 상이한 제다방법으로 제조되어, 맛과 향에서 차별화된다(Park *et al.*, 2008). 본 연구에서는 중국과 일본의 미생물발효차와 구분되는 한국전통 미생물발효차 청태전의 품질을 결정짓는 미생물 군집구조를 분석하여 한국전통 미생물발효차의 우수성을 밝히는데 기초자료를 제공하고자 한다.

DG-DGGE를 통한 미생물 군집분석

청태전은 한국전통 미생물발효차로 본 연구에서는 2015년 5월 장흥 D다원에서 제조하여 2년간 숙성된 미생물발효차를 분석하였다. 청태전은 제조후 바로 먹을 수 있는 녹차와 홍차와는 달리 최소 6개월의 숙성기간을 거친 후에 음용할 수 있다. 이것은 청태전의 최소 발효기간을 6개월이라 할 수 있으며, 2년의 발효기간을 거친 최상품 청태전의 미생물 군집분석을 위해 Double Gradient-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DG-DGGE)를 수행하였다. 기존 DGGE기법은 homo-duplexes를 분리하지 못하는데 DG-DGGE에서는 분리가 가능하기 때문에 보다 정확한 염기서열간의 차이를 구분할 수 있다는 장점을 가진다(Cremonesi *et al.*, 1997; Scarpellini *et al.*, 1999; Petri and Imhoff, 2001).

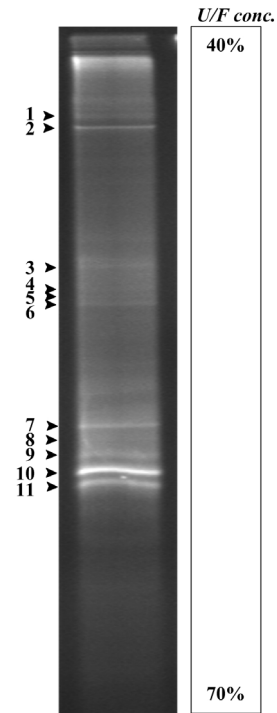


Fig. 1. DG-DGGE profiles based on 16S rRNA gene generated from the Korean traditional post-fermented tea (Chungtaejeon). The DG-DGGE was electrophoresed on an 8~12% polyacrylamide gel with a 40~70% urea-formamide gradient. The bright bands on the DG-DGGE were excised and the amplified DNA fragments partially sequenced and compared to known sequences using BLAST.

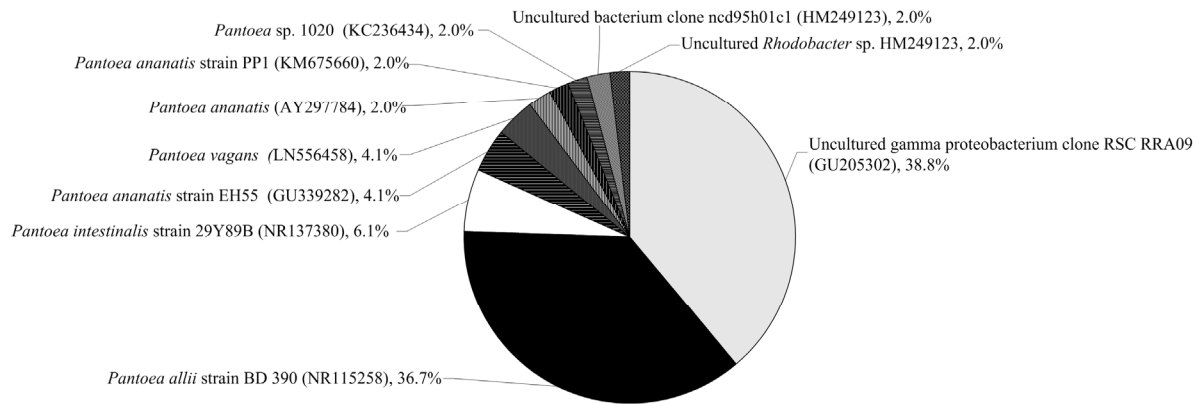
시료부터 total DNA를 분리하여 bacterial universal primer 341F-GC와 786R을 이용하여 PCR증폭산물을 얻고 군집구조를 확인할 수 있는 DG-DGGE를 이용하여 미생물 군집구조 분석을 수행하여 미생물 군집 패턴을 확인하였다(Fig. 1). 미생물 동정을 위해 DG-DGGE gel로부터 11개의 밴드를 분리하여 염기서열을 결정하고, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search (BLASTn)를 통해 상동성을 검색하였다(Table 1). DG-DGGE 수행을 통한 청태전의 우점미생물을 분석한 결과 *Pantoea* (band 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10), *Enterobacteriaceae* (band 5), *Klebsiella* (band 9, 11)의 3종의 미생물이 우점하는 것으로 확인되었다.

16S rRNA clone library 분석을 통한 미생물 군집분석

16S rRNA clone library를 통해 미생물 군집의 다양성과 우점하는 각각의 군집의 크기를 결정하였다. Bacterial universal primer 27F와 1542R을 이용하여 PCR 증폭산물을 얻고, TA cloning을 통해 49개의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하고, NCBI의 BLAST search를 통해 동정하였다. 청태전의 16S

Table 1. Identity of the bands obtained from 16S rRNA gene DG-DGGE bands and those of the closest relatives in the GenBank database, indicating the detected bacteria among Korean traditional post-fermented tea as Chungtaejjeon

Band No.	Accession No.	Description	Similarity
1	NR118857	<i>Pantoea cypripedii</i> strain ATCC 29267	98%
2	KX887307	<i>Pantoea</i> sp. strain ZYJG-2	99%
3	GU205302	Uncultured gamma proteobacterium clone RSC RRA09	99%
4	GU339282	<i>Pantoea ananatis</i> strain EH55	99%
5	FJ357827	<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium PA2	99%
6	NR118857	<i>Pantoea cypripedii</i> strain ATCC 29267	98%
7	NR118857	<i>Pantoea cypripedii</i> strain ATCC 29267	98%
8	NR118857	<i>Pantoea cypripedii</i> strain ATCC 29267	99%
9	NR114152	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain NBRC 102593	97%
10	NR118857	<i>Pantoea cypripedii</i> strain ATCC 29267	99%
11	NR113341	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain JCM 1665	98%

**Fig. 2.** Dominant bacterial OTUs detected in the Korean traditional post-fermented tea (Chungtaejjeon) 16S rRNA gene clone libraries.**Table 2.** Analysis of microbial community structure of the Korean traditional post-fermented tea (Chungtaejjeon) based on 16S rRNA gene clone library analysis

Accession No.	Description	Clone number	Compositions
GU205302	Uncultured gamma proteobacterium clone RSC RRA09	19	38.8%
NR115258	<i>Pantoea allii</i> strain BD 390	18	36.7%
NR137380	<i>Pantoea intestinalis</i> strain 29Y89B	3	6.1%
GU339282	<i>Pantoea ananatis</i> strain EH55	2	4.1%
LN556458	<i>Pantoea vagans</i>	2	4.1%
AY297784	<i>Pantoea ananatis</i>	1	2.0%
KM675660	<i>Pantoea ananatis</i> strain PP1	1	2.0%
KC236434	<i>Pantoea</i> sp. 1020	1	2.0%
HM249123	Uncultured bacterium clone ncd95h01c1	1	2.0%
HE648204	Uncultured <i>Rhodobacter</i> sp.	1	2.0%
Total		49	100.0%

rRNA 유전자의 미생물 군집분석 결과 Uncultured gamma proteobacterium clone RSC RRA09 (GU205302, 38.8%), *Pantoea allii* (NR115258, 36.7%), *Pantoea intestinalis* (NR

137380, 6.1%), *Pantoea ananatis* (GU339282, 4.1%) 순으로 우점하는 것으로 확인되었다(Fig. 2 and Table 2). 추가적으로 *Pantoea allii* (NR115258, 36.7%), *Pantoea intestinalis* (NR

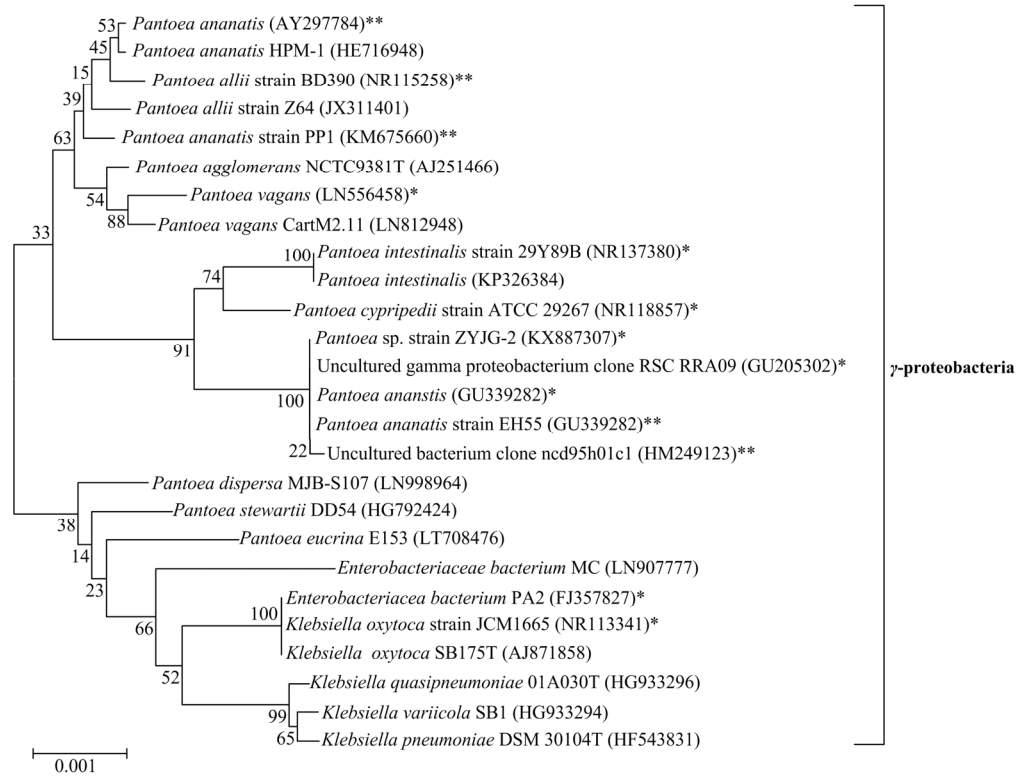


Fig. 3. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence using the neighbor-joining methods showing the Korean traditional post-fermented tea (Chungtaejeon). *, 16S rRNA gene clone library, **, DG-DGGE

137380, 6.1%), *Pantoea ananatis* (GU339282, 4.1%; AY 297784, 2.0%; KM675660, 2.0%)를 포함하는 *Pantoea* sp. 내 미생물 다양성이 매우 높은 것으로 확인되었으며, 청태전내에서 *Pantoea*가 군집내 57.0%로 가장 크게 우점하고 있는 것을 확인할 수 있다. 이외에 *Rhodobacter* (HE648204, 2.0%)와 Uncultured bacterium (HM249123, 2.0%)의 군집내 우점을 확인하였다. DG-DGGE기법과 16S rRNA gene clone library기법을 이용하여 한국전통 미생물발효차인 청태전의 생물군집을 분석에서 *Pantoea*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*가 주요 우점미생물로 확인되었고, 이들은 모두 γ-proteobacteria에 속하는 것으로 나타났으며, 다른 phylum의 미생물의 존재는 확인되지 않았다(Fig. 3). 한국 미생물발효차인 알가차와 단차에 우점하는 미생물은 α-proteobacteria에 속하는 *Rhodobacteraceae*가 우점하고 있으며, 미생물 다양성 역시 매우 높은 것을 확인하였다. 또한, 중국의 미생물발효차인 보이차는 α-proteobacteria의 *Sphingomonas*와 γ-proteobacteria의 *Pantoea allii*가 각각 약 16.9%와 17.2% 우점한다고 보고되었다(Kim *et al.*, 2017). 보이차내에 존재하는 미생물 역시 *Rhodobacteraceae*, *Roseomonas*, *Gemmobater*, *Reyranella*, *Sphingomonas*, *Thioclava*, *Acidoborax*,

Aeromonas, *Pseudomonas*등을 포함하며 미생물 다양성 높은 것을 보고하였다. 그러나, 청태전내 분석된 우점미생물은 γ-proteobacteria phylum내의 *Pantoea*, Uncultured gamma proteobacterium, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella* 4종의 미생물만이 우점을 확인할 수 있었으며, 이 중 *Pantoea*가 57%, Uncultured gamma proteobacterium 38.8% 우점도를 확인하였고, 두 가지 미생물이 청태전내 미생물의 95% 이상 차지하여 미생물 다양성은 낮음을 확인하였다. 이와 같이 종 다양성이 낮고 소수의 미생물이 전체 미생물군집의 우점을 차지하는 것은 극한의 환경에서 종종 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2010; Kaplan *et al.*, 2014; de Quadros *et al.*, 2016). *Pantoea agglomerans*는 polyphenol tannic acid와 gallic acid의 분해에 관여하는 gallic acid decarboxylase를 갖고 있으며, gallic acid와 tannic acid이용하여 2차대사산물을 생성한다고 알려졌다(Zeida *et al.*, 1998). *Pantoea agglomerans* SWg2는 뽕나무에서 세균성 마름병에 대해 강력한 생물학적 방제제로 사용되며, 뽕나무의 성장을 촉진시키는 것이 보고되었다(Xie *et al.*, 2017). 그리고 *Pantoea dispersa* Y08은 carotenoids를 아로마 화합물로 전환시키는 것이 보고되었다(Zhao *et al.*, 2015).

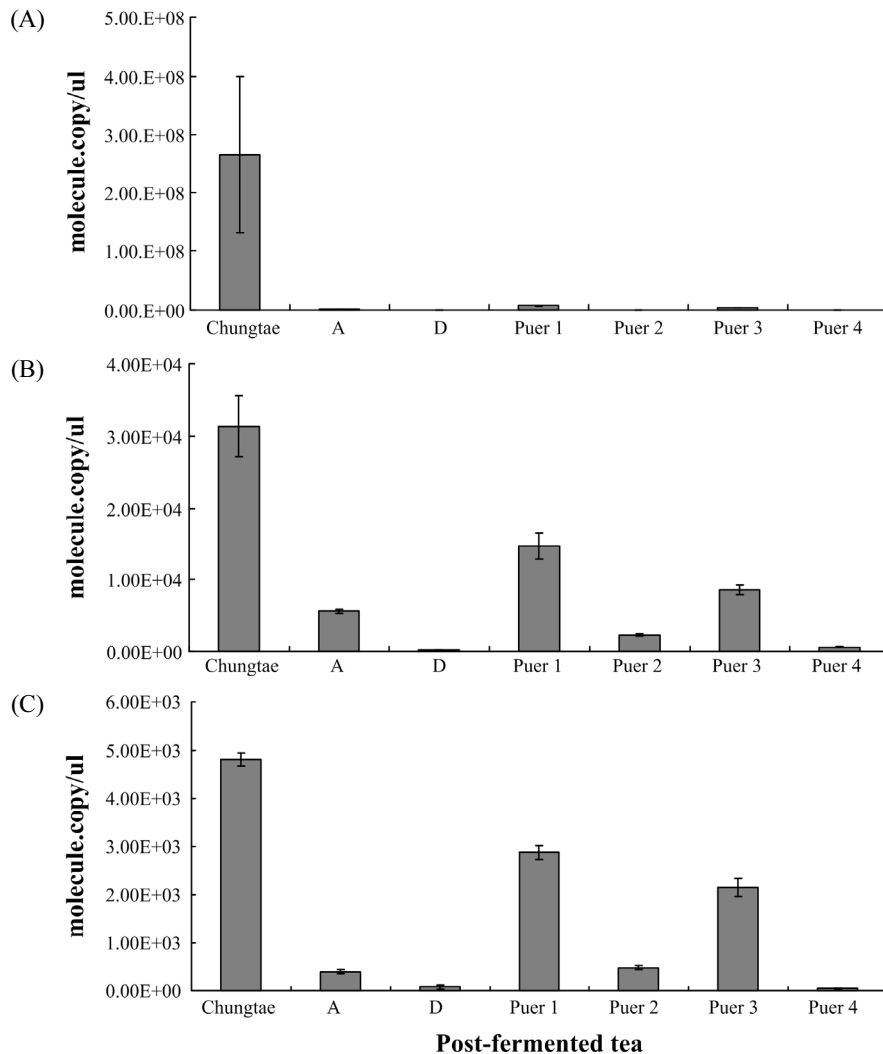


Fig. 4. Comparison of bacterial (A), fungal (B), and archaeal (C) community size using the Real-time PCR from the various oriental post-fermented teas.

*Pantoea*는 식물의 잎 등에서 분리되었으며, meta-genome 분석을 통해 떡차 등과 같은 미생물발효차에 우점하였다(Baik *et al.*, 2012; Shim *et al.*, 2013). 이와 같이 gallic acid, carotenoid, tannic acid와 방향족 화합물의 생물전환이 보고된 *Pantoea*가 청태전내 우점하는 것을 고려하면 청태전의 발효과정에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

Real time PCR을 이용한 미생물 군집의 크기 분석

한국 전통 미생물발효차인 청태전의 군집분석을 수행하여 우점 미생물을 분석하고, 청태전내 우점하는 미생물군집(eubacteria, fungi, archaea)의 크기를 정량 PCR을 통해 분석하였다. Real time PCR을 이용하여 각 미생물군집의 총균수와 군집의 크기를 각각 분석하였으며, 대조군으로 중국 미생물발

효차인 보이차 4종(puer 1~4)과 제다방법이 다른 한국의 미생물발효차 2종(A and D)을 함께 분석하여 비교하였다(Fig. 4 and Table 3). 대조군으로 사용한 6종의 미생물발효차 제다방법은 채엽, 위조(시들리기), 유념(비비기), 악퇴(쌓아두고 미생물발효), 긴압(제형)순으로 유사하게 제조되고 있으며, 청태전 제다방법과는 매우 다르다(Cabrera *et al.*, 2006; Park and Cho, 2011; Lv *et al.*, 2013).

정량 PCR을 이용한 각 미생물군집(eubacteria, fungi, archaea)의 크기를 분석한 결과, 박테리아의 총균수는 청태전 $2.654 \times 10^8 \pm 1.345 \times 10^8$ copy/ul, A는 $1.457 \times 10^6 \pm 1.325 \times 10^5$ copy/ul, D는 $1.288 \times 10^5 \pm 2.013 \times 10^4$ copy/ul, pure 1은 $7.449 \times 10^6 \pm 4.501 \times 10^5$ copy/ul, puer 2는 $6.003 \times 10^5 \pm 4.107 \times 10^4$ copy/ul, puer 3은 $3.877 \times 10^6 \pm 2.034 \times 10^5$ copy/ul, puer 4는

Table 3. Quantification using the eubacterial and archaeal 16S rRNA gene and fungal 18S rRNA gene

	Bacteria		Fungi		Archaea	
	Average	STDEV	Average	STDEV	Average	STDEV
Chungtaejeon	2.654E + 08	1.345E + 08	3.135E + 04	4.243E + 03	4.802E + 03	1.332E + 02
A	1.457E + 06	1.325E + 05	5.613E + 03	2.628E + 02	3.907E + 02	4.173E + 01
D	1.288E + 05	2.013E + 04	2.489E + 02	3.090E + 01	7.565E + 01	4.493E + 01
Puer 1	7.449E + 06	4.501E + 05	1.466E + 04	1.755E + 03	2.866E + 03	1.443E + 02
Puer 2	6.003E + 05	4.107E + 04	2.303E + 03	1.359E + 02	4.782E + 02	4.470E + 01
Puer 3	3.877E + 06	2.034E + 05	8.604E + 03	6.797E + 02	2.156E + 03	1.866E + 02
Puer 4	2.631E + 05	5.950E + 04	5.795E + 02	5.384E + 01	4.631E + 01	1.113E + 01

2.631 × 10⁵ ± 5.950 × 10⁴ copy/ul로 분석되었다. 중국의 보이차 4종과 한국의 다른 미생물발효차의 박테리아 총균수는 평균 2.56 × 10⁶으로 청태전 내 박테리아의 총균수는 다른 미생물발효차보다 약 100배 이상 월등히 많은 수가 존재하는 것으로 분석되었다. 곰팡이 총균수는 청태전 3.135 × 10⁴ ± 4.243 × 10³ copy/ul, A는 5.613 × 10³ ± 2.628 × 10² copy/ul, D는 2.489 × 10² ± 3.090 × 10¹ copy/ul, puer 1은 1.466 × 10⁴ ± 1.755 × 10³ copy/ul, puer 2는 2.303 × 10³ ± 1.359 × 10² copy/ul, puer 3은 8.604 × 10³ ± 6.797 × 10² copy/ul, puer 4는 5.795 × 10² ± 5.384 × 10¹ copy/ul로 각각 분석되었다. 중국 보이차 4종과 한국의 미생물발효차 A와 D의 곰팡이 총균수 평균은 각각 4.73 × 10³ copy/ul과 2.93 × 10³ copy/ul로 분석되어 비슷한 수준이었으나, 청태전 내의 곰팡이 총균수(3.135 × 10⁴ copy/ul)와 비교하면 청태전내 곰팡이 총균수가 다른 미생물발효차내 곰팡이 총균수보다 약 7배 정도 많이 존재하는 것으로 분석된다. 중국의 미생물발효차인 보이차부터 분리·동정된 곰팡이는 *Aspergillus* sp. (*A. glaucus*, *A. niger*), *Penicillium* sp. 등이 보고되고 있으며, 이들 곰팡이를 이용한 제조공정연구도 활발히 진행중이다(Xu *et al.*, 2005; Jeng *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2010). 그러나, 청태전 내의 우점하는 곰팡이에 관한 연구는 미비하며, 향후 발효과정을 연구를 위해 선행연구가 필요한 실정이다. 또한, 고세균의 총균수는 청태전 4.802 × 10³ ± 1.332 × 10² copy/ul, A는 3.907 × 10² ± 4.173 × 10¹ copy/ul, D는 7.565 × 10¹ ± 4.493 × 10¹ copy/ul, pure 1은 2.866 × 10³ ± 1.443 × 10² copy/ul, pure 2는 4.782 × 10² ± 4.470 × 10¹ copy/ul, pure 3은 2.156 × 10³ ± 1.866 × 10² copy/ul, pure 4는 4.631 × 10¹ ± 1.113 × 10¹ copy/ul로 각각 분석되었다. 중국 보이차 4종과 미생물발효차 A와 D의 고세균 총균수 평균은 각각 4.80 × 10² copy/ul와 1.38 × 10³ copy/ul로, 청태전의 고세균이 약 6배 정도 많은 것으로 분석되었다. 7종의 미생물발효차의 미생물 총균수 확인 결과, 청태전 내에 존재하는 박테리아, 곰팡

이와 고세균 군집의 크기가 제일 큰 것으로 분석되었다. 또한, 중국의 보이차와 한국의 미생물발효차 A와 D내의 미생물 군집의 크기가 유사하게 나타났는데, 이는 6종 미생물발효차 제다방법이 서로 유사하기 때문에 우점하는 미생물의 종과 크기가 비슷하다고 판단 할 수 있다(Cabrera *et al.*, 2006; Park and Cho, 2011; Lv *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). 제다방법이 매우 특이한 청태전의 미생물 군집을 분석한 결과, 중국의 보이차와 제다방법이 다른 한국 미생물발효차와는 매우 다른 미생물 군집의 구조를 가지고 있으며, 미생물발효차내 미생물 군집 크기 정량을 통해 대조군들보다 매우 많은 미생물 군집 크기를 확인하였다.

본 연구는 한국 전통 미생물발효차인 청태전의 미생물군집을 분자생태학적기법으로 분석하고 각각의 미생물군집(eubacteria, fungi, archaea) 크기를 정량하였다. 그 결과, 청태전내 우점미생물은 *Pantoea*가 절대적으로 우점하며, 종 다양성 역시 매우 낮음을 확인하였다. 또한 청태전 내 우점하는 미생물군집 크기는 보이차내 존재하는 미생물군집들보다 박테리아는 약 100배, 곰팡이는 약 7배, 고세균은 약 6배정도 큰 것을 확인하였다. 이를 통해, 청태전은 기존의 보이차 및 미생물발효차와 확실히 구별되는 미생물 군집구조를 가지고 있으며, 차의 맛을 좌우하는 미생물의 총균수가 매우 높은 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 청태전은 매우 독창적인 한국의 미생물발효차임을 확인하였다. 향후 한국 전통 미생물발효차인 청태전의 발효과정을 이해하는데 기초자료로 제공될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

차는 세계적으로 인기있는 음료로 불발효차(녹차), 반발효차(우롱차), 완전발효차(홍차)와 흑차(미생물발효차 or 후발효차)를 포함하고 구분된다. 미생물발효차는 차나무(*Camellia*

sinensis)의 잎을 미생물 발효과정을 통해 제조된다. 삼국시대부터 전해 내려온 청태전은 한국 남해안지역에서 제조되며 돈차 또는 떡차로 불리는 독창적인 한국의 미생물발효차이다. 본 연구에서는 청태전에 우점하는 미생물군집구조 분석을 위해 16S rRNA 유전자를 이용하였다. 청태전에 우점하는 미생물은 γ -proteobacteria에 속하는 *Pantoea* sp.와 *Klebsiella oxytoca*가 우점하였다. 미생물 군집크기 분석을 통해 청태전의 미생물 군집크기가 다른 미생물발효차와 비교해 가장 큰 것을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 2016년도 농촌진흥청 국립원예특작과학원 박사 후연수과정지원사업(과제번호: PJ011964)에 의해 이루어진 것임.

References

- Abe, M., Takaoka, N., Idemoto, Y., Takagi, C., Imai, T., and Nakasaki, K. 2008. Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea. *Int. J. Food Microbiol.* **124**, 199–203.
- Baik, K.S., Seong, C.N., Hwang, Y.M., Kim, G.A., Lee, N.R., Kim, D., Cho, J.Y., Kim, S.J., Park, E.H., and Moon, J.H. 2012. Microbial diversity of Ddek cha using DNA sequence analysis. *J. Korean Tea Soc.* **18**, 86–91.
- Basu, A. and Lucas, E.A. 2007. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutr. Rev.* **65**, 361–375.
- Cabrera, C., Artacho, R., and Giménez, P.R. 2006. Beneficial effects of green tea-A Review. *J. Am. Coll. Nutr.* **25**, 79–99.
- Chen, Y.S., Liu, B.L., and Chang, Y.N. 2010. Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process. *J. Biosci. Bioeng.* **109**, 557–563.
- Cremonesi, L., Firpo, S., Ferrari, M., Righetti, P.G., and Gelfi, C. 1997. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *BioTechniques* **22**, 326–330.
- de Quadros, P.D., Zhalnina, K., Davis-Richardson, A.G., Drew, J.C., Menezes, F.B., Camargo, F.A.d.O., and Triplett, E.W. 2016. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Appl. Soil Ecology* **98**, 195–203.
- Forney, L.J., Zhou, X., and Brown, C.J. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 210–220.
- Gantner, S., Andersson, A.F., Alonso-Sáez, L., and Bertilsson, S. 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Methods* **84**, 12–18.
- Heo, B.G., Park, Y.S., Chon, S.U., Lee, S.Y., Cho, J.Y., and Gorinstein, S. 2007. Antioxidant activity and cytotoxicity of methanol extracts from aerial parts of Korean salad plants. *BioFactors* **30**, 79–89.
- Ho, C.T., Lin, J.K., and Shahidi, F. 2008. Tea and tea products: chemistry and health-promoting properties. CRC press, Boca Raton, USA.
- Ishii, K. and Fukui, M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3753–3755.
- Jaspers, E., Nauhaus, K., Cypionka, H., and Overmann, J. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 153–164.
- Jeng, K.C., Chen, C.S., Fang, Y.P., Hou, R.C.W., and Chen, Y.S. 2007. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in pu-erh tea. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8787–8792.
- Jung, E.H. 2001. Characteristics of Korean fermented tea culture: focusing on the literature of old tea folk songs, tea poetry, and anthologies. Sungshin Womans University, Seoul, Vol. Master.
- Kang, D.J., Lee, S.H., Ma, S.J., and Eun, J.B. 2010. Chemical changes of microbial-fermented tea manufactured with *Aspergillus niger* during fermentation. *J. Kor. Tea Soc.* **16**, 81–87.
- Kaplan, H., Ratering, S., Hanauer, T., Felix-Henningsen, P., and Schnell, S. 2014. Impact of trace metal contamination and in situ remediation on microbial diversity and respiratory activity of heavily polluted Kastanozem. *Biol. Fertil. Soils* **50**, 735–744.
- Kato, M., Tamura, A., Mizooti, Y., Omori, M., Nanba, A., and Miyagawa, K. 1993. Changes of flavor during manufacturing process of Japanese fermented tea (Awa-bancha) and its characteristic. *Japan Soc. Home Economics* **44**, 561–565.
- Kato, M., Tamura, A., Omori, M., Nanba, A., Miyagawa, K., Nishimura, O., and Kamed, W. 1994. Changes of flavor during manufacturing process of Japanese fermented tea (Goishi-cha) and its characteristic. *Japan Soc. Home Economics* **45**, 527–532.
- Kim, B.H., Baek, K.H., Cho, D.H., Sung, Y., Koh, S.C., Ahn, C.Y., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2010. Complete reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by anaerobic microbial enrichment culture developed from sediment. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1829–1835.
- Kim, B.H., Jang, J.O., Jo, J.H., Kim, J.A., Song, S.Y., Lim, C.K., Kim, C.H., Jung, Y.B., Seong, K.C., Kim, H.S., et al. 2017. A comparison of the microbial diversity in Korean and Chinese post-fermented teas. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 71–80.
- Kim, B.H., Ramanan, R., Cho, D.H., Oh, H.M., and Kim, H.S. 2014. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass Bioenergy* **69**, 95–105.
- Ly, H.P., Zhang, Y.J., Lin, Z., and Liang, Y.R. 2013. Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review. *Food Res. Int.* **53**, 608–618.

- Moon, J.H., Cho, J.Y., Kim, S.J., and Park, K.H.** 2015. Review of the characteristics of the chemical constituents of Ddeok-cha. *J. Kor. Tea Soc.* **21**, 1–12.
- Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., and Orrego, C.** 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2676–2680.
- Muyzer, G.** 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H., and Inouye, I.** 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* **44**, 47–55.
- Park, J.S. and Cho, J.I.** 2011. Isolating microorganisms to ferment traditional Cheongtaejeon. *Korean J. Food Culture* **26**, 190–197.
- Park, Y.S., Lee, M.K., Ryu, H.H., and Heo, B.G.** 2008. Content analysis of Chungtaejeon tea and green tea produced in Jangheung district. *Korean J. Community Living Science* **19**, 55–61.
- Petri, R. and Imhoff, J.F.** 2001. Genetic analysis of sea-ice bacterial communities of the Western Baltic Sea using an improved double gradient method. *Polar Biol.* **24**, 252–257.
- Scarpellini, P., Braglia, S., Carrera, P., Cedri, M., Cichero, P., Colombo, A., Crucianelli, R., Gori, A., Ferrari, M., and Lazzarin, A.** 1999. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2550–2554.
- Shim, H.J., Cho, J.Y., Moon, J.H., Kim, S.J., Kim, D., Shibn, K.H., and Park, K.H.** 2013. Changes of bacterial communities in microbial-fermented tea during fermentation. *J. Korean Tea Soc.* **19**, 91–98.
- Shon, M.Y., Kim, S.H., Nam, S.H., Park, S.K., and Sung, N.J.** 2004. Antioxidant activity of Korean green and fermented tea extracts. *J. Life Sci.* **14**, 920–924.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., and M.B., Y.** 2009. Neuro-protective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: A reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. *Gene Nutr.* **4**, 283–296.
- Xie, J., Shu, P., Strobel, G., Chen, J., Wei, J., Xiang, Z., and Zhou, Z.** 2017. *Pantoea agglomerans* SWg2 colonizes mulberry tissues, promotes disease protection and seedling growth. *Biol. Control* **113**, 9–17.
- Xu, X., Yan, M., and Zhu, Y.** 2005. Influence of fungal fermentation on the development of volatile compounds in the puer tea manufacturing process. *Eng. Life Sci.* **5**, 382–386.
- Yang, C.S., Wang, X., Lu, G., and Picinich, S.C.** 2009. Cancer prevention by tea: Animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 429–439.
- Zaveri, N.T.** 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal used in cancer and noncancer application. *Life Sci.* **78**, 2073–2080.
- Zeida, M., Wieser, M., Yoshida, T., Sugio, T., and Nagasawa, T.** 1998. Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4743–4747.
- Zhang, L., Zhang, Z.Z., Zhou, Y.B., Ling, T.J., and Wan, X.C.** 2013. Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities. *Food Res. Int.* **53**, 600–607.
- Zhang, W., Yang, R., Fang, W., Yan, L., Lu, J., Sheng, J., and Lv, J.** 2016. Characterization of thermophilic fungal community associated with pile fermentation of Pu-erh tea. *Int. J. Food Microbiol.* **227**, 29–33.
- Zhao, M., Xiao, W., Ma, Y., Sun, T., Yuan, W., Tang, N., Zhang, D., Wang, Y., Li, Y., Zhou, H., and Cui, X.** 2013. Structure and dynamics of the bacterial communities in fermentation of the traditional Chinese post-fermented pu-erh tea revealed by 16S rRNA gene clone library. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1877–1884.
- Zhao, Y., Zhong, G.F., Yang, X.P., Hu, X.M., Mao, D.B., and Ma, Y.P.** 2015. Bioconversion of lutein to form aroma compounds by *Pantoea dispersa*. *Biotechnol. Lett.* **37**, 1687–1692.
- Zhu, Y., Luo, Y., Wang, P., Zhao, M., Li, L., Hu, X., and Chen, F.** 2016. Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation. *Food Chem.* **194**, 643–649.