
碩士學位論文

차나무 잎 callus에서
caffeine과 catechin류의 함량 분석

濟州大學校 大學院



제주 生物學科양도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

吳 順 子

1997年 2月

**Contents of caffeine and catechins
from leaf callus of *Thea sinensis***

Soon-Ja Oh

(Supervised by professor In-Ok Heo)

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF NATURAL SCIENCE**



DEPARTMENT OF BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 2

차나무 잎 Callus에서 caffeine과 catechin류의 함량 분석

지도교수 : 허 인 옥

오 순 자

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함


1996年 12月

오순자의 이학 석사학위 논문을 인준함


심사위원장

高 頌 贊 

위 원

屠 文 洪 

위 원

郭 仁 五 

제주대학교 대학원

1997年 2月

차나무 잎 Callus에서 caffeine과 catechin류의 함량 분석

지도교수 : 허 인 옥


오 순 자

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함


1996年 12月

오순자의 이학 석사학위 논문을 인준함


심사위원장

高 頌 贊 

위 원

康 文 洪 

위 원

郭 仁 五 

제주대학교 대학원

1997年 2月

목 차

| | |
|-------------------------------------|-----|
| List of Tables | i |
| List of Figures | ii |
| Abstract | iii |
| Abbreviations | iv |
| I. 서 론 | 1 |
| II. 재료 및 방법 | 4 |
| 1. 실험 재료 | 4 |
| 2. 켈러스 배양 | 4 |
| 3. Caffeine과 catechin류의 함량 분석 | 6 |
| III. 결 과 | 9 |
| 1. 신초 배양을 통한 켈러스 유도 | 9 |
| 2. 켈러스의 증식 | 9 |
| 3. Caffeine 함량 | 18 |
| 4. Catechin류 함량 | 23 |
| IV. 고 찰 | 30 |
| V. 적 요 | 35 |
| VI. 참 고 문 헌 | 36 |

List of Tables

- Table 1. HPLC conditions for the analysis of caffeine
- Table 2. HPLC conditions for the analysis of catechins
- Table 3. Effects of NAA and BA on callus induction from *Thea sinensis* young leaf
- Table 4. Effect of auxins and cytokinins on growth of callus cultured in MS and mMS media
- Table 5. Effect of auxins and cytokinins on callus growth on the MS medium



List of Figures

- Fig. 1. Callus induction from young leaf of *Thea sinensis*.
- Fig. 2. Effect of MS and mMS media on growth and proliferation of *Thea sinensis* leaf callus.
- Fig. 3. Effect of thiamin-HCl and PVP on growth of callus cultured in media with hormone for 4 weeks.
- Fig. 4. 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.
- Fig. 5. Change of caffeine content in young leaf from May to August.
- Fig. 6. Caffeine content of callus cultured in MS and mMS media with various concentrations of thiamin-HCl and PVP.
- Fig. 7. Caffeine content of callus cultured in MS medium with various concentrations of taxifolin and quercetin.
- Fig. 8. Change of content of catechins in young leaf from May to August.
- Fig. 9. Catechin contents of callus cultured in MS and mMS media with various concentration of thiamin-HCl or PVP.
- Fig. 10. Catechin contents of callus cultured in MS medium with various concentrations of taxifolin and quercetin.

Abstract

This study aimed to measure the growth of callus cultured under MS and mMS media, growth regulators, thiamin-HCl as a vitamine, PVP as the antioxidant, taxifolin and quercetin as precursors of catechins and to select the clone producing caffeine and 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 the induced callus was cultured in MS and mMS media with various growth regulators, the growth of callus was much greater in MS than in mMS and promoted in the medium with 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ. The growth of callus was great in the MS medium with 30 mg/L thiamin-HCl, whereas it was poor in the medium with PVP. Particularly the growth of callus increased 2~3 times in 1 mM taxifolin and 0.01 mM quercetin.

When components of callus were compared with those of young leaf, the caffeine content of young leaf was higher than that of cultured callus. 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.

Abbreviations

| | | |
|-------|---|--|
| BA | : | Benzyladenine |
| 2,4-D | : | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid |
| EC | : | (-)-Epicatechin |
| ECG | : | (-)-Epicatechingallate |
| EGC | : | (+)-Epigallocatechin |
| EGCG | : | (-)-Epigallocatechin-3-gallate |
| HPLC | : | High performance liquid chromatography |
| IBA | : | Indolebutyric acid |
| mMS | : | modified Murashige and Skoog |
| MS | : | Murashige and Skoog |
| NAA | : | Naphthaleneacetic acid |
| PVP | : | Polyvinylpyrrolidone |
| TDZ | : | Thidiazuron |
| THF | : | Tetrahydrofurane |

I. 서 론

차나무(*Thea sinensis* L.)는 동백나무과(Theaceae)에 속하는 상록관목으로서, 아시아를 중심으로 북위 40도와 남위 30도 사이의 넓은 지역에 걸쳐 광범위하게 분포되어 있다. 잎은 호생하고 피침상 긴 타원형이고 약간 내곡하는 둔한 톱니가 있으며 표면은 녹색이며 양면에 털이 없고 엽맥이 들어간다. 꽃은 백색으로 10~11월에 피고 1~3개가 액생하거나 또는 가지 끝에 달린다. 열매는 편구형이며 종자는 둥글며 외피가 굳다(이, 1982).

차나무는 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). 차나무 품종 중 중국 소엽종을 개량한 일본산인 야부끼다종은 증제녹차 만들기에 적합한 품종으로 온대성 기후에 알맞고 내한성이 강하여 대량으로 재배되고 있다(감, 1994).

차나무의 번식은 실생번식과 영양번식으로 나누어지는데(농촌진흥청, 1987), 실생번식의 경우에는 형질이 균일하지 않기 때문에 삼목에 의해서 번식을 하고 있으며, 삽수의 발근을 촉진하기 위해 발근 촉진물질, 특히 auxin 계열 물질인 IBA와 NAA 및 황화제 처리시 발근효과가 있음이 알려져 있다(Wu *et al.*, 1974; 허, 1986; Kim *et al.*, 1995). 현재 실생번식과 영양번식 등으로 인한 문제점을 해결하고 단기간에 묘목의 다량 증식을 위하여 조직배양기법을 이용하고 있는데 주로 배지선택과 생장조절물질 처리 등이 주요한 요인으로 제기되고 있다. 최근에는 thidiazuron(TDZ), polyvinylpyrrolidone(PVP), thiamin-HCl을 첨가해 재분화를 유도하고 있다. TDZ은 diphenylurea형의 cytokinin과 유사한 식물생장조절물질로 식물에 처리하면 에틸렌이 방출되어 잎의 노화를 촉진시키고, 조직배양시 배지에 첨가하면 캘러스의 생장을 증진시켜 기관분화를 유도하는 것으로 알려지고 있다. 뿐만 아니라 사과나무의 액아에서는 ABA의 길항물질로서 휴면

타과에 작용하며(Wang *et al.*, 1987) 고무나무에서는 기관분화에 BA나 zeatin보다 효과적이라고 알려지고 있다(Fiola *et al.*, 1990). 사과나무의 기관분화를 위한 실험에서도 신초유기에 효과적이었으며(Fasolo *et al.*, 1989) 목본, 초본 및 화훼식물의 기내 배양 배지에 첨가하면 신초증식 및 기관분화에도 효과가 있음이 알려지고 있다(Lee *et al.*, 1995). PVP는 산화방지제로 캘러스의 갈변방지와 재분화율을 향상시키기 위하여 사용되는데, *Cattleya*의 경정배양시 0.5~2%의 PVP 처리가 절편의 생존에 필수적이며(Walky, 1972) 절편 끝에서 나오는 자주색 물질의 발생은 0.01% PVP에 의해서 억제되었다고 한다(Stevenson *et al.*, 1980).

차나무의 성분은 catechin류, caffeine, 단백질, 아미노산, 전분, 섬유소, 펙틴 등과 엷록소, 플라보노이드 유도체, 안토시안 등의 식물 색소 그리고 지질, 무기질 등이 존재하고 있다. 이중 다른 식물에 비해 caffeine과 polyphenol인 catechin류의 함유량이 많은 것이 특징이다. Caffeine은 중추신경계, 심장, 신장에 작용해서 신경 흥분, 강심, 이노작용을 나타내는데, caffeine 함량과 기호도는 정의 상관관계가 있다고 보고되고 있다(신, 1985). Catechin류로는 (+)-catechin(C)과 (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG), (+)-epigallocatechin(EGC) 및 (-)-epicatechin gallate(ECG) 등 5가지 성분이 알려져 있으며(Ikegaya, 1985) 약리기작으로서 항암, 항종양, 혈중 콜레스테롤 억제작용 등을 나타내고 있다(David *et al.*, 1990; Ikeda *et al.*, 1991; Hara *et al.*, 1989). 차나무 성분에 대한 연구로는 녹차의 품질과 관계가 있는 차엽의 이화학적 성분(Kim *et al.*, 1979; Oh, 1988), caffeine의 분석(오, 1988; Horwitz, 1980), catechin류의 분석(Rah *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1992; So, 1993), 차엽의 품질에 영향을 주는 차류의 채취 시기별 화학 성분(김, 1977), 한국에 자생하고 있는 야생차의 성분에 대한 결과로써 전질소, 탄닌, 카페인(Eun *et al.*, 1985) 등에 관한 연구 등이 있다. 또한 catechin류의 임상의학적인 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), 항돌연변이작용(Kada, 1985), 항십이지장작용(Fujita *et al.*, 1989), 중추신경계 활성화 작용(Hayashi, 1990) 등에 대한 연구가 있다.

차나무과 식물중 관상용으로 많이 재배되고 있는 동백나무(*Camellia japonica*)에서는 조직배양에 의한 많은 연구가 이루어지고 있다(Pedroso *et al.*, 1993). 차나무는 줄기에서 캘러스 및 현탁 세포를 유도한 연구 보고(Bagratishevili *et al.*, 1979)와 자엽에서의 미세증식에 관한 연구(Arulpragassam *et al.*, 1986; Arulpragassam *et al.*, 1988; Kato, 1985, 1986; Seneviratne *et al.*, 1988), 그리고 액아를 coconut milk, yeast extract, vitamine 등을 첨가해서 변형시킨 MS 배지에서 기관 분화를 유도한 연구(Beena *et al.*, 1992) 등이 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 실생 묘나 삽목 등의 번식에 의존하고 있는 차나무의 신초를 이용하여 배양조건에 따른 캘러스의 성장량을 조사하여 대량증식의 기법을 확립하고 배양한 캘러스에서 주성분인 caffeine과 catechin류 등의 함량을 분석하여 생산성이 높은 배양조건을 찾고자 실시하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

제주대학교 부속농장에 식재되어 있는 차나무(품종명:Yabukita) 신초를 채취하여, 중성세제로 20분간 씻고, 35℃ 항온수조에서 2 시간 동안 증탕 가열한 후 70%(v/v) 에탄올에서 10분간 침적해서 1 차 표면살균한 다음, tween 2~3방울이 첨가된 1% 차아염소산 나트륨에서 15분간 2 차 표면살균 시켜 멸균수로 4~5 회 수세한 다음 본 실험의 재료로 이용하였다.

2. 캘러스 배양

1) 캘러스의 유도

캘러스를 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 처리하였으며, 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) 배지의 효율성 검정

캘러스 유도조건에서 0.5 mg/L NAA, 1 mg/L BA와 5 mg/L thiamin-HCl 이 처리된 MS 배지에서 유도된 캘러스를 동일조건에서 다량으로 증식 시킨 후, 캘러스의 배양에 적합한 배지를 구명하기 위해서 MS 배지와 MS 배지에 1 g/L myo-inositol, 450 mg/L glutamine, 500 mg/L casein hydrolysate를

첨가한 MS 개량배지를 대상으로 0~1.0 mg/L NAA, 2,4-D, BA와 TDZ이 여러 농도로 처리되어진 배지에 일정한 크기의 켈러스를 치상하여 40 일간 배양한 후 켈러스의 증식정도를 관찰하였다. 배양조건은 25±2℃, 4,000 lux, 16/8(명/암) 시간의 광주기로 하였다.

3) 성장조절물질의 처리

MS 기본배지에 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 켈러스 성장을 알아보기 위하여, 0~1.0 mg/L auxin류(NAA, 2,4-D, IBA)와 0.5~4.0 mg/L cytokinin류(BA, TDZ)가 조합 처리되어진 배지에 증식된 켈러스를 일정한 크기로 잘라 10 ml 배지가 들어있는 시험관에 치상하여 40 일간 배양한 후, 각각의 성장조절물질에 의한 켈러스 증식정도를 관찰하였다.

4) Thiamin-HCl과 PVP의 처리

Thiamin-HCl과 PVP가 켈러스의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 켈러스 성장에 양호한 호르몬 배지, 즉 MS 배지(0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ, 4 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA)와 mMS 배지(0.2mg/L 2,4-D and 1mg/L TDZ, 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA)에 thiamin-HCl, PVP를 각각 농도별로 처리한 후, 0.2 g의 켈러스를 10 ml 배지가 들어있는 시험관에 치상하여 4주 동안 배양하여 켈러스의 성장을 측정하였다.

5) Taxifolin과 quercetin의 처리

Catechin 합성의 전구물질인 taxifolin과 quercetin이 켈러스의 성장에 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 처리하여, 0.2 g의 켈러스를 10 ml 배지가 들어있는 시험관에 치상하여 4주 동안 배양한 후, 켈러스의 성장을 측정하였다.

3. Caffeine과 catechin류의 함량 분석

1) 실험재료

Thiamin-HCl, PVP, taxifolin과 quercetin이 처리된 배지에서 자란 켈러스의 caffeine과 catechin류의 함량을 알아보기 위해, thiamin-HCl과 PVP는 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 MS 배지와 mMS 배지에서 4주간 배양한 켈러스를 사용하였고, taxifolin과 quercetin은 thiamin-HCl과 PVP 농도별 처리시 생장이 가장 양호했던 4 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA와 100 mg/L PVP 가 처리된 MS 배지에서 4주간 배양한 켈러스를 사용하였다. 대조구로서는 조직배양에 사용했던 차나무 신탄 즉, 5~8월의 월별 신탄를 채취하여 사용하였다. 각각의 켈러스와 신탄는 80℃의 건조기에서 20시간 건조시켜 분쇄한 후 분석재료로 사용하였다.

2) 표준용액 조제

Caffeine은 10 mg을 정량하여 100 ml HPLC용 증류수로 녹여 표준용액으로 사용하였다. Catechin류의 표준용액은 (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(ECG), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)은 5 mg을 10 ml ethyl acetate로, (+)-epigallocatechin(ECG)은 5 mg을 50 ml ethyl acetate로 녹여 사용하였다. 표준품인 caffeine, (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechingallate(ECG), (+)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)는 Sigma회사 제품을 사용하였다. 용매인 acetonitrile, N, N-dimethyl formamide, ethyl acetate, tetrahydrofurane(THF)은 Sigma회사의 HPLC용을 사용하였으며, 전처리 과정에 사용된 시약은 특급시약을 사용하였다.

3) Caffeine과 catechin류의 분석

3-1) 분석 방법

Caffeine과 catechin류의 분석을 위한 전처리 과정은 Ikegaya 등(1985)의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 caffeine은 분쇄한 시료 100 mg을 시험관에

넣고 10 ml 증류수를 가한 다음 80℃ 항온 수조에서 50~60분간 가온 추출하여 TOYO 여과지로 여과한 추출액을 분액깔대기에 넣고 chloroform 20 ml를 넣어 잘 흔들었다. 이 과정을 3회 반복한 후, 이중 상층액을 따로 모아두고, chloroform층은 45℃로 조정된 항온수조에서 감압농축한 후, 3 ml HPLC용 증류수를 첨가하여 녹인 다음 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 분석용 재료로 사용하였다. Catechin류는 caffeine 추출과정에서 모아둔 상층액을 분액깔대기에 넣고 ethyl acetate 20 ml를 넣어 추출하였다. 이 조작 역시 3회 반복한 후 ethyl acetate층을 60℃로 조정된 항온수조에서 감압농축한 후 다시 3 ml HPLC용 ethyl acetate를 첨가하여 녹인 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

3-2) 분석 조건

HPLC를 이용한 caffeine 분석조건(Table 1)을 보면, 주입기는 model 441, 펌프는 model 590, 검출기는 UV absorbance를 사용하였다. Catechin류의 분석은 Ikegaya(1985) 방법에서 이동상을 달리한 2가지 방법을 병행하여 EGC, EC, EGCG, ECG 등을 분석하였다. 분석조건을 보면 검출기는 UV absorbance를 사용했으며, 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈를 사용하였다(Table 2). HPLC를 통한 caffeine과 catechin류 분석시, caffeine은 3.5분대에서 검출되었고, catechin류는 method(I)에서 ECG가 23분, method(II)에서 EGC, EC, EGCG가 각각 10, 11.5, 16분대에서 검출되었다.

Table 1. HPLC conditions for the analysis of caffeine

| Item | Condition |
|------------------|----------------------------|
| Column | ODS(14 cm x 0.5 cm) column |
| Mobile phase | 70% Methanol |
| Flow rate | 1 ml/min |
| Sensitivity | 0.2 |
| Wavelength | 254 nm |
| Chart speed | 0.5 cm/min |
| Injection volume | 10 μ l |

Table 2. HPLC conditions for the analysis of catechins

| Item | Method(I) | Method(II) |
|------------------|---|---------------------------------|
| Column | μ -Bondapak C ₁₈ | μ -Bondapak C ₁₈ |
| 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 μ l | 10 μ l |

*: Tetrahydrofuran.

III. 결 과

1. 신허 배양을 통한 켈러스의 유도

신허를 채취하여 5 mg/L thiamin-HCl이 첨가된 MS 배지에 NAA와 BA의 농도를 달리하여 배양한 결과는 Table 3, Fig. 1과 같다. 켈러스의 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 켈러스 분화가 잘 나타나지 않았으며, 5 mg/L NAA 단일 처리에서는 뿌리 분화가 나타났다.

2. 켈러스의 증식

1) 배지의 영향

배지에 따른 켈러스의 생장 상태를 보기 위하여 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA 조합에서 증식시킨 켈러스를 MS 배지와 mMS 배지를 대상으로 NAA와 BA, 2,4-D와 TDZ의 농도별 조합에 일정한 크기의 켈러스를 배양한 결과는 Table 4, Fig. 2와 같다.

NAA와 BA의 농도에 따른 MS 배지와 mMS 배지에서의 켈러스 생장을 보면, 먼저 MS 배지에서는 1 mg/L NAA와 0~1 mg/L BA 조합에서 생장이 양호하여 켈러스의 크기가 처음 치상보다 3~4 배 증가하였다. BA 단독 처리에서는 켈러스의 생장이 저조합을 보였다. mMS 배지에서는 NAA농도에 상관없이 BA 0.5 mg/L 처리구에서 생장이 양호하였는데 그중에서도 1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 조합에서는 4~5 배 증가하는 등 가장 왕성한 생장을 보였다. 그리고 생장조절물질을 처리하지 않은 배지에 배양된 켈러스는 생장이 불량하였고 나중에는 갈변하였다. 2,4-D와 TDZ의 농도별

Table 3. 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 | - |

- : nonresponse, C; callus, R; root.

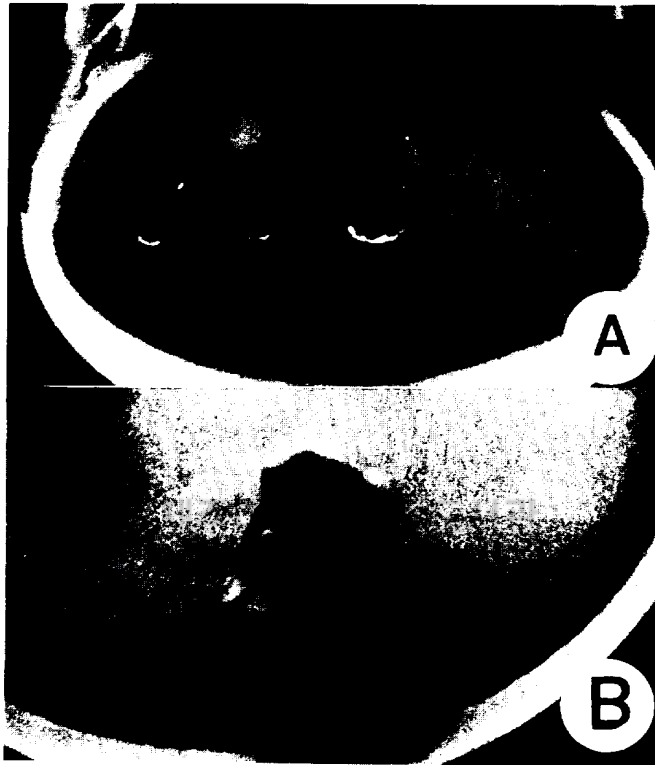


Fig. 1. Callus induction from young leaf of *Thea sinensis*.

A: 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA,

B: 5 mg/L NAA

Arrow indicates roots.

Table 4. Effect of auxins and cytokinins on growth of callus cultured in MS and mMS media

| Growth regulators(mg/L) | | | Media | |
|-------------------------|------------|-----|-------|------|
| Auxins | Cytokinins | | MS | mMS |
| Control | | | + | + |
| NAA 0 | BA | 0.5 | + | ++ |
| | | 1 | + | ++ |
| | | 0 | + | ++ |
| 0.5 | | 0.5 | ++ | +++ |
| | | 1 | ++ | +++ |
| | | 0 | +++ | ++ |
| 1 | | 0.5 | +++ | ++++ |
| | | 1 | +++ | ++ |
| | | 0 | +++ | ++ |
| 2,4-D 0 | TDZ | 0.5 | + | ++ |
| | | 1 | + | ++ |
| | | 0 | + | ++ |
| 0.2 | | 0.5 | ++ | ++ |
| | | 1 | ++++ | ++++ |
| | | 0 | + | + |
| 1 | | 0.5 | ++ | + |
| | | 1 | + | + |

+: poor, ++: moderate, +++: good, ++++: excellent.

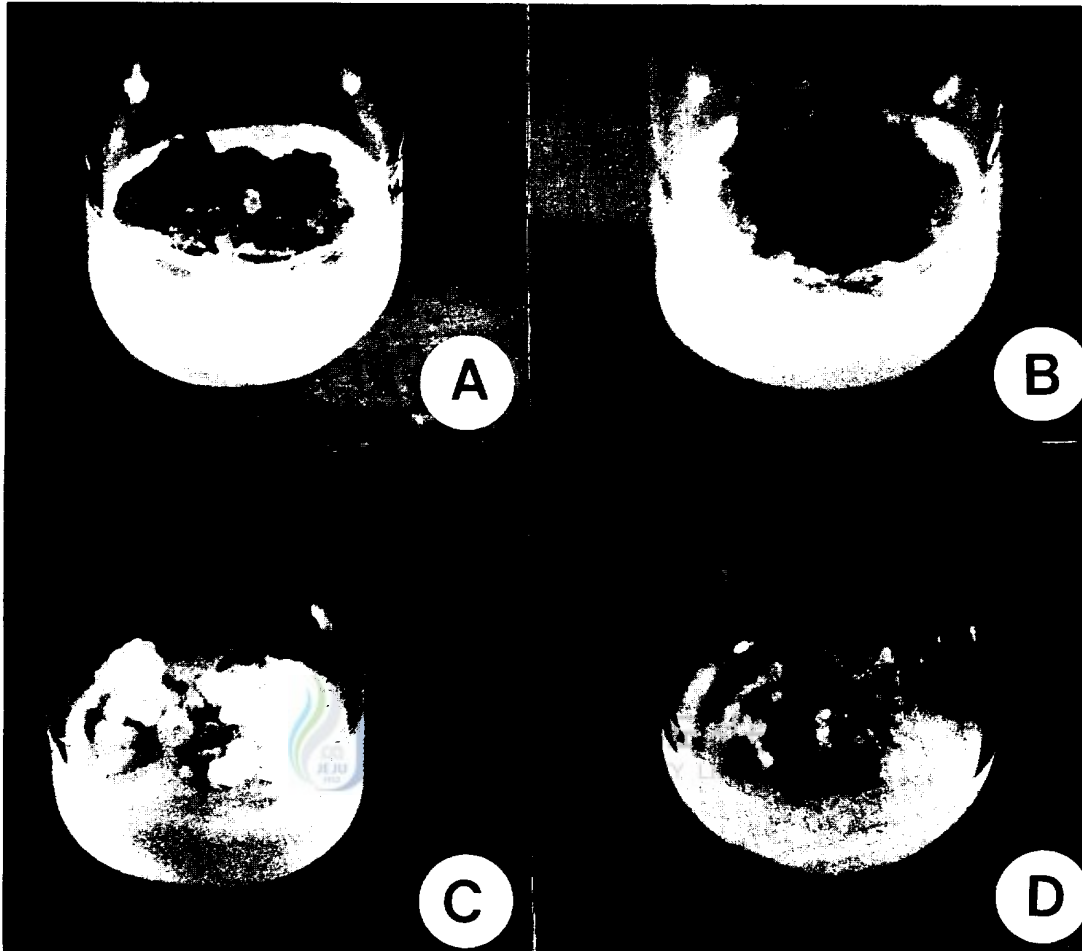


Fig. 2. Effect of MS and mMS media on growth and proliferation of *Thea sinensis* leaf callus.

A: MS medium with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA

B: mMS medium with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA

C: MS medium with 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ

D: mMS medium with 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ

처리시 MS 배지와 mMS 배지에서의 캘러스의 생장을 보면 MS, mMS 배지 둘 다 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합에서 4~5 배 증가하는 경향을 보였다. 그러나, TDZ 단용처리구인 MS 배지, 1 mg/L 2,4-D와 TDZ 조합 처리구인 mMS 배지에서는 캘러스의 생장이 저조 하였다. MS와 mMS 배지 모두 캘러스 증식에 효과적이었는데 특히 mMS 배지에서 생장이 양호하였다. 그러나 MS 배지에서 증식된 캘러스는 녹색 혹은 연두색의 색상을 띄는데 반해, mMS 배지에서는 붉은색의 색상을 나타냈다.

2) 성장조절물질의 영향

캘러스의 생장에 적합한 성장조절물질의 종류와 농도를 결정하기 위하여 MS 배지에 auxin류(NAA, 2,4-D, IBA)와 cytokinin류(TDZ, BA)를 단일 및 조합 처리하여 배양하였다(Table 5). NAA, 2,4-D, IBA를 처리했을 때 고농도 처리구보다 저농도에서 캘러스 생장이 양호하였다. 특히, 0.2 mg/L NAA와 2,4-D, 0.5 mg/L IBA 처리시 대조구에 비해 2~3 배의 생장을 보였는데 NAA, 2,4-D보다 IBA가 더 효과적이었다. 한편, IBA와 BA를 처리한 경우는 NAA와 TDZ, 2,4-D와 BA를 처리했을 때보다 캘러스 증식에 효과적이었다. 특히, 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA 처리구에서 처음 치상보다 4~5 배 이상의 생장을 보였다. 그리고 NAA와 TDZ, 2,4-D와 BA가 처리된 배지에서 배양된 캘러스는 배양 10일 후부터 급격히 갈변하는 양상을 보였다. IBA와 BA 조합 처리구에서는 IBA의 농도에 상관없이 4 mg/L BA 처리구에서 캘러스 증식이 잘 되었다.

3) 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)배지와 mMS(0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA)배지에 thiamin-HCl과 PVP를 농도별로 처리하여 4주간 배양한 후 생장을 조사하였다(Fig. 3).

먼저 thiamin-HCl 농도에 따른 캘러스의 생장을 보면(Fig. 3A), 0.2 mg/L

Table 5. Effect of auxins and cytokinins on callus growth on the MS medium

| Growth regulators(mg/L) | | | | Growth |
|-------------------------|-----|------------|-----|--------|
| Auxins | | Cytokinins | | |
| Control | | | | + |
| NAA | 0 | TDZ | 0.5 | ++ |
| | | | 1 | ++ |
| | 0.2 | | 0 | + |
| | | | 0.5 | ++ |
| | 1 | | 1 | ++ |
| | | | 0 | + |
| 2,4-D | 0 | BA | 0.5 | + |
| | | | 1 | + |
| | 0.2 | | 0.5 | ++ |
| | | | 1 | + |
| | 1 | | 0.5 | ++ |
| | | | 1 | + |
| IBA | 0 | | 0.5 | + |
| | | | 1 | ++ |
| | 0.5 | | 4 | +++ |
| | | | 0.5 | + |
| | 1 | | 1 | ++ |
| | | | 4 | ++++ |
| 1 | | 0.5 | + | |
| | | 1 | ++ | |
| | | 4 | +++ | |

.+: poor, ++: moderate, +++: good, ++++: excellent.

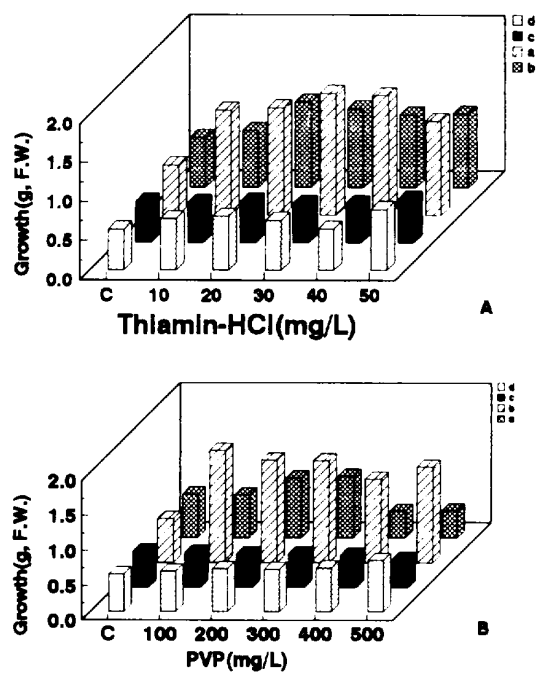


Fig. 3. Effect of thiamin-HCl and PVP on growth of callus cultured in media with hormone for 4 weeks (Initial in oculum: 0.2 g).

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,
- c) mMS with 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ,
- d) mMS with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA

2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 MS 배지에서는 대조구에 비해 thiamin-HCl 처리시 생장이 증가했는데, 특히 20 mg/L thiamin-HCl 처리시 1.10 g으로 대조구에 비해 2 배의 성장을 보였고 그 이상의 농도처리시에는 약간 감소하는 경향이 있지만 대조구에 비하면 thiamin-HCl을 처리하는 것이 켈러스의 성장을 증가시켰다(Fig. 3A-a). 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA가 처리된 MS 배지에서는 대조구에 비해 thiamin-HCl 처리시 2 배 이상의 성장을 보였다. 특히 30 mg/L thiamin-HCl 처리시 1.57 g으로 대조구에 비해 3 배 이상의 성장을 보였다(Fig. 3A-b). 2,4-D와 TDZ, IBA와 BA가 처리된 MS 배지에 thiamin-HCl을 처리했을 때 켈러스의 생장은 IBA와 BA 조합 처리구에서 양호한 결과를 보였다. 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 mMS 배지에 thiamin-HCl을 농도별로 처리한 경우(Fig. 3A-c) 대조구에 비해 켈러스 생장에 있어서 별 효과를 보지 못했으며, 1mg/L NAA와 0.5 mg/L BA에 thiamin-HCl을 농도별로 처리한 경우는 대조구보다 약간 증가하였으나 별 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3A-d). 비타민의 일종인 thiamin-HCl을 농도별로 처리했을 때의 켈러스 성장양상을 보면 대조구에 비해 농도별(0~50 mg/L)로 처리했을 때 생장이 좋았으며, 또한 mMS 배지보다 MS 배지에서, 특히 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA, 30 mg/L thiamin-HCl를 처리하여 배양했을 때 켈러스 생장이 가장 높음을 알 수 있었다.

PVP의 농도에 따른 켈러스 성장을 보면(Fig. 3B), 먼저 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ를 조합 처리한 MS 배지에서 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. 3B-a). 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA를 조합한 MS 배지에서는 대조구에 비해 PVP 처리시 켈러스 생장이 증가하였는데, 100 mg/L PVP 처리시 1.54 g으로 대조구에 비해 생장이 3 배 이상 증가했으며, 100 mg/L PVP를 기점으로 그 이상의 농도에서는 감소하였다. 그러나, 대조구에 비하면 PVP를 처리하는 것이 켈러스의 성장을 증가시켰다(Fig. 3B-b). PVP가 처리된 MS 배지에서는 2,4-D와 TDZ보다는 IBA와 BA 조합 처리된 배지에서 켈러스 생장이 양호하였다. 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L

TDZ로 처리된 mMS 배지에서는 PVP 처리시 대조구에 비해 생장이 저조하였다(Fig. 3B-c). 1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA로 조성된 mMS 배지에서 PVP 농도별 생장을 보면 대조구에 비해 약간 증가하였으나 대체적으로 저조함을 보였다(Fig. 3B-d). PVP 농도에 따른 켈러스의 생장은 MS 배지에서는 호르몬의 조성에 상관없이 PVP 처리시 생장이 양호한데 반해 mMS 배지에서는 PVP 처리시 생장이 저조함을 보였다. Thiamin-HCl, PVP의 농도별 처리시 MS 배지가 mMS보다 켈러스 생장이 3~4 배 정도 효과적이었는데, 특히 4 mg/L BA, 0.5 mg/L IBA, 100 mg/L PVP가 처리된 MS 배지가 가장 생장이 좋았다.

4) 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. 4).

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 이후의 농도에서 생장은 점차 감소하는 경향을 보였다. Taxifolin과 quercetin을 농도별로 처리 했을때 켈러스의 생장은 고농도보다 저농도로 처리했을때 대조구에 비해 2~3 배의 생장을 보였다.

3. Caffeine 함량

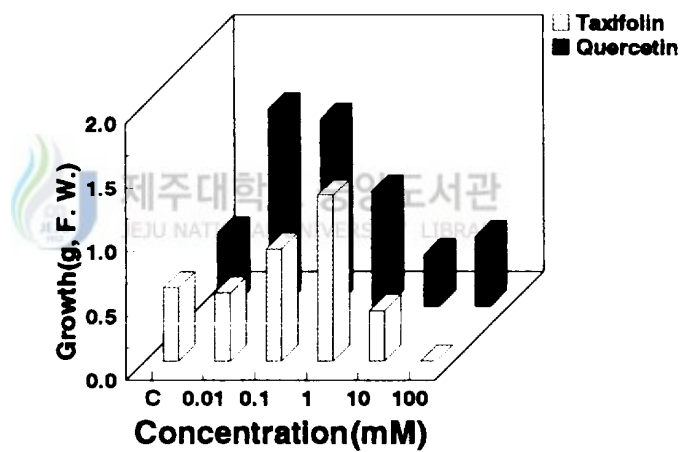


Fig. 4. Effect of taxifolin and quercetin on growth of callus cultured in MS medium with 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA and 100 mg/L PVP for 4 weeks.

1) 신초의 caffeine 함량

차나무 신초와 배양조건을 달리한 켈러스의 caffeine 함량을 비교하고자 5월부터 8월 동안에 채취한 신초의 caffeine 함량을 분석하였다(Fig. 5). Caffeine 함량은 5~7월 동안 14.73 mg/g에서 7.31 mg/g으로 감소하다가 8월에 16.92 mg/g으로 높은 함량을 보였다.

2) 배지별 thiamin-HCl과 PVP의 효과

Thiamin-HCl과 PVP의 농도별에 따른 켈러스의 caffeine 함량을 분석하였다(Fig. 6). 먼저 thiamin-HCl의 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합의 MS 배지와 mMS 배지에서 배양한 켈러스의 caffeine 함량을 살펴보았다(Fig. 6A). MS 배지에서는 40 mg/L 농도까지는 1.39 mg/g으로 무처리구보다 2 배 가량 증가하다가 50 mg/L 농도에서는 1.15 mg/g으로 감소하였고, 40 mg/L 처리시 함량이 높았으며, 무처리구와 비교했을 때 10 mg/L 처리에는 caffeine 함량이 0.64 mg/g으로 낮게 나타났다. 변형한 MS 배지에서는 30 mg/L 농도까지는 점차 증가하다가 40 mg/L 농도에서는 감소하는 경향을 보였으며 30 mg/L 처리시 1.15 mg/g으로 높았으나, 무처리구와 비교했을 때 thiamin-HCl 처리구는 모두 낮게 나타났다. MS 배지와 mMS 배지에서의 thiamin-HCl 처리에 따른 caffeine 함량을 비교해보면 MS 배지보다는 mMS 배지에서 thiamin-HCl의 농도에 관계없이 caffeine 함량은 낮게 검출되었다.

PVP의 농도에 따른 caffeine 함량을 살펴보았다(Fig. 6B). 먼저 PVP 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합의 MS 배지와 mMS 배지에서 배양한 켈러스의 caffeine 함량을 살펴보면 MS 배지에서는 300 mg/L PVP 처리시 함량이 1.32 mg/g으로 무처리구보다 2 배 가량 높게 나타났으며, 400 mg/L 이상의 처리구에서는 무처리구의 절반으로 낮게 나타났다. mMS 배지에서는 무처리구에서 함량이 1.37 mg/g인데 반해 PVP 처리시에는 대부분이 2~3 배 낮게 나타났다. MS 배지와 mMS 배지에서의 PVP 처리시 caffeine 함량을 비교해보면 MS 배지보다는 mMS 배지에서 caffeine 함량은 낮게 검출되었다.

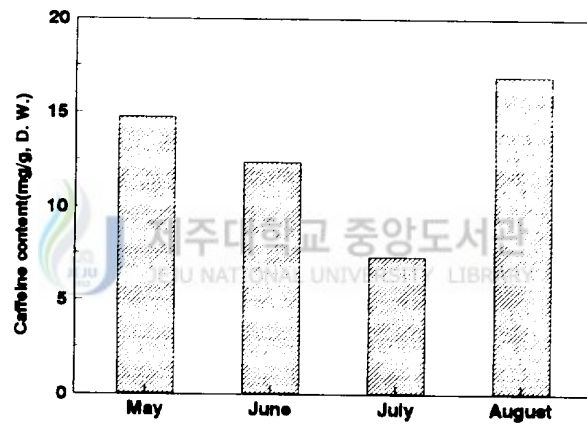


Fig. 5. Change of caffeine content in young leaf from May to August.

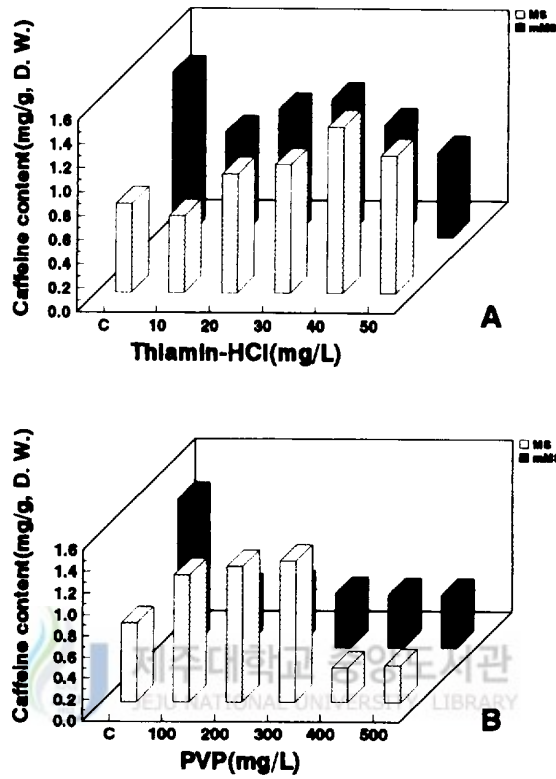


Fig. 6. Caffeine content of callus cultured in MS and mMS media with various concentrations of thiamin-HCl and PVP. Each media were treated with 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ.

A: MS and mMS media with Thiamine-HCl,

B: MS and mMS media with PVP

3) 배지별 taxifolin과 quercetin의 효과

Taxifolin과 quercetin의 농도에 따른 켈러스의 caffeine 함량을 보면 (Fig. 7), 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA, 100 mg/L PVP가 조합된 MS 배지에 taxifolin의 농도별 caffeine 함량은 1 mM taxifolin 처리시 2.51 mg/g으로 나타났으며, 0.01 mM과 10 mM에서는 무처리구보다 낮게 나타났다. Quercetin의 농도별 caffeine 함량을 보면 무처리구에서 2.32 mg/g으로 높았으며 quercetin 처리시 caffeine 함량이 낮게 나타났는데 특히 10 mM이상의 농도에서는 4 배 이하로 낮게 검출되었다.

4. Catechin류 함량

1) 신초의 catechin류 함량

차나무 신초와 배양조건을 달리한 켈러스의 catechin류 함량을 비교하고자 5월에서 8월동안에 채취한 신초의 catechin류 함량을 분석하였다(Fig. 8). 신초에서의 catechin류는 월별에 관계없이 EGC, EGCG, ECG 등 3가지 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.

2) 배지별 thiamin-HCl과 PVP의 효과

Thiamin-HCl과 PVP의 농도별에 따른 켈러스의 catechin류의 함량을 분석하였다(Fig. 9). 먼저 thiamin-HCl의 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1mg/L TDZ 조합의 MS 배지와 mMS 배지에서 배양한 켈러스의 catechin류의 함량을 살펴보면(Fig. 9A, B), MS 배지에서 thiamin-HCl이 처리되지 않은 무

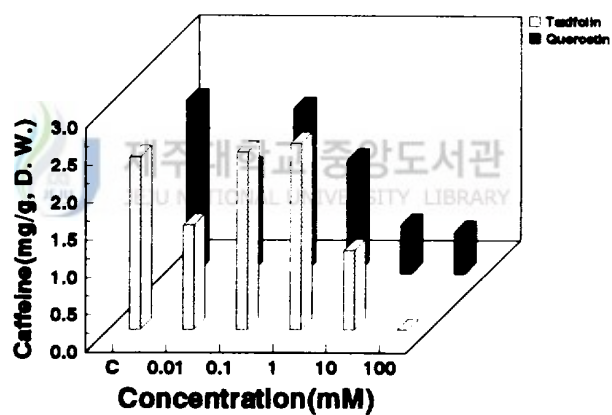


Fig. 7. Caffeine content of callus cultured in MS medium with various concentrations of taxifolin and quercetin. Each medium were supplied with 0.5 $\mu\text{g/L}$ IBA, 4 $\mu\text{g/L}$ BA and 100 $\mu\text{g/L}$ PVP.

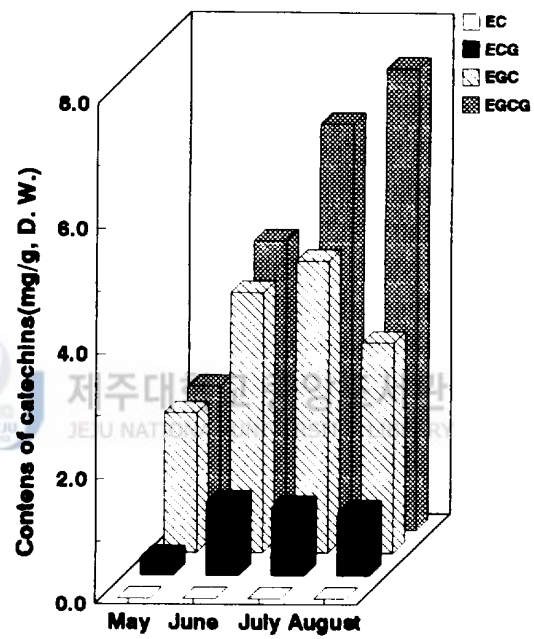


Fig. 8. Change of content of catechins in young leaf from May to August.

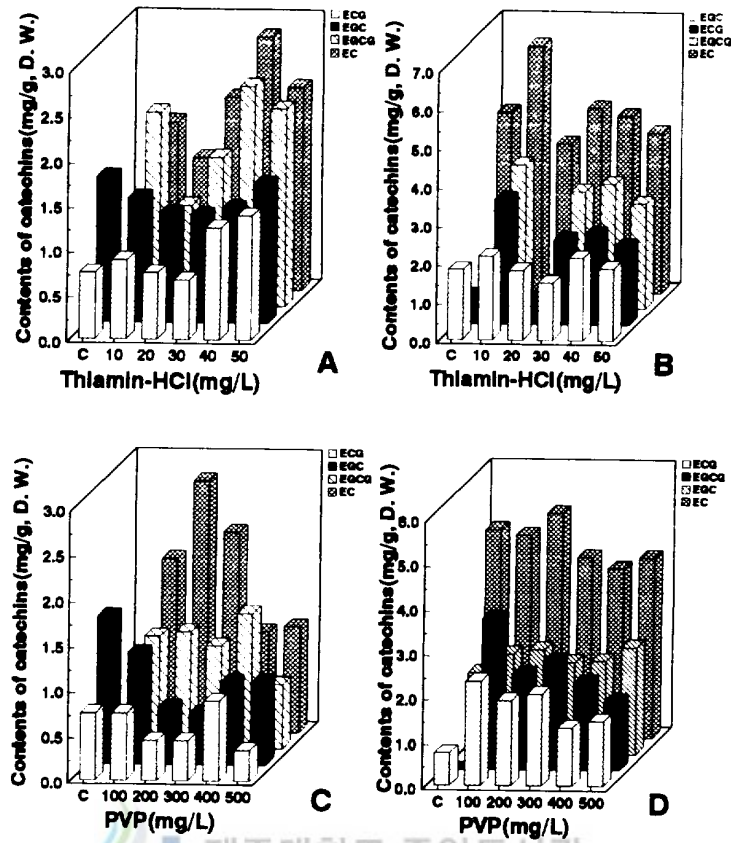


Fig. 9. Catechin contents of callus cultured in MS and mMS media with various concentration of thiamin-HCl or PVP. Each media were treated 0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg /L TDZ.

- A: MS medium with thiamin-HCl,
- B: mMS medium with thiamin-HCl,
- C: MS medium with PVP,
- D: mMS medium with PVP

처리구에서는 EGC, EGCG, ECG 등 3가지 종류의 catechin류만이 검출되고 EC는 검출되지 않았다. Thiamin-HCl를 처리한 경우에는 농도에 관계없이 4가지 성분 모두 검출되었다. 먼저 EGC는 30 mg/L까지는 1.21 mg으로 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. 9A). 변형한 MS 배지에서의 catechin류 함량을 보면 thiamin-HCl 무처리구에서는 EGCG가 검출되지 않았다. 그러나 thiamin-HCl 처리구에서는 농도에 관계없이 4가지 성분 모두 검출되었다. EGC, EC, EGCG, ECG 성분 모두 10 mg/L thiamin-HCl 처리구에서 다른 처리구에 비해 가장 함량이 높았으며 각각 2.17, 6.39, 3.74, 3.24 mg/g이며, 총 catechin은 15.54 mg/g, EGCG+ECG는 6.98 mg/g의 함량을 보였다(Fig. 9B). MS 배지와 mMS 배지에서의 thiamin-HCl 처리에 따른 catechin류 함량을 비교해 보면 MS 배지보다는 mMS 배지에서 thiamin-HCl의 농도에 관계없이 catechin류 함량은 높게 검출되었다.

PVP 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합의 MS 배지와 mMS 배지에서 배양한 켈리스의 catechin류 함량을 살펴보았다(Fig. 9C, D). MS 배지에서 PVP의 무처리구에서는 EC가 검출되지 않았으며 mMS 배지에서는 EGCG가 검출되지 않았다. MS 배지에서의 catechin류 함량은 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(Fig. 9C). mMS 배지에서는 catechin류 함량이 PVP 농도에 따라 크게 차이가 나타나지 않았으며, EGC는 500 mg/L, EC는 200 mg/L, EGCG와 ECG는 100 mg/L의 농도하에서 각각 2.40, 5.04, 3.10, 2.35 mg/g으로 높게 나타났다. 총 catechin 함량과 EGCG+ECG 함량은 100 mg/L 처리시 각각 12.24 mg/g, 5.45 mg/g으로 그 함량이 높게 나타났다(Fig.

9D). MS 배지와 mMS 배지에서 PVP 처리시 catechin류 함량을 비교해보면 MS 배지보다는 mMS 배지에서 PVP의 농도에 상관없이 catechin류 함량은 높게 검출되었다.

3) 배지별 taxifolin과 quercetin의 효과

Taxifolin과 quercetin의 농도에 따른 켈러스의 catechin류 함량을 보면 (Fig. 10), 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA, 100 mg/L PVP가 조합된 MS 배지에 taxifolin의 농도별 catechin류 함량은 taxifolin 무처리구에서는 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. ECG 성분은 10 mM의 taxifolin 처리구에서만 12.65 mg/g으로 높게 나타났고, 총 catechin은 23.47 mg/g, EGCG+ECG의 함량은 14.81 mg/g이었다(Fig. 10-A).

Quercetin의 농도별 처리에 따른 catechin류를 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/g 으로 나타났다(Fig. 10-B).

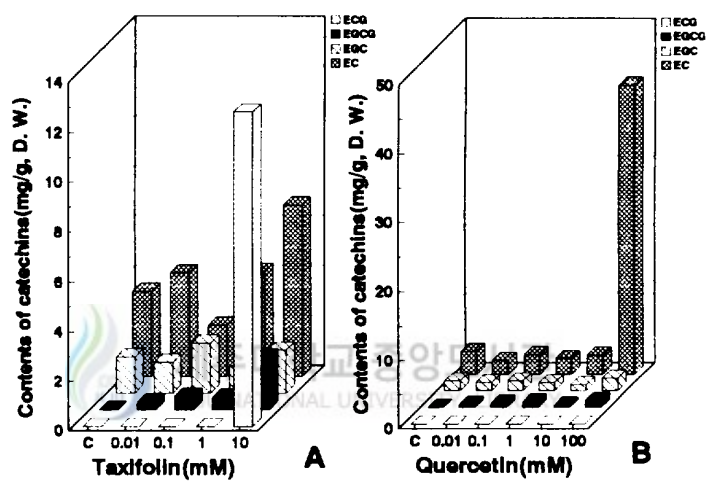


Fig. 10. Catechin contents of callus cultured in MS medium with various concentrations of taxifolin and quercetin. Each medium were 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA and 100 mg/L PVP.

A: taxifolin,

B: quercetin

IV. 고 찰

차나무 싹초에서 NAA와 BA를 단일 또는 조합 처리하여 캘러스를 유도시킨 결과 단일 처리했을 때 보다 조합 처리구에서 더 잘 유도되었다. 차나무 경정을 이용하여 캘러스와 현탁 세포의 유도 및 자엽에서 유도된 캘러스의 미세증식된 보고와는 비슷한 결과를 보였다(Bagratishevili *et al.*, 1979; Seneviratne *et al.*, 1988). 그리고 같은 과인 동백나무의 잎에서 부위별에 따른 배양시 호르몬의 영향이 기관형성과 체세포 발생에 매우 효과적이었다는 보고와는 다른 결과를 보였다(Vieitez *et al.*, 1990; Pedrosa *et al.*, 1993).

차나무 싹초에서 유도된 캘러스를 가지고 증식과 생장에 미치는 영향을 구명하고자 배지와 성장조절물질을 달리하여 배양하였을 때 MS 배지에서는 대체로 녹색 또는 연두색을, mMS 배지에서는 붉은 계통의 캘러스로 증식되었다. 이와같이 mMS 배지에서 배양된 캘러스의 색깔이 붉은색으로 나타나는 것은 목본류의 대표적인 특징으로 페놀 화합물 또는 anthraquinon류의 색소가 캘러스가 성장함에 따라 2차 산물로 세포내에 축적된 결과라고 생각된다. 성장조절물질로는 식물체의 기관분화에 미치는 가장 결정적인 auxin류(NAA, 2,4-D, IBA)와 cytokinin류(BA, TDZ)를 이용하여 캘러스의 증식과 생장을 측정하였다. 캘러스의 생장은 auxin류와 cytokinin류가 저농도에서 효과적이었으며, 고농도로 갈수록 억제되는 경향이 나타났다. 특히 1 mg/L NAA와 0.2 mg/L 2,4-D가 처리된 배지에서 양호하였다. BA와 TDZ에서의 생장은 BA 저농도, TDZ 고농도에서 왕성하였고 단일 처리구보다는 조합 처리구에서 양호하였다. 이는 두릅나무의 엽병조직을 이용한 배발생 캘러스의 유도 및 체세포배 발생에 2,4-D와 TDZ를 조합했을 때 캘러스 유도가 가장 양호하였다는 보고와 일치하였으며(Jhang *et al.*, 1994), *Pecan*의 자엽과 배축으로부터 캘러스 유도에 촉진적인 역할을 하고(Obeidy *et al.*, 1993), 같은 차나무과에 속하는 노각나무에서도 NAA와 2,4-D를 TDZ와 조합한 처리구에서 캘러스 발생이 가장 왕성하였다는 보고와도 일치하였다(Choi *et*

al., 1995). 켈러스 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)배지와 mMS(0.2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA)배지에 thiamin-HCl과 PVP를 농도별로 처리하여 4주간 배양한 후 생장을 조사하였는데, 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. mMS 배지를 기본으로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 배지에 thiamin-HCl을 농도별로 처리한 경우는 대조구에 비해 켈러스 생장이 저조하였으며, 1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA가 처리된 배지에서는 대조구보다 약간 증가하였으나 별 차이를 나타내지 않았다. 이는 담배 켈러스에서 thiamin-HCl의 농도를 높였을 때 thiamin의 요구도가 증가하여 4 배의 생장을 보였으며, 장미의 경단배양시 thiamin-HCl 농도를 높였을 때 생장이 촉진된다는 결과와 일치하였으나(Linsmaier *et al.*, 1967; Hasegawa *et al.*, 1979, 1980), *Carrizo citrange*와 탱자나무(*Poncirus trifoliata*)의 경단배양에서 thiamin-HCl의 양을 증가시켰을 때 다경으로 분화된다는 결과와는 일치하지 않았다(Kitto *et al.*, 1981).

PVP의 농도에 따른 켈러스 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 증가했으며, mMS 배지에서는 호르몬의 종류와 PVP 농도에 관계없이 대조구에 비해 생장이 저조함을 보였다. 이는 온대산 *Cymbidium*의 경정배양시 활성탄과 PVP를 처리한 배지에서 생존율이 높았다는 보고와 일치하였으며(Choi *et al.*, 1996), *Datura inoxia*의 화분 배양에서 배형성과 켈러스 성장은 0.5% PVP를 처리했을 때 생장이 양호하다는 보고와 유사한 결과를 보였으나(Tyagi *et al.*, 1981), 티크나무(*Tectona grandis*)의 경단배양에서 0.7% PVP를 처리했을 때 다경의 형성과 풍년화(*Hammelis japonica*)의 경단배양에서 PVP가 생장억제물질로 작용한다는 결과와

*Datura metal*의 약 배양에서 2% PVP를 처리했을 때 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 성장을 억제하는 polyphenoloxidase의 활성이 억제되고 목본 식물에서 배양중에 생성되는 페놀 화합물등을 제거시킴으로써 켈러스의 증식이 양호한 결과로 나타나지 않았다고 생각되며, 묘조 형성을 유도하기 위해서는 여러가지의 성장조절물질과 유기물의 처리 등 많은 연구과정이 필요하다고 생각된다.

차나무 신초를 차나무 잎에서 유도된 켈러스의 caffeine 함량과 비교하고자 HPLC를 이용하여 분석한 결과 신초의 caffeine 함량은 켈러스에 비해 높은 함량을 보였다. Thiamin-HCl의 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합의 MS 배지와 mMS 배지에서 배양한 켈러스의 caffeine 함량을 살펴보면 MS 배지에서는 무처리구와 비교했을 때 10 mg/L 처리에는 caffeine 함량이 낮게 나타났으며, 변형한 MS 배지에서는 무처리구와 비교했을 때 thiamin-HCl 처리구는 모두 낮게 나타났다. PVP의 농도별로 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ 조합의 MS 배지와 mMS 배지에서 배양한 켈러스의 caffeine 함량을 살펴보면, MS 배지에서는 300 mg/L의 PVP하에서는 함량이 높은 반면에, 400 mg/L 이상에서는 무처리구보다 낮은 함량을 보였다. mMS 배지에서는 무처리구에 비해 PVP 처리시에는 대부분이 낮은 caffeine 함량을 보였다. 0.5 mg/L IBA, 4 mg/L BA, 100 mg/L PVP로 조합된 MS 배지에 taxifolin과 quercetin의 농도별 처리시의 증식된 켈러스의 caffeine 함량을 보면, 먼저 taxifolin 처리구에서 1 mM의 taxifolin 처리구를 제외한 나머지 농도에서는 낮게 검출되었다. Quercetin의 농도별 caffeine 함량은 대부분 quercetin 처리시 caffeine 함량이 낮게 나타났는데 특히, 10 mM이상의 농도에서는 4 배 이하로 낮게 검출되었다.

차나무 신초를 차나무 잎에서 유도된 켈러스의 catechin류 함량과 비교하고자 HPLC를 이용하여 분석한 결과 신초의 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 함량결정에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 생각된다. Thiamin-HCl과 PVP가 처리된 MS와 mMS 배지에서 catechin류는 무처리구에서 3가지의 catechine류 만이 검출된 반면에 thiamin-HCl를 처리한 경우에는 농도에 관계없이 4가지 성분 모두 검출되었다. 총 catechin과 EGCG와 ECG의 함량은 40 mg/L의 thiamin-HCl 처리에서 높았으며, 변형한 MS 배지에서 catechin류 함량은 EGC, EC, EGCG, ECG 성분 모두 10 mg/L의 thiamin-HCl 처리구에서 다른 처리구에 비해 가장 함량이 높게 검출되었다. PVP 처리구에서의 catechin류의 함량을 보면 MS 배지에서 PVP의 무처리구에서는 EC가 검출되지 않았으며, mMS 배지에서는 EGCG가 검출되지 않았다. MS 배지에서의 총 catechin 함량은 200 mg/L의 PVP 처리구에서, EGCG+ECG의 함량은 400 mg/L 처리구에서 가장 높게 나타났다. mMS 배지에서는 catechin류 함량이 PVP 농도에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며, 총 catechin과 EGCG+ECG 함량은 100 mg/L 처리시 함량이 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 EGCG함량은 증가하는 경향을 보였다. Quercetin의 처리구에서 catechin류의 검출양상은 무처리구에서는 EGC, EC이 검출되었고, 처리구에서는 EGC, EC, EGCG만이 검출되었다. EGC와 EGCG는 농도에 따라 함량에 큰 차이를 나타내지 않았으나 EC는 quercetin 100 mM 처리시 함량이 가장 높게 검출되었다. 일반적으로 MS와 mMS 배지에서의 thiamin-HCl과 PVP처리에 따른 caffeine과 catechin류의 함량을 비교해보면 MS 배지보다는 mMS 배지에서 thiamin-HCl과 PVP의 농도에 관계없이 caffeine 함량은 낮고 catechin류의 함량은 높은 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼때 신허에서의 catechin류는 EC를 제외한 나머지 성분, 즉 EGC, EGCG, ECG만이 검출되었지만 배양된 켈러스에서는 4가지 성분이 모두 검출되었다. 여러가지 조절물질과 생합성 전구물질을 처리

한 배지에서 배양된 켈러스는 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 켈러스에서 식물체로의 재분화 등은 앞으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

IV.적 요

본 연구는 차나무의 신초를 이용하여 기내에서 여러가지 배양조건에 따른 캘러스의 성장량을 조사하고, 차나무의 주성분인 caffeine과 catechin류 등을 분석하여 생산성이 높은 배양조건을 찾고자 실시하였다.

신초배양시 캘러스는 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA 조합 처리구에서 가장 잘 유도되었다. 이 조건에서 유도된 캘러스를 여러 농도의 auxin과 cytokinin을 처리한 MS 혹은 변형된 MS 배지에 배양한 결과 2개의 배지 모두 캘러스 증식이 잘 되었다. 특히, 1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA, 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L TDZ가 처리된 MS와 mMS 배지, 0.5 mg/L IBA와 4 mg/L BA가 처리된 MS 배지에서 캘러스의 생장이 좋았다.

Thiamin-HCl, PVP, taxifolin과 quercetin을 처리했을때 캘러스의 생장은 mMS 배지보다는 MS에서, 특히 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 caffeine과 catechin류를 분석하고자 신초와 여러 조건에서 배양된 캘러스를 가지고 분석한 결과를 보면, caffeine은 신초에서, catechin류는 캘러스에서 높은 함량을 보였다. 또한 신초에서의 catechin류는 EGC, EGCG, ECG등은 검출되었으나, EC는 검출되지 않았다. 그러나, 배양된 캘러스에서는 4가지 성분이 모두 검출되었다. 각각의 성분들의 최적 배양조건을 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.

V. 참고문헌

- Ana, M. V. and J. Baciera. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic tissues of *Camellia japonica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 267-274.
- Anderson, W. C. 1975. Propagation of *Rhododendron*: Part I. Development of culture medium for multiplication of shoot. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 25: 129-134.
- Arupragassam, P. V. and R. Latiff. 1986. Studies on the tissue culture of tea(*Camellia sinensis*) 1. Development of a culture method for the multiplication of shoot. *Sri Lanka J. Tea Sci.* 55: 44-47.
- Arupragassam, P. V., R. Latiff and P. Seneviratne. 1988. Studies on the tissue culture of tea(*Camellia sinensis*) 3. Regeneration of plants from cotyledon callus culture. *Sri Lanka J. Tea Sci.* 57: 20-23.
- 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. Pflazenphysiol.* 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.
- Beena, U. S. and B. Maitreyi. 1992. *In vitro* clonal propagation of tea(*Thea sinensis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 1-5.

-
- Choi, E. G., H. B. Park, K. S. Kim and Y. K. Lee. 1995. Plant regeneration from immature zygotic embryos of *Stewartia koreana* Nakai via somatic embryogenesis. *Korean J. Plant Tissue Culture* 22(2): 77-81.
- Choi, S. H., B. H. Lee and H. D. Choi. 1992. Analysis of catechin contents in green tea by HPLC. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21(4): 386-389.
- 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.
- Eun, J. B., C. O. Rhee and D. Y. Kim. 1985. Studies on the chemical constituents of the tea shoots in native tea plant in Korea-part I. Total nitrogen, ash, water extract, tannin, caffeine and vitamine C. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 35(4): 276-280.
- Fasolo, F., R. H. Zimmerman and I. Fordham. 1989. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 75-87.



- Fiola, J. A., M. A. Hassan, H. J. Swartz, R. H. Bors and R. Mcnicols. 1990. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledon and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20: 223-228.
- 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.
- Hasegawa, P. M. 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.

- 허 인옥. 1986. 차나무의 조기육묘법에 관한 연구. 한국차문화회지. 1: 32-36.
- 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.
- Horwitz, W. 1980. Official methods of analysis of the AOAC. 13th. AOAC, Washington pp. 233-237.
- 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.
- Jhang, H. H., C. H. Park, Y. S. Lee and Y. B. Shin. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata*. *Korean J. Plant Tissue Culture* 21: 167-171.
- 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.

- Kato, M. 1985. Regeneration of plantlets from tea stem callus. *Japan J. Breed.* 35: 317-322.
- Kato, M. 1986. Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* L. and *C. sinensis* L. *Japan J. Breed* 36: 31-38.
- 김 승희. 1994. 한국 차생활 총서(기초교재1) 한국차생활 교육원. 서울.
- Kim, D. Y., G. H. Jung, K. Kim, C. O. Ree and K. H. Park. 1979. Studies on the special component of the Korean tea-leaves. *J. Korea Agric. Chem. Soc.* 22(2): 970-1000.
- Kim, J. W., T. S. Kim, G. H. Shin, J. H. Kim, J. H. Park, K. S. Cho and H. K. Choi. 1995. Rooting promotion in cutting propagation of tea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 3(3): 195-199.
- Kim K. 1977. Studies on the chemical constituents of the tea leaf. *Korean J. Food Sci. Technol.* 9(1): 10-12.
- Kitto, S. L. and M. J. Young. 1981. *In vitro* propagation of Carrizo citrange. *Hort. Sci.* 16: 305-306.
- Lee, B. K., J. A. Ko and Y. S. Kim. 1992. Studies on the thidiazuron treatment of anther culture in *Paeoria albiflora*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 33: 384-395.
- Lee, B. K., Y. S. Kim and B. M. Park. 1995. *In vitro* propagation of *Narcissus pseudonarcissus* by scale culture using thidiazuron. *Korean*

J. Plant Tissue Culture 22(1): 53-57.

李昌福. 1982. 大韓植物圖鑑. 鄉文社. 서울. p. 543.

Lim, H. T., Y. R. Yeoung, Y. N. Song, K. P. Han and J. H. Kim. 1994. Influence of growth regulators and potassium humate on *in vitro* multiplication of apple rootstock M. 26. *Korean J. Plant Tissue Culture* 21: 131-136.

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.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15: 473-497.

Obeidy A. A. and M. Smith. 1993. Organogenesis from mature pecan cotyledon and embryonic axes. *Hort. Sci.* 28: 213-215.

오상룡. 1988. 近赤外 分光分析法에 의한 綠茶의 迅速品質測定. 중앙대학교 박사학위 논문

Park H. B. and E. G. Choi. 1992. Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of Japanese apricot(*Prunus*

- mume* Sieb et Zucc). *Korean J. Plant Tissue Culture* 19: 261-266
- Pedroso, M. C. and M. S. Pais. 1993. Direct embryo formation in leaves of *Camellia japonica* L. *Plant cell reports* 12: 639-643.
- 나효환, 백순옥, 한상빈, 목진영. 1992. 녹차종자의 일반성분. *한국농화학회지*. 35: 272-277.
- 나효환, 백순옥, 한상빈, 목진영. 1992. 녹차의 카테킨류 분석법 개선. *한국농화학회지*. 35(4): 276-280.
- 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.
- 농촌진흥청. 1987. *茶栽培技術*. pp. 9-54.
- Seneviratne, P., R. Latiff and P. V. Arulpragassam. 1988. Studies in the tissue culture of tea(*Camellia sinensis*). 3. Rooting of shoots produced in culture. *Sri Lanka J. Tea Sci.* 57: 16-19.
- 신미경. 1985. 한양대학교, 한국산 야생 녹차의 품질에 관한 종합적 연구. pp. 1-64
- 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.
- Steevenson, J. H. and R. E. Harris. 1980. Glanlea red spring wheat. *Can J. Plant Sci.* 63: 557-560.

- Tyagi, A. K., A. Rashid and S. C. Maheshwari. 1981. Promotive effect of polyvinylpyrrolidone on pollen embryogenesis in *Datura innoxia*. *Plant Physiol.* 53: 405-406.
- Walky, D. C. A. 1972. Delay of onset of leafroll symptom expression in *Vitis vinifera* 'Liemberger' from rivavirin-treated *in vitro* cultures. *Can J. Plant Sci.* 52: 1085-1087.
- Wang, S. Y., G. L. Steffens and M. Faust. 1986. Breaking bud dormance in apple with a plant bioregulator, thidiazuron. *Phytochemistry* 25: 311-317.
- Wang, S. Y., Z. L. Ji, T. Sun and M. Faust. 1987. Effect of thidiazuron on abscisic acid content in apple bud relative to dormancy. *Physiol. Plantarum* 71: 105-109.
- 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.
- Whitney, H. L. 1987. Effect of dietary caffeine on lipid metabolism. *J. Nutr.* 117: 224-227.
- Wu, C. T., J. I. Fong and J. M. Tasy. 1974. The effect of the combination of the different growth substance and concentration on the rooting and growth of tea cuttings. Taiwan tea experiment station No. 64.

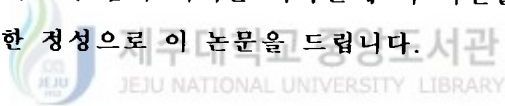
감사의 글

본 논문이 완성되기까지 항상 자애롭게 지도해 주신 허 인옥 교수님께 진심으로 감사드립니다. 앞으로 교수님의 가르침을 잊지않고 성실하게 살도록 노력하겠습니다.

여러가지 바쁘신 가운데도 심사를 맡아 충고와 논문을 다듬어주신 고 석찬 교수님, 김 문홍 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 평소에 많은 가르침을 주신 생물학과 모든 교수님께도 감사드립니다. 실험과 자료 정리에 따른 많은 조언을 해주신 한 태완 선배님과 이이를 비롯한 식물생리학 실험실 여러분에게 고마움을 전합니다.

끝으로 본 논문이 나오기까지 부족한 자식을 위해 따스한 사랑으로 보살펴 주신 부모님과 어려울때 힘이 되어준 가족들께 이 지면을 통하여 깊은 감사를 드리며 조그마한 정성으로 이 논문을 드립니다.



1996년 12월

오 순자