

차잎의 초기 성장 시기 동안 lipoxygenase 활성 및 휘발성 향기성분의 변화

김현정 · 류성권¹ · 노진철¹ · 이상준 · 박승국^{1,*}

태평양기술연구원, ¹경희대학교 식품공학과

(2002년 11월 7일 접수, 2003년 1월 27일 수리)

Lipoxygenase는 녹차의 전체적인 품질에 영향을 미치는 “신선하고 풋풋한 풀 향기(green odor)” 향기특성을 가지는 C₆-alcohol과 C₆-aldehyde 등 C₆-화합물을 생성시키는데 관여하는 효소로서 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 녹차잎의 초기 성장기간인 4월 4에서 15일까지 12일 동안에 매일 채엽한 녹차잎의 lipoxygenase 활성을 측정하고, 이에 따른 C₆-화합물 및 terpene 등 휘발성 향기성분을 분석하여 수확 날짜에 따른 효소 활성과 녹차잎의 중요한 휘발성 향기성분의 변화를 살펴보았다. 효소활성의 측정에는 linoleic acid를 기질로 한 흡광도 측정방법을 사용하였고, 휘발성 향기성분은 Solid Phase MicroExtraction (SPME) 방법으로 휘발성 향기성분을 포집한 후에 GC 또는 GC-MS를 이용해 분석하였다. 실험 결과, 초기 녹차 잎 성장기간 동안 lipoxygenase 활성과 C₆-화합물의 함량은 서로 비례하여 증가 또는 감소하였고, 이러한 변화는 당일의 온도변화와 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 즉, 온도가 증가함에 따라서 향기성분의 양도 증가하였으며, 너무 이른 시기에 채엽한 시료는 향기 성분이 매우 적은 것으로 나타났다. 본 연구로부터 “신선한 풀향기”와 “향긋한 꽃향기 (floral)” 등 녹차향 품질에 중요한 영향을 미치는 향 화합물들이 녹차의 초기 채엽기간 중에 어떻게 변화하는지에 대해서 확인 할 수 있었으며, 향기품질이 우수한 녹차를 제조하기 위해서는 생엽 성장 기간동안의 향기성분변화를 이해하는 것이 중요하다는 것을 확인하였다.

Key words: 녹차, lipoxygenase, 녹차 향기, terpene, C₆-화합물, 휘발성 화합물, GC, SPME

서 론

녹차의 향은 차의 품질 및 특성을 결정짓는 중요한 요소 중의 하나이다. 최근의 연구에서 녹차 향기성분의 종류는 600여 가지로 보고되고 있으며,¹⁾ 이들 중 녹차에서 중요한 향기성분은 크게 C₆-화합물, terpene류, 그리고 방향족 alcohol류의 세 가지 종류로 구분할 수 있다. 이러한 향기 성분의 생화학적 생성은 다음의 과정을 통해서 일어난다고 알려져 있다. linolenic acid 등을 기질로 하여 lipoxygenase의 peroxidation과정을 통해 c-3-hexenol과 t-2-hexenal 등의 C₆-alcohol과 aldehyde가 생성, mevalonate의 생합성경로를 통해 다양한 terpene류의 생성, 그리고 아미노산의 효소적인 반응을 통한 방향족 알코올의 생성,²⁾ 향기성분을 배당체로서 가지고 있는 glycosides의 분해를 통한 생성과정도 알려져 있다.³⁾

녹차의 향미 특성 중 “신선한 풀향기”는 녹차의 전체적인 향기품질에 영향을 주는 매우 중요한 특성이며, 이는 C₆-alcohol 및 C₆-aldehyde 등 휘발성의 C₆-화합물들이 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Leaf aldehyde인 t-2-hexenal은 1912년 차잎에서 분리되었으며,³⁾ leaf alcohol인 c-3-hexenol은 1933년 발효 공정 중의 홍차와 녹차 생엽에서 분리 및 확인이 되었다.⁴⁾ 또한, t-3-hexenol, t-2-hexenol, c-3-hexenal, t-3-hexenal, n-

hexanol 및 n-hexanal 등도 녹차에 존재하는 것으로 확인되었다.^{2,5,6)} 이러한 휘발성의 C₆-화합물들은 α-linolenic acid를 전구체로 다음과 같은 세단계의 효소적 반응을 거쳐 생합성된다고 보고되었다.^{7,8)} 즉, i) α-linolenic acid가 lipolytic acyl hydrolase에 의해 galactolipids, phospholipids 또는 triglycerides로부터 분리되고, ii) 분리된 지방산들이 lipoxygenase에 의해 산화되어 과산화물을 생성하며, iii) 생성된 과산화물의 지방산 사슬중 C-12와 C-13 결합이 hydroperoxide lyase에 의해 절단되어 C₆-화합물이 생성된다. Lipoxygenase (linoleate: oxygen oxide reductase, EC1.13.11.12)는 “lipoxidase”로도 알려져 있으며,⁹⁾ α-linolenic acids 또는 α-linoleic acids의 C-13에 작용하는 lipoxygenase-1과 C-9에 작용하는 lipoxygenase-2, 두 가지로 나뉘어 진다.¹⁰⁾ 이중 녹차에 존재하는 것은 lipoxygenase-1로서¹¹⁾ 엽록체의 lamellae막에 단단히 결합되어 있는 것으로 추정되었다.¹²⁾

우리나라에서는 관례적으로 초기에 수확한 차엽일수록 양질의 차라고 여기고 있다. 그러나 채엽시기가 너무 이른 경우, 녹차의 특유한 품질 특성인 “신선한 풀향기”를 생성시키는 lipoxygenase의 활성이 너무 낮아 오히려 향미가 부족한 녹차를 만들어낼 수도 있다. 따라서, 채엽시기 동안에 lipoxygenase 활성의 변화를 이해하는 것은 양질의 녹차를 생산하기 위한 채엽시기의 결정에 매우 중요하다고 볼 수 있다. 현재까지 1년 중 계절별 또는 월별로 lipoxygenase의 활성을 측정된 보고는 있었으나,^{16,17)} 고급녹차를 제조하기 위한 짧은 기간동안에 매일 변화하는 효소의 활성 측정 및 이에 따른 C₆-화합물과 terpene

*연락처

Phone: 82-31-201-2655; Fax: 82-31-204-8116

E-mail: skpark@khu.ac.kr

의 변화에 대한 연구는 없었다. 따라서, 본 연구에서는 초기 성장시기에 매일 수확한 고급 녹차를 제조하기 위한 녹차잎의 lipoxygenase 활성을 측정하고, 이에 따른 C₆-화합물 및 terpenes 등 휘발성 향기성분 분석하여 수확날짜에 따른 효소와 휘발성 향기성분의 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약. 차생엽은 제주도에 있는 장원산업의 도순다원에서 2001년 4월 4일부터 15일까지 매일 오전 9시부터 10시 사이에 채엽하였으며, 약 100 g 정도의 차잎(*Camellia sinensis* L. var. Yabukita)을 손으로 채엽한 후, 알루미늄 파우치에 넣고 진공포장하여 냉동보관 하였다. 채집 기간에 비는 오지 않았으며, 매일의 평균 온도를 기록하였다. 효소활성도 측정에 사용한 시약은 조 등¹³⁾의 방법에 준하여 0.1 M, pH 7.0의 Tris buffer(Sigma Chemical Co., USA)를 제조하였으며, solution I은 0.1 M, pH 9.0의 Tris buffer에 0.1%(w/w) Tween 20과 2 mM linoleic acid를 잘 혼합 후 첨가하였다. Solution II는 5 ml의 포화 KI 용액을 15% acetic acid 100 ml에 혼합하였고, solution III는 1%(w/v) starch 용액을 사용하였다. 모든 시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 시료와 용액은 사용시까지 냉동보관 하였다.

Lipoxygenase 활성도 측정. Lipoxygenase의 효소활성 측정은 조 등^{13,14)}이 콩의 lipoxygenase 활성 측정시 사용한 방법을 기본으로 하여 녹차잎의 효소활성 측정에 적합하도록 변형하여 사용하였다. 즉, 생엽 2.0 g에 1 ml의 buffer를 넣고 1분간 마쇄한 후에, 마쇄한 잎 0.5 g에 buffer 1 ml을 다시 넣고 1분간 혼합하고, 7,500 rpm에서 3분간 원심분리하여 상정액을 얻었다. 얻어낸 상정액 중 20 µl에 1 ml의 solution I을 첨가하고 15분 동안 반응시킨 후, 이 반응액에 solution II와 III를 각각 300 µl씩 첨가하여, 반응 1시간 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최적의 발색 반응 조건을 확인하기 위하여, buffer는 pH 7.0, 9.0에서, 상정액은 10~80 µl, solution II와 III는 100~400 µl 범위에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

휘발성 성분 분석 및 동정. 2.0 g의 녹차잎에 1 ml의 Tris buffer 용액(pH 7.0)을 넣고 1분간 마쇄하여 10 ml solid phase-microextraction(SPME) vial(Supelco, Bellefonte, PA, USA)에 2.0 g을 넣은 후, 40°C의 항온수조에서 SPME fiber(75 µm Carboxen/Polydimethylsiloxane, Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 vial의 headspace에 고정시켜서 30분간 휘발성 화합물을 흡착한 후, fiber에 흡착된 수분 제거를 위해 silica가 담긴 vial에 SPME fiber를 5분간 노출하였다. 수분 제거 후, FID가 설치된 GC(HP-6890, Hewlett-Packard, USA)의 주입구에 SPME fiber를 넣어 5분간 휘발성 향기성분을 탈착시켜 분석하였다. 분리용 DB-1 column(30 m × 0.53 mm ID × 1.5 µm, J&W, Folsom, CA, USA)을 사용하였고, 초기 오븐 온도는 40°C에서 2분간 유지한 후에 5°C/min씩 상승시켜 최종온도 230°C에서 5분간 유지하였다. 분리된 휘발성 성분의 동정을 위해 GC(HP-6890)와 연결된 mass spectrometer(HP 5973,

Table 1. Changes in absorbance by variation of buffer pH and solution concentration

Buffer pH	Solution II, III (µl)	Supernatant solution (µl)			
		10	20	40	80
7.0	100	- ¹⁾	-	-	-
	200	-	0.053	0.147	0.357
	300	-	0.369	0.533	0.864
	400	-	0.578	0.833	- ²⁾
9.0	100	-	-	-	-
	200	-	-	-	-
	300	-	-	-	-
	400	-	-	-	-

¹⁾No color changes.

²⁾Saturation of absorbance.

Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, 분리용으로 사용한 column(HP-1, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 µm, USA) 이외의 모든 분석 조건은 GC 분석 조건과 동일하였다. MS의 이온화는 70 eV에서 수행하였다. GC로 분리된 각 peak 성분의 최종적인 확인은 GC-MS의 library(Wiley/NBS)와 n-paraffin 혼합물(Supelco, Bellefonte, PA, USA)의 분석으로 얻은 retention index 계산 결과를 바탕으로 확인하였다.

결과 및 고찰

Lipoxygenase의 최적 활성도 측정 조건. Buffer pH가 7.0과 9.0일 때에 solution의 농도에 따른 효소의 활성도 차이를 실험한 결과, buffer의 pH가 9.0인 경우에는 전혀 발색이 되지 않았다(Table 1). 그러나, buffer의 pH가 7.0일 때에, 상정액의 농도가 20~80 µl, solution II, III의 농도가 200~400 µl인 범위 내에서 발색이 되었으며, 상정액의 농도가 80 µl, 반응용액의 농도가 400 µl일 경우에는 측정범위를 넘어서는 것으로 나타났다. 이것은 녹차에 존재하는 lipoxygenase가 isoenzyme 중 유리상태의 linoleic acid와 반응성이 높은 것으로 알려져 있는 lipoxygenase-1이기 때문인 것으로 추측할 수 있다.¹⁵⁾ 따라서 buffer의 pH가 7.0, 상정액의 양을 20 µl, solution II, III의 양을 각 300 µl씩 첨가 후 1시간 반응시켰을 때를 적정 발색 조건으로 하여 이후의 모든 lipoxygenase 활성 측정에 이용하였다.

Lipoxygenase 활성도의 변화. 일반적으로 국내에서는, 4월 초부터 첫 수확이 시작되는 시기에 제조된 녹차는 가장 고품질의 녹차로 인정되고 있으므로, 본 실험에서는 현재 우리나라의 녹차 재배지 중 가장 위도가 낮아 차 수확시기가 가장 빠른 제주도의 도순다원에서 생육된 차잎을 4월 초, 매일 채엽하여 lipoxygenase 활성을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 4월 4일에서 15일까지 초기 성장기간 동안 lipoxygenase의 활성은 전체적으로 증가하다가 9일 이후부터 감소하였고, 다시 완만한 증가에 이어, 13일 이후에는 급격히 증가하였다. 이와 같은 변화는 hydroperoxide lyase의 경우 1년 내내 일정한 활성을 유지하는 반면, lipoxygenase는 7~8월에 가장 높고, 12월~4월에 가장 낮아 계절에 따라 lipoxygenase의 활성이 변화한다고 보고한 것과 같이,^{16,17)} lipoxygenase의 활성이 외부 환경

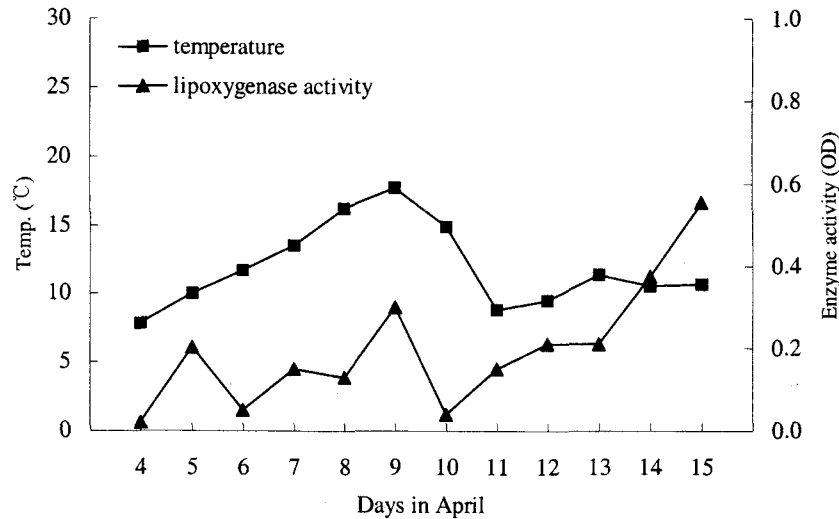


Fig. 1. Changes in lipoxygenase activities and temperatures during early growing season of fresh tea leaves.

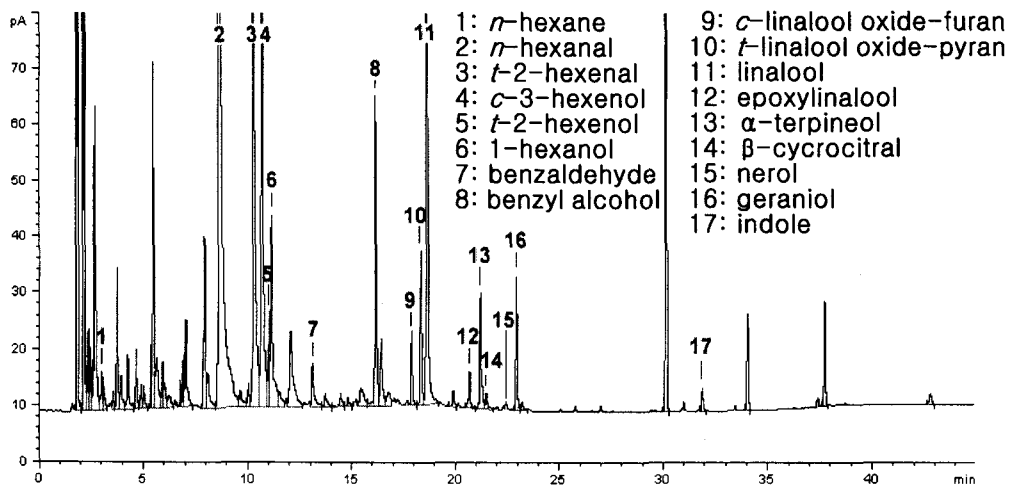


Fig. 2. A typical gas chromatogram of volatile compounds from fresh tea leaves.

특히 온도의 변화와 비례하여 변화하고 있음을 볼 수 있다 (Fig. 1).

휘발성 향기성분의 변화. 서론에서 이미 언급하였듯이, lipoxygenase는 차잎내에 존재하여 α -linolenic acid를 기질로 하여 녹차의 “신선한 풀향기”에 중요한 역할을 하는 C_6 -화합물을 만들어낸다. 차잎의 lipoxygenase의 활성 정도에 따라 C_6 -화합물의 생성량이 달라질 수 있다는 보고에 따라,¹⁷⁾ 이를 조사하기 위해 녹차 생엽의 휘발성 향기성분을 SPME-GC법을 이용하여 측정하였다. Fig. 2는 대표적인 녹차 생엽의 GC chromatogram으로서, Lipoxygenase와 관련있는 *n*-hexane, *n*-hexanal, *t*-2-hexenal, *c*-3-hexenol, *t*-2-hexenol과 1-hexanol을 포함한 여섯개의 C_6 -화합물이 분리 및 확인되었고, benzaldehyde, benzyl alcohol 등 방향성의 알데히드와 알코올과 linalool, nerol 및 geraniol 등과 같은 terpene 화합물도 중요한 휘발성 성분으로 확인되었다. 이러한 C_6 -화합물과 terpenes류는 각각 녹차의 “신선한 풀향기” 또는 “꽃향기”, “단냄새”를 생성시키는 중요한 요소인데, 녹차 잎에서 자유로운 형태로 존재하거나 여러 종류

의 당과 결합된 glycoside로 존재하기도 하고, 제조 공정 중에 자유형태로 가수분해 되기도 한다. C_6 -화합물 중에서 녹차 잎에 가장 많이 존재하는 화합물은 *n*-hexanal로 “fatty”, “green”, “grassy”한 특성을 가지고 있으며 생엽에서 1-hexanal과 함께 linoleic acid를 기질로 하여 생성된다. 채엽 날짜에 따른 함량 변화가 비슷한 경향을 보이는 *n*-hexanal, *t*-hexenal, 및 *c*-3-hexenol 등은 lipoxygenase 활성 변화와 함께 관찰하여 볼 때 더욱 뚜렷하게 나타난다(Fig. 3). 또한 lipoxygenase 활성은 온도 등의 환경적 영향을 받아 9일 이후 한차례 감소하였는데, 가장 변화가 크게 나타난 이 세 종류의 C_6 -화합물도 같은 경향을 나타내 lipoxygenase 활성 정도에 따라 C_6 -화합물의 생성 정도가 달라진다는 것을 보였다. 초기 성장 시기의 lipoxygenase 활성도와 C_6 -화합물과 terpene 화합물의 총량에 대한 변화는 Fig. 4에 나타나 있다. Terpene 화합물의 증가 경향은 C_6 -화합물에 비해 적은 양이므로 C_6 -화합물과 같은 채엽일에 따른 뚜렷한 변화는 없었으나 비교적 완만하게 증가함을 볼 수 있었다. 대략 4월 4일부터 11일까지의 채엽시기 동안 차향미의 중요

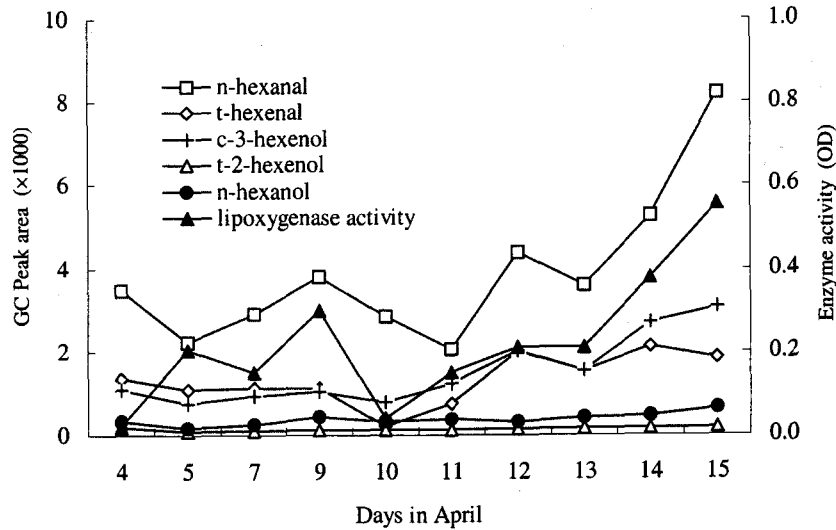


Fig. 3. Changes in C₆-compounds in fresh tea leaves during early growing season.

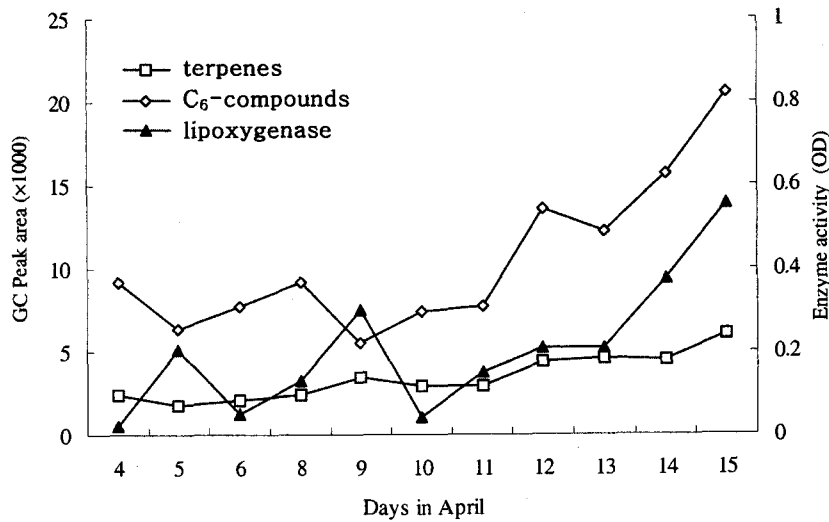


Fig. 4. Changes in lipoxygenase activities, total terpenes, and total C₆-compounds during early growing season of fresh tea leaves.

한 성분인 terpene류와 C₆-화합물 중에서 terpene류의 함량 변화는 C₆-화합물보다는 차이가 적었으나, C₆-화합물은 상당히 변화함을 알 수 있었고, 이는 10일을 전후로 하여 생엽으로부터 제조한 차의 품질 또한 달라질 수 있다는 것을 시사한다. 본 연구에서는 진행되지 않았으나, 실제 채엽 날짜에 따른 생엽을 같은 조건에서 녹차로 제조하였을 때 그 향미의 변화를 조사한다면, lipoxygenase 활성이 녹차제품 품질에 미치는 영향을 알 수 있을 것이고, 또한 결과에서 나타나듯이 이러한 lipoxygenase 활성 변화에 따른 C₆-화합물의 변화가 녹차 제품의 향미에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

녹차 제품 품질 또는 수확량에 있어서 채엽시기를 결정하는 것은 매우 중요하다. 현재까지 채엽시기를 결정하는 여러가지 요건 중 특별히 lipoxygenase 활성을 고려하지 않던 것이 현실이나 lipoxygenase는 녹차 고유의 “신선한 풀향기”를 갖게 하는 중요한 인자로 볼 수 있다. 따라서, 채엽시기 결정에 지금까지 이용해 온 방법 이외에 이러한 lipoxygenase 활성정도

와 녹차의 중요한 향기성분의 양을 고려하는 것이 중요할 것이며, lipoxygenase 활성과 기존 채엽시기 결정 방법과의 관계성을 정립하여 보다 객관성 있는 지표를 찾는다면, 최적 채엽시기의 결정에 도움을 줄 수 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Teranishi, R. and Hornstein, I. (1995) In *Food Rev. Int'l. (Special Issue on Tea)* **11**, 480-525.
2. Hatanaka, A. and Harada T. (1973) Formation of *cis*-3-Hexenal, *trans*-2-Hexenal and *cis*-3-Hexenol in macerated *Thea sinensis* leaves. *Phytochem.* **12**, 2341-2346.
3. Erman, W. F. (1985) In *An Encyclopedic Handbook: Chemistry of the Monoterpenes* Dekker, New York, pp. 34-126.
4. Hatanaka, A. (1993) The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochem.* **34**, 1201-1218.
5. Hatanaka, A. and Ohno, M. (1971) Leaf alcohol XIX. Chronic

- acid oxidation of isomeric *n*-hexenols. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1044-1051.
6. Kajiwara, T., Harada, T. and Hatanaka, A. (1975) Isolation of *z*-3-hexenal in tea leaves, *Thea Sinensis*, and synthesis thereof. *Agric. Bio. Chem.* **39**, 243-247.
 7. Kajiwara, T., Sekiya, J., Kido Y. and Katanaka, A. (1977) The photoaddition of diethyl ether to leaf aldehyde [*Thea sinensis*, *Farfugium japonicum*]. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2249-2253.
 8. Hatanaka, A., Kajiwara, T., Sekiya, K. and Kido, Y. (1977) Formation of 12-oxo-*trans*-10-dodecenoic acid in chloroplasts from *Thea sinensis* leaves. *Phytochem.* **16**, 1828-1829.
 9. Axelrod, B. (1974) In *Advances in Chemistry Series 134: Food Related Enzymes* American Chemical Society: Washington, DC.
 10. Manuel, J. and M. Isabel, M. (1999) Effect of pepper lipoxygenase activity and its linked reactions on pigments of the pepper fruit. *J. Agri. Food. Chem.* **47**, 4532-4536.
 11. Sekiya, J., Aoshima, H., Kajiwara, T., Togo, T. and Hatanaka, A. (1977) Purification and some properties of potato tuber lipoxygenase and detection of linoleic acid. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 827.
 12. Sekiya, J., Numa, S., Kajiwara, T. and Hatanaka, A. (1976) Biosynthesis of leaf alcohol formation of 3-Z-hexenal from linolenic acid in chloroplasts of *Thea sinensis* [tea] leaves. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 85-190.
 13. Cho, J. H., Kim, Y. M., Yoon, H. T. and Kim, Y. H. (1997) Studies on various test conditions and application of test method for lipoxygenase-1 in soybean. *J. Crop Sci.* **42**, 739-747.
 14. Cho, J. H., Kim, Y. M., Hong, T. Y., Kim, Y. H., Kim, Y. W., and Kim, M. A. (1998) Application of rapid lipoxygenase-2 test method of soybean seed. *Korean J. Breed.* **30**, 47-54.
 15. Christopher, J. P., Pistorius, E. K., and Axelrod, B. (1972) Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **284**, 54-62.
 16. Sekiya, J., H., Kajiwara, T., and Hatanaka, A. (1977) Seasonal changes in activity of the enzyme system producing *cis*-3-hexenal and *n*-hexenal from linoleic acids in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* **18**, 283.
 17. Sekiya, J., H., Kajiwara, T., and Hatanaka, A. (1977) Seasonal changes in activities of enzymes responsible for the formation of C₆-aldehydes and C₆-alcohols in tea leaves, and the effects of environmental temperatures on the enzyme activities [*Camellia sinensis*, summer and winter differences]. *Plant Cell Physiol.* **18**, 283.

Changes in Lipoxygenase Activity and Volatile Compounds of Fresh Tea Leaves During Early Growing Season

Hyun-Jeong Kim, Sung-Kwon Ryu¹, Jin-Chul Roh¹, Sang-Jun Lee and Seung-Kook Park^{1,*} (*Pacific Corporation R & D Center, Yongin-Si, 449-729, Korea; ¹Dept. of Food Science & Technology, Kyung Hee University, Yongin-Si, 449-701, Korea*)

Abstract: Lipoxygenase is the enzyme responsible for the formation of C₆-alcohols and C₆-aldehydes (C₆-compounds), which are well known contributors to various types of "green odor" in green tea. Changes in lipoxygenase activity and volatile compounds of green tea leaves were monitored daily during early growing season. The enzyme activity was spectrophotometrically measured using linoleic acid as a substrate. The volatile compounds were extracted through Solid Phase Micro-Extraction, and were subjected to GC and GC-MS analyses. Results showed that lipoxygenase activity and levels of C₆-compounds concomitantly increased or decreased during the early growing season, probably caused by the fluctuation in the daily temperature; increase in temperature led to the increase in enzyme activities and C₆-compound levels, whereas leaves plucked too early had low volatile compound levels. In this study, optimum plucking time of tea leaves for the production of high quality green tea with a well-balanced aroma was determined.

Key words: Green tea, lipoxygenase, tea aroma, terpene, C₆-compounds, volatile compounds, GC, SPME.

*Corresponding author