

## 발효차의 향기 ( II )

### - 동방미인차의 향기성분 및 발현 유전자 -

#### Aroma of Fermented Tea (II)

- Aroma and Gene Expression Profiling during Manufacturing Process of Oriental Beauty -

조정용 · 문제학<sup>1</sup> · 박근형<sup>1</sup> · 마승진\*

Jeong-Yong Cho, Jae-Hak Moon<sup>1</sup>, Keun-Hyung Park<sup>1</sup>, Seung-Jin Ma\*

목포대학교 식품공학과, <sup>1</sup>전남대학교 식품공학과 및 기능성식품연구센터

Department of Food Engineering, Mokpo National University,

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, and Functional Food Research Center, Chonnam National University

### I. 서론

전보(1)에서 우롱차 및 홍차와 같은 효소발효차의 주요 향기는 linalool, linalool oxides, geraniol, benzylalcohol, 2-phenylethanol 등의 알코올계 성분들이며, 이들 성분은 차 잎에서 주로 배당체 형태로 존재하고 있다가 위조 공정 중에  $\beta$ -primeverosidase와 같은 당기수분해효소에 의해 분해됨으로서 향기가 형성된다는 내용을 소개하였다. 한편, 식물의 향기성분은 외부의 위협에 대한 자기방어 기작 및 동종 또는 이종개체간의 통신수단으로 작용한다고 알려져 있다(2), 이러한 의미에서 우롱차, 홍차 등의 효소발효차는 제조과정을 통해 잎에 여러 가지 스트레스를 인위적으로 가함으로써 여기에 대응하여 발현되는 식물의 자기 방어 기작을 이용한 대표적인 예라고 할 수 있다. 즉 효소발효차의 경우 차 잎은 열처리 공정 전까지 채취, 일광위조, 실내위조, 교반 등의 과정을 통해 다양한 스트레스에 노출되며 이로 인하여 차 잎에 존재하는 자기

방어 유전자들의 발현량이 급속하게 증가된다. 효소발효차의 향기생성에 직접적 원인이 되는 향기배당체 가수분해 효소 및 향기 생합성 효소의 작용 역시 결과적으로 이들 유전자의 발현에 의한 것으로 생각된다(3,4).

따라서 본 총설에서는 다양한 스트레스를 가하여 제조하는 대표적인 우롱차인 동방미인차(Oriental Beauty)의 향기성분 및 이에 관련된 발현 유전자를 소개함으로써 발효차의 향기생성 메커니즘에 대한 이해를 돕고자 하였다.

### II. 동방미인차의 특징

타이완 북부지역에서 주로 생산되고 있는 동방미인차는 숙성된 과일 혹은 꽃과 같은 향을 지녔다고 하여 세계에서 가장 고가로 유통되는 우롱차 중 하나이며, Pom-Fong tea, Champagne 우롱차, Chan Pin 우롱차, White Tip 우롱차 등으로도 불리고 있다(5).

이 우롱차는 두 가지 측면에서 일반 우롱차와 매우 다

\*Corresponding author: Seung-Jin Ma  
Department of Food Engineering, Mokpo National University, Jeonnam 534-729  
Tel: 82-61-450-2428  
Fax: 82-61-454-1521  
E-mail: sjma@mokpo.ac.kr

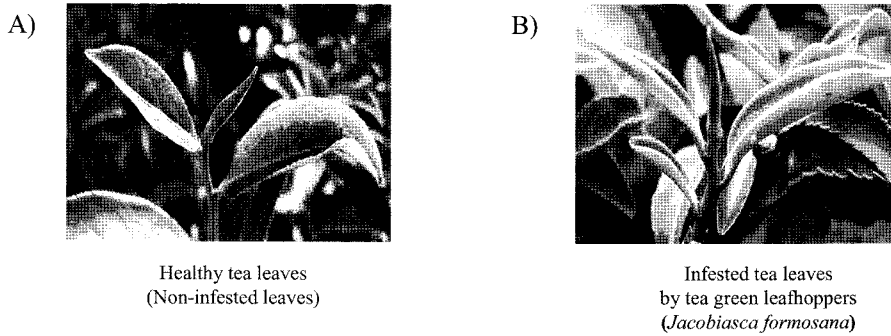


Fig. 1. Healthy tea leaves (A) and tea leaves infested by tea green leafhoppers (B) (Cho J. Y. *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007).

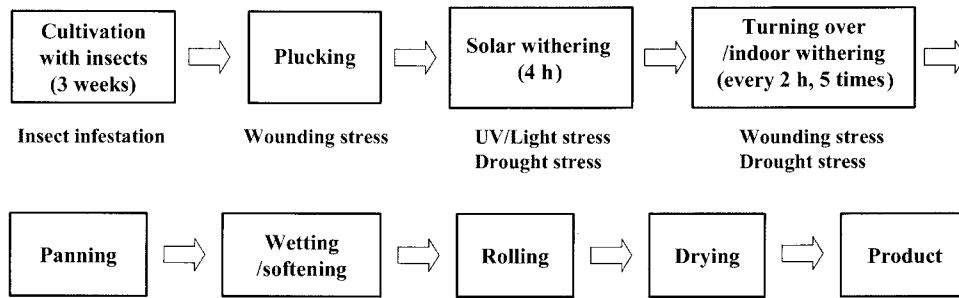


Fig. 2. Manufacturing process of Oriental Beauty (Cho J. Y. *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007; Kinoshita, T. *et al.*, Proceedings of 2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science, 2005).

르다. 그 중 하나는 벌레 먹은 차 잎을 이용한다는 것이다. 즉 매미충(*Jacobiasca formosana*)이라는 차 잎을 먹고 사는 벌레에 의해 2~3주 동안 피해를 받은 차 잎은 보통 차 잎보다 작고 노란색을 띠는데 동방미인차는 이 차 잎을 이용하여 제조한다(Fig. 1).

또 다른 하나의 특징은 일반 우롱차의 제조공정에 비해 장시간의 일광위조, 살내위조 및 교반공정을 거치기 때문에 발효정도가 비교적 높다는 점이다(Fig. 2). 아직까지 우롱차의 발효정도에 대해 확실한 설정기준은 없으나 홍차의 발효정도를 100%로 할 경우 일반 우롱차는 25~60%로 발효를 진행시키는 반면, 동방미인차의 경우는 그 발효정도가 약 70%로 알려져 있다.

### III. 동방미인차의 향기 성분

최근 Cho 등(6)은 매미충의 피해를 받은 차 잎과 일반 차 잎을 이용하여 불발효차 및 발효차(동방미인차 제다법 이용)를 제조한 후 주요 향기를 각각 분석하였다. 그 결

과(Table 1), 발효차에서 18종의 alcohol류, 2종의 aldehyde류, 3종의 acid류, 1종의 ester 등 총 24종의 성분이 주요 향기로 검출되었으며, 매미충의 피해를 받은 차

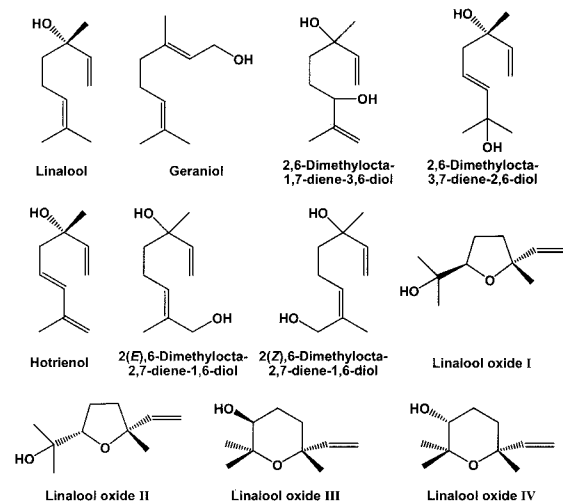


Fig. 3. Structures of alcoholic monoterpenes in oolong tea.

Table 1. Volatile compound contents during the oolong tea manufacturing process (Cho, J. Y. et al., International Symposium on Innovation in Tea Science and Sustainable Development in Tea Industry, 2005)

Compounds	Tea products <sup>a</sup>			
	Infested leaves		Healthy leaves	
	Fresh leaves	Oriental Beauty	Fresh leaves	oolong tea
1-Penten-3-ol	0.003 <sup>b</sup>	0.047	0.006	0.057
Isoamyl alcohol	0.002	0.200	ND	0.034
Amyl alcohol	ND <sup>c</sup>	0.177	0.005	0.074
Hexanol	ND	0.177	ND	0.17
(Z)-3-Hexenol	ND	0.706	ND	0.46
(E)-2-Hexenol	0.002	0.130	ND	0.11
<b>Linalool</b>	<b>0.022</b>	<b>0.236</b>	<b>0.014</b>	<b>0.20</b>
<b>Geraniol</b>	<b>0.036</b>	<b>0.873</b>	<b>ND</b>	<b>0.87</b>
<i>trans</i> -Linalool-3,6-oxide (linalool oxide I)	<b>0.040</b>	<b>1.759</b>	<b>trace</b>	<b>0.36</b>
<i>cis</i> -Linalool-3,6-oxide (linalool oxide II)	<b>0.067</b>	<b>1.701</b>	<b>0.016</b>	<b>0.72</b>
<i>trans</i> -Linalool-3,7-oxide (linalool oxide III)	<b>0.108</b>	<b>1.593</b>	<b>trace</b>	<b>0.43</b>
<i>cis</i> -Linalool-3,7-oxide (linalool oxide IV)	<b>0.142</b>	<b>1.212</b>	<b>0.052</b>	<b>0.61</b>
<b>3,7-Dimethylocta-1,5,7-trien-3-ol (hotrienol)</b>	<b>0.202</b>	<b>0.159</b>	<b>0.003</b>	<b>0.06</b>
<b>2,6-Dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol</b>	<b>1.816</b>	<b>3.058</b>	<b>0.12</b>	<b>0.43</b>
<b>2,6-Dimethylocta-1,7-diene-3,6-diol</b>	<b>ND</b>	<b>0.219</b>	<b>ND</b>	<b>0.049</b>
<b>2,6-Dimethylocta-2,7-diene-1,6-diol</b>	<b>0.073</b>	<b>0.445</b>	<b>ND</b>	<b>0.46</b>
Benzyl alcohol	0.114	4.335	0.038	3.52
2-Phenylethanol	0.105	4.352	0.065	3.64
Hexanal	ND	0.040	0.005	0.052
Benzaldehyde	0.001	0.237	ND	0.075
Caproic acid	0.043	0.604	0.063	1.27
(Z)-3-Hexenoic acid	ND	0.471	ND	1.57
(E)-2-Hexenoic acid	ND	0.681	ND	1.09
Methyl jasmonate	0.038	trace	0.12	0.08

<sup>a</sup> Tea products were collected at each step of the manufacturing process and subjected to the processes of panning, rolling, and drying.

<sup>b</sup> Volatile compound contents are expressed as the ratios of volatile compounds (GC peak area)/9-nonanone (GC peak area) of internal standard.

<sup>c</sup> ND is no detection.

Bold characters are alcoholic monoterpenes.

잎과 일반 차 잎을 사용한 경우 모두에 있어 불발효차에 비해 발효차의 향기성분이 보다 많이 증가한다고 하였다. 또한 매미충의 피해를 받은 차 잎으로 제조한 발효차(동방미인차 모델)와 일반 차 잎으로 제조한 발효차(일반 우롱차 모델)의 향기를 비교한 결과, 일반 차 잎으로 제조한 발효차에 비하여 매미충의 피해를 받은 차

잎으로 제조한 발효차에서 linalool oxides를 비롯한 alcoholic monoterpene류의 향기성분 함량이 높게 검출되었음을 보고하였다(Fig. 3) (7). 뿐만 아니라 매미충의 피해를 받은 차 잎의 경우 일반 차 잎에서 미량이던 2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol과 3,7-dimethylocta-1,5,7-triene-3-ol (hotrienol)의 성분이 크게 증가함을

Table 2. Differences on the volatiles emitted from healthy tea shoots and those damaged by some pests, etc. (Chen, Z. M. *et al.*, Proceedings of 2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science, 2005)

Compounds	Relative contents of emitted volatiles				
	Natural tea shoots	Mechanically damaged	Tea shoots damaged by		
			Geometrid larvae	Aphid	Leaf hopper
1-Pentanol	+	++	trace	trace	-
1-Penten-3-ol	++	+	+	+	-
Linalool	++	++	++	+	+++
Geraniol	+	trace	trace	++	+
Benzyl alcohol	+	++	-	-	-
Benzaldehyde	-	-	-	++	-
Hexanal	trace	++	+	-	-
(E)-2-Hexenal	+	++	++	++	++
(Z)-3-Hexenyl acetate	++	+	-	+	-
3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene	+	++	+	++	+
2,6-Dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol	-	-	-	-	++
Indole	+	+	++	+	+++

발견하고, 이들 두 성분이 매미충에 의한 스트레스에 대응하여 차 잎에서 생성된 성분으로써 동방미인차의 특징적인 향기성분이라고 보고하였다. 이들은 계속적인 연구를 통하여 이들 두 화합물이 거의 (S)-form으로 존재하고 있음을 밝힌 후, 이들 물질이 매미충에 의한 스트레스에 의해 차 잎에서 발현된 효소가 작용하여 linalool로부터 산화되어 생성되었을 가능성이 높다고 예측하였다(Fig. 4) (8).

최근 Arimura (9)와 Bartam (10) 등은 식물이 곤충의 공격 혹은 wounding을 받을 경우, monoterpene계 화합물들 및 C<sub>6</sub>계 화합물들을 생산한다고 보고한 바 있어 Cho 등의 주장을 뒷받침하고 있다. 또한 Chen 등(11)은 기계적 손상 혹은 곤충의 종류에 따라 차 잎에서 다른 종류의 향기 성분들이 생성된다고 보고하였는데(Table 2), 차 잎이 기계적 손상을 받은 경우, 정상 차 잎보다 benzyl alcohol, (E)-2-hexenal, hexanal, 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene의 함량이 높으며, 곤충 스트레스 중 진디물(aphid)에 의하여 손상을 받는 경우 geraniol, benzaldehyde, (E)-2-hexenal, 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene의 함량이 높은 반면, 매미충의 경우 linalool, 2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol, indole 등의 함량이 높다고 하였다.

#### IV. 동방미인차의 제조과정 중 발현 유전자

위에서 살펴본 바와 같이 우롱차를 비롯한 일반 효소발효차는 제다과정 중에 위조, 교반 등에 의하여 wounding, light, UV 및 drought 등의 물리적 스트레스를 주로 받는다.

반면, 동방미인차는 이러한 물리적 스트레스와 함께 곤충에 의한 biotic 스트레스를 받은 것이 큰 차이이며, 이

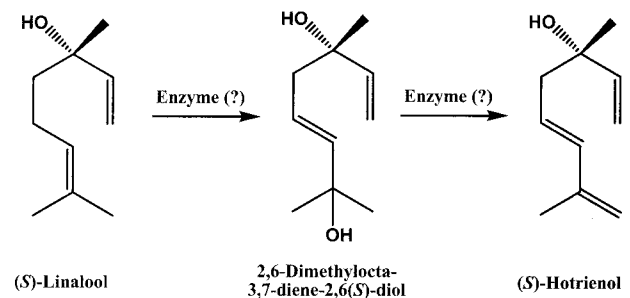


Fig. 4. A proposal biosynthetic route of 2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol and hotrienol from linalool (Ogura M. *et al.*, ACS Symposium Books, 2006).

Table 3. Up-regulated genes in tea leaves during the oolong tea manufacturing (Cho J. Y. *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007)

Groups	Gene functions
Carbohydrate metabolism	Trehalose 6-phosphate synthase
	Raffinose synthase
	$\beta$ -Amylase
Abscisic acid biosynthesis	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	9- <i>cis</i> -Epoxy-carotenoid dioxygenase
	Ntdin (senescence-associated protein)
Signaling pathways	Molybdenum cofactor sulfurase
	Glutamine synthase
	Jasmonic acid 2
Stress-inducible protein	Glyoxysomal fatty acid oxidation
	Heat shock protein
	Small rubber particle protein
	Bax inhibitor
	Senescence-associated protein
	DnaJ protein
	Chitinase
Hexose transporter protein	
	Dessication-related protein

에 따라 발현되는 유전자의 종류도 서로 다를 것으로 생각되고 있다.

#### 1) 물리적 stress에 의해서 발현되는 유전자

Cho (12)와 Kinoshita (13) 등은 우롱차용 신선 차 잎을 이용하여 일광위조, 실내위조, 교반 등의 제조공정에 따라 발효 차를 제조하면서 각 단계별로 발현되는 특이적인 유전자를 조사하였다. 그 결과(Table 3), 발효차 제조공정이 진행됨에 따라 stress-inducible protein 관련 유전자들(heat shock protein, small rubber particle protein, senescence-associated protein), abscisic acid 생합성 관련 유전자들(9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase, senescence-associated protein의 Ntdin, molybdenum cofactor sulfurase), 그리고 당 대사 관련 유전자들(trehalose 6-phosphate synthase, raffinose synthase,  $\beta$ -amylase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

이 발현됨을 관찰하였다. 또한 그들은 당 대사 및 abscisic acid 생합성에 관련된 유전자의 발현량이 일광위조 단계에서 급속히 증가하였으며, 실제로 발효차의 제조과정 중에도 일광위조단계에서 raffinose와 abscisic acid의 함량이 증가되기 때문에 발효차 제조과정 중 일광위조 과정이 중요하다고 주장하였다(12,14).

#### 2) 곤충 stress에 의해서 발현되는 유전자

Cho 등(15)은 동방미인차의 특징적인 향기 성분인 2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol과 3,7-dimethylocta-1,5,7-triene-3-ol이 식물의 대표적인 2차대사산물 산화 관련 효소인 cytochrome P450 monooxygenase에 의하여 linalool로부터 산화되어 생합성될 것으로 예측하였다. 이들은 이를 증명하기 위하여 매미충의 피해를 받은 차 잎으로부터 6종의 P450 유전자들을 단리한 후 이들을 형질전환하여 얻은 효소들을 대상으로 수산화 첨가반응 여부를 확인하였다. 그 결과, geraniol과 linalool의 8위에 수산기를 첨가하는 P450 효소를 발견하였으며, 실제로 매미충의 피해를 받은 차 잎에서도 이 P450 유전자(CYP76 homologue gene)가 크게 발현됨이 관찰되어 동방미인차의 곤충 stress에 의해 발현되는 주요 효소가 cytochrome P450라고 보고하였다.

### V. 결론

식물의 향기성분은 외부로부터의 위협에 대한 자기 방어 기작의 일부로 알려져 있으며, 우롱차, 홍차 등의 효소 발효차는 제조과정 중 차 잎의 채취, 위조 및 교반 등의 과정을 통해 다양한 스트레스에 노출시킴으로서 차 잎에 존재하는 자기 방어 기작이 충분히 발현되도록 제조된다. 특히 동방미인차는 일반 효소발효차와 달리 매미충의 피해를 받은 차 잎을 사용함으로써 발효차의 제조과정 중 차 잎이 받는 drought, wounding, light 등의 물리적 스트레스 외에 곤충에 의한 biotic 스트레스를 함께 이용하여 동방미인차 특유의 2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol과 hotrienol을 포함하는 alcoholic계 향기성분의 함량을 증가시키는 것으로 해석된다. 최근 차잎에 가해지는 곤충, wounding, drought 등의 여러 가지 stress와 이에 반응하는 생합성 유전자들에 대한 연구가 진행되고 있으나 이에 대한 분자생물학적, 생화학적, 및 천연물화학적

접근 방법에 의한 폭넓은 연구는 아직 부족한 실정이다. 때문에 차 잎에 대한 생리학적 기작과 발효과정 중의 향기 생성 메커니즘에 대하여 심도있는 연구가 계속 진행 될 것이며, 이러한 연구와 이해를 통하여 향기와 품질이 향상된 다양한 발효차의 생산 또한 가능할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Cho, J.Y., Moon, J.H., Park, K.H., Ma, S.J. Aroma of fermented tea ( I ). Mechanisms of aroma formations on black tea and oolong tea. *Food Science and Industry* 40: 59-65 (2007).
2. Pichersky, E., Gershenzon, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 237-243 (2002).
3. Hara, Y., Luo, S.J., Wickremasinghe, R.L., Yamanishi, T. Processing of tea. Special issue on tea, *Food Rev. Int.* 11: 426-430 (1995).
4. Yamanishi, T. Special issue on tea: Flavor of tea. *Food Rev. Int.* 11: 477-525 (1995).
5. Kinoshita, T., Sakata, K., Mysterious aroma of Oriental Beauty. *Koryo (in Japanese)* 229: 113-120 (2006).
6. Ogura, M., Terada, I., Shirai, F., Tokoro, K., Chen, K.R., Chen, C.L., Lin, M.L., Shimizu, B., Kinoshita, T., Sakata, K. Tracing aroma characteristics changes during processing of the famous Formosa oolong tea "Oriental Beauty". *Proceedings of 2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science, Shizuoka, Japan*, p. 240-242 (2005).
7. Cho, J.Y., Mizutani, M., Shimizu, B., Kinoshita, T., Ogura, M., Tokoro, K., Lin, M.L., Sakata, K. Chemical profiling of aroma and carbohydrates during the fermentation process of Formosa oolong tea "Oriental Beauty". *International Symposium on Innovation in Tea Science and Sustainable Development in Tea Industry, Hangzhou, China*, p. 928-932 (2005).
8. Ogura, M.; Kinoshita, T.; Shimizu, B.; Shirai, F.; Tokoro, K.; Lin, M. L.; Sakata, K. Identification of aroma components during processing of the famous Formosa oolong tea "Oriental Beauty". *ACS Symposium Books (in press)*.
9. Arimura, G., Kost, C., Boland, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 91-111 (2005).
10. Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., Boland, S. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry* 67: 1661-1672 (2006).
11. Chen, Z.M., Ning, X., Han, B.Y., Zhao, D. Chemical communication between tea plant-herbivore-natural enemies. *Proceedings of 2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science, Shizuoka, Japan*, p. 90-93 (2005).
12. Cho, J.Y., Mizutani, M., Shimizu, B., Kinoshita, T., Ogura, M., Tokoro, K., Lin, M.L., Sakata, K. Chemical profiling and gene expression profiling during the manufacturing process of Taiwan oolong tea "Oriental Beauty". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1476-1486 (2007).
13. Kinoshita, T., Cho, J.Y., Mizutani, M., Shimizu, B., Tsai, H.T., Chen, Y.L., Lin, M.L., Sakata, K. Gene expression profiling in the manufacturing process of "Oriental Beauty". *Proceedings of 2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science, Shizuoka, Japan*, p. 161-164 (2005).
14. Cho, J.Y., Shimizu, B., Kinoshita, T., Mizutani, M., Chen, K.R., Chen, C.L., Sakata, K. Chemical profiling in the manufacturing process of "Oriental Beauty". *2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science, Shizuoka, Japan*, p. 260-262 (2005).
15. Cho, J.Y., Mizutani, M., Shimizu, B., Kinoshita, T., Sakata, K. Monoterpene hydroxylation of cytochromes P450 isolated from the leafhopper-infested tea leaves of Taiwan oolong tea. *Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2007 (in Japanese)* 3A18P17 (2007)