

## 차나무 callus의 catechin류 함량 분석

오순자 · 한태완 · 허인옥  
제주대학교 자연과학대학 생물학과

### Contents of catechins from callus of *Thea sinensis*

Soon-Ja Oh · Tae-Wan Han · In-Ok Heo  
Department of Biology, Cheju National University \*Corresponding author

#### ABSTRACT

This study aimed to measure the growth of callus cultured under MS medium with thiamin-HCl as a vitamine, PVP as the antioxidant, taxifolin and quercetin as precursors of catechins and to select the clone producing catechins highly.

Callus induction from *Thea sinensis* young leaf was great in the MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA.

When components of callus were compared with those of young leaf. Four kinds of catechins(EC, EGC, EGCG, ECG) were detected in cultured callus whereas EC not in young leaf. Catechins were detected most in the medium with 10 mg/L thiamin-HCl. Expecially, EC was most as a 6.39 mg/g. The content of catechins in PVP treatment was not different each other but was higher in 100 mg/L and 200 mg/L PVP than in control. When the callus was cultured in the medium with taxifolin and quercetin the caffeine content was lower than in the medium with not them. Also, the content of catechins in taxifolin and quercetin treatment was not different each other but it was highest in 10 mM taxifolin and 100 mM quercetin treatment.

**key words:** (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG),  
(+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechin gallate(ECG)

#### I. 서론

차나무(*Thea sinensis* L.)는 동백나무과

(Theaceae)에 속하는 상록관목으로서, 오랜 기간을 통해 품종내에서 형태적 또는 생리·생태적으로 특유한 형질변이를 일으키는 것으로

알려지고 있으며, 생육은 기상요인과 밀접한 관계가 있어 온난다우지가 재배적지로 알려져 있다(허, 1981).

최근 차의 유효성분들에 관한 약리작용의 연구가 활발히 진행되면서 녹차에 대한 인식이 새로워졌다. 차나무의 성분은 catechin류, caffeine, 단백질, 아미노산, 전분, 섬유소, 펙틴 등과 엽록소, 플라보노이드 유도체, 안토시안 등의 식물 색소 그리고 지질, 무기질 등이 존재하고 있다. 이중 다른 식물에 비해 caffeine과 polyphenol인 catechin류의 함량이 많은 것이 특징이다. Catechin류로는 (+)-catechin(C)과 (-)-epicatechin(EC), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 및 (-)-epicatechin gallate(ECG) 등 5가지 성분이 알려져 있다(Ikegaya, 1985). Catechin류의 임상학적인 연구로서 항산화작용(Rhi *et al.*, 1993; So, 1993), 항균작용(Hara *et al.*, 1989), 항종양작용(David *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992, 1995; Fujita *et al.*, 1985; Hiroshi *et al.*, 1994), 혈중 콜레스테롤 억제작용(Ikeda *et al.*, 1991; Muramatsu, 1986), 항돌연변이 작용(Kada, 1985), 항십이지장작용(Fujita *et al.*, 1989), 중추신경계 활성화작용(Hayashi, 1990) 등에 대한 연구가 있다.

따라서 본 연구는 차나무의 신초를 이용하여 배양조건에 따른 켈러스의 catechin류 함량을 분석하여 생산성이 높은 배양조건을 찾고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

제주대학교 부속농장에 식재되어 있는 차나무(품종명:Yabukita) 신초를 채취하여, 중성

세제로 20분간 씻고, 35℃ 항온수조에서 2시간 동안 중탕 가열한 후 70%(v/v) 에탄올에서 10분간 침적해서 1 차 표면살균하였다. 그리고 tween 2~3방울이 첨가된 1% 차아염소산 나트륨에서 15분간 2 차 표면살균시켜 멸균수로 4~5 회 수세한 다음 본 실험의 재료로 이용하였다.

### 2. 켈러스 배양

#### 1) 켈러스의 유도

켈러스를 유도시키기 위하여 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 5 mg/L thiamin-HCl, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar를 첨가하였고, 성장조절물질로서 NAA와 BA를 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L를 단일 또는 조합 처리하였다. pH는 멸균전 5.8로 조정하여 121℃, 1.5 기압에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 배양조건은 표면살균된 신초를 배지에 치상하여 25±2℃, 4,000 lux, 16/8(명/암) 시간의 광주기 하에서 60 일간 배양하였다.

#### 2) Thiamin-HCl과 PVP의 처리

Thiamin-HCl과 PVP가 켈러스의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, MS 배지(0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ, 4 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA)에 thiamin-HCl, PVP를 각각 농도별로 처리하였다. 켈러스의 생장은 0.2 g의 켈러스를 10 ml 배지가 들어있는 시험관에 4 주 동안 배양한 후 측정하였다.

#### 3) Taxifolin과 quercetin의 처리

Catechin 합성의 전구물질인 taxifolin과 quercetin이 켈러스의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, thiamin-HCl, PVP 처리시 생장이 가장 양호했던 4 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA와 100 mg/L PVP가 처리된 MS

배지에 taxifolin, quercetin을 농도별로 처리하였다. 켈러스의 생장은 0.2 g의 켈러스를 10 ml 배지가 들어있는 시험관에 4 주 동안 배양한 후 측정하였다.

### 3. Catechin류의 함량 분석

#### 1) 실험재료

Thiamin-HCl, PVP, taxifolin과 quercetin이 처리된 배지에서 배양된 켈러스의 catechin류 함량을 알아보기 위해, thiamin-HCl과 PVP는 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 MS 배지에서 4주간 배양한 켈러스를 사용하였다. Taxifolin과 quercetin은 thiamin-HCl과 PVP 농도별 처리시 생장이 가장 양호했던 4 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA와 100 mg/L PVP가 처리된 MS 배지에서 4주간 배양한 켈러스를 사용하였다. 대조구로서는 조직 배양에 사용했던 차나무 싹 즉, 5~8 월의 월별 싹을 채취하여 사용하였다. 각각의 켈러스와 싹은 80℃의 건조기에서 20시간 건조시켜 분쇄한 후 분석재료로 사용하였다.

#### 2) 표준용액 조제

Catechin류의 표준용액은 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(EGC),

(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)은 5 mg을 10 ml ethyl acetate로, (+)-epigallocatechin(EGC)은 5 mg을 50 ml ethyl acetate로 녹여 사용하였다. 표준품인 caffeine, (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(EGC), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)는 Sigma회사 제품을 사용하였다. 용매인 acetonitrile, N, N-dimethyl formamide, ethyl acetate, tetrahydrofuran(THF)은 Sigma회사의 HPLC용을 사용하였으며, 전처리 과정에 사용된 시약은 특급시약을 사용하였다.

#### 3) Catechin류의 분석

##### 3-1) 분석 방법

Catechin류의 분석을 위한 전처리 과정은 Ikegaya 등(1985)의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 분쇄한 시료 100 mg을 시험관에 넣고 10 ml 증류수를 가한 다음 80℃ 항온 수조에서 50~60분간 가온 추출하여 TOYO 여과지로 여과하였다. Caffeine을 제거하기 위해 여과한 추출액을 분액깔대기에 넣고 chloroform 20 ml를 넣어 잘 흔들었다. 이 과정을 3회 반복한 후 chloroform층을 제거한 상

Table 1. HPLC conditions for the analysis of catechins

Item	Method(I)	Method(II)
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>
Mobile phase	Acetonitrile : 130 Acetic acid : 5 Methanol : 20 Water : 862	25% THF* 1% Phosphoric acid
Flow rate	1 ml/min	1 ml/min
Wavelength	280 nm	280 nm
Chart speed	0.25 cm/min	0.25 cm/min
Injection volume	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

\*: Tetrahydrofuran.

층액을 분액깔대기에 넣고 ethyl acetate 20 ml를 넣어 catechin류를 추출하였다. 이 조작 역시 3회 반복한 후 ethyl acetate층을 60°C로 조정된 항온수조에서 감압농축한 후 다시 3 ml HPLC용 ethyl acetate를 첨가하여 녹인 후 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

3-2) 분석 조건

HPLC를 이용한 catechin류의 분석은 Ikegaya(1985) 방법에서 이동상을 달리한 2가지 방법을 병행하여 EGC, EC, EGCG, ECG 등을 분석하였다. 분석조건을 보면 검출기는 UV absorbance를 사용했으며, 컬럼은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>를 사용하였다(Table 2). HPLC를 통한 catechin류 분석시, method(I)에서 ECG가 23분, method(II)에서 EGC, EC, EGCG가 각각 10, 11.5, 16분대에서 검출되었다.

III. 결 과

1. 신초 배양을 통한 캘러스의 유도

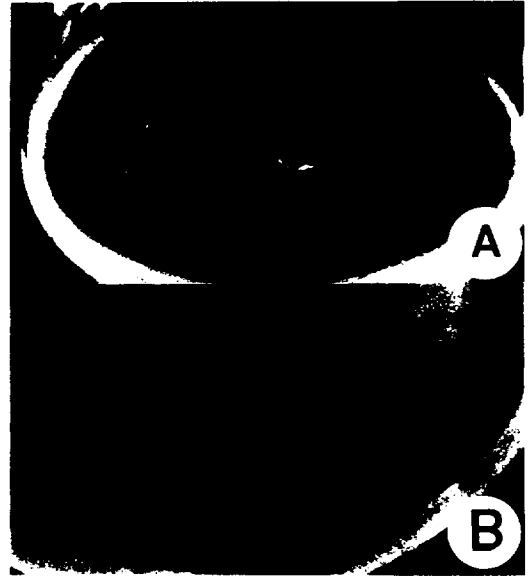


Figure 1. Callus induction from young leaf of *Thea sinensis*. A, 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA; B: 5 mg/L NAA. Arrow indicates roots.

Table 2. Effects of NAA and BA on callus induction from *Thea sinensis* young leaf

BA (mg/L)	NAA(mg/L)					
	0	0.1	0.5	1	5	10
0	-	-	-	C	C.R	-
0.1	-	C	C	C	CC	-
0.5	C	C	CC	CC	-	-
1	-	C	CCC	CC	-	CC
5	-	C	-	CC	CC	-
10	-	-	-	-	C	-

- : none, C: callus, R: root.

신탄을 채취하여 5 mg/L thiamin-HCl이 첨가된 MS 배지에 NAA와 BA의 농도를 달리하여 배양한 결과는 Table 2, Fig. 1과 같다. 캘러스의 유도는 NAA와 BA 각각 0.5~1 mg/L 조합에서 이루어졌는데, 특히 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA 조합에서 가장 좋았다. NAA(0, 0.1, 10 mg/L)와 BA(0, 0.1, 5, 10 mg/L)의 조합에서는 대체적으로 캘러스 분화가 잘 나타나지 않았으며, 5 mg/L NAA 단일 처리에서는 뿌리 분화가 나타났다.

2. Thiamin-HCl과 PVP의 영향

캘러스 생장에 양호했던 MS(0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ, 0.5 mg/L IBA and 4 mg/L BA)배지에 thiamin-HCl과 PVP를 농도별로 처리하여 4주간 배양한 후 생장을 조사하였다(Fig. 2).

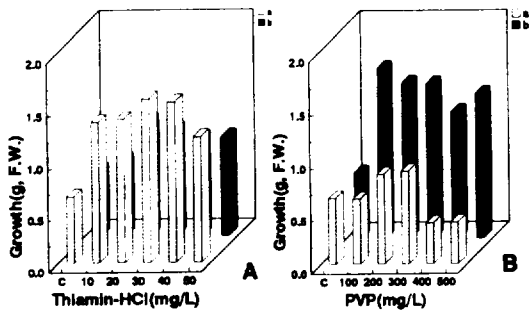


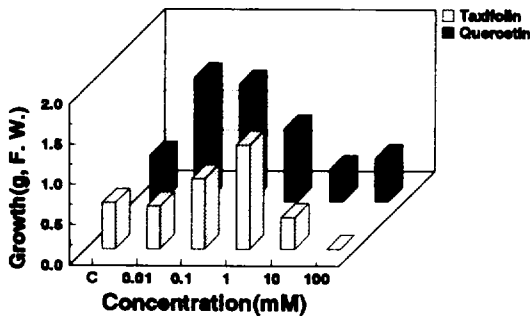
Figure 2. Effect of thiamin-HCl and PVP on growth of callus cultured in MS medium with hormone for 4 weeks (Initial in oculum: 0.2 g). A, Thiamine-HCl; B: PVP. a) MS with 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ. b) MS with 0.5 mg/L IBA and 4 mg/L BA.

먼저 thiamin-HCl 농도에 따른 캘러스의 생장을 보면(Fig. 2A), 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 MS 배지에서는 대조구에 비해 thiamin-HCl 처리시 생장이 증가하였다. 특히 20 mg/L thiamin-HCl 처리시 1.10 g으로 대조구에 비해 2 배의 생장을 보였고, 그 이상의 농도처리시에는 약간 감소하는 경향이 있었다. 그러나 대조구에 비하면 thiamin-HCl을 처리하는 것이 캘러스의 생장을 증가시켰다(Fig. 2A-a). 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA가 처리된 MS 배지에서는 대조구에 비해 thiamin-HCl 처리시 2 배 이상의 생장을 보였다. 특히 30 mg/L thiamin-HCl 처리시 1.57 g으로 대조구에 비해 3 배 이상의 생장을 보였다(Fig. 2A-b). 2,4-D와 TDZ, IBA와 BA가 처리된 MS 배지에 thiamin-HCl을 처리했을때 캘러스의 생장은 IBA와 BA 조합 처리구에서 양호한 결과를 보였다.

PVP의 농도에 따른 캘러스 생장을 보면(Fig. 2B), 먼저 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ를 조합 처리한 MS 배지에서는 대조구에 비해 300 mg/L PVP까지는 증가하는 경향을 보였다. 특히 300 mg/L의 PVP에서는 0.89 g으로 대조구에 비해 2 배 정도 증가하다가 그 이상의 농도하에서는 생장이 떨어지는 경향을 나타내었다(Fig. 2B-a). 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA를 조합한 MS 배지에서는 대조구에 비해 PVP 처리시 캘러스 생장이 증가하였는데, 100 mg/L PVP 처리시 1.54 g으로 대조구에 비해 생장이 3 배 이상 증가하였다. 그리고 100 mg/L PVP를 기점으로 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 그러나, 대조구에 비하면 PVP를 처리하는 것이 캘러스의 생장을 증가시켰다(Fig. 2B-b). PVP가 처리된 MS 배지에서는 2,4-D와 TDZ보다는 IBA와 BA 조합 처리된 배지에서 캘러스 생장이 양호하였다.

### 3. Taxifolin과 quercetin의 영향

Thiamin-HCl과 PVP를 농도별로 처리한 결과에서 생장이 가장 양호했던 4 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA, 100 mg/L PVP가 처리된 MS 배지에 taxifolin과 quercetin을 농도별로 처리하여 4주 후에 생장을 측정하였다 (Fig. 3).



**Figure 3.** Effect of taxifolin and quercetin on growth of callus cultured in MS medium with 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA and 100 mg/L PVP for 4 weeks.

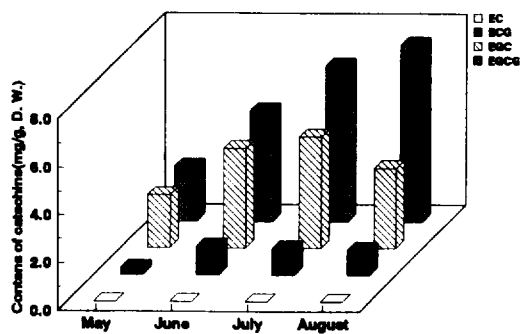
먼저 taxifolin을 농도별(0~10 mM)로 처리한 경우, 대조구에서는 0.57 g인데 반해 0.01, 0.1, 1 mM taxifolin 처리에서는 각각 0.53, 0.87, 1.29 g으로 대조구에 비해 taxifolin 처리시 생장이 좋았다. 특히, 1 mM taxifolin 처리구에서는 대조구에 비해 2 배 이상의 생장을 보였고, 10 mM에서는 0.39 g으로 급격히 감소하는 경향을 보였다. Quercetin을 농도별(0~100 mM)로 처리한 경우 대조구보다 생장이 증가하였는데 0.01 mM 처리에서 1.54 g으로 3 배 이상의 생장을 보였으며, 0.01 mM 이상의 농도에서 생장은 점차 감소하는 경향을 보였다. Taxifolin과 quercetin을 농도별로 처리 했을때 캘러스의

생장은 고농도보다 저농도로 처리했을때 대조구에 비해 2~3 배의 생장을 보였다.

### 4. Catechin류 함량

#### 1) 신초의 catechin류 함량

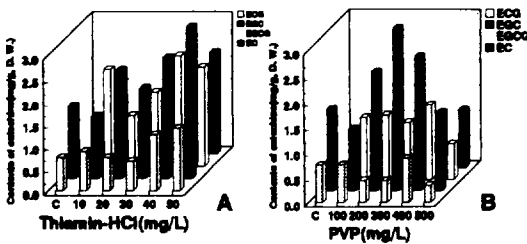
차나무 신초와 배양조건을 달리한 캘러스의 catechin류 함량을 비교하고자 5월에서 8월 동안에 채취한 신초의 catechin류 함량을 분석하였다(Fig. 4). 신초에서의 catechin류는 월별에 관계없이 EGC, EGCG, ECG 등 3 가지 성분만이 검출되고 EC는 검출되지 않았다. 먼저 EGC는 5월부터 7월까지 점점 증가하다가 감소하는 경향인데 7월에 4.69 mg/g으로 가장 높게 나타났다. EGCG는 8월까지 계속 증가하여 8월에 7.38 mg/g으로 함량이 높았다. ECG는 월별에 관계없이 함량의 변화가 전혀 나타나지 않았다. 그리고 총 catechin류는 7월에, EGCG+ECG의 함량은 8월에 각각 12.28, 8.41 mg/g으로 높게 나타났다.



**Figure 4.** Change of content of catechins in young leaf from May to August.

2) 배지별 thiamin-HCl과 PVP의 효과  
Thiamin-HCl과 PVP의 농도별에 따른 캘

러스의 catechin류의 함량을 분석하였다 (Fig. 5). 먼저 thiamin-HCl의 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1mg/L TDZ 조합의 MS 배지에서 배양한 켈러스의 catechin류의 함량을 살펴보았다(Fig. 5A). Thiamin-HCl의 EGC, EGCG, ECG등 3가지 종류의 catechin류만이 검출되고 EC는 검출되지 않았다. Thiamin-HCl를 처리한 경우에는 농도에 관계없이 4가지 성분 모두 검출되었다. 먼저 EGC는 30 mg/L까지는 1.21 mg/g으로 감소하다가 다시 증가하는 양상을 보였는데 무처리구에서 1.63 mg/g으로 높은 함량을 보였다. EC와 EGCG는 40 mg/L 농도하에서 그리고 ECG는 50 mg/L 농도하에서 각각 2.83, 2.46, 1.39 mg/g으로 함량이 높게 검출되었다. 그리고 총 catechin과 EGCG와 ECG의 함량은 40 mg/L thiamin-HCl 농도하에서 높았으며, 함량은 각각 7.83, 3.71 mg/g이다(Fig. 5A).

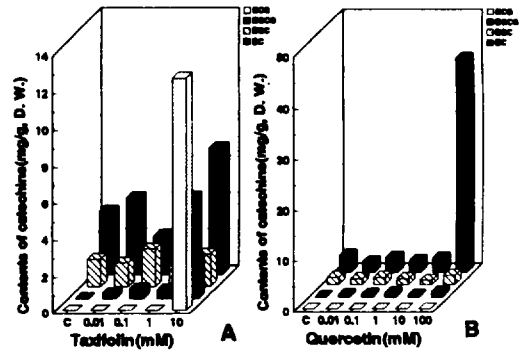


**Figure 5.** Catechin contents of callus cultured in MS medium with various concentration of thiamin-HCl or PVP. Each media were treated 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ. A, thiamin-HCl; B, PVP.

PVP 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합의 MS 배지에서 배양한 켈러스의

catechin류 함량을 살펴보았다(Fig. 5B). PVP의 무처리구에서는 EC이 검출되지 않았으며, 처리구에서는 농도에 관계없이 4가지 성분 모두 검출되었다. 먼저 EGC는 무처리구, EC는 200 mg/L, EGCG와 ECG는 400 mg/L 처리시 각각 1.63, 2.77, 1.4, 0.88 mg/g의 함량으로 높게 나타났다. 총 catechin 함량은 PVP 200 mg/L 처리구에서 5.12 mg/g, EGCG+ECG의 함량은 400 mg/L 처리구에서 2.37 mg/g으로 가장 높게 나타났다.

3) 배지별 taxifolin과 quercetin의 효과  
Taxifolin과 quercetin의 농도에 따른 켈러스의 catechin류 함량을 보면(Fig. 6),



**Figure 6.** Catechin contents of callus cultured in MS medium with various concentrations of taxifolin and quercetin. Each media were 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA and 100 mg/L PVP. A, taxifolin; B, quercetin.

0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA, 100 mg/L PVP가 조합된 MS 배지에 taxifolin의 농도 별 catechin류 함량은 taxifolin 무처리구에

서는 EGC, EC만이 검출되었다. 0.01~1 mM 농도의 taxifolin 처리시는 EGC, EC, EGCG가 검출되었으며, 10 mM에서는 모든 성분이 검출되었다. EGC, EC, EGCG의 함량은 taxifolin 농도에 따라 큰 차이를 나타내지 않았는데 농도가 증가함에 따라 EGCG 함량도 증가하는 경향을 보였다. EGC 성분은 10 mM의 taxifolin 처리구에서만 12.65 mg/g으로 높게 나타났고, 총 catechin은 23.47 mg/g, EGCG+EGC의 함량은 14.81 mg/g이었다(Fig. 6-A).

Quercetin의 농도별 처리에 따른 catechin 류를 보면 무처리구에서는 EGC, EC만이 검출되었고, 처리구에서는 EGC, EC, EGCG만이 검출되었다. EGC와 EGCG는 농도에 따라 함량에 큰 차이를 나타내지 않았다. EC는 100 mM의 quercetin 처리시 42.05 mg/g으로 함유량이 가장 높게 검출되었으며, 총 catechin 함량은 44.92 mg/g으로 나타났다(Fig. 6-B).

#### IV. 고찰

차나무 싹초에서 NAA와 BA를 단일 또는 조합 처리하여 캘러스를 유도 시킨 결과 단일 처리했을때 보다 조합 처리구에서 더 잘 유도되었다.

캘러스 생장이 양호했던 MS(0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ, 0.5 mg/L IBA and 4 mg/L BA)배지에 thiamin-HCl과 PVP를 농도별로 처리하여 4주간 배양한 후 생장을 조사하였다. Thiamin-HCl 농도에 따른 생장을 보면 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 MS 배지에서는 20 mg/L thiamin-HCl 처리시 생장이 2 배로 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향이 있었다. 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA가 처리된 MS 배지에서는 thiamin-HCl 30 mg/L

처리시 생장이 가장 좋았다. 이는 담배 캘러스에서 thiamin-HCl의 농도를 높였을때 thiamin의 요구도가 증가하여 4 배의 생장을 보였으며, 장미의 경단배양시 thiamin-HCl 농도를 높였을때 생장이 촉진된다는 결과와 일치하였다(Linsmaier *et al.*, 1967; Hasegawa *et al.*, 1979, 1980). 그러나, Carrizo citrange와 탕자나무(*Poncirus trifoliata*)의 경단배양에서 thiamin-HCl의 양을 증가시켰을 때 다경으로 분화된다는 결과와는 일치하지 않았다(Kitto *et al.*, 1981). PVP의 농도에 따른 캘러스 생장은 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ를 조합 처리한 MS 배지에서 300 mg/L의 PVP 처리시 양호하였고 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA를 조합 처리한 MS 배지에서는 100 mg/L의 PVP 처리시 생장이 2 배이상 증가하였다. 이는 온대산 *Cymbidium*의 경단배양시 활성탄과 PVP를 처리한 배지에서 생존율이 높았다는 보고와 일치하였으며(Choi *et al.*, 1996), *Datura innoxia*의 화분 배양에서 배형성과 캘러스 성장은 0.5% PVP를 처리했을때 생장이 양호하다는 보고와 유사한 결과를 보였다(Tyagi *et al.*, 1981). 그러나, 티크나무(*Tectona grandis*)의 경단배양에서 0.7% PVP를 처리했을때 다경의 형성과 풍년화(*Hammelis japonica*)의 경단배양에서 PVP가 생장억제물질로 작용한다는 결과와 *Datura metal*의 약 배양에서 2% PVP를 처리했을때 재분화가 촉진된다는 결과와는 일치하지 않았다(Gupta *et al.*, 1980; Christiansen *et al.*, 1975; Babrar *et al.*, 1982). 이것은 PVP가 배지의 갈변 방지 및 절편조직의 산화를 방지하여 생장을 억제하는 polyphenoloxidase의 활성이 억제되고 목본식물에서 배양중에 생성되는 페놀 화합물등을 제거시킴으로써 캘러스의 증식이 양호한 결과로 나타나지 않았다고 생각된다. 그



리고, 묘조 형성을 유도하기 위해서는 여러가지의 성장조절물질과 유기물의 처리 등 많은 연구과정이 필요하다고 생각된다.

차나무 싹초를 차나무 잎에서 유도된 캘러스의 catechin류 함량과 비교하고자 HPLC를 이용하여 분석한 결과 싹초의 catechin류는 EGC, EGCG, ECG 등 3가지 성분만이 검출되고 EC는 검출되지 않았다. 이러한 catechin류의 함량은 기후나 습도 등의 외부 환경적인 요소에 의해 많이 좌우되는 것으로 알려져 있는데 주로 차나무 잎의 성장할수록, 그리고 차나무의 생육상태가 이들 성분의 함량 결정에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 생각된다. Thiamin-HCl과 PVP가 처리된 MS 배지에서 catechin류는 무처리구에서 3가지의 catechine류만이 검출된 반면에 thiamin-HCl를 처리한 경우에는 농도에 관계없이 4가지 성분 모두 검출되었다. 총 catechin과 EGCG와 ECG의 함량은 40 mg/L의 thiamin-HCl 처리에서 높았다. PVP 처리구에서의 catechin류의 함량을 보면 무처리구에서는 EC가 검출되지 않았으며, 총 catechin 함량은 200 mg/L의 PVP 처리구에서, EGCG+ECG의 함량은 400 mg/L 처리구에서 가장 높게 나타났다. Taxifolin 처리구에서 catechin류의 검출양상을 보면 무처리구에서는 EGC, EC만이 검출되었고, 0.01~1 mM 농도의 taxifolin 처리시는 EGC, EC, EGCG가 검출되었으며 10 mM에서는 모든 성분이 검출되었다. EGC, EC, EGCG의 함량은 taxifolin 농도에 따라 큰 차이를 나타내지 않았는데 농도가 증가함에 따라 EGCG 함량은 증가하는 경향을 보였다. Quercetin의 처리구에서 catechin류의 검출양상은 무처리구에서는 EGC, EC가 검출되었고, 처리구에서는 EGC, EC, EGCG만이 검출되었다. EGC와 EGCG는 농도에 따라 함량에 큰 차이를 나타내지 않았으나 EC는

quercetin 100 mM 처리시 함량이 가장 높게 검출되었다.

이상의 결과를 종합해 볼때 싹초에서의 catechin류는 EC를 제외한 나머지 성분, 즉 EGC, EGCG, ECG만이 검출되었지만 배양된 캘러스에서는 4가지 성분이 모두 검출되었다. 여러가지 조절물질과 생합성 전구물질을 처리한 배지에서 배양된 캘러스는 대조구나 무처리구 보다 많은 양의 catechin류 성분을 생산할 수가 있을 것으로 생각된다. 이들 성분들을 생산하기 위한 최적 배양조건으로는, EGC는 500 mg/L PVP, EC는 100 mM quercetin, EGCG는 10 mg/L thiamin-HCl, ECG는 10 mM taxifolin 처리가 중요한 요인으로 작용할 것으로 생각된다. 이러한 결과를 토대로 조직배양을 이용하여 고품질의 차나무 품종을 개발할 수 있으리라 생각되나 캘러스에서 식물체로의 재분화 등은 앞으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

## V. 적 요

본 연구는 차나무의 싹초를 이용하여 기내에서 여러가지 배양조건에 따른 캘러스의 catechin류 함량을 분석하여 생산성이 높은 배양조건을 찾고자 실시하였다.

싹초배양시 캘러스는 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA 조합 처리구에서 가장 잘 유도되었다. 이 조건에서 유도된 캘러스를 가지고 thiamin-HCl, PVP, taxifolin과 quercetin을 농도별로 처리하여 4주간 배양하여 성장 및 catechin류 함량을 조사하였다. 캘러스의 생장은 30 mg/L thiamin-HCl, 200 mg/L PVP, 1 mM taxifolin, 0.01 mM quercetin 처리시 대조구에 비해 2~3 배의 성장을 보였다. 차나무 잎의 주성분인 catechin류를 분석하고자 싹초와 여러조건에서 배양된 캘러스를 가지고 분석한 결과를 보

면, 켈러스에서 높은 함량을 보였다. 또한 신초에서의 catechin류는 EGC, EGCG, ECG 등은 검출되었으나, EC는 검출되지 않았다. 그러나, 배양된 켈러스에서는 4가지 성분이 모두 검출되었다. 각각의 성분들의 최적 배양 조건을 보면, EGC는 500 mg/L PVP, EC는 100 mM quercetin, EGCG는 10 mg/L thiamin-HCl, ECG는 10 mM taxifolin 처리구에서 가장 높은 함량을 보였다.

## VI. 참고문헌

- Babbar, S. and S. C. Gupta. 1982. Promotory effect of polyvinylpyrrolidone and L-cysteine HCl on pollen plantlet production in anther culture of *Datura metel*. *Z. Pflanzphysiol.* 106: 459-464.
- Bagravillid, G., M. N. Zaprometov and K. G. Butenko. 1979. Obtaining a cell suspension from the tea plant. *Soviet Plant Physiol.* 26: 358-360.
- Choi, S. O., J. D. Chung and J. H. Lee. 1996. Effect of culture media on rhizome formation and its subsequent growth from shoot-tip culture of temperate *Cymbidium* species. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23(3): 167-172.
- Christiansen, J. and Fomnesbech. 1975. Prevention by polypyrrolidone of growth inhibition of *Hamamelis* shoot tips grown *in vitro* and of browning of the agar medium. *Acta Hort.* 54: 101-104.
- David, K. M. 1990. Catechin inhibition of mutagenesis and alteration of DNA binding of 2-acetyl-aminofluorene in rat hepatocytes. *Mutat. Res.* 240: 151-158.
- Fujita, Y. Y., M. Tanaka, K. Kuwata, J. Okuzumi, T. Takahashi and H. Fujiki. 1985. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N-nitro-N-nitroguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 503-505.
- Gupta, P. K., A. L. Nadgir, A. E. Mascarenhas and V. Jaganathan. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L.(teak) by tissue culture. *Plant Sci. Lett.* 17: 259-268.
- Hara, Y. and T. Ishigami. 1989. Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. Studies on antibacterial effects of tea polyphenols. Part III. *Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36: 996-1001.
- Hasegawa, P. M. 1979. *In vitro* propagation of rose(*Rosa hybrida* L.). *Hort. Sci.* 14: 610-612.
- . 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105: 216-220.
- Hayashi, E., M. Hayashi and H. Yamazoe. 1990. Pharmacological action of tea extract on the central nervous system in mice. *Oyo Yakuri* 40(3): 351-357.
- Hiroshi, N., O. Masahide, F. Yasushi, N. Mitsuo, N. Shinji, S. Masami, M. Hisataka and M. Yasushi. 1994.

- Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCRj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 Cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 85: 221-225.
- Ikeda, I., Y. Masato, M. Nakayama, T. Takeo, F. Yayade and M. Sugano. 1991. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. International symposium on tea science(Shizuoka) Abstr. 11-A-3.
- Ikegaya, 1985. 綠茶カテキン類の亢酸化作用について. *日本農業化學會誌.* 59: 129-133.
- Kada, T., K. Kaneko, T. Matsuzaki and Y. Hara. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of the green tea factor. *Mutation Res.* 50: 243-248.
- Kitto, S. L. and M. J. Young. 1981. *In vitro* propagation of *Carrizo citrange*. *Hort. Sci.* 16: 305-306.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1967. Thiamine requirement in relation to cytoplasm in normal and mutant strains of tobacco callus. *Planta.* 72: 146-184.
- Muramatsu, K., M. Fukuyo and Y. Hara. 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32: 613-619.
- Rhi, J. W. and H. S. Shin. 1993. Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25(6): 759-763.
- So, R. S. 1993. Water-soluble antioxidant used in food industry-obtained from tea leaves by water extraction followed by liquid chromatography fractionation. *European Patent* 547: 370-376.
- Tyagi, A. K., A. Rashid and S. C. Maheshwari. 1981. Promotive effect of polyvinylpolypyrrolidone on pollen embryogenesis in *Datura innoxia*. *Plant Physiol.* 53: 405-406.
- Wang, Z. Y., L. D. Wang, M. J. Lee, C. T. Ho, M. T. Huang, A. H. Conney and C. S. Yang. 1995. Inhibition of N-nitromethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by green and black tea. *Carcinogenesis* 6(9): 2143-2148.