



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

차 유전자원의 특성평가 및
선발계통의 생리활성과 제다특성



제주대학교 대학원

원예학과

이 민 석

2014년 12월

차 유전자원의 특성평가 및 선발계통의 생리활성과 제다특성

지도교수 송관정

이 민 석

이 논문을 농학 박사학위 논문으로 제출함

2014년 12월

이민석의 농학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장

강 훈

위 원

송관정

위 원

이영재

위 원

한상권

위 원

宋仁寬

제주대학교 대학원

2014년 12월

Evaluation of Tea Germplasm and Bioactive and Tea Manufacturing Characteristics in Selection Lines

Min-Seuk Lee

(Supervised by Professor Kwan-Jeong Song)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of
Doctor of Philosophy in Agriculture

2014. 12

Department of Horticulture
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

目 次

목 차	i
Abstract	iii
List of Tables	vi
List of Figures	viii
I. 서언	1
II. 연구사	3
1. 차나무 식물학적 특성	3
2. 차의 성분특성 및 효능	5
3. 차의 제다 및 품질 특성	9
III. 재료 및 방법	12
1. 유전자원 수집, 증식 및 보존	12
2. 생육 특성 평가	16
3. 유용성분 탐색 및 분석	17
4. 생리활성 평가	19
5. 제다방법 및 관능검사	21

IV. 결과 및 고찰	-----	22
1. 국내외 차나무 유전자원의 생육특성	-----	22
1.1 차나무 유전자원의 잎 특성	-----	22
1.2 차나무 유전자원 잎에서의 기능성 성분 탐색	-----	27
2. 우수계통의 선발 및 품종화	-----	49
2.1 기능성 성분 고함유 계통 육성 및 품종 개발	-----	49
2.2 차나무 잎의 생육에 따른 기능성 성분의 함량 변화	-----	55
3. 선발 계통의 생리활성 및 체다특성	-----	59
2.1 생리활성 평가	-----	59
2.2 체다특성	-----	70
V. 종합고찰	-----	78
VI. 적요	-----	83
VII. 인용문헌	-----	85



Abstract

Tea has long been one of the most popular non alcoholic beverages worldwide for thousands of years. And tea has continually been improved, increasing popularity and palatability. Recently, the functional effects of tea have been scientifically proved and there has been increased development of functional products using tea components. It is particularly true that most people think the tea plant is the base of the all tea industry and science. But, over thousands of years, palatability has been the aim of selecting new cultivars and preserving genetic resources. Therefore, there has been a great deal of artificial selection.

Therefore, the objectives of this study were to determine the catechin and functional compounds in tea leaves, and to determine their contents in tea germplasms, also, to search a bioactive effectiveness of new compounds of tea and to set a selection standard of tea cultivars by specific manufacturing and sensory taste characters for new functional tea cultivars.

Collected germplasms were classified into three groups based on the sprouting time, i.e, early, mid and late sprouting time, and the ratios were 20%, 43% and 37%, respectively. There was a difference in characteristics among these collected germplasms, leaf width of those ranged from 19.8 to 75 mm, leaf length was 35.5–160.0 mm, and leaf area was 660–8,400 mm². The concentrations of the total nitrogen, total free amino acids, and theanine were ranged 4.18–6.07%, 2.87–4.58%, and 1.64–2.66%, respectively. Also, catechin concentration showed from 50.67 to 147.67mg/g, and concentration of caffeine was 2.82–4.23%.

The acetone extracts of green tea leaves have extensive absorbance at 440–460nm and 650–660nm. Using RP-HPLC method, 11 major peaks were detected. The 11 pigments were purified using C18 open column

chromatography and semi-preparative HPLC technique, and their chemical structures were identified by spectroscopic methods. The structures of these three pigments were elucidated as lutein, chlorophyll b, a and pheophytin a, b, β -carotene and EGCG3Me. A simple, rapid and reproducible RP-HPLC method was developed for quantitative determination of these compounds. The pigments were separated on the YMC ODS AM 303 (4.6 × 250mm) column using the gradient system.

Hi- functional tea cultivars were developed using the variety germplasm. The cultivar, JANGWON No. 3 contained high EGCG3Me as $4.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. EGCG3Me is one of new catechin components, which is not existed in introduced cultivars and very rarely existed in collected germplasm. The cultivar, JANGWON No. 4 contained high lutein as; $553.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. It is higher than that of the green tea cultivar 'Yabukita' by nearly 4 folds.

The antioxidative activities of JANGWON No. 3 and JANGWON No. 4 were measured using the DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide anion. The results showed that the superoxide anion activity of high lutein cultivar 'JANGWON No. 4' is higher than ascorbic acid and Yabukita at the same concentration. The in vitro anticancer effects of EGCG3Me and lutein were studied using 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (NTT) assay on human cancer cells (Lung cancer cell line: A549, Renal cancer cell line: ACHN, Colorectal cancer cell: HCT15, Prostate cancer line: LNCaP, Breast cancer cell line: MCF-7). The cancer cell growth inhibition activities of lutein at the concentration of $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ showed less than 50% compared to control in all cancer cell lines. Lutein showed inhibition of 38% ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 26% ($100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 15% ($200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) at LNCaP and 39% ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 28% ($100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 19% ($200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) at MCF-7. EGCG3Me showed inhibition of 46% ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37.7% ($100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 20% ($200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) at LNCaP. EGCG3Me has more efficient inhibitory

effect than control. These results suggested that the cancer cell growth inhibition activities of EGCG3Me and lutein showed a concentration dependent effect.

Among different tea manufacturing methods, the non-fermented tea from the cultivar JANGWON No. 3 with high EGCG3Me content is more bitter than half-fermented tea and fermented tea of this cultivar. That is resulted due to the changing of rich catechin components into the theaflavin and thearubidin as fermentation take place. Sensory test score of fermentation in JANGWON No. 4 is reduced as the order of non-fermentation > half-fermentation > fermentation.



List of Table

Table 1. Collected tea plant germplasms and locations in Korea-----	13
Table 2. Collected tea plant germplasms and locations in Sri Lanka -----	14
Table 3. HPLC conditions for analysis of acetone extraction compounds-----	18
Table 4. Standard score of sensory test-----	21
Table 5. Characteristics of tea leaves of collected tea plant germplasms -----	24
Table 6. Sprouting time of collected tea gerplasms in Korea and overseas-----	26
Table 7. ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃) data of compound 1-----	30
Table 8. ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃) data of compound 2 and 3 -----	35
Table 9. The identification of cumpounds in tea leaves by online HPLC-----	38
Table 10. Caffeine and catechin contents of collected tea germplasms in Korea and overseas -----	43
Table 11. Contents of lutein, chlorophyll, pheophytin and β-carotene of collected tea germplasms in Korea and overseas -----	45
Table 12. Contents of theanine, total amino acids of collected tea germplasms -----	48
Table 13. Index and elite lines of selected germplasms were analyzed based on ingredient. 50	
Table 14. Growth characteristics of fuctional tea cultivars, Jangwon No. 3, Jangwon No. 4 and Yabukita -----	51
Table 15. Total nitrogen, total amino acid and theanine of fuctional tea cultivars, Jangwon No. 3 , Jangwon No. 4 and Yabukita -----	52
Table 16. Caffein and catechin contents of fuctional tea cultivars, Jangwon No. 3, Jangwon No. 4, and Yabukita -----	53
Table 17. Lutein, chlorophyll, phaeophytin, β-carotene contents of fuctional tea cultivars, Jangwon No. 3, Jangwon No. 4, and Yabukita-----	54

Table 18. Contents of caffeine and catechin components at leaf opening stage in first harvesting season -----	56
Table 19. Contents of caffeine and catechin of new young shoots at different growth stages in first harvestion season-----	58
Table 20. Effect of β -carotene, lutein and EGCG3Me isolated from <i>Camellia sinensis</i> (GT) on the proliferation of human cancer cell of A549 (lung), ACHN(renal), LNCaP (prostate), HCT15(colon) and MCF-7 (breast) cells-----	69
Table 21. The catechin and caffeine contents in different functional tea cultivars based on the tea manufacturing methods-----	72
Table 22. Contents of lutein, chlorophyll, pheophytin, β -carotene in different functional tea cultivars based on the tea manufacturing methods-----	74
Table 23. Qualities and their sensory scores of different functional tea cultivars based on the tea manufacturing methods-----	76



List of Figures

Fig. 1. Tea plant germplasms collected locations in Korea -----	12
Fig. 2. Tea plant germplasms collected locations in Sri Lanka -----	14
Fig. 3. Elite lines selection among collected tea plant germplasms-----	15
Fig. 4. Single cutting propagation to raise the selected tea plant lines -----	15
Fig. 5. HPLC chromatogram of acetone extraction compounds of tea leaves-----	18
Fig. 6. Leaf characteristics of selected tea plant lines -----	25
Fig. 7. Measuring chlorophyll contents in tea shoots of collected tea germplasms using SPAD -----	25
Fig. 8. Different sprouting patterns of collected tea germplasms -----	26
Fig. 9. HPLC chromatogram of major compounds of acetone extraction in tea leaves-----	27
Fig. 10. Purity of separated extraction in RP-HPLC and TLC -----	28
Fig. 11. ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃) spectrum of compound 1 -----	29
Fig. 12. UV-VIS. Spectrum of compound 1 -----	31
Fig. 13. Chemical structure of compound 1 -----	31
Fig. 14. ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃) spectrum of compound 2-----	33
Fig. 15. UV-VIS. Spectrum of compound 2-----	33
Fig. 16. ¹ H-NMR(300MHz, CDCl ₃) spectrum of compound 3 -----	34
Fig. 17. UV-VIS. Spectrum of compound 3-----	34
Fig. 18. Chemical structures of compound 2 and 3-----	36
Fig. 19. Spectrum of tea leaves extraction in online HPLC-DAD -----	37
Fig. 20. Lutein peak of tea leaves in LC-MS spectrum -----	39
Fig. 21. Chlorophyll b peak of tea leaves in LC-MS spectrum-----	39
Fig. 22. Chlorophyll a peak of tea leaves in LC-MS spectrum -----	39
Fig. 23. Pheophytin b peak of tea leaves in LC-MS spectrum-----	40

Fig. 24. Pheophytin a peak of tea leaves in LC-MS spectrum -----	40
Fig. 25. β -carotene peak of tea leaves in LC-MS spectrum -----	40
Fig. 26. Cutting propagation of the selected elite lines -----	50
Fig. 27. Superoxide radical scavenging activity of EGCG3Me and acetone extract of Jangwon No. 3 and Yabukita. Ascorbic acid was used as positive control -----	60
Fig. 28. Hydroxy radical scavenging activity of EGCG3Me and acetone extract of Jangwon No. 3 and Yabukita. Ascorbic acid was used as positive control -----	61
Fig. 29. DPPH radical scavenging activity of acetone extract of Jangwon No. 4, and Yabukita. The α -tocopherol was used as positive control. The control was not contained any antioxidant or lutein. The absorbance was measured at 517nm. -----	62
Fig. 30. Inhibitory effect of acetone extract of Jangwon No. 4 and Yabukita on superoxide radical production was estimated by NBT reduction. The α -Tocopherol was used as positive control. -----	63
Fig. 31. Electron spin resonance spectra of hydroxyl radical adducts and plots of the capacity for scavenging hydroxyl radical of the concentrations of Jangwon No. 4 and Yabukita -----	65
Fig. 32. Proliferation of LNCaP, MCF-7 and A431 cells treated with EGCG and EGCG3Me -----	68

I. 서 언

국내 차 재배가 본격화되어 산업화가 된 것은 1980년경 이후의 일로 비교적 최근이라 할 수 있다. 일반인의 웰빙과 건강에 대한 관심이 증대하면서 녹차의 소비량도 꾸준히 증가하는 추세에 있다. 이에 따라 차 재배면적과 생산량도 매년 증가하는 경향으로(정 등, 2006; 이, 2006) 현재 약 3,400ha 정도에 이르러 차 재배기술과 가공방법도 점차 체계화되어 가고 있는 상황이다(은 등, 2009). 그러나 아직도 차 산업의 경쟁력은 일본이나 중국에 비해 낮은 편이다(Jeong 등, 2006; Kim, 2000). 차의 제품과 품질에 대한 소비자의 요구는 다양한데, 생산기반이 열악하여 이를 충족시키지 못하고 있는 실정이다. 무엇보다도 재배와 산업화에서 가장 기본이 되는 품종의 다양화가 실현되지 못하고 있기 때문이다.

차나무는 영년생작물로서 우량품종을 육종하기 위해서는 20년 이상의 많은 시간과 노력이 필요할 뿐만 아니라 기술력이 요구되기 때문에 초기 육종계획을 세울 때에는 장기적인 수요를 예측하여 품종개발을 하는 것이 중요하다(岩淺, 1994; Lee 등, 2005). 그러나 우리나라에서는 차나무 육종에 대한 역사가 짧고 아직 대표할만 한 차나무 품종 개발 및 보급이 이루어 지지 않아 농가들은 재래종 다원에서 채취한 차의 종자를 이용하여 실생번식으로 차밭을 조성하여 왔다(이 등, 2005). 우리나라 전체 다원의 약 80%는 각 개체 간 유전적 조성이 다른 재래종 실생으로 구성되어 싹트는 시기, 신초 생장속도, 잎 형태 등이 고르지가 않아 생산성과 경제성이 낮다(Jeong 등, 2006; Kim, 2000). 최근에 품종화된 다원이 계속적으로 증가하고 있지만 대부분 도입된 일본 품종으로 조성되고 있는 실정이다.

차나무 잎을 이용한 다류는 수천년 동안 기호성과 대중성을 바탕으로 인류의 중요한 음료로써 발전하였다. 그리하여 재배, 가공, 제품개발 응용법, 그리고 품종에까지 기호성을 강화하는 방향으로 개량이 이루어져 왔다.

그러나 중국에서 차나무 잎을 BC 2,700년 전에 신농이 약용으로 마셨다는 차나무 이용에 대한 기록이 있듯이 인류가 오랜 기간 음용을 한 것이 오직 기호성에만 국한된 것은 아니라 할 수 있다. 최근에 녹차에서 여러 유용한 기능성들이 과학적으로 밝혀지면서 다류, 기능성 소재와 관련한 제품들이 많이 개발되어 시

장이 급속도로 발전을 하고 있다. 그러나 이러한 제품들의 원료가 되는 차나무는 모두 기호성 위주로 개량 된 것이기 때문에 새로운 제품과 건강기능식품, 화장품, 제약 등의 고부가가치 산업과 연계를 통하여 시장을 확대하는 것에는 한계를 가질 수 밖에 없다.

이러한 대안으로 새로운 기능성 차나무 품종개발이 시급한 현황이지만 현재 국내에서의 차나무 유전자원에 대한 연구는 극히 미미한 실정으로 우리나라 자생 차나무의 형태적 특성에 관한 몇몇 연구만 수행된 바 있을 뿐(Song 등, 2005; Je 등, 2007)이며 국내외 유전자원 수집과 함유된 유용 기능성 및 효능에 대한 포괄적 평가는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내외 다양한 차나무를 수집하고 이들 차나무 유전자원에 대하여 신규 기능성 성분 탐색, 효능 발굴과 동시에 고 기능성 차나무 품종개발을 통하여 차나무의 기능성을 활용한 부가가치의 증진과 새로운 시장형성을 위한 기초를 마련하고자 수행되었다.



II. 연구사

1. 차나무의 식물학적 특성

차나무는 동백나무과(Theaceae)에 속하는 상록수로 학명은 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze이며, 타식성 작물로서 실생번식을 할 경우에는 개체간 변이가 심하게 발생한다(Mizukami 등, 2006; Sung, 2006). 차나무는 아쌈종(var. *assamica*)과 중국종(var. *sinesis*)으로 크게 나눌 수 있으며, 한국산 재래종 차나무는 중국종으로 분류된다(Ikeda와 Park, 2002). 중국종은 온대지역에 분포하고 중국, 일본의 품종들과 한국 재래종을 포함하며 주로 녹차생산에 많이 이용되고 있다. 아쌈종은 인도, 스리랑카 등 열대, 아열대 지역에 분포를 하며 내한성이 약하지만 카테킨 함량이 높아 홍차용으로 많이 이용되고 있다(Ikeda와 Park, 2002).

차나무는 세계적으로 600여 품종이 재배되고 있으며 일본, 중국, 인도의 일부 품종을 제외한 이들 대부분의 품종들은 영양계 분리선발에서 유래되었다(Mondal, 2004). 이는 차나무가 내혼약세, 자가불화합성, 긴 종자 성숙기간 등 교배육종에 있어서의 몇 가지 제약 요인을 가지고 있기 때문이다(Mondal, 2004; Park, 2007; Singh, 1999). 종자의 발아에서는 종자의 유전적 특성, 성숙도, 성분 등에 의한 내적 조건과 광, 온도, 수분, 공기 등의 외적 조건에 따라 발아율이 다르게 나타난다(Kelly 등, 1992). 차 종자는 열매가 성숙되면 자연적으로 과피가 벌어져 땅에 떨어지게 되는데, 떨어진 종자는 발아력이 급격히 떨어지는 것으로 알려져 있다(柳沢, 2006; Park, 2007; 양 등, 2008).

차나무는 영년생 식물로서 봄부터 가을까지 지속적으로 성장하며 봄에는 겨울 동안 월동을 한 정아 및 측아에서 새순들이 신장을 하여 약 6일에 1매씩 개엽수가 증가하게 된다. 봄철의 첫물차에서는 5-6매의 잎이 출개된 후에 신초 생장이 멈춘다. 일반적으로 차잎의 수확은 봄부터 가을까지 연 3-4회 이루어 지는데, 경영전략에 따라 여름차는 수확을 하지 않기도 한다(岩波, 1994). 차나무는 품종에 따라 생육특성의 차이가 크다고 하였는데(大石, 1988) 鳥丸 등(1991)은 4년생 차나무 12개의 품종을 공시하여 첫물차의 생육특성을 비교한 결과 가나야미도리가 수량이 가장 많았고 유타카미도리가 가장 적었다고 하였다.

우리나라에서 차나무 도입은 삼국사기 문헌에 신라 흥덕왕 3년(AD 828년)에 대림이 중국 당나라에서 차 종자를 가져와 지리산에 심었다는 기록이 있으며(김 등, 1984), 가락국 초기 허황옥의 인도 도입설도 있다(박 등, 2001). 고려시대에는 불교문화와 함께 전성기를 누렸으나 조선시대에는 송유억불정책에 의해 차문화가 점차 쇠퇴하였다. 이후 차산업과 문화는 명맥만 유지해 왔고 1970년대에 전남 보성지역에 다원이 조성되기는 하였으나 본격적인 산업기반이 구축된 것은 1980년 (주)태평양이 전남 강진, 제주도 등에 대규모 다원을 조성하면서 시작되었다. 현재는 경남 하동, 전남 보성, 제주도가 한국의 주요 산지가 되었다(천, 2000).

일본도 우리나라와 비슷한 시기인 805년에 중국으로부터 차종자를 가지고 들어와 파종하였다는 것이 재배의 시초라고 하였듯이(岩淺, 1994) 비교적 오랜 다업의 역사를 가지고 있다. 일본은 메이지시대 말기부터 차나무 육종을 실시해 왔으며 현재까지 100개 이상의 우량품종을 육성하여 재배해오고 있어(Takeda, 2007), 일본에서의 차나무 품종과 생육 특성에 대한 연구는 매우 오래된 편이다.

현재 국내에서 우량품종 개발을 전제로 한 차나무 유전자원의 평가 연구는 극히 미비한 실정으로 한국의 자생 차나무의 형태적 특성에 관한 연구(Song 등, 2005; Je 등, 2007)와 한국 야생 차나무와 야부기다 품종의 아미노산, 테아닌, 카페인 분석(Park 등 1996)만이 수행 되었다. 우리나라에서는 차나무 품종개발의 역사가 짧으며 연구할 수 있는 전문 육종가도 극소수이기 때문에 아직 신규 기능성 품종 개발을 목적으로 국내외 차나무 유전자원의 수집과 식물 특성평가, 유용 기능성 성분 분석 및 생리활성 효능에 대한 포괄적인 평가는 전무한 실정이다.

2. 차의 성분특성 및 효능

차는 다른 기호음료에 비해 질소화합물, 폴리페놀, 당, 유기산, 비타민 및 무기질 등을 많이 함유하고 있는 것이 특징이며, 아미노산은 차의 맛과 깊은 관계가 있고 테아닌과 같은 특정 아미노산은 차의 품질에 크게 영향을 미치며, 실제 이들 아미노산 성분들은 가공된 녹차 제품의 가격과도 상관이 있다고 알려져 있다 (Park 등, 2002). 차 잎의 성분 중 전질소 함량은 전통적으로 아미노산과 더불어 차의 품질을 결정하는 중요 인자이다. 차 잎의 전질소 중 약 20%는 카페인 성분이며, 그 외 질소화합물로 아미노산, 단백질, 핵산 등이 있다 (Millin, 1987). 차의 질소 성분 중 단백질은 제조과정 중 탄닌과 결합하거나 가열에 의해 응고되어 거의 용출되지 않으나, 아미노산은 수용성이므로 용출되어 차의 맛에 크게 관여한다고 보고되고 있다 (Lee 등, 1997).

카테킨 류는 녹차의 중요한 품질 평가 및 기능성 성분으로 C₆-C₃-C₆ 골격을 가진 물질로서 차나무에는 (-)-epi catechin gallate (ECG), epi catechin (EC), (-)-epigallo catechin (EGC), (-)-epigallo catechin gallate (EGCG), (-)-gallo-catechin (GC), catechin gallate (CG), (+)-catechin (C) 등으로 존재하고 있다. Saijo (1981)는 첫물차 시기에 찻잎의 생육에 따른 카테킨 성분의 함량 변화를 알아보기 위하여 야부기다와 중국 품종 4종, 아쌈종 2종 모두 7종을 공시하여 생육의 진전에 따른 카테킨 함량을 조사하였는데 모든 품종에서 EC, EGC의 함량은 생육이 진행될수록 증가하였고 ECG, EGCG의 함량은 감소한다고 하였다.

Takayanagi 등(1985)은 차잎의 성숙에 따라 맛 성분의 함량이 어떻게 변화하는지 조사하기 위하여 야부기다와 오푸미도리 두 품종을 공시하고 성분 변화를 조사하였다. 전질소, 탄닌, 카페인, 아미노산 함량은 차잎의 성숙이 진행됨에 따라 서서히 감소한다고 하였다. CG는 첫물차와 세물차 모두에서 속도가 진행될수록 감소하였고 ECG는 증가한다고 하였다. 펙틴 함량은 속도가 진행될수록 증가한다고 하였으며 무기성분 중 인산, 칼륨은 급격히 감소하였고 칼슘, 망간, 알루미늄의 함량은 조금씩 증가한다고 보고하였다.

根角 등(1999)은 비교적 최근에 육성된 14개의 품종을 공시하여 첫물차 시기에 생육의 진행에 따른 품종별 찻잎 성분의 함량을 알아보기 위해서 전질소와

탄닌의 함유 비율을 조사하였다. 그 결과 생육의 진행에 따른 전질소 함유율의 감소 속도는 후쿠미도리, 후순, 메이료꾸, 오푸히카리, 베니호마레, 오푸미도리 및 NN27이었고 반대로 사야마가오리, 순메이, 오푸유타카는 감소 속도가 빨랐다고 하였다. 탄닌 함유율 감소 속도는 메이료꾸, 후순, 베니호마레, 오푸미도리가 빨랐는데 새싹의 경화도가 빠른 품종은 전질소 함유량의 감소 속도도 빠르다고 하였다. 오푸유타카는 품질이 우수한 다수성 품종이지만 최근에 수확 적기가 느려지고 품질의 저하가 현저한 품종으로서 적채 적기의 기간이 짧은 것이 문제가 된다고 하였다.

차는 기호음료 일뿐만 아니라 다양한 약리작용을 나타내므로 최근 차의 생리활성 물질이 관심의 대상이 되어 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 차에는 특히 폴리페놀류가 많이 함유되어 있는데, 차의 폴리페놀류는 카테킨 화합물로 알려진 flavonol류가 대부분이며, 주요 카테킨 화합물은 (+)-catechin, (-)-gallo catechin, (-)-epigallo catechin, (-)-epigallo catechin gallate, (-)-epicatechin, (-)-gallo catechin gallate 및 (-)-epi catechin gallate 등이다(Graham, 1992). 최근에는 다양한 이성질체들의 존재와 효능이 주목을 받고 있다(Choung과 Lee, 2008). C와 GC는 주로 체다 공정 중 가열시 EC와 EGC의 이성체로 생성되며, 주요 형태는 EC, EGC, EGCG, ECG 등 4성분으로 알려져 있다(Saijo, 1981). 또한 녹차에서 유리형인 EC, EGC와 ester형 EGCG, ECG등의 존재형태에 따라 다른 맛을 나타낸다고 하였다(永田, 1982). 일반적으로 유리형은 쓴맛을 나타내고, ester형은 떫은맛과 쓴맛을 같이 가지고 있기 때문에 ester형이 유리형보다 맛의 품질에 미치는 영향이 더 강하다고 할 수 있다(岩淺, 1994).

녹차에 들어 있는 카테킨 화합물은 혈중 콜레스테롤을 저하시키고(Asai 등, 1987; Cho 등, 1993), 항산화 작용(Matsuzaki & Hara, 1985; Ryu & Park, 1990; Yeo 등, 1995), 항암작용(Hara 등, 1989; Hunter 등, 1992) 해독작용(Choi 등, 1994), 항균작용(Fukai 등, 1991), 충치예방(Cao, 1995) 및 미백효과(Kim 등, 1997) 등의 다양한 생리활성 효과를 나타내고 있다.

최근 작물에 함유된 식이 피토케미칼(phytochemical)의 섭취가 강력한 항산화 활성을 나타내어 다양한 질병예방 및 치료에 중요한 역할을 하고 있다는 것이 증명 되고 있다. 다양한 항발암제와 항 돌연변이가 *in vivo*상에서 종양, 암의

중간 매개 biomarker의 증식과 빈도를 감소시키는 것이 확인 되었으며, *in vivo* 상에서 단기간의 유전독성 검정을 통해 항암효능을 나타내는 것이 확인 되고 있다.

다양한 동물 실험을 통해 피토케미칼이 인체에 섭취되는 수준 또는 그 이상의 농도에서 항암효능이 검증되고 있으나 작물의 잎이나 과일과 같은 영양체로부터 발견되는 클로로필이나 카로티노이드와 같은 색소화합물에 대한 고찰은 극히 미흡한 실정이다. 또한 작물의 활성성분 중 항산화활성에 기인하여 질병치료와 건강증진에 기여하는 것이 비타민 C나 E, 폴리페놀 등과 같은 피토케미칼에 의해서인지 혹은 클로로필이나 카로티노이드와 같은 색소화합물에 의한 것이지에 대해서는 불분명하며, 대부분의 연구가 이러한 색소화합물을 제외한 플라보노이드나 사포닌과 같은 피토케미칼에 국한 되어 있는 실정이다.

카로티노이드는 일반적으로 인간의 식 재료가 되는 식물체의 열매 및 잎에 많이 포함되어 있으며, 노란색과 적색의 색상을 나타내는 화합물의 한 종류로서 자연 상태에서 수백 개의 성분들을 포함하고 있으나 체내에 섭취되어 인간이 혈장과 조직에서 검출되거나 기능을 수행하는 것이 밝혀진 것은 단지 몇 가지에 지나지 않고 있다(Khachik 등, 1992). 몇몇의 카로티노이드는 인체 내에서 생물학적 기능을 수행하고 있으며, 인간의 건강을 유지하는데 중요한 역할을 수행하고 있다. 또한 많은 질병 역학적 연구에서 이들 카로티노이드의 섭취와 혈장에서의 수준이 암이나 심혈관계질환과 부의 상관관계를 가지고 있는 것이 보고 되고 있다(Cooper 등, 1999).

카로티노이드 계열의 하나인 루테인(lutein)은 녹색 채소에 존재하는 다중의 지용성 항산화제 중 하나이며, 천연의 소재에서 분리된 약 700개의 카로티노이드 중에서 free radical를 소거할 수 있는 가장 효율적이며 중요한 하이드록시 카로티노이드 이다(Southon, 2000). 또한 루테인은 인간이 섭취하는 의미과 체내 혈장, 조직에서 쉽게 발견되며, 혈장에서 가장 높은 비율로 존재하는 카로티노이드이고, 다른 카로티노이드와 유사하게 임상적으로 체내 섭취가 암이나 백내장과 같은 질환에 도움이 되는 것으로 알려져 있다(Zhang 등, 1999; Enger 등, 1996; Rumi 등, 1999; Slattery 등, 2000).

루테인과 연관된 화합물이 지아잔틴(zeaxanthin)은 디하이드록시 잔토피릴(dihydroxy xanthophylls) 계열의 카로티노이드로서 두 개의 하이드록시기를

보유하고 있는 반면, 베타카로틴이나 라이코펜과 같은 하이드로카본 카로티노이드는 산소원자를 가지고 있지 않다. 루테인과 지아잔틴이 가지는 하이드록시기는 이것을 포함하고 있지 않는 카로티노이드인 하이드카본 카로티노이드 보다 더 큰 극성을 나타내게 되며, 인체의 시각조직에서 유익한 효능을 나타내는데 기여한다.

루테인은 유일하게 높은 에너지의 청색광에 대한 필터로 작용하거나 광촉매 radical이나 활성산소종을 제거하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Krinsky, 1989). 질병과 관계되어 루테인의 섭취는 노인성황반변성이나 백내장과 같은 안 질환에 효율적으로 작용하는 것으로 알려져 있으나, 차나무 잎에 함유되어 있는 루테인의 항산화 활성과 항암활성에 관한 보고는 미진한 실정이다.



3. 차의 제다 및 품질 특성

일반적으로 차는 발효정도에 따라 불발효차(녹차), 반발효차(우롱차, 포종차), 발효차(홍차) 및 미생물을 이용한 후발효차(황차, 흑차)등으로 분류된다. 또한 녹차는 산화효소인 polyphenol oxidase를 불활성화시키는 방법에 따라 다시 증기를 이용하는 증제차와 솥에서 덫는 방법의 덫음차로 나눌 수 있다(大石, 1988; 김, 1996). 그러나 산지, 품종, 수확시기와 가공방법에 따라 매우 다양하게 차별화가 이루어지고 있다.

Anan (1991)은 녹차 제조 중에 찻잎의 성분 변화를 조사하였는데 1차 가공 공정에 의해서 시스테인, 글루타치온, 메티오닌 등의 황화수소화합물이 감소한다고 하였고 2차 가공 공정 중 130℃ 이상의 배전 공정에서 아미노산, 카테킨, 유리당 등이 감소한다고 하였다. Shimada 등(1996)도 녹차 가공 공정 중의 찻잎 성분 변화를 검토하였는데 Takayanagi 등(1986)의 연구 결과와는 반대로 비타민 C의 함량은 공정이 진행될수록 감소한다고 보고하였으나 카테킨, 카페인, 전질소의 함량은 변화가 없다고 하였다.

Masuda 등(1977)은 차나무 품종 간의 아미노산 함량을 조사하기 위해서 5년간 59개의 품종 및 계통의 아미노산 함량을 비교 분석하고 히스티딘을 많이 함유한 것은 NN48, NN49였고 아르기닌을 많이 함유한 것은 후지미도리, 나즈미도리, NN47, NN48, NN49였으며 알라닌을 많이 함유한 품종은 야에호, 아사쯔유였다. 그리고 리신을 많이 함유한 것은 NN48, 테아닌은 NN50에서 전아미노산은 NN49와 NN50에서, 많이 함유하고 있다고 보고하였다.

Ikeda 등(1993)은 차나무 각 품종들의 품질 특성을 평가하기 위하여 36개 품종을 공시하고 첫물차 및 가을차에 대하여 전질소, 총아미노산, 카페인, 탄닌 성분을 분석하였다. 품종에 따라서 전질소 함량은 첫물차 4.59-6.12%, 가을차 3.05-4.83%, 총아미노산이 첫물차 1.47-5.07%, 가을차 0.76-2.86%, 탄닌이 첫물차 2.60-4.88%, 가을차 2.07-3.56%의 범위로 품종에 따라 차이가 크다고 하였다. 또한 야부기다, 오꾸미도리 등의 품종과 옥로차용 품종에서 전질소, 총아미노산의 함량이 높고 탄닌의 함량은 적다고 하였으며 유타카미도리가 총아미노산 함량이 가장 낮은 품종이었다고 보고하였고 홍차용 품종인 이즈미와 인도잡종 131은 카페인의 함량이 매우 많다고 하였다. 아미노산의 품종간 함유량

범위는 테아닌이 첫물차에서 6.19-30.70 mg · g⁻¹, 가을차에서 2.00-15.03 mg · g⁻¹, 아르기닌이 첫물차에서 0.36-8.75 mg · g⁻¹, 가을차에서 0.08-1.87 mg · g⁻¹ 등이라고 보고하였다.

Takayanagi 등(1986)은 증제차 가공 공정 중에 증열, 조유, 유념, 증유, 정유, 건조 각 공정에 있어서 차잎의 화학 성분 변화를 조사하였는데 제차 공정 중에서 전질소, 탄닌, 카페인, 유리환원당, 가용분, 총아미노산 및 비타민 C 함량은 변화가 없다고 보고하였다. 그리고 수용성펙틴의 함량은 조유공정 이후 건조공정까지 서서히 감소하였고 다른 형태의 펙틴 함량은 변화가 없다고 하였으며 차잎의 부피밀도, 페오피틴 색소의 함량은 공정이 진행될수록 명확히 증가한다고 하였다.

Ueno 등(1959)은 품종별 적합한 증제차 가공법을 확립하기 위하여 야부기다 등 11개 품종 및 계통에 대해 증열 공정과 조유 공정의 조건을 달리하여 가공 후 관능심사로 품질을 비교하였다. 실험 결과 증열 공정은 S6 계통 이외의 품종에서는 품질에 별다른 영향을 미치지 않았고 조유 공정에서 야부기다, U9, 타마미도리, S6 품종은 비빔손의 압력을 55%로 하는 것이 45%로 하는 것보다 품질이 좋다고 보고하였다. 또한 Ueno 등(1960)은 야부기다, 아사쯔유, 타마미도리, 나쯔미도리 4개의 품종에 대해 적합한 증제차 제법을 확립하고자 증열시간을 달리하여 가공한 후 관능검사에 의한 품종 간의 품질을 비교하였다. 모든 품종에서 증열시간이 길수록 잎이 부드러워 졌는데 타마미도리, 야부기다, 아사쯔유가 타마미도리, 나쯔미도리 품종보다 더 부드럽다고 하였으며 나쯔미도리가 다른 3품종에 비하여 품질에 대한 증열시간의 영향이 크다고 하였다.

우롱차, 홍차 등의 발효는 미생물이 관여하는 미생물 발효와 달리 차잎에 존재하는 산화효소 작용에 의해 차잎 성분이 산화되는 반응을 이용하므로 효소 발효로 불리운다. 효소 발효차는 제다과정 중 차잎의 성분이 생화학적으로 변화된 것으로 효소의 불활성화 시점에 따른 효소반응의 시간 및 정도에 따라 반발효차 및 완전발효차 등으로 구분한다. 불발효차인 녹차는 제다공정의 첫단계에서 차잎을 가열하여 효소의 활성을 정지시키는 반면 반발효차인 우롱차는 수확한 차잎을 위조작업을 통하여 약발효시킨 뒤 효소활성을 정지시키고, 완전발효차인 홍차는 위조, 발효공정을 통하여 효소반응을 충분히 시킨 다음 효소활성을 정지 시킨다 (조 등, 2007).

발효차는 이러한 효소반응에 의해서 차잎의 성분이 변화됨에 따라 맛, 색, 향기가 달라지면서 고유의 풍미를 가지게 된다.

일본에서는 품종별 가공방법의 확립에 대한 연구가 1950년대 후반부터 비교적 일찍부터 수행되었다. 그러나 우리나라에서는 이러한 품종과 발효도에 따른 기능성 성분의 변화와 기호적인 특성에 대하여 비교한 연구는 매우 부족한 실정이며 연구의 양적 질적인 면에서도 미흡한 수준이라 할 수 있다.



Ⅲ. 재료 및 방법

1. 유전자원 수집 및 보존

1) 유전자원 수집

국내 야생 차나무 유전자원 수집을 위하여 2007 년 10 월 경남, 전남, 전북의 유전적 혼입이 작은 차나무 자생지인 김해(상동면, 대동), 사천(다솔사), 남해(용문사, 보리암, 쌍계사), 하동(차 시배지), 보성(대원사), 화순(쌍봉사), 장흥(보림사), 고창(선운사) 등 11 곳을 대상으로 총 2,100 여점의 유전자원을 수집하였으며(Table 1, Fig. 1), 제주도 서귀포시 안덕면 서광리에 있는 아모레퍼시픽 그룹, (주)장원 설록차연구소의 실험포장 내에 증식을 하였다.



Fig. 1. Tea plant germplasms collected locations in Korea.

Table 1. Collected tea plant germplasms and locations in Korea.

Location	No. of Germplasms
Sangdong-myeon, Gimhae-si, Gyeongsangnam-do	62
Daedong-myeon, Gimhae-si, Gyeongsangnam-do	201
Dasolsa temple, Sacheon-eup, Gyeongsangnam-do	248
Yongmunsa temple, Namhae-gun, Gyeongsangnam-do	73
Boriam temple, Namhae-gun, Gyeongsangnam-do	157
Ssanggyesa temple, Hadong, Gyeongsangnam-do	103
First tea farm, Hadong, Gyeongsangnam-do	286
Daewonsa temple, Boseong-gun, Jeollanam-do	206
Ssangbongsa temple, Hwasun-gun, Jeollanam-do	288
Borimsa temple, Jangheung-gun, Jeollanam-do	292
Seonunsa temple, Gochang-gun, Jeollanam-do	185
Total	2,100

또한 대엽종 위주로 분포되어 있는 스리랑카의 주요 차 산지인 누와라엘리아, 캔디, 덤블라 지역의 유전자원을 2008 년 2 월 13 일부터 18 일 까지 수집하였다. 자생지 및 재배지의 재래종을 대상으로 모수의 특성을 기록한 후 총 733 개의 유전자원을 수집하였다.

Table 2. Collected tea plant germplasms and locations in Sri Lanka.

Location	No. of Germplasms
Dimbula – Ratnapura	125
Nuwara Eliya – Glenloch estate	22
Nuwara Eliya – Pedro estate	38
Nuwara Eliya – TRI(Tea Research Institute)	12
Nuwara Eliya – CSA & C estate	357
Uva – Blue Field estate	34
Uva – Mack Woods estate	88
Kandy – Embilmeegama estate	57
Total	733

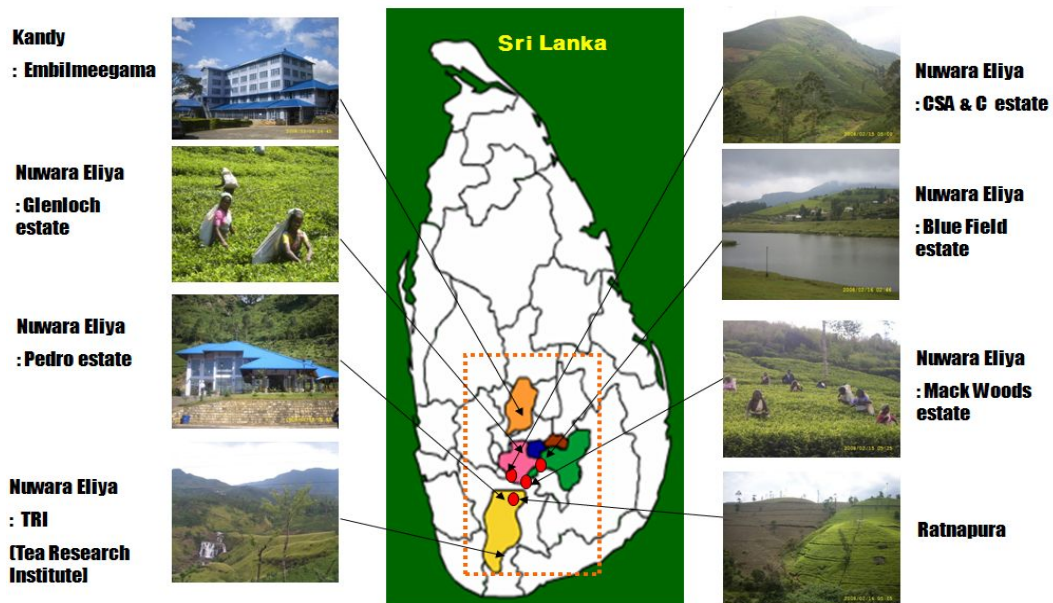


Fig. 2. Tea plant germplasms collected locations in Sri Lanka.

2) 국내외 수집 유전자원의 증식 및 고기능성 선발 자원 계통화

국내 수집 유전자원과 해외수집(스리랑카) 유전자원의 안정적 증식을 위하여 온실에서 3 월초에 페이퍼 포트를 이용하여 파종하였고, 신품종 육성을 위한 유전자원의 작물형질 평가 및 기능성 분석을 위하여 본 포장에 이식하여 증식을 진행 하였다.



Fig. 3. Elite lines selection among collected tea plant germplasm.

국내외 수집 보존 차나무 유용자원 중 생육특성 및 신규 기능성 성분평가에 대한 결과를 바탕으로 선발한 우수 개체를 대상으로 계통증식을 위하여 삽목을 실시하였다. 1심 5엽까지 전개한 신초가 경화되는 시점인 6월 말에 삽수를 잘라 80개체씩 피트모스와 펄라이트로 조성된 상토를 담은 종이포트에 삽목하여 증식 하였다.



Fig. 4. Single cutting propagation to raise the selected tea plant lines.

2. 생육 특성평가

실험기간 내 차나무 생육기는 첫물차 시기는 4월 24일부터 5월 5일 이었다. 첫물차 기간 중 신아를 대상으로 출개도 70% 시기에 가로, 세로 20cm의 격자를 차나무 위에 놓고 격자내의 1심 5엽 부위까지 새싹을 모두 채취하여 조만성, 엽장, 엽폭, 신아장, 신아중 등의 생육 지표 평균값을 국립종자관리원의 국제식물유전자원평가기준(UPOV)에 의하여 측정하였다. 조만성은 전체 새싹 중 발아한 새싹의 비율이 70%가 되는 맹아기를 조사하여 비교하였다. 신아장은 새싹 기부에서부터 제일 상위엽까지의 잎줄기 길이를 측정하였다. 신아중은 새싹 100개의 무게인 백아중으로 평가하였다. 엽장, 엽폭, 엽면적의 조사부위는 채취된 신아의 상부로부터 3번째 잎을 대상으로 하였으며 엽면적은 엽면적 측정기(LI-3100 Area Meter, LI-COR. Inc, Japan)를 이용하여 측정하였다.



3. 유용성분 탐색 및 분석

차나무의 신규 기능성 성분 탐색을 위하여 수집한 차나무 유전자원을 대상으로 아세톤을 이용하여 잎에 함유된 화합물을 추출하였다. 추출 조건은 분쇄 시료 0.1g에 20ml의 아세톤 용액을 가한 후 상온에서 1시간 추출하였으며, 차나무 잎 아세톤 추출물에 함유된 화합물의 조성을 확인하기 위해서 역상 조건의 HPLC를 이용(그림 2)하여 성분 검출을 실시하였다. 이들 11종의 주요성분 중 분리도가 양호하고, 함량이 높은 성분에 대해서 column chromatography를 실시하여 순수분리를 시도하고 $^1\text{H-NMR}$ 질량분석과 online-HPLC-DAD-MS 동정법을 사용하여 구조를 확인 하였다.

첫물차 시기의 생육단계별 생엽의 성분함량 특성을 조사하기 위해 첫물차 기간 중 1심 1엽기부터 5엽기까지의 생육시기별로 각각 100g씩 시료를 채취하였다. 첫물차와 두물차의 수확시기별 성분함량분석을 위해 수확적기라 판단하는 출개도가 70%에 도달한 1심 5엽기에(田中, 1989) 상위엽으로부터 1심 3엽이 되는 부분까지 전정가위를 이용해 채취하였다. 준비된 시료는 증열기에 40초간 통과시켜 찌고 80℃ 건조기에 건조시킨 후 분쇄하고 60mesh 체로 사별하여 얻은 분말을 이용하였다.

루테인, 베타카로틴, 카페인 및 카테킨 류의 분석은 녹차 함유 카테킨 및 카페인 동시분석방법을 변형하여 사용하였다(정과 이, 2008; Choung과 Lee, 2011). HPLC 분석 조건은 Table 3과 같이 YMC ODS AM 303 (250X4.6 mm) 컬럼을 사용하고 이동상의 농도 구배 조건은 A는 0.1% 인산에 증류수를 가하고, B는 100% 메탄올로 280 nm의 파장으로 하였고 유속은 1.0 mL, 주입량은 20 μL , 30℃에서 HPLC 분석을 수행하였다.

총아미노산, 테아닌, 섬유소 함량 측정은 제작사의 매뉴얼에 따라 근적외분광 분석법(Foss, NIR Analyzer, Sweden)으로 분석을 하였다.

Table 3. HPLC conditions for analysis of acetone extraction compounds.

Parameter	Conditon
Column	YMC ODS AM 303 (250 x 4.6 mm)
Mobile phase	A : 0.1% Phosphoric acid – D.W. B : 100% MeOH
Wavelength UV detector	280 nm
Flow rate	1.0 mL
Injection volume	20 μ L
Oven temperature	30 $^{\circ}$ C

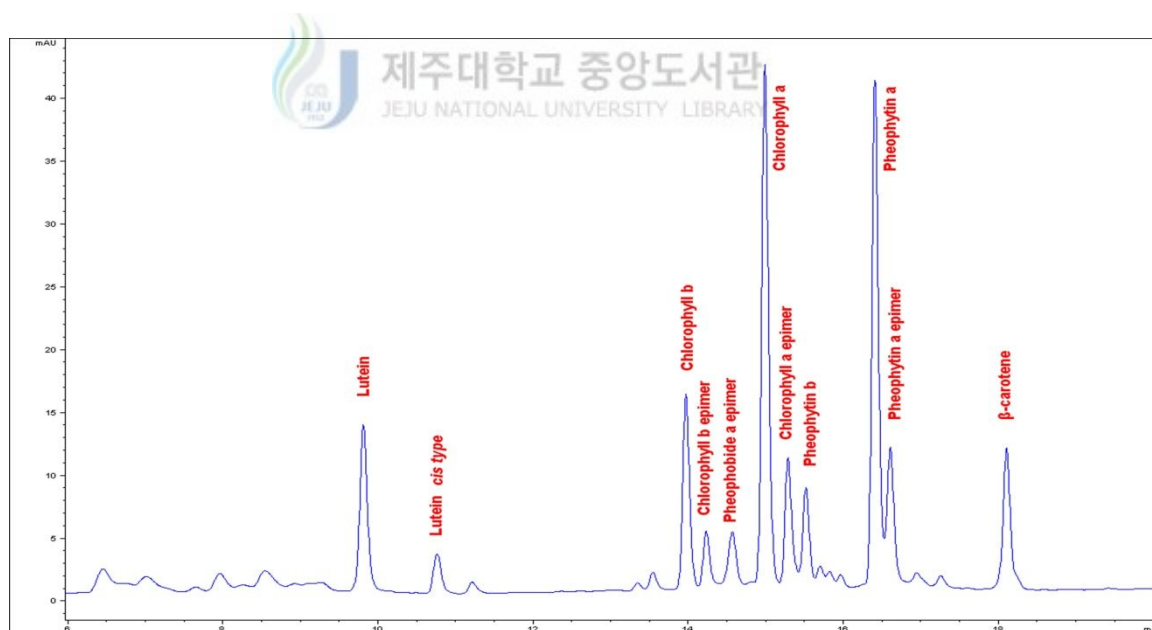


Fig. 5. HPLC chromatogram of acetone extraction compounds of tea leaves.

4. 생리활성 평가

1) 항산화 효능 평가

(1) DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거활성 검정은 Shimada 등(1992)에 의한 방법으로 검정하였다. 0.5 mM의 DPPH ethanol solution 1mL 와 2mL의 0.1 M acetate buffer 를 혼합하고 여기에 농도별($10-50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)로 EGCG3Me와 루테인이 고함유 된 차나무 신포중인 장원 3호와 장원 4호의 차잎 아세톤 추출물을 처리한 후 암 상태로 상온에서 30분 동안 정치하여 둔 후 UV-1200 UV/VIS spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 517 nm에서 흡광도로 측정하여 검정하였다. 양성 대조군으로는 $10-50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 의 α -tocopherol(VE)를 사용하여 비교하였다.



(2) Superoxide anion 소거활성

Superoxide anion 소거활성을 xanthine 및 xanthine oxidase의 반응에 의해 발생한 superoxide anion과 이들과 급속하게 반응하는 nitron spin trap인 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)를 이용하여 측정하였다. 즉, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 120 μL 에 농도별 시료, ascorbic acid 의 농도별 시료 각 20 μL , 3 M DMPO 20 μL , 10mM xanthine 20 μL , 0.25U xanthine oxidase 20 μL 를 첨가, 혼합하여 총량이 200 μL 가 되게 한 다음 실온에서 2분 20초간 방치하고, quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer (JES-FA ESR spectrometer, JEOL, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 시료에 대한 superoxide anion의 소거활성 계산은 처리구와 대조구의 signal intensity에 대한 평균 높이의 차이를 이용하여 아래의 공식에 의해 검정하였다.

$$\text{superoxide anion 의 소거활성: } [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100\%$$

(3) Hydroxyl radical 소거활성 검정

Hydroxyl radical 소거활성 검정을 위해 ESR을 이용한 hydroxyl radicals의 생성 저해활성을 검정하였다. Hydroxyl radicals 생성은 Fenton reaction($H_2O_2 + FeSO_4$)을 이용하였으며, hydroxyl radical과 급속하게 반응할 수 있는 DMPO를 사용하였다. 즉 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 루테인, 베타카로틴, ascorbic acid의 농도별 각 20 μ L, 0.3 M DMPO, 0.2 mL, 10 mM $FeSO_4$ 0.2 mL, 10mM H_2O_2 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR spectrophotometer (JES-FA ESR spectrometer, JEOL, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 시료에 대한 hydroxyl radical의 소거활성 계산은 처리구와 대조구의 signal intensity에 대한 평균 높이의 차이를 이용하여 검정하였다.

Hydroxyl radical 소거활성:

$$[(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) - (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})] / A_{\text{control}} - A_{\text{blank}} \times 100\%$$

2) 항암 효능 평가



Cancer cell line에 대한 세포증식 억제율을 검정하기 위하여 인간 폐암 세포주 A549, 위암 세포주 ACHN, 전립선암 세포주 LNCaP, 결장암 세포주 HCT-15, 유방암 세포주 MCF-7를 대상으로 차잎의 아세톤 추출물과 분리 클로로필, 베타카로틴 및 루테인을 농도별(200, 100, 50 μ g \cdot mL⁻¹)로 처리하고, MTT assay를 통해 cell viability를 검정하였다. 각 암 세포주를 96 well plate에 1×10^4 /well로 분주 후 시료를 농도별로 36시간동안 처리 하였다. 세포 생존율은 Cell Titer 96 non-radioactive cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI)를 통하여 검정하였다.

Tetrazolium compound MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]와 electron coupling reagent phenazine methosulfate(PMS)를 포함하는 혼합물 20 μ L를 각 well에 첨가하고 1시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양한 후 enzyme-linked immunosorbent assay plate reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 제다 방법 및 관능검사

첫물차 시기는 1심 5엽기에 1심 3엽 부위를 가반형 채엽기(Ochiai, V8X2, Japan)로 채취해 시료로 사용하였으며, 두물차 시기는 1심 4엽기에 1심 3엽 부위를 채취해 시료로 사용하여 불발효차, 반발효차, 발효차를 각각 제조하였다.

불발효차는 증열(50초) → 조유(40-50분) → 유념(25분) → 증유(30분) → 정유(40분) → 건조(80℃, 30분)의 조건으로 가공을 하였다. 반발효차는 일광 위조(60분) → 실내정치(120분) → 요청(3회) → 살청 → 유념(6분) → 건조(100℃, 15분) → 재건조(80℃, 15분)의 조건이었으며, 발효차는 위조(6-8시간) → 유념(1시간) → 발효(8시간) → 건조(80℃, 10분) → 재건조((80℃, 20분)의 조건으로 가공을 하였다.

제조된 시료는 은색 봉투에 질소로 충전 후 -76℃ 냉동고에 보관 후 관능 검사에 사용하였다. 차의 관능검사는 한국차생산자연협회의 품평기준에 따라(한국차 품질평가 기준설정 위원회, 2008) 관능심사 전문 교육을 받은 10명의 패널에 의하여 실시되었다. 관능심사는 먼저 형상 및 색택을 평가하고 시료 3g을 200mL의 백색 다완에 넣고 100℃물 150mL를 부은 직후 향기를 평가하였으며, 수색과 맛은 3분간 침출 후 평가하였다.

Table 4. Standard score of sensory test.

Appearance		Quality of liquor			Total
Shape	Color	Taste	Aroma	Color	
20	20	20	20	20	100

IV. 결과 및 고찰

1. 국내외 차나무 유전자원 의 생육특성

1) 차나무 유전자원의 잎 특성

국내외에서 수집된 차나무 유용자원 497 계통을 대상으로 잎의 일반특성을 검토하였다. 일반적으로 엽장은 수량과 상관도가 높으며, 엽장이 짧은 것 보다는 긴 잎이 수량성이 높다. 조사 결과 한국에서 수집된 차나무 유전자원의 경남, 하동, 전남지역이 엽폭의 평균은 각각 33.8 ± 8.1 , 24 ± 4.5 , 32.4 ± 2.7 mm, 엽장은 78 ± 12.7 , 53.3 ± 6.9 , 77.2 ± 3.5 mm 를 나타 내었다. 엽면적은 1885 ± 604.2 , 878.3 ± 83.8 , 1910.8 ± 149.1 mm² 로 하동지역의 차나무 유전자원의 잎의 크기가 다른 지역 보다 상대적으로 작았다. 이는 하동지역이 타 지역에 비해서 품종화된 다원조성이 많지않고 재래종으로 구성 되었으며, 인근의 차나무의 자생지에서의 인위적인 유전적 혼입이 적은 이유로 인하여 소엽종 특유의 잎 형질을 나타낸다고 할 수 있다. 스리랑카에서 수집된 차나무의 잎은 모두 한국의 차나무 유전자원 보다 약 2 배 정도 큰 결과를 보였다. 조사개체 중 최대 엽폭 및 엽장은 75 및 160mm 로 가장 큰 양상을 나타내었다(Table4, Fig. 6). 스리랑카 차나무 유전자원은 전형적인 대엽종의 특성을 나타내었으며 한국의 차나무 유전자원은 소엽종의 특성을 나타냈다. Park (2007)은 국내 재래종 집단 의 형태적 특성을 평가한 결과 평균 엽장은 71mm, 엽폭은 29mm 로 일본 도입품종 보다 엽장 및 엽폭이 좁았으며, 잎이 둥글면서 약간 뾰족한 소엽종의 형태라고 보고하였다. Je 등(2007)도 중국 복건성, 무이산 지역의 주요 품종(11 종)에 대하여 차나무 잎의 형태별 특성, 엽장, 엽폭, 엽면적, 생엽중, 건엽중을 조사하였는데 엽장은 품종별로 다소 차이가 있었으며 평균 엽장은 55.7mm, 엽폭은 24.3mm 으로 품종간 차이가 컸다고 하였다.

본 실험에서도 한국 및 스리랑카의 유전자원의 잎의 엽폭은 19.8-75mm 의 범위를, 엽장은 35.5-160mm, 엽면적은 660-8400mm² 로 매우 다양한 변이를

나타내었으며, 이는 엽면적은 차나무 수량의 구성요소로서 향후 다수성 차나무
신품종 개발을 위한 유용 육종소재로 활용이 가능하리라고 판단된다.

차에서 수색의 차이는 엽록소 함량에 따라 달라지는데 엽록소 함량이 많으면
많을수록 수색이 녹색을 띠며 품질이 좋은 쪽으로 분류된다. 엽록소 함량의
상대적 비교치인 SPAD 값은 51.3-82.3 의 변이를 보였으며 수집지역간에 큰
차이가 없이 대체적으로 고루 분포 하는 양상을 나타내었다(Table 5, Fig. 7).



Table 5. Characteristics of tea leaves of collected tea plant germplasms.

	Germplasm collected region and scession No.	Leaf width	Leaf length	Leaf area	Chlorophyll (SPAD)
Korea	Gyeongsangnam-do (n=79)	33.8±8.1 ^z	78±12.7	1885±604.2	64±4.7
	Hadong (n=93)	24±4.5	53.3±6.9	878.3±83.8	66±4.1
	Jeollanam-do (n=86)	32.4±2.7	77.2±3.5	1910.8±149.1	65±2.3
Sri Lanka	Dimbula (n=45)	65.1±7.2	135.9±14.6	6190.3±986.1	63±3.2
	Nuwara Eliya (n=81)	66.8±6.2	133.2±16.3	6238.6±1056	61±4.2
	Uva (n=62)	65.7±5.6	132.3±15.2	6097.7±993.8	60±3.8
	Kandy (n=51)	67.1±5.9	134.3±15.8	6325.3±1044.2	61±4.9

^z Mean±SD (n=497).



Fig. 6. Leaf characteristics of selected tea plant lines.



Fig. 7. Measuring chlorophyll contents in tea shoots of collected tea germplasms using SPAD.

차나무의 조만성은 재배농가에서의 첫물차에대한 소득, 작업량 및 녹차의 가공기간을 결정하는 중요한 형질이라 할 수 있다. 중생종인 야부기다의 맹아기(3 월 25 일)를 중심으로 하여 조만성을 비교한 결과 전체 유전자원 중에서 조생종이 18%, 중생종이 45%, 만생종이 37%로 조사되어 수집 유전자원 중 중생종과 만생종이 전체의 82%를 차지하는 것을 알 수 있다(Tbale 6, Fig. 8).

Table 6. Sprouting time of collected tea germplasms in Korea and overseas.

Sprouting Time	Early	Mid	Late	Total
No. of Germplasms	89	224	184	497
Ratio(%)	18%	45%	37%	100%



Early sprouting



Mid sprouting



Late sprouting

Fig. 8. Different sprouting patterns of collected tea germplasms.

2) 차나무 유전자원에서의 기능성 성분 탐색

(1) 차나무 잎 아세톤 추출물의 HPLC 특성 분석

차나무 잎 아세톤 추출물에 함유된 화합물의 조성을 확인하기 위해 역상 조건에서의 HPLC로 아세톤 추출물을 분석하여 크로마토그램을 비교하였다(Fig. 9). 그 결과 머무름시간(Rt.) 30 분 동안 총 25 종의 성분이 검출되었고, 이들 중 peak area가 비교적 커 주요물질로 평가되는 물질은 약 11종으로 평가되었다.

이들 11종의 주요성분 중 HPLC 분석결과 전, 후의 물질과 분리도가 비교적 양호하고, 함량이 높은 성분에 대해서는 column chromatography를 실시하여 순수분리를 시도하고, 기타 소량이 존재하거나 전, 후의 물질과 분리도가 불량한 성분에 대해서는 online-HPLC-DAD-MS 동정법을 사용하여 구조 확인을 시도하였다.

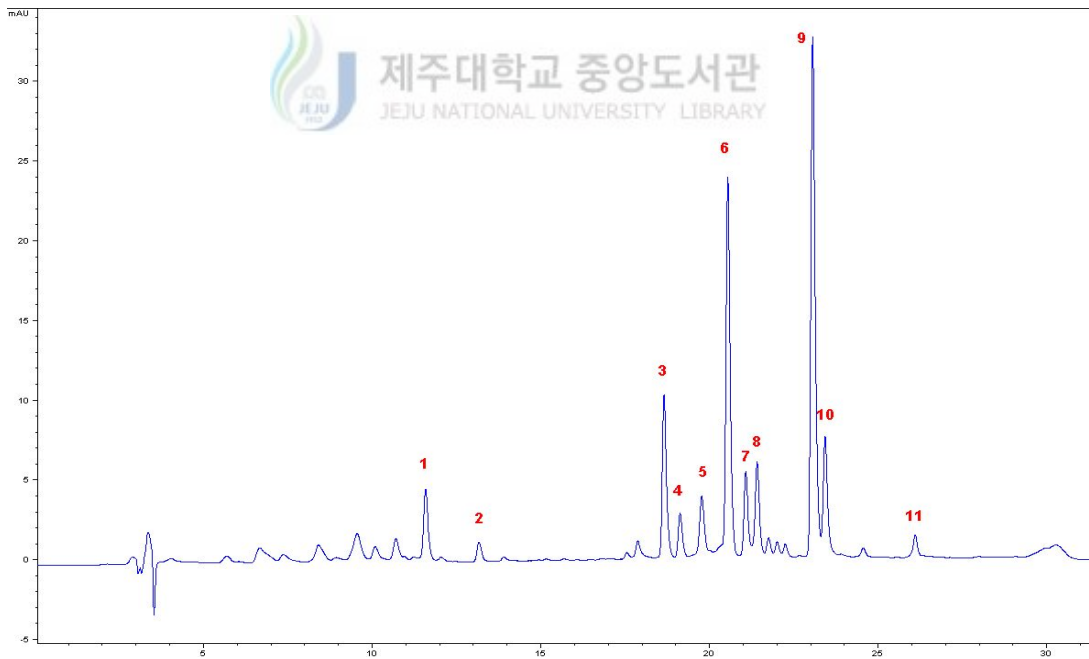


Fig. 9. HPLC chromatogram of major compounds of acetone extraction in tea leaves.

(2) 성분 분리를 위한 open column chromatography

차나무 잎 함유 유용성분의 분리를 위해 여러 종류의 컬럼 resin 을 대상으로 분리 실험을 수행한 결과 silica gel 및 sucrose resin 을 사용할 경우 성분의 화학적 변성이 유도되어 용액 분리 중 클로로필계로 판단되는 성분들이 검은색으로 산화, 변성되는 양상을 나타내었다. C18 resin 의 사용 시 분리 화합물의 변성도 유도되지 않으며, 극성에 따른 분리가 가장 양호한 양상을 나타내어 open column chromatography 의 resin 으로 C18 을 사용하여 차나무 잎 함유 클로로필계 및 카로티노이드계 성분의 분리를 하였다.

C18 open column chromatography에서 50%MeOH : EtoAC 용액의 농도구배를 이용한 stepwise 방식으로 클로로필계 및 카로티노이드계 성분의 분리를 시도한 결과 황색, 갈색 및 녹색계열의 색소를 함유하고 있는 주요 분획을 분리할 수 있었으나, 순도가 높지 않아 이들 분획을 대상으로 고순도 분리를 수행하였다.

C18 open column 에서 분리된 주요 분획물을 대상으로 semi-preparative HPLC 를 이용하여 고순도 분리를 수행한 결과 황색 및 녹색을 나타내는 fraction 에서 상대순도 92-98% 수준의 3 종 색소를 고순도로 분리하였고(Fig. 10), 갈색의 분획물에서는 semi-preparative HPLC 분리에서도 peak 가 중첩되어 나오는 등 양호한 분리양상이 도출되지 않았다.

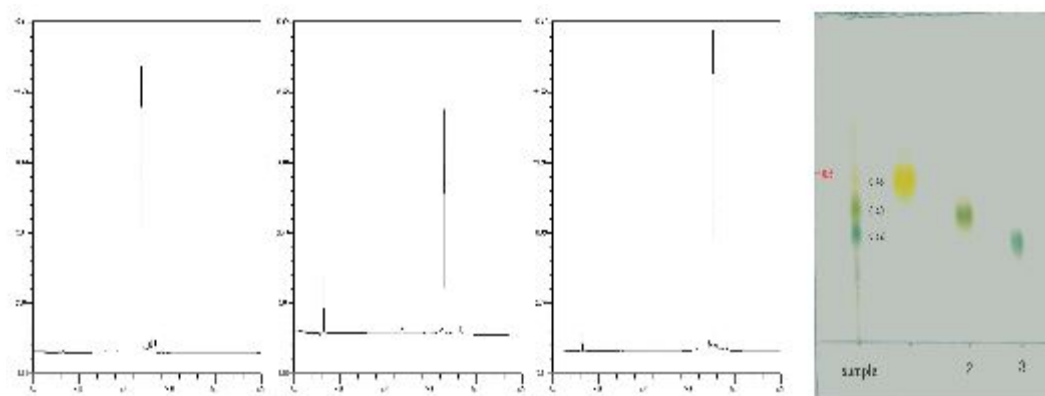


Fig. 10. Purity of separated extraction in RP-HPLC and TLC. Compound 1, yellow; compound 2, green; compound 3, green.

(3) 차나무 잎 함유 분리 화합물의 화학적 구조 동정

화합물 1 (peak 1) 의 화학적 구조 검정을 위하여 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) 스펙트럼 측정한 결과 스펙트럼은 Fig. 11 과 같았다. 화합물 1 의 질량분석 및 UV-VIS. 스펙트럼 분석 결과 MS (Fab-high resolution) 분석은 $m/z = 569.3$ 의 값을 나타냈으며, UV-VIS. 스펙트럼 특성은 λ (nm) = 426, 448, 476 의 결과를 보였다. 화합물 1 의 $^1\text{H-NMR}$, 질량분석 및 UV-VIS. 스펙트럼을 종합적으로 분석한 결과 황색을 나타내며, 화학식이 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2 = 569.3$ 인 (*all-trans*)-lutein 으로 동정 되었다.

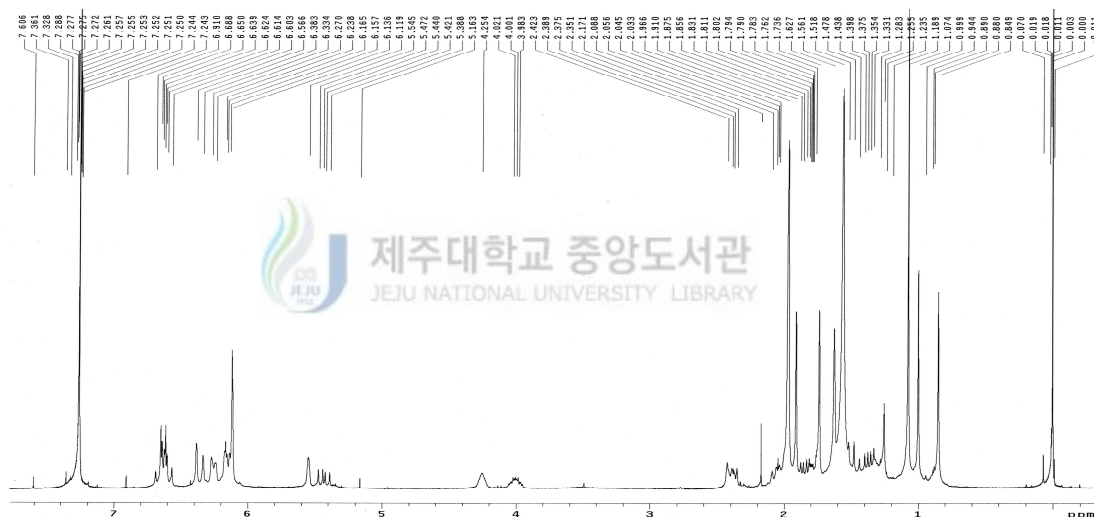


Fig. 11. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) spectrum of compound 1 .

Table 7. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) data of compound 1.

Position	δ_{H}	Position	δ_{H}
1		1'	
2	ax 1.48 (m)	2'	ax 1.38 (dd, 13, 7)
	eq 1.79 (m)		eq 1.86 (m)
3	4.00 (m)	3'	4.25 (m, br)
4	ax 2.05 (m)	4'	5.55 (m, br)
	eq 2.38 (m)		
5		5'	
6		6'	2.42 (d, 9.5)
7	6.12 ov ^z	7'	5.44 (dd, 15.5, 10.1)
8	6.12 ov ^z	8'	6.15 ov ^z
9		9'	
10	6.17 ov ^z	10'	6.14 ov ^z
11	6.63 (dd, 14.3, 11.4)	11'	6.61 (dd, 15.0, 11.4)
12	6.36 (d, 14.7)	12'	6.36 (d, 14.7)
13		13'	
14	6.25 (m)	14'	6.25 (m)
15	6.65 (m)	15'	6.65 (m)
16	1.07 (s)	16'	1.00 (s)
17	1.07 (s)	17'	0.85 (s)
18	1.74 (s)	18'	1.63 (s)
19	1.97 (s)	19'	1.91 (s)
20	1.97 (s)	20'	1.97 (s)

^z ov : overlapped by other signals.

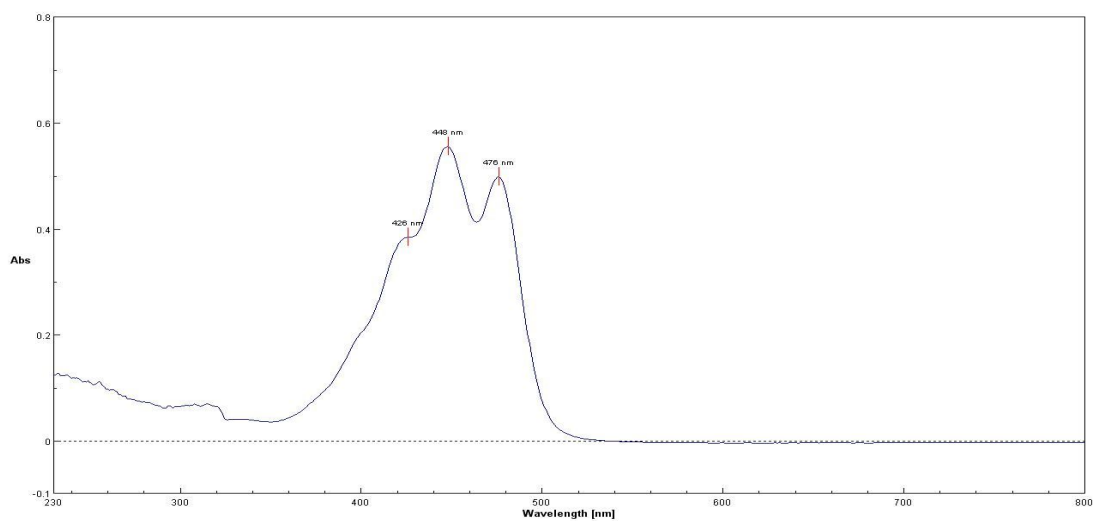


Fig. 12. UV-VIS. Spectrum of compound 1.

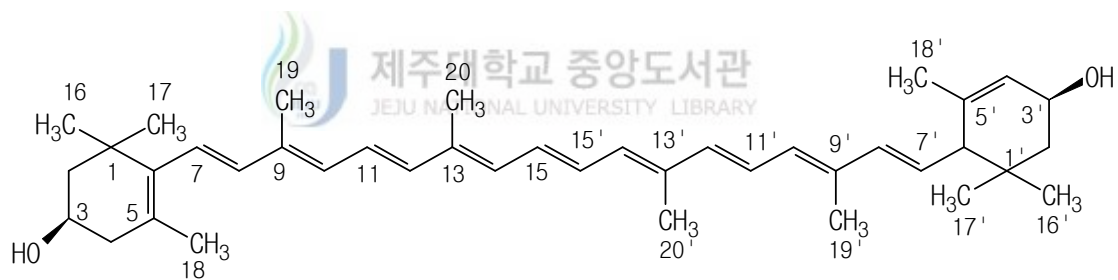


Fig. 13. Chemical structure of compound 1.

화합물 2(peak 2)와 화합물3(peak 3)의 화학적 구조 검정을 위하여 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) 스펙트럼 측정한 결과 스펙트럼은 Fig. 14, 15와 같았다. 화합물 2의 질량분석 및 UV-VIS. 스펙트럼 분석 결과 MS(Fab-high resolution) 분석은 $m/z = 907.5$ 의 결과를 나타냈으며 UV-VIS. 스펙트럼 특성은 λ (nm) = 432, 456, 596, 645 이며, R = CHO($\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{MgN}_4\text{O}_6$)를 나타내었다. 화합물 3의 질량분석 및 UV-VIS. 스펙트럼 분석 결과 MS(Fab-high resolution) 분석은 $m/z = 893.5$, UV-VIS. 스펙트럼 특성은 λ (nm) = 381, 411, 430, 577, 615, 662 이었으며, R = CH_3 ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5$)를 나타내었다 (Fig. 16, 17).



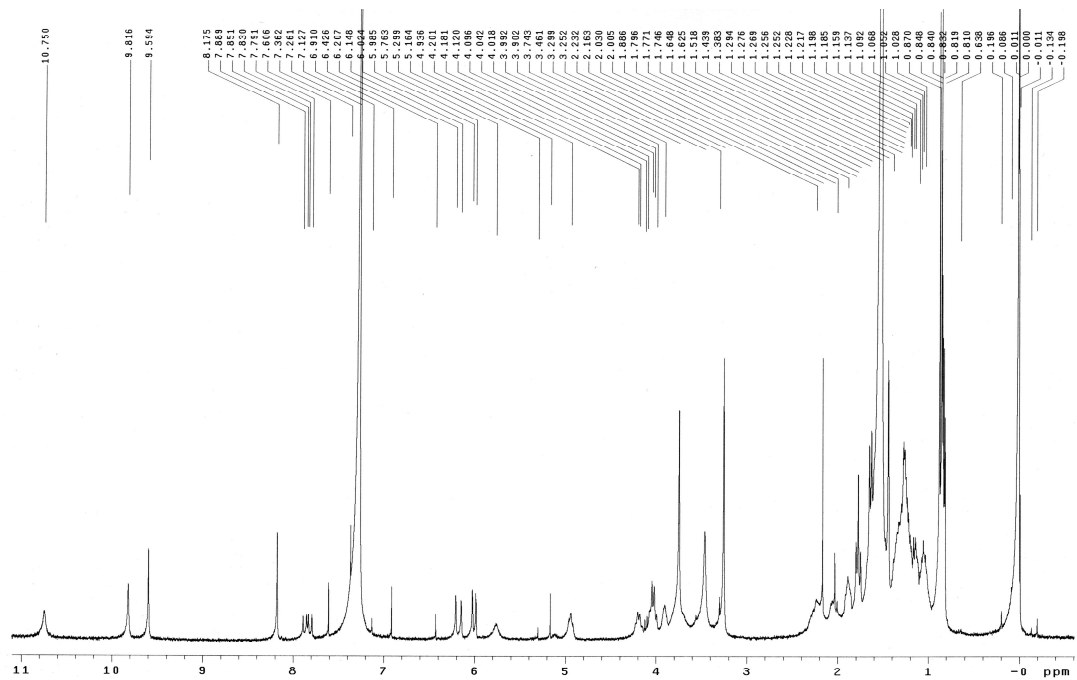


Fig. 14. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) spectrum of compound 2.

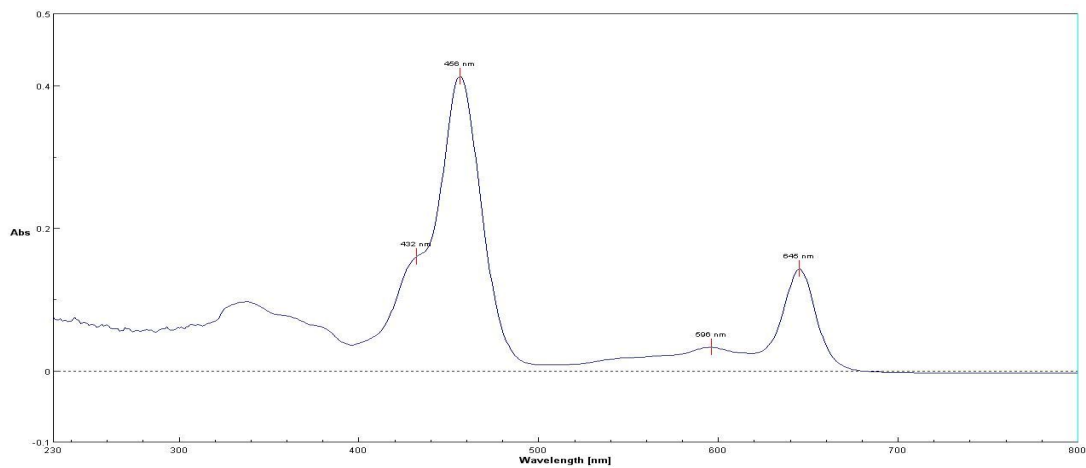


Fig. 15. UV-VIS. Spectrum of compound 2.

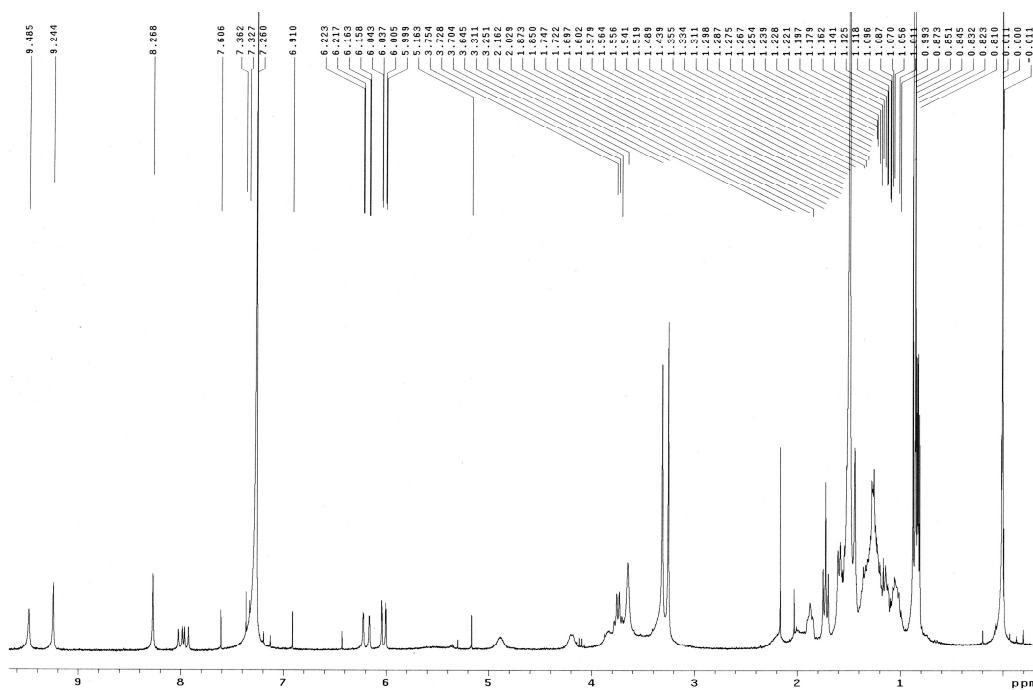


Fig 16. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) spectrum of compound 3.

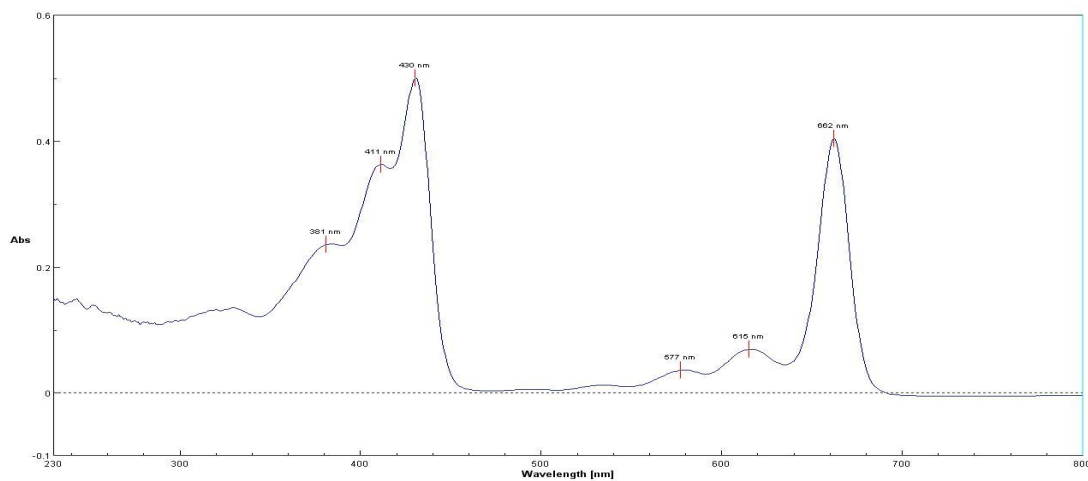


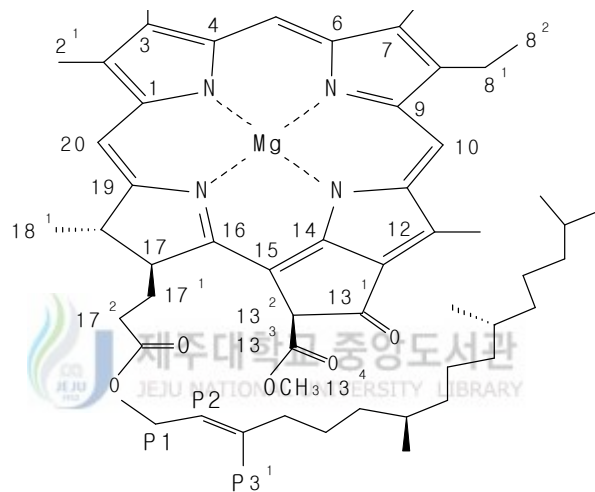
Fig. 17. UV-VIS. Spectrum of compound 3.

Table 8. ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) data of compound 2 and 3.

Position	Pigment 2 (δ _H)	Pigment 3 (δ _H)
2 ¹	3.25 (s)	3.25 (s)
3 ¹ (H _X)	7.84 (m)	7.98 (m)
3 ² (H _{cis})	6.00 (dd, 11.7, 1.8)	6.02 (dd, 11.4, 1.8)
3 ² (H _{trans})	6.18 (dd, 15.6, 1.8)	6.19 (dd, 15.5, 1.8)
5	9.59 (s)	9.24 (s)
7 ¹	10.75 (s)	3.25 (s)
8 ¹	4.03 (d, 7.2)	3.65 (s)
8 ²	1.77 (m)	1.72 (m)
10	9.82 (s)	9.49 (s)
12 ¹	3.46 (s)	3.31 (s)
13 ²	6.43 (s)	6.43 (s)
13 ⁴	3.74 (s)	3.74 (m)
17	4.18 (m)	4.12 (m)
17 ¹ , 17 ²	1.89 – 2.16 ov ^z	1.85 – 2.16 ov ^z
18	4.20 (m)	4.20 (s, br)
18 ¹	1.64 (m)	1.58 (m)
20	8.18 (s)	8.27 (s)
P1	4.94 (m, br)	4.89 (m, br)
P2	5.76 (m, br)	5.36 (m)
P3 ¹	1.44 (s)	1.44 (s)
P4	1.89 (m)	1.87 (m)
P5 – P16 (Phytol)	0.81 – 1.38 ov ^a	0.81 – 1.36 ov ^a

^z ov : overlapped by other signals.

화합물 2 및 3의 $^1\text{H-NMR}$, 질량분석 및 UV-VIS. 스펙트럼을 종합적으로 분석한 결과 분리화합물 2는 진녹색을 나타내며, 화학식이 $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{MgN}_4\text{O}_6 = 907.5$ ($\text{R}=\text{CHO}$)인 chlorophyll b로 동정 되었고, 분리 화합물 3은 청녹색을 나타내며, 화학식이 $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5 = 893.5$ ($\text{R}=\text{CH}_3$)인 chlorophyll a로 동정 되었다.



$\text{R} = \text{CH}_3$, Chl a

$\text{R} = \text{CHO}$, Chl b

Compound 2 : $\text{R} = \text{CHO}$ ($\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{MgN}_4\text{O}_6$, Chlorophyll b)

Compound 3 : $\text{R} = \text{CH}_3$ ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5$, Chlorophyll a)

Fig. 18. Chemical structures of compound 2 and 3.

차나무 잎 아세톤 추출물의 HPLC 분석결과 주요 peak 인 1 번, 3 번 및 6 번 peak 는 open column chromatography 및 semi-preparative HPLC 방법에 의해 순수분리가 가능하여 각각 분리 후 NMR, MS 및 UV-VIS. spectrometric 방법을 이용하여 화학적 구조를 동정하였다. 그러나 차나무 잎의 아세톤 추출물은 이들 성분 외에도 중요하게 판단되는 기타 화합물이 8 종 더 존재하였으므로, 이들 화합물은 순수분리에 의한 화학구조 동정이 불가능하여 online HPLC-DAD-MS 분석에 의한 흡광특성 혹은 질량분석을 통해 화학적 구조를 동정하였다. 그 결과 이들 성분들은 chlorophyll a epimer 를 포함한 8 종의 화합물로 추가 동정할 수 있었으며, 이들 성분은 황색을 나타내는 카로티노이드계 2 종, 클로로필계인 녹색을 나타내는 클로로필 유도체 및 갈색을 나타내는 페오피틴 화합물 6 종을 신규로 동정하였다.

이들 성분은 주로 불용성 성분으로 기존의 차를 물에 우려서 마시는 전통적인 기호식품으로 음용시에는 용출이 되지 않아 주목받지 못하였던 성분으로서 본 실험결과 다양한 성분들이 존재하고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이들 성분들은 기존의 차나무 품종개발에서는 전혀 고려 되지 않았던 성분으로 향후 새로운 건강 기능성에 대한 효능 발굴과 더불어 신규 고기능성 품종개발을 위한 유용한 자료로 활용 될 것으로 판단된다.

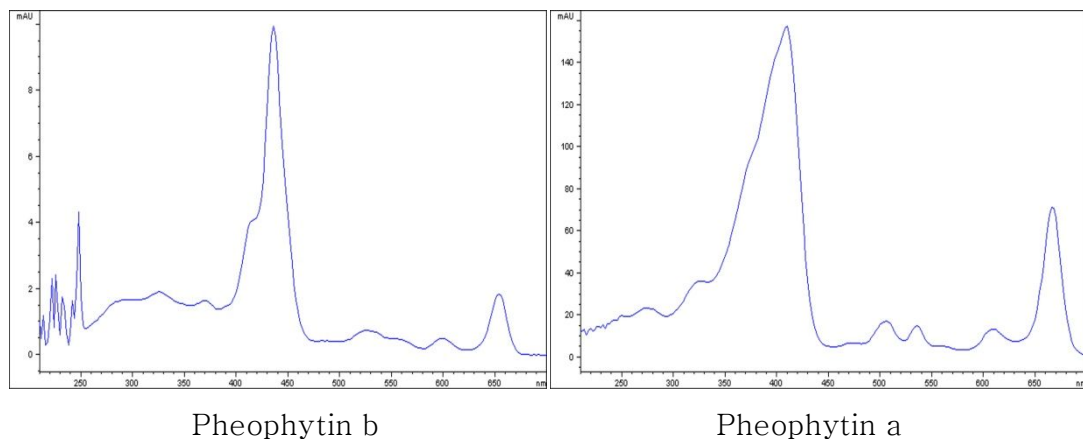


Fig. 19. Spectrum of tea leaves extraction in online HPLC-DAD.

Table 9. The identification of compounds in tea leaves by online HPLC-DAD-MS.

Peak	Compound	Rt.	Online HPLC λ_{max} .(nm)	LC-MS (m/z, M+H)
1	(<i>all-trans</i>)-lutein	9.90	422, 446, 474	569
2	lutein- <i>cis</i> type	10.84	419, 442, 470	
3	chlorophyll b	14.09	462, 598, 648	907
4	chlorophyll b epimer	14.35	460, 600, 649	
5	pheophobide a epimer	14.68	424, 618, 664	
6	chlorophyll a	15.10	414, 432, 582, 616, 664	894
7	chlorophyll a epimer	15.39	414, 432, 582, 618, 664	
8	pheophytin b	15.63	414, 436, 598, 654	886
9	pheophytin a	16.52	410, 505, 535, 608, 665	872
10	pheophytin a epimer	16.71	410, 505, 536, 608, 668	
11	β -carotene	18.21	452, 476	538

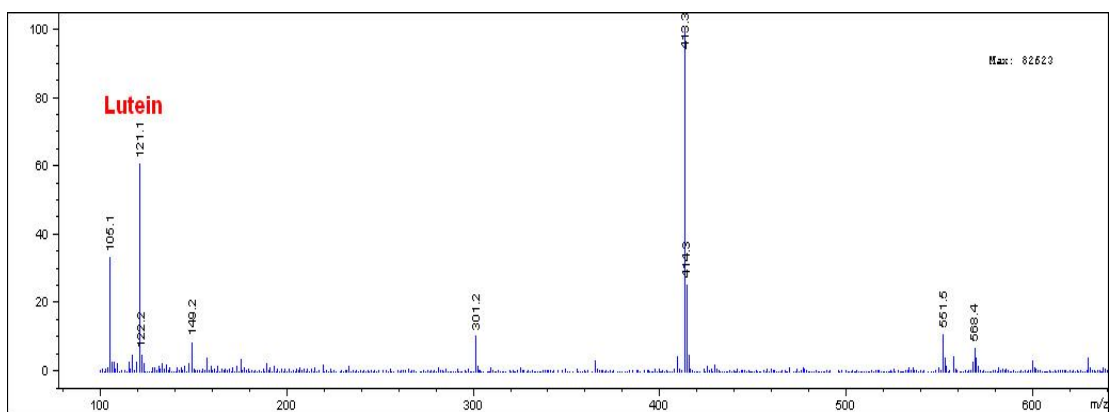


Fig. 20. Lutein peak of tea leaves in LC-MS spectrum.

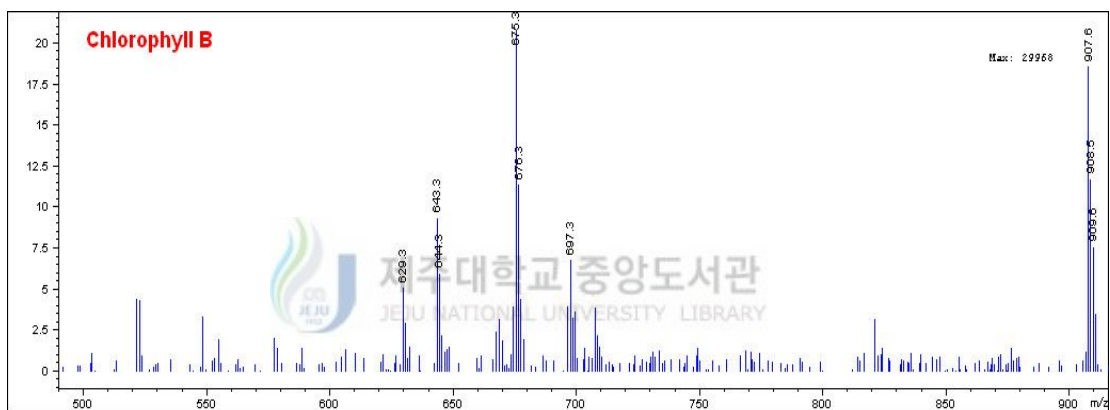


Fig. 21. Chlorophyll b peak of tea leaves in LC-MS spectrum.

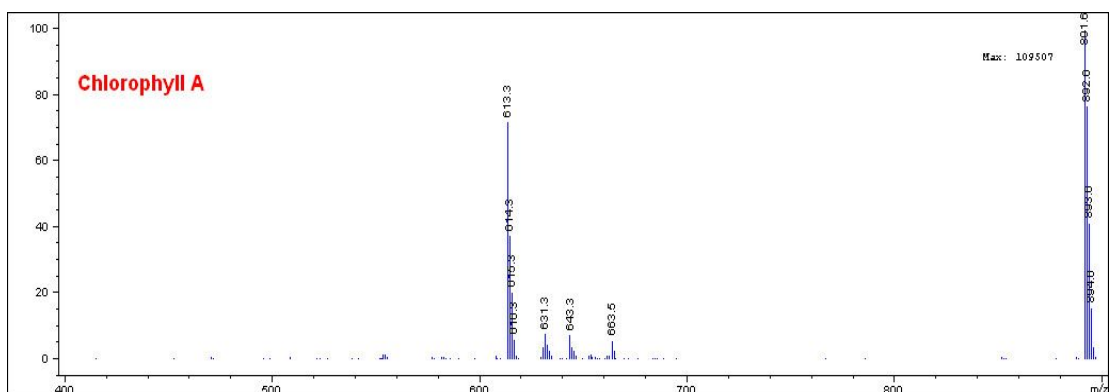


Fig. 22. Chlorophyll a peak of tea leaves in LC-MS spectrum.

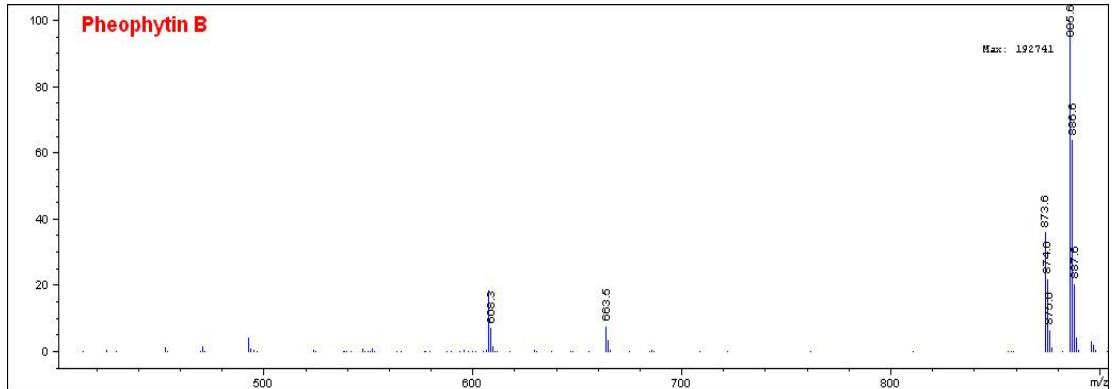


Fig. 23. Pheophytin b peak of tea leaves in LC-MS spectrum.

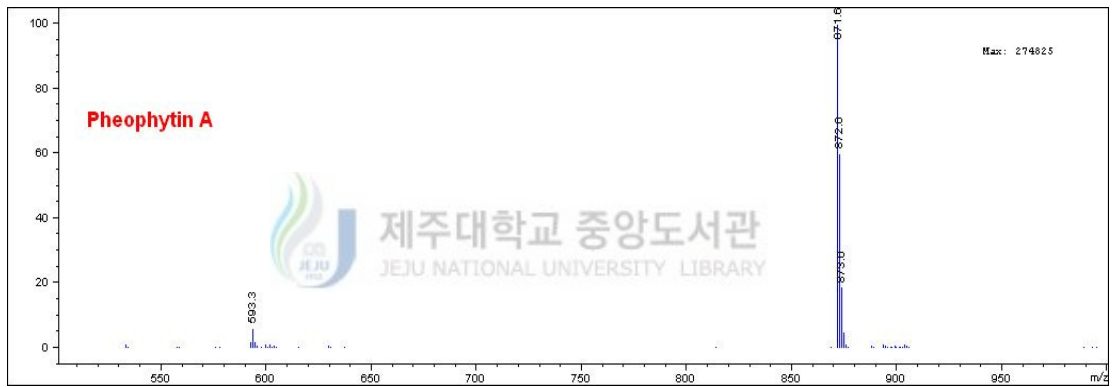


Fig. 24. Pheophytin a peak of tea leaves in LC-MS spectrum.

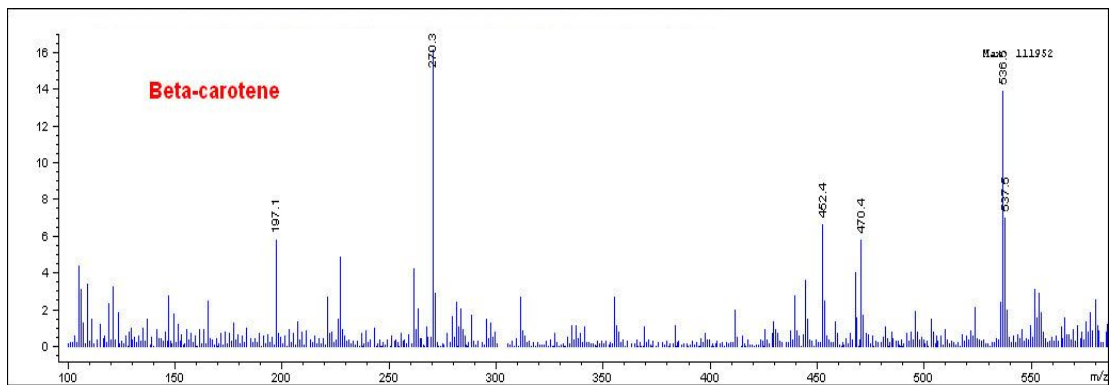


Fig. 25. β -carotene peak of tea leaves in LC-MS spectrum.

(4) 수집 차나무 유전자원의 기능성 성분 변이

가. 카테킨 및 카페인

국내외 차나무 수집 유전자원 497계통을 대상으로 총 9종의 카테킨 및 카페인 함량을 HPLC를 이용하여 정량적으로 평가하였다. 그 결과 국내외 유전자원 전체적으로는 카페인 함량이 $6.26-34.64 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 범위로 존재하였으며, 총 카테킨 함량은 $50.67-147.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 최소함량 자원과 최대함량 자원 간에 약 3배의 함량차이가 있어 역시 유전자원의 함량 다양성이 있음을 알 수 있었다. 신규 카테킨 화합물인 EGCG3Me는 전혀 존재하지 않는 자원부터 최대 $6.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 까지 존재하여 수집 유전자원 간에 함량의 분포가 극단적이었으며 대부분의 유전자원에서 검출되지 않았다.

한국의 차나무 유전자원중 카페인 함량은 경남이 $23.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 하동 $23.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 전남 $21.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 로 경남과 하동 지역의 유전자원이 전남지역보다 높은 평균 함량을 나타내었다. 총 카테킨의 함량도 경남과 하동 지역이 $119.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $115.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 로 전남 지역 $103.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 보다 높은 특성을 나타내었다(Table 10). 스리랑카에서 수집한 유전자원의 카테킨과 카페인 함량이 한국의 유전자원 보다 모든 지역에서 성분 함량이 높게 나타났는데 이는 한국의 차나무의 특성이 중국, 일본과 같은 소엽종이고 인도 스리랑카의 차나무는 교목성의 특성을 나타내고 카테킨 함량이 높다는 결과와 유사하였다(박 등, 2001; 정 등, 2005; Takeda, 2007).

차나무 잎의 수용성 성분중 가장 대표적인 기능성 성분은 폴리페놀류의 성분이며 그중 카테킨이 주성분으로 알려져 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 차의 쓴맛과 수렴성의 주체로 알려져 있는 탄닌 성분의 본체는 카테킨류의 혼합물이다. 또한 카페인은 차를 약용으로 또는 기호음료로 오랫동안 마시게한 핵심 성분이며 뜨거운 물에 잘 우려나오고 쓴맛을 낸다(송 등, 2006).

차나무 유전자원에 함유된 카테킨의 평균적 함량비율을 살펴보면 EGCG가 52.1%로 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 EGC가 24.6%, ECG가 11.4%, EC가 8.2%를 나타내어 이들 4종의 카테킨 화합물이 전체의 96.3%를 차지하는 양상을 나타내었으며, 신규 기능성을 나타내는 EGCG3Me는 전체 평균 함량의 0.7% 수준으로 극히 낮은 비율 분포를 나타내는 것으로 조사되었다. 이

등(2008)에 의하면 국내 차나무 유전자원의 총 카테킨 함량을 조사한 결과 11.54-15.07%의 함량 범위를 나타내었으며, 평균 13.46%를 나타내었다고 했다. 또한 카페인의 함량은 2.82-4.23% 범위로 존재하여 유전자원의 변이가 비교적 다양 하여 신품종 차나무 육종 소재로서의 가치가 높다고 하였다.

본 실험에서도 유전자원의 카테킨, 카페인 함량 변이가 다양하게 분포를 하였으며 이는 향후 고 기능성 차나무 품종개발을 위한 육성소재로 유망하다고 판단된다. 특히 카테킨의 경우 한국의 유전자원 보다는 스리랑카의 유전자원에서 함량이 높은 자원이 다수 분포하기 때문에 해외 유전자원의 적극적인 활용이 필요하다고 생각된다.



Table 10. Caffeine and catechin contents ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of collected tea germplasm in Korea and overseas.

Germplasm collected region and accession No.	Caffeine	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	EGCG3Me	ECG	Total catechin
Gyeongsangnam-do (n=79)	23.8±1.5 ^z	0.1	0.8±1.0	27.8±1.8	0.5±0.1	63.5±2.7	10.3±0.7	3.0±0.7	0	13.3±0.7	119.3±6.2
Korea Hadong (n=93)	23.9±5.0	0.2±0.1	0.7±0.3	22.5±6.1	0.7±0.5	64.8±13.1	8.8±2.9	2.0±1.3	2.8±1.6	15.5±3.8	115.7±13.4
Jeollanam-do (n=86)	21.3±4.1	0.3±0.2	0.9±0.8	22.8±6.4	0.7±0.5	54.8±6.9	8.4±2.5	2.4±0.9	1.3±0.6	12.9±3.8	103.5±3.9
Dimbula (n=45)	26.5±3.4	0.2±0.1	1.9±1.8	33.4±7.6	0.7±0.6	80±10.7	15.5±24.5	2.4±0.9	0.9±2.1	16.1±6.4	152.3±27.3
Sri Lanka Nuwara Eliya (n=81)	24.1±2.7	0.2±0.1	2.8±2.2	30.6±6.2	0.9±0.5	85.9±15.5	11.0±2.9	2.0±0.8	1.6±3.3	21.6±7.9	158.7±25
Uva (n=62)	26.3±4.2	0.2±0.2	1.7±1.1	31.3±7.8	0.7±0.5	82±12.2	10±3.0	2.1±1.1	1.8±2.7	18.2±6.0	149±12.7
Kandy (n=51)	24.3±3.5	0.2±0.1	1.9±1.6	29.3±8.9	0.7±0.4	73.1±9.8	9.0±2.3	2.1±0.9	0.3±3.0	14.7±4.8	133.2±9.7

^z Mean ± SD (n=497).

나. 루테인, 베타카로틴, 클로로필, 페오피틴

국내외 차나무 수집 유전자원 497 계통을 대상으로 6 종의 클로로필계 및 카로티노이드 성분의 함량을 HPLC 를 이용하여 정량적으로 평가한 결과 루테인 99.4-555.8 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 클로로필 a 18.8-4,096.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 클로로필 b 187.9-1,111.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 페오피틴 a 317.6-3,745.9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 페오피틴 b 25.5-407.2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 베타카로틴 126.4-1,593.8 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 범위로 존재하여 국내외 수집 유전자원 간에 클로로필계 및 카로티노이드계 화합물 함량의 다양성도 크게 존재하는 것으로 조사되었다.

국내외 차나무 유전자원에 함유된 클로로필계 및 카로티노이드계 성분의 함량 비율을 살펴보면 페오피틴 a가 39.1%로 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 클로로필 a 32.3%, 클로로필 b 11%, 베타카로틴 8.8%, 루테인 5.6% 및 페오피틴 b 3.2%의 순으로 존재하였고, 이들 성분 중 클로로필계 4종의 화합물이 전체의 85.6%를 차지하는 양상을 나타내어 녹차의 수색에 관여하는 클로로필계 화합물이 신규 가능성을 나타내는 물질에서도 주요한 부분을 차지하고 있는 것으로 확인되었다.

지역별로는 루테인 함량은 경남이 272.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 가장 낮았고, 전남 지역이 538.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 가장 높았으며, 스리랑카는 각지역별로 Dimbula 531.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Nuwara Eliya 411.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Uva 438.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Candy 509.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 를 나타냈다(Table 11). 베타카로틴 함량은 하동이 739.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 전남이 735.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 로 스리랑카의 Dimbula 675 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Nuwara Eliya 520.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Uva 554.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Candy 650.9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 보다 높았다. 이는 소엽종으로 분류되는 한국의 차나무 유전자원들이 대엽종인 스리랑카의 유전자원보다 루테인과 베타카로틴 함량의 분포에서 보다 높은 함량과 다양한 유전적 변이를 나타낸다고 할 수 있다.

Table 11. Contents ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) of lutein, chlorophyll, pheophytin, β -carotene of collected tea germplasms in Korea and overseas.

Germplasm collected region and accession No.	Lutein	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Pheophytin b	Pheophytin a	β -carotene
Gyeongsangnam-do (n=79)	272.5±25.3 ^z	183.7±26.6	129.5±86.8	14.9±6.3	455±146.7	279±50.3
Korea Hadong (n=93)	515.5±212	310.8±132.1	1331.8±850.5	75.5±31.9	1221.5±460.8	739.1±334.3
Jeollanam-do (n=86)	538.6±163.1	316.6±129.1	1244.8±902.1	87.5±38.4	1240.3±490.2	735.5±289.2
Sri Lanka Dimbula (n=45)	531.3±141.4	379.9±132.4	1503.2±891.6	103.3±41.9	1657.2±549.6	675±273.5
Nuwara Eliya (n=81)	411.3±209.7	270.7±154.4	771±989.7	122.6±96.9	1459±701	520.1±301
Uva (n=62)	438.3±198.3	323.4±141	1123.3±825.9	101.9±51.6	1560.9±628.1	554.7±328
Kandy (n=51)	509.1±186.9	347.1±138.6	1261.5±921.2	110.7±52.8	1601.6±611.2	650.9±311.9

^z Mean ± SD (n = 497).

다. 테아닌과 아미노산

수집 후 증식중인 국내외 차나무 수집 유전자원 497계통을 대상으로 NIRs(근적외분광분석기)를 이용하여 테아닌, 아미노산의 함량을 평가하였다. 그 결과 테아닌은 0.49-3.07%, 총 아미노산은 0.71-4.79%, 범위로 존재하였으며, 수집 지역별로는 전남지역이 $1.79 \pm 0.21\%$ 로 하동의 $1.53 \pm 0.36\%$, 경남의 $1.42 \pm 0.31\%$ 보다 높았다. 아미노산 역시 전남지역이 $3.91 \pm 0.36\%$ 로 가장 높은 함량을 나타냈다. 스리랑카는 Dimbula 지역의 테아닌과 아미노산 함량이 각각 $1.13 \pm 0.29\%$ 와 $2.95 \pm 0.39\%$ 로 높게 나타났으며 테아닌의 함량과 아미노산의 함량이 정의 상관관계를 가지며 유전자원간에 분포를 하는 것을 알 수 있다. 실험 결과 국내외 수집 유전자원 간에 테아닌과 아미노산 성분함량의 다양성이 존재하는 것으로 조사되었다.

또한 김(2008)은 해외 도입 녹차 품종의 아미노산 함량이 1심 1엽기에는 사에미도리, 야부기다, 오푸미도리가 각각 4.1%, 4.0%, 3.8%로 유타카미도리 3.2%, 후순 3.1%에 비해 높은 함량을 나타냈으며 생육 후기인 1심 5엽기에서도 사에미도리가 1.2%로 가장 높은 함량을 보였다고 하였다. 본 실험에서 유전자원에서의 최대 함량은 1심 3엽기에 4.79%로 총 아미노산함량이 차잎에서 가장 높은 시기인 1심 1엽기의 도입 녹차 품종보다 높은 결과를 나타 내고 있기에 차나무 신품종 육성을 위한 유전자원으로서의 가치가 매우 높다고 할 수 있다.

차 잎에서 총 아미노산함량은 차의 감칠맛을 내는 주성분으로 고품질의 녹차 제품을 평가하는 주요 성분기준으로 제시되고 있다(Kim 등, 2007; Toshihiro 등, 1992; 中川 등, 1981). Kato 등(1971)은 아미노산 함량이 많고 탄닌 함량이 적당한 차가 좋은 맛을 나타내며 아미노산은 품종간, 또는 차나무의 수확시기에 따라 차이가 나타난다고 하였다(Nakagawa 등, 1977; 오 등, 1998).

테아닌은 차의 아미노산 중 가장 많은 함량(40-60%)을 나타내고 있으며 차의 독특한 감칠맛과 향미 성분의 주체로서 차의 품질과 밀접한 관계가 있는 성분으로 다른 작물들에서 거의 발견되지 않고 차나무의 잎에만 함유되어 있다(Mukai 등, 1992; Shimada 등, 1996; 中川 등, 1981). 뿐만 아니라 사람의 뇌파 가운데 안정감을 느끼게 하는 알파(α)파의 발생을 증가시켜 집중력을 강화하며, 면역력증강작용, 혈중 콜레스테롤을 저하, 스트레스 해소, 집중력 강화 등의 효능이 밝혀지고 있다(Tetsuhisa 등, 1993; 武田, 2008).

본 실험결과 국내에서 수집된 유전자원에서는 테아닌이 2.5% 이상 고 함유된 자원이 다수 분포하였으며, 특히 모든 지역의 테아닌과 아미노산 평균이 스리랑카 보다 높았는데 이는 향후 고 아미노산, 고 테아닌 품종 육성을 위해서는 소엽 중에 속하는 국내 유전자원을 활용하는 것이 보다 효율적인 것으로 판단되었다.



Table 12. Contents (%) of theanine, total amino acids of collected tea germplasms.

	Germplasm collected region and sccession No.	Theanine	Total amino acids
Korea	Gyeongsangnam-do (n=79)	1.42±0.31 ^z	3.43±0.41
	Hadong (n=93)	1.53±0.36	3.65±0.52
	Jeollanam-do (n=86)	1.79±0.21	3.91±0.36
Sri Lanka	Dimbula (n=45)	1.13±0.29	2.95±0.39
	Nuwara Eliya (n=81)	1.02±0.32	2.69±0.43
	Uva (n=62)	1.03±0.31	2.76±0.61
	Kandy (n=51)	1.09±0.25	2.71±0.45

^z Mean ± SD (n=497).

2. 우수계통의 선발 및 품종화

1) 기능성 성분 고함유 계통 육성 및 품종 개발

선발된 유전자원들을 대상으로 품종화를 위한 유전형질 고정을 목적으로 삽목을 실시하였다. 1심 5엽까지 전개하여 신초가 경화되는 시점인 6월 말에서 7월 초순경에 각각 80개체씩 삽수를 잘라 피트모스와 펄라이트로 조성된 상토를 담은 종이포트에 삽목을 실시하여 계통증식을 실시 하였다. 국내외 수집 차나무 유전자원 497계통 중 성분 평가를 통해 유망자원을 선발하였다. 그 결과 EGCG 함량이 $80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 이상인 자원 8계통, 루테인 함량이 $500 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 이상인 자원 7계통, 베타카로틴 함량이 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 이상인 자원 7계통, EGCG3Me 함량이 $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 이상인 자원 8계통, 테아닌 함량이 2% 이상인 자원 3계통 등 총 33 계통의 유망 자원을 육성하였다(Table 13).

이후 육성된 계통을 대상으로 생육 및 성분 특성에 대한 계통평가를 실시하였고, 신규 카테킨인 EGCG3Me가 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 고함유된 품종인 ‘장원 3호’ 및 루테인이 $553.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 함유된 신품종 ‘장원 4호’를 개발 하였으며 그 특성은 Table 14, 15, 16, 17과 같다. EGCG3Me는 기존의 차나무 품종 및 대부분의 유전자원에서 함유되어 있지 않은 성분으로 극소수의 유전자원에서만 소량으로 존재하였으며, 장원 3호에는 그 함유량을 극대화 하였다. 또한 카테킨 함량은 $149.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 표준품종인 야부기다의 $112.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 보다 높았으며 수세는 강하며, 개장형으로 생육이 우수한 특성을 나타내었다.

장원 4호는 기존의 녹차 품종인 야부기다 보다 루테인이 $553.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 4 배 이상 고함유된 품종이며 아미노산과 테아닌이 각각 3.75% 와 2.15%로 야부기다의 3.37%와 2.05% 보다 높고 중생종, 직립형 품종으로써 그 기능성이 주목된다.

Table 13. Index and elite lines of selected germplasms were analyzed based on ingredient.

Index	No. of elite lines
High EGCG (above $80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	8
High lutein (above $500 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	7
High β -carotene (above $1000 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	7
High EGCG3Me (above $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	8
High theanine (above 2%)	3
Total	33



Fig. 26. Cutting propagation of the selected elite lines.

Table 14. Growth characteristics of functional tea cultivars, Jangwon No. 3 , Jangwon No. 4 and Yabukita.

Cultivar	Vigor	Type of leaves	Leaf shape	Leaf length	Leaf color	Sprouting time	Disease resistance	Cold resistance
JW 03	Strong	Erect	Narrow elliptic	Moderate	Moderate green	Mid	Strong	Moderate
JW 04	Moderate	Semi erect	Narrow elliptic	Moderate	Yellowish green	Late	Moderate	Moderate
Yabukita	Moderate	Semi erect	Narrow elliptic	Moderate	Light green	Mid	Low	Moderate

Table 15. Total nitrogen, total amino acids, theanine of fuctional tea cultivars, Jangwon No. 3, Jangwon No. 4 and Yabukita.

Cultivar	Total nitrogen (%)	Total amino acids (%)	Theanine (%)
JW 03	5.67	3.15	1.85
JW 04	5.71	3.75	2.15
Yabukita	5.91	3.37	2.05

Table 16. Caffeine and catechin contents ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of functional tea cultivars, Jangwon No. 3, Jangwon No. 4, and Yabukita .

Cultivar	Caffeine	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	EGCG3Me	ECG	Total catechin
JW 03	22.0	0.0	0.7	32.9	1.0	8.3	5.3	1.1	4.5	21.3	149.2
JW 04	29.0	0.2	0.4	13.1	0.6	81.9	5.3	2.7	0.0	16.6	120.9
Yabukita	24.7	0.1	0.8	35.1	1.1	48.3	1.9	1.2	0.0	16.5	112.4



Table 17. Lutein, chlorophyll, phaeophytin, β -carotene contents ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) of fuctional tea cultivars, Jangwon No. 3, Jangwon No. 4, and Yabukita.

Cultivar	Lutein	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Pheophytin b	Pheophytin a	β -carotene
JW 03	217.7	210.7	385.6	119.8	1,304.1	218.1
JW 04	553.1	277.9	836.1	112.3	1,658.3	620.3
Yabukita	168.1	223.0	623.2	59.1	1,088.2	164.2

2) 차나무 잎의 생육에 따른 기능성 성분의 함량 변화

(1) 첫물차 시기 차이 생육단계별 기능성 성분의 함량

신규 기능성 성분인 EGCG3Me의 함량이 높은 품종인 장원 3호를 대상으로 첫물차 시기에 신엽 전개에 따른 생육시기별 성분함량 변화에 대하여 분석을 하였다. 생육이 진행 될수록 카페인의 함량은 1심 1엽기부터 1심 5엽기까지 각각 $13.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $12.35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $12.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $11.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $10.83 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 감소를 하였다. 카페인은 알카로이드계 성분으로 강심작용, 항비만, 스트레스해소 등의 기능성에 있어 최근 주목받고 있는 차의 중요한 성분이기도 하다. 카페인 함량이 첫물차기에 생육이 진행되면서 3.5-2.6%로 감소하는 경향을 보인다고 하였는데(Nakagawa 등, 1975; 정과 김 등, 2005; 武田, 2008; 김, 2009) 본 실험에서도 동일한 경향을 나타내었다(Table 18).

EGCG의 함량은 1심 1엽기에는 $45.32 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 였으나 1심 2엽기는 $44.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 1심 3엽기는 $39.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 1심 4엽기는 $32.57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 1심 5엽기는 $28.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 감소를 하였다. ECG 함량도 1심 1엽기에는 $14.52 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 였으며 생육이 진행 되면서 1심 5엽기에는 $7.58 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 약 1/2 가량 감소를 하였다.

EGCG3Me의 함량은 1심 1엽기에 $1.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 이였고 1심 5엽기에는 $4.55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 생육시기가 증가 할수록 함량도 증가하였고 1심 1엽기 보다 5엽기에 2.5배 가량 함량이 높았다. 총 카테킨의 함량은 1심 1엽기부터 1심 3엽기 까지 증가하다가 이후에는 감소하였는데 EGC 와 EGCG3Me성분들은 증가하였으나 카테킨류의 대부분을 차지하고 있는 EGCG성분의 감소에 의한 영향이 반영된 것으로 판단된다.

Ryoyasu(1981)는 차잎의 성숙시간 중 카테킨 화합물에 대한 성분분석을 한 결과 생육이 진행될수록 EGCG, ECG 성분은 지속적으로 감소를 하고, EGC, EC 성분은 증가를 한다고 보고하였으며, Park 등(2008)과 Takayanagi 등(1985)은 수확시기별 카테킨 함량이 첫물차에서 늦게 수확할 수록 감소한다고 하였다.

본 연구의 결과에서는 EGCG, ECG의 함량은 선행 연구와 같이 감소하는 경향을 나타내었으나 신규 카테킨 화합물인 EGCG3Me의 함량은 증가하였다. 이는 차나무에서 생합성시 EGC 성분과 유사한 경로로 형성된다고 추정된다.

Table 18. Contents ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of caffeine and catechin components at leaf opening stage in first harvesting season.

Leaf opening stage	Caffeine	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	EGCG3Me	ECG	Total Catechin
1 st tea leaf stage	13.15 b ^z	0.04 b	0.85 c	1.26 a	0.22 a	45.32 b	2.06 a	2.81 c	1.69 a	14.52 c	68.77 a
2 nd tea leaf stage	12.35 b	0.01 a	0.85 c	7.73 b	0.00 a	44.31 b	4.71 b	1.56 b	2.08 a	12.10 b	73.33 b
3 rd tea leaf stage	12.31 b	0.04 b	0.82 c	11.04 c	0.41 b	39.53 b	4.99 b	1.47 b	3.23 b	11.76 b	73.29 b
4 th tea leaf stage	11.04 a	0.02 a	0.32 a	16.85 d	0.52 c	32.57 a	6.01 c	0.62 a	3.61 b	9.78 a	70.31 ab
5 th tea leaf stage	10.83 a	0.00 a	0.57 b	18.61 d	0.38 b	28.90 a	5.70 c	0.35 a	4.55 c	7.58 a	66.64 a

^z The same letters within a column mean no significant different at 5% probability level by DMRT.

(2) 첫물차 시기 엽위별 기능성 성분 함량변이

EGCG3Me 성분이 고함유된 기능성 차나무 품종 장원 3 호의 첫물차 시기(1 심 5 엽기) 엽위별 성분함량은 상위엽에서 하위엽으로 갈수록 카페인, EGCG, EGC, 총 카테킨 등의 성분이 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 EGCG3Me 성분은 1 엽부터 4 엽까지 $1.80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 에서 $7.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 지속적인 증가를 하다가 5 엽위 부터는 $6.55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 다소 감소하였으며 줄기부위 에서는 $0.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 급감 하였는데, 줄기에서는 모든 성분이 엽에서의 성분함량에 비해 큰 차이를 보이며 낮았다(Table 19).

차잎을 원료로 한 다류는 가공방법뿐만 아니라 차 잎을 수확하는 시기와 부위에 따라서 다양한 제품들이 형성 되어 있는데, 기능성 소재로 개발하기 위해서는 차잎에 함유된 성분을 고려하여 결정하는 것이 필요하다. 따라서 일반적인 고급차들과 같이 어린잎을 수확하는 것 보다는 신아의 생육이 충분히 진전된 이후인 1심 4엽기 또는 1심 5엽기의 시기에 신아의 3-4엽 이하의 하위엽 부분까지 수확을 하는 것이 효과적으로 차잎에 함유된 EGCG3Me성분을 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

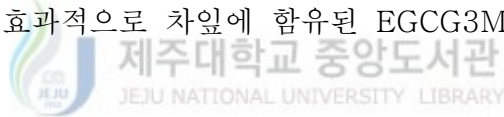


Table 19. Contents ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) of caffeine and catechin of new young shoots at different growth stages in first harvesting season.

	Caffeine	GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	EGCG3Me	ECG	Total Catechin
1 st leaf	16.33 a ^z	0.00 a	0.35 a	5.98 a	0.51 b	53.04 a	4.84 a	0.72 c	1.80 b	17.04 e	84.26 d
2 nd leaf	15.84 a	0.03 b	1.30 b	18.32 b	0.00 a	52.24 a	6.42 c	0.63 c	4.74 c	14.20 d	98.31 f
3 rd leaf	13.40 d	0.00 a	2.57 c	21.59 c	0.00 a	40.96 d	6.62 c	0.48 b	6.98 d	10.39 c	89.61 e
4 th leaf	11.35 c	0.00 a	2.20 c	20.63 c	0.00 a	31.33 c	6.32 c	0.45 b	7.37 e	7.76 b	75.73 c
5 th leaf	10.49 b	0.00 a	0.00 a	19.15 b	0.00 a	24.40 b	5.42 b	0.37 b	6.55 d	6.18 b	62.06 b
Stem	3.78 a	0.04 b	0.00 a	7.59 a	1.47 a	5.61 a	5.18 b	0.15 a	0.17 a	1.87 a	22.09 a

^z The same letters within a column mean no significant different at 5% probability level by DMRT.

3. 선발 계통의 생리활성 및 제다특성

1) 생리활성 평가

(1) 장원 3호의 항산화 능력

가. Superoxide Anion 소거활성 검정

EGCG3Me고함유 품종인 장원 3호와 대표적인 녹차 품종인 야부기다의 아세톤 추출물을 대상으로 ESR spectrophotometer를 이용하여 superoxide anion 소거활성을 검정하였다. ascorbic acid(AsA)와 비교하여 본 결과 superoxide anion 소거활성은 장원 3호와 야부기다가 양성대조군인 ascorbic acid 보다 10 μ M 과 20 μ M의 농도에서 더 높은 활성을 나타내었다. Ascorbic acid의 경우 20 μ M에서 21.2%의 소거활성을 나타낸 반면 야부기다의 경우 10 μ M에서 47.4%, 20 μ M에서 64.9%의 소거활성을 나타내었고 장원 3호는 10 μ M에서 54.8%, 20 μ M에서 76.3%의 소거활성을 나타내었다. 이러한 결과를 통하여 항산화제의 처리 없이 발생된 DMPO-OOH signal을 강력히 소거할 수 있음을 나타내며 mol 수로 계산하여보면 DMPO가 superoxide anion과 반응하는 비율보다 EGCG3Me가 superoxide anion과 반응하는 비율이 약 10,000배 이상 높았다.

Superoxide anion 소거활성은 모두 양성대조군인 ascorbic acid보다 높은 활성을 나타내었는데 이는 차잎에 함유된 주요 기능성 성분인 EGCG와 EGCG3Me성분이 공통적으로 가지고 있는 gallate group과 B ring에 가지고 있는 ortho-trihydroxy에 기인하는 것으로 판단된다. 그리고 장원 3호의 아세톤 추출물에서 더 높은 활성이 나타나는 것은 차잎에 공통으로 있는 EGCG 성분뿐만 아니라 신규 카테킨 성분인 EGCG3Me를 함유 하고 있는 상승효과에 의한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 EC와 같은 non-galloylated catechin 보다 EGCG나 EGCG3Me와 같이 gallate group을 가지고 있는 catechin이 ortho-dihydroxy group을 가지고 있는 EC나 (+)-C보다 ortho-trihydroxy group을 가지고 있는 EGC나 GC가 더 높은 높은 superoxide anion 소거활성을 나타낸다는 결과 (Qiong 등, 1999)와 유사하게 나타났다.

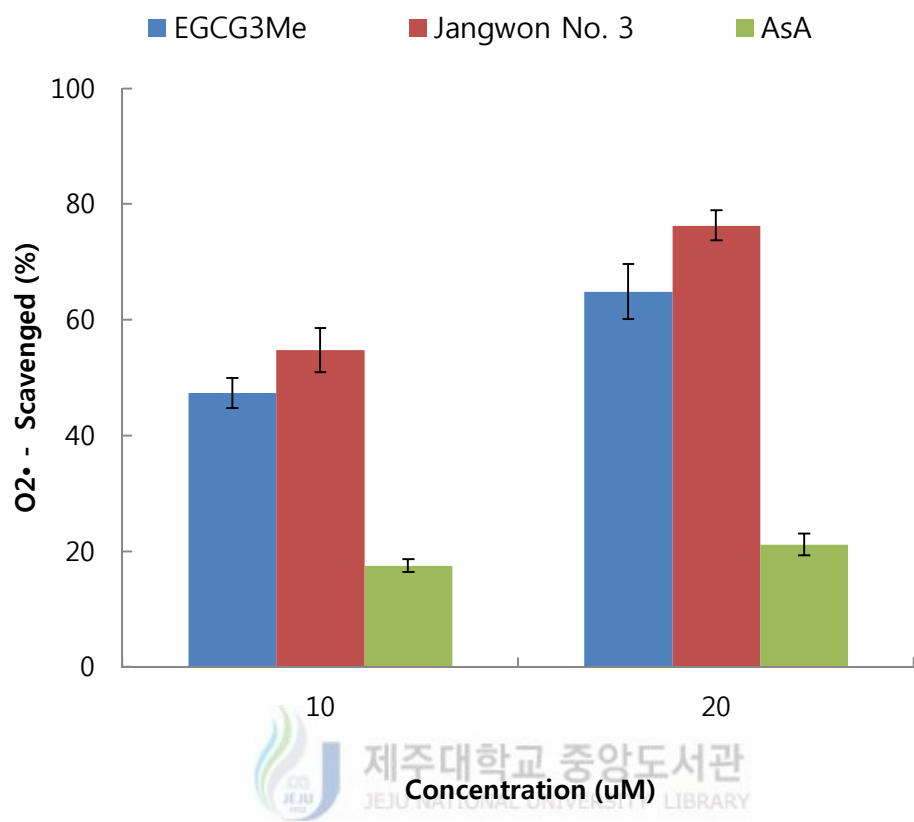


Fig. 27. Superoxide radical scavenging activity of EGCG3Me and acetone extract of Jangwon No. 3 and Yabukita. Ascorbic acid was used as positive control.

나. Hydroxyl radical 소거 활성 검정

장원 3호와 야부기다의 하이드록시기 소거활성을 농도별로 비교 검정하여 본 결과는 Fig. 12와 같다. 5 μ g을 처리하는 경우 야부기다는 약 19%, 장원 3호는 12%를 나타내었으나, 10 μ g을 처리하는 경우 야부기다가 46%, 장원 3호가 43%로 급격히 hydroxyl 소거활성이 증대되다가 그 이상의 농도에서는 소거활성 증대비율이 크지 않는 경향을 나타내었으며, 약 10 μ g의 수준에서 50%를 소거하는 활성을 나타내었다. 야부기다와 장원 3호의 음이온 소거활성은 장원 3호가 더 높았으며, ascorbic acid 대비 약 5배 이상 높은 수준이었다.

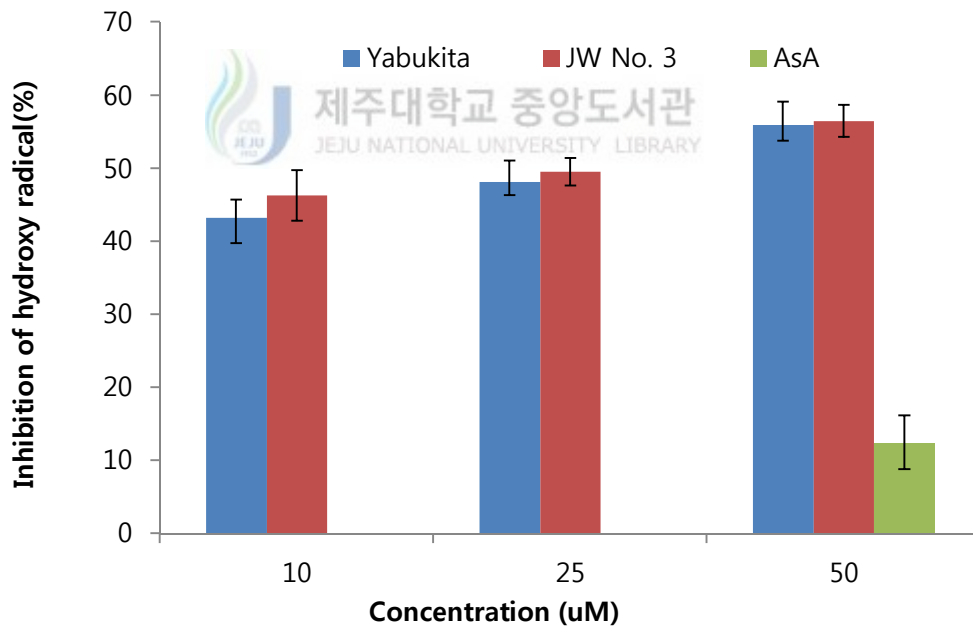


Fig. 28. Hydroxy radical scavenging activity of EGCG3Me and acetone extract of Jangwon No. 3 and Yabukita. Ascorbic acid was used as positive control.

(2) 장원 4 호의 항산화 능력

가. DPPH radical 소거활성 검정

루테인 고함유 품종인 장원 4호와 야부기다의 DPPH radical 소거활성을 α -tocopherol과 비교 검정하여 본 결과 장원 4호가 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서 약 79%의 저해율을 나타낸 반면, α -tocopherol은 동일한 수준의 저해율이 약 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 을 처리한 경우에서 관찰되었다. 야부기다의 경우 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 를 처리하는 경우 26%의 저해율을 나타내어 28%의 저해율을 나타내는 양성대조군 α -tocopherol과 유사한 소거활성을 나타내었다. 그러나 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 를 처리하는 경우 48%, $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 를 처리하는 경우 63%의 저해율을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 단지 일정한 수준으로 유지되는 경향만을 나타내었다. 장원 4호의 radical 소거활성은 루테인 자체의 소수성 특성과 구조상 교호적으로 연결되어 있는 이중결합에 기인하는 것으로 생각된다.

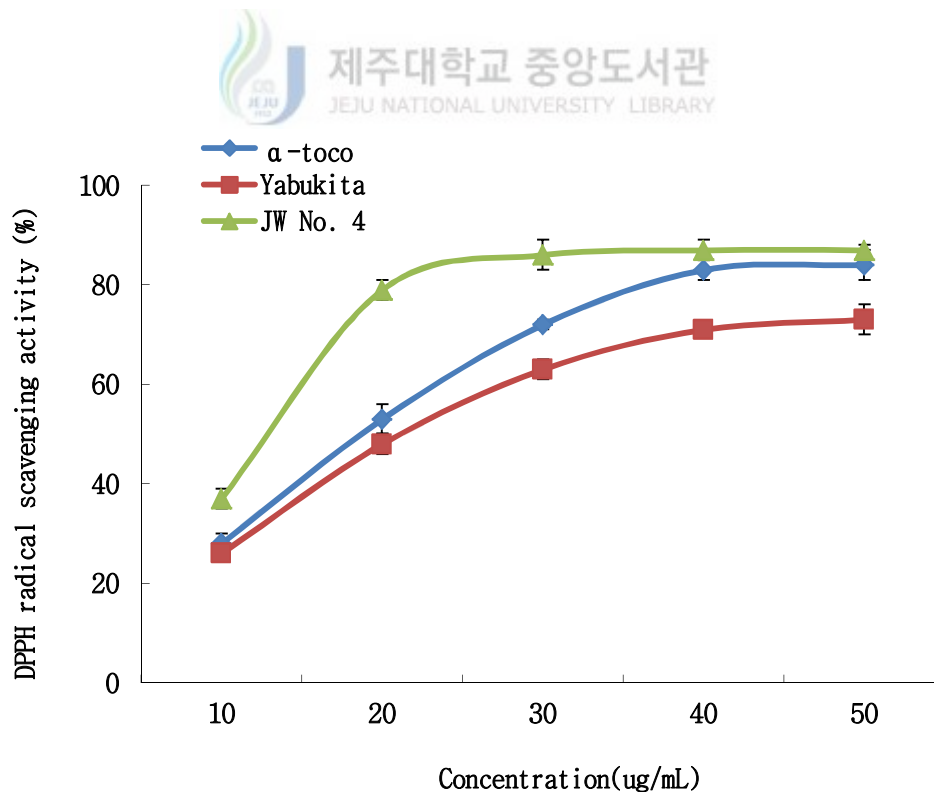


Fig. 29. DPPH radical scavenging activity of acetone extract of Jangwon No. 4, and Yabukita. The α -tocopherol was used as positive control. The absorbance was measured at 517nm. Results were shown as mean \pm SD (n=3).

나. superoxide anion 소거활성 검정

루테인 고함유 품종인 장원 4호와 야부기다 품종의 아세톤 추출물에 대한 superoxide radicals 소거활성을 NBT(nitro-blue tetrazolium) 환원법을 사용하여 확인한 결과 야부기다는 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 을 처리하는 경우 약 26%의 superoxide radicals 소거활성을 나타내었으며, 모든 농도에서 α -tocopherol이나 장원 4호 보다는 낮은 superoxide radicals 소거활성을 나타내었으나, $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 까지 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

장원 4호는 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서 약 87%의 소거활성을 나타내었고, 그 이상의 농도에서 일정하게 유지되는 결과를 나타낸 반면, α -tocopherol의 경우 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 처리한 경우의 superoxide radicals 소거율이 야부기다 품종 추출물을 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 처리한 경우의 superoxide radicals 소거율과 유사하여 superoxide radical의 소거에 있어 장원 4호가 α -tocopherol 보다 약 3배 이상의 활성을 나타내었다. 본 결과를 통하여 루테인이 고함유 되어 있는 품종인 장원 4호는 동일한 농도의 항산화제보다 높은 superoxide radical 소거활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

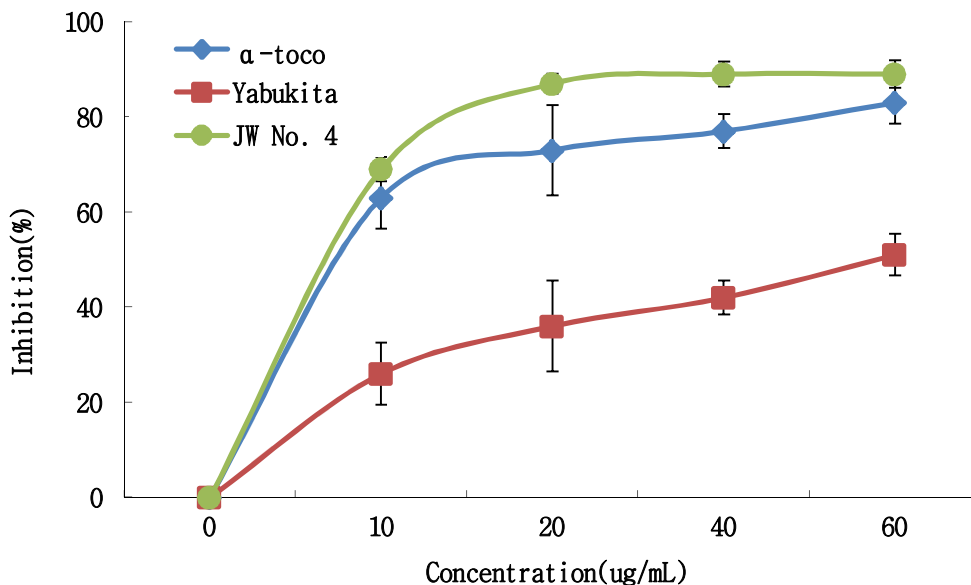


Fig. 30. Inhibitory effect of acetone extract of Jangwon No. 4 and Yabukita on superoxide radical production was estimated by NBT reduction. Results were shown as mean \pm SD (n=3).

다. Hydroxyl radical 소거활성 검정

Hydroxyl radical은 세포에 초기 손상을 유발하는 가장 독성이 강한 radical로 알려져 있다. 장원 4호와 야부기다의 아세톤 추출물, ascorbic acid의 농도별 시료의 hydroxyl radical 소거활성을 ESR을 통해 검정하여 본 결과 장원 4호 아세톤 추출물을 10 μM 수준으로 처리할 경우 DMPO-OOH signal은 18.6%의 생성저해율을 보인 반면, ascorbic acid와 야부기다의 경우 동일 농도에서 약 2.5% 미만의 생성 저해율을 나타내었다. 농도가 증가함에 따라서 장원 4호의 hydroxyl radical 생성저해율은 약 40 μM 에서 58.9%의 저해율을 나타낸 반면, 야부기다는 동일 농도에서 10.6%의 저해율을 나타내었고, ascorbic acid의 경우 8.5% 수준의 저해율을 나타내었다. 이 결과를 통해 장원 4호는 야부기다나 ascorbic acid 보다 월등히 우수한 hydroxyl radical 소거활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

일반적으로 hydroxyl radical은 H_2O_2 에서 유도되며 혹독한 스트레스 하에서 식물체가 만들어내는 radical로 가장 반응성이 높고 독성이 강한 것으로 알려져 있다 (Foyer 등, 1994; Asada, 2000). 활성산소 중의 소거와 제거에 있어 루테인이 다른 항산화제보다 hydroxyl radical에 대한 소거활성이 상대적으로 높다는 것은 항산화제로서 루테인이 산화적 손상에 의해 유발되는 다양한 질병에 대한 치료와 예방적 효과가 매우 높다는 것을 나타낸다고 하겠다.

카로티노이드의 구조에서 conjugate된 이중결합과 hydroxyl이나 epoxide와 같은 작용기의 갯수, polyene chain에서 말단의 유형에 따라 서로 다른 항산화 능력을 나타낼 수 있다는 보고와 같이 차나무 잎의 루테인이 가지고 있는 구조적 특징에 의해 ascorbic acid 를 비롯한 다른 항산화제보다 우수한 항산화 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 베타카로틴은 radical trapping을 통하여 singlet oxygen을 물리적으로 제거하는 항산화제로서 작용할 수 있다고 알려져 있고, 베타카로틴과 루테인은 각각 11개와 10개의 conjugate된 탄소-탄소 이중결합을 가지고 있는 것으로 볼 때, 이러한 conjugate된 탄소-탄소 이중결합이 radical을 소거할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있고, 루테인의 경우 베타카로틴과 차이가 나는 부분 즉, β -ring에서의 이중결합의 위치, β -ring과 epsilon ring에 부착되어 있는 2개의 hydroxy 작용기에 의해 서로 다른 항산화 능력을 가지게 된다고 판단된다.

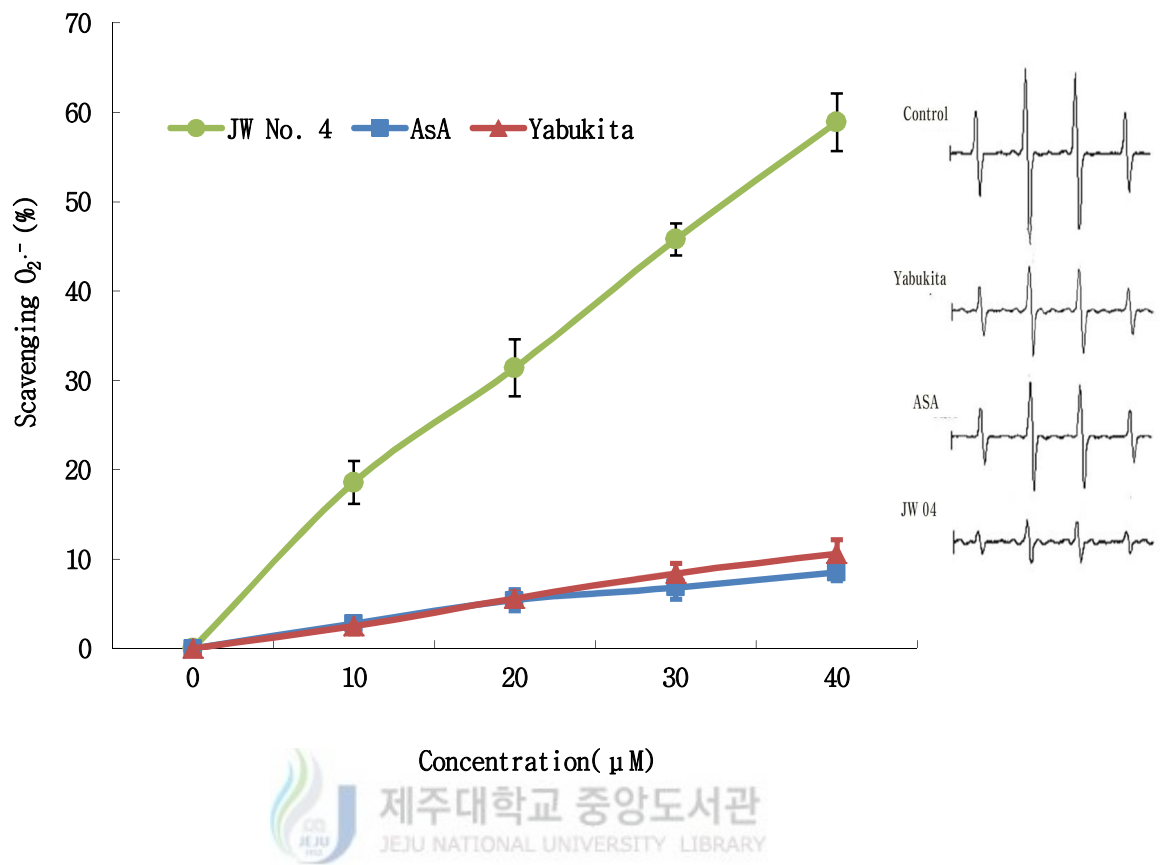


Fig. 31. Electron spin resonance spectra of hydroxyl radical adducts and plots of the capacity for scavenging hydroxyl radical of the concentrations of Jangwon No. 4 and Yabukita.

(3) EGCG3Me, 루테인 및 베타카로틴 성분의 암세포 증식 억제율

차잎의 아세톤 추출물과 차로부터 분리된 베타카로틴, 루테인 및 EGCG3Me 성분의 암세포 증식억제 효과를 검증하기 위하여 폐암 세포주(A549), 신장암 세포주(ACHN), 결장암 세포주(HCT15), 전립선암 세포주(LNCaP)와 유방암 세포주(MCF-7)를 대상으로 MTT assay를 수행하였다. 차나무 잎 아세톤 추출물 및 분리된 각 화합물의 농도별 적용에 따른 세포독성 검정을 MTT assay로 수행한 결과 아세톤 추출물의 경우 모든 세포주에 대하여 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서 50%의 암세포 생존율을 나타내었으며, 특히 다른 세포주보다 A549 폐암 세포주와 LNCaP 전립선암 세포주, MCF-7 유방암 세포주에 대하여 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 처리 시 12%, 24%, 16%의 암세포 생존율을 나타내어 높은 암세포 억제활성을 나타내었다.

반면 베타카로틴의 경우 모든 세포주에 대하여 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 이것은 베타카로틴과 같은 색소화합물 및 유도체의 경우 세포가 carcinogen에 노출되는 동안에 carcinogen이 세포에 부착되는 것을 막는 효과적인 방어물질로서 작용할 수 있다고 보고한 결과와 chlorophyllin이 carcinogen과 complex를 형성하여 암 형성 초기과정에 활성을 나타내는 항암 방어메카니즘이 가진다는 보고(Wu 등, 2010)와 비교하여 볼 경우 베타카로틴과 같은 색소 화합물은 이미 발생된 암세포주에 대한 독성에 근거하는 항암활성이 아닌 암 형성과정에서 발암물질과 결합하거나 발암물질이 세포와 부착되는 것을 막아 암발생 과정을 막는 메카니즘을 가질 수 있다고 판단된다.

차로부터 분리된 카로티노이드계 색소인 루테인의 경우 모두 암세포주에 대하여 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 처리한 수준에서 대조구에 비하여 약 50% 수준의 생존율을 나타내어 가장 높은 세포 독성을 나타내었으며, 농도 의존적으로 암세포 증식 억제효능을 나타내는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 전립선암 세포주(LNCaP)와 유방암 세포주 (MCF-7)에 대하여 높은 활성을 나타내었다.

이 결과는 쥐에서 androgen 비의존성이고, 악성전립선암 type II 세포종양 세포주인 AT3 세포를 대상으로 하여 포도로부터 분리한 루테인을 $2.0 \mu\text{M}$ ($\approx 1.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 수준으로 처리하고 3일 후 세포생존율을 검정한 결과 약 42%의 세포 성장저해율을 나타내었다는 보고와 비교하여 보면 다소 낮은 활성을 나

타내었지만, 다양한 전립선암 세포주(PC3, DU145, LNCaP)에 대하여 $20 \mu\text{M}$ ($\approx 11.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)에서 약 74%의 세포 생존률을 나타내었다는 결과 보다는 높은 활성을 나타내었다(Ojima 등, 1993).

차나무로부터 분리된 EGCG3Me의 human cancer cell line에 대한 생육 및 증식 억제 효과를 검정하기 위하여 폐암 세포주(A549), 신장암 세포주(ACHN), 결장암 세포주(HCT15), 전립선암 세포주(LNCaP)와 유방암 세포주(MCF-7)를 대상으로 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 EGCG3Me는 모든 암세포주에 대하여 농도의존적으로 암세포 증식을 억제하였다(Table 20). EGCG3Me의 경우 LNCaP세포주에 대하여 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서는 46%, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서는 37.7%의 세포 생존률을 나타내었으며 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서는 20%로 아세톤 추출물 보다 높은 억제 효과를 나타내었다(Fig. 33).

유방암 세포주인 MCF-7에 대하여서도 유사한 수준의 결과를 나타내었다. 반면 폐암 세포주인 A549 암세포주에서는 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 를 처리하는 경우에서도 41.0%의 세포 생존률을 나타내었으며 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서는 20.0%, $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서는 16.0%의 세포생존률을 나타내어 전립선암 세포주나 유방암세포주 보다 높은 암세포 증식억제효능을 나타내었다(Table 20).

다양한 동물실험 모델을 이용한 실험결과를 통하여 EGCG 및 차나무 잎의 카테킨 화합물이 명확한 항종양활성일 나타내고 있는 것이 보고 되고 있으며 (Pisters 등, 2001), 특히 EGCG와 차에 포함된 폴리페놀이 피부에서 성장을 저해할 수 있는 항염증효과와 항암활성을 가지고 있다고 보고하였다(Katiyar 등, 2000; Kuroda와 Hara, 1999). 본 연구의 결과 EGCG3Me 역시 EGCG와 유사하게 피부암을 비롯한 다양한 암세포의 증식을 억제하고 종양의 형성을 막을 수 있는 효과적인 소재로 생각된다.

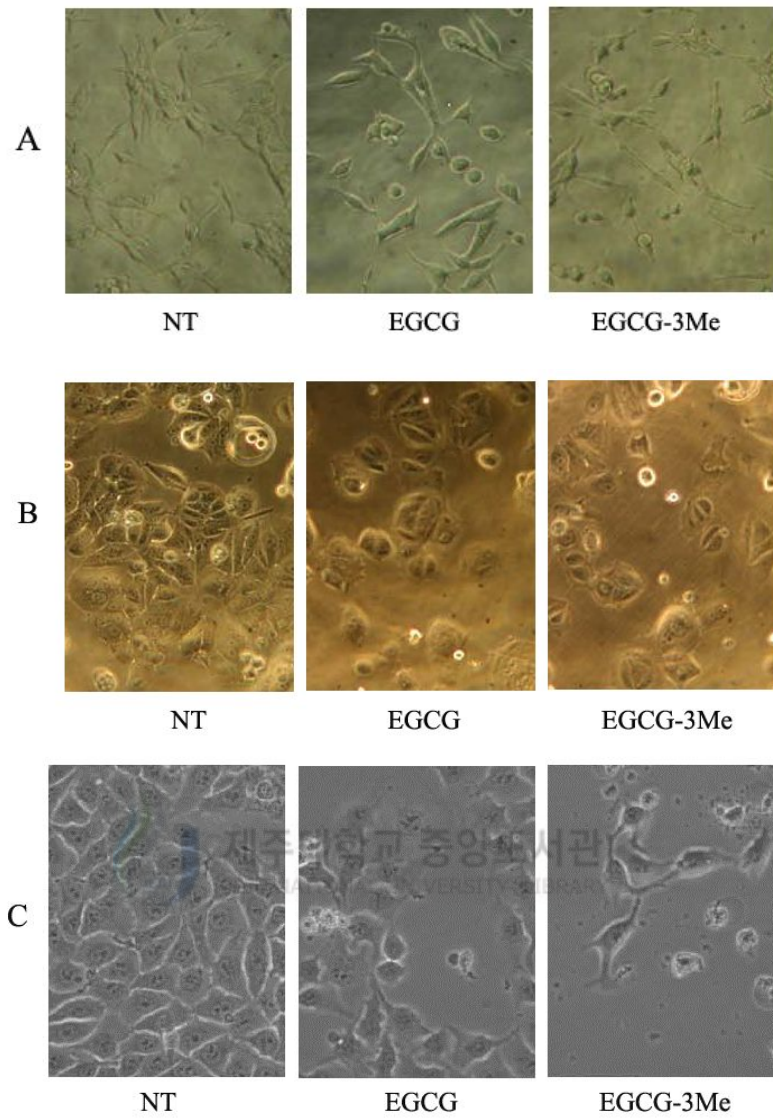


Fig. 32. Proliferation of LNCaP, MCF-7 and A431 cells treated with EGCG and EGCG3Me.

Table 20. Effect of β -carotene, lutein and EGCG3Me isolated from *Camellia sinensis* (GT) on the proliferation of human cancer cell of A549 (lung), ACHN(renal), LNCaP(prostate), HCT15(colon) and MCF-7 (breast) cells.

Extract and Compound	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Viable Cell (% of Control) / Human Cancer Cell line ^z				
		A549	ACHN	LNCaP	HCT15	MCF-7
GT	200	18.0 \pm 8.0	32.0 \pm 4.0	24.0 \pm 5.0	25.0 \pm 4.0	16.0 \pm 2.0
	100	21.0 \pm 6.0	46.0 \pm 6.0	35.0 \pm 4.0	36.0 \pm 2.0	29.0 \pm 4.0
	50	54.0 \pm 7.0	61.0 \pm 6.0	41.0 \pm 6.0	51.0 \pm 4.0	58.0 \pm 5.0
EGCG3Me	200	16.0 \pm 6.0	40.0 \pm 3.0	20.0 \pm 3.0	36.0 \pm 2.0	18.0 \pm 2.0
	100	20.0 \pm 5.0	49.0 \pm 5.0	37.0 \pm 4.0	42.0 \pm 1.0	31.0 \pm 1.0
	50	41.0 \pm 3.0	63.0 \pm 3.0	46.0 \pm 3.0	60.0 \pm 3.0	62.0 \pm 2.0
β -carotene	200	62.0 \pm 2.0	76.0 \pm 2.0	61.0 \pm 2.0	51.0 \pm 2.0	51.0 \pm 2.0
	100	73.0 \pm 3.0	85.0 \pm 3.0	70.0 \pm 3.0	55.0 \pm 2.0	70.0 \pm 2.0
	50	80.0 \pm 4.0	91.0 \pm 1.0	80.0 \pm 4.0	71.0 \pm 3.0	70.0 \pm 3.0
Lutein	200	22.0 \pm 1.0	28.0 \pm 3.0	15.0 \pm 3.0	28.0 \pm 1.0	19.0 \pm 2.0
	100	35.0 \pm 2.0	37.0 \pm 2.0	26.0 \pm 2.0	38.0 \pm 2.0	28.0 \pm 2.0
	50	46.0 \pm 3.0	51.0 \pm 2.0	38.0 \pm 2.0	57.0 \pm 2.0	39.0 \pm 2.0

^z After incubation with different concentrations of *camellia* extracts and isolated pigments at 37°C for 36h, the effect on cell growth was examined by MTT assay. The percentage of viable cells was compared with that of the vehicle control. This experiment was repeated three times. Results were shown as mean \pm SD (n=3).

2) 선발 계통의 제다특성

(1) 차의 발효도와 기능성 성분 함량의 변화

동백나무과의 차나무 잎을 시기별로 채취하여 가공하는 방법에 따라 다양한 다류제품이 만들어 지는데 이때 증기로 찌거나 덫는 과정을 통하여 산화효소를 불활성화 시켜 발효를 방지한 녹차(불발효차)와 발효의 진행도에 따라 우롱차(반발효차), 홍차(발효차)로 구분된다. 일반적으로 발효가 진행됨에 따라서 맛과 향, 수색등의 기호성의 변화가 크게 발생하며 함유된 성분도 변화를 하게되는데, 신규 기능성 성분을 고함유한 품종(장원 3 호, 장원 4 호)과 대표적인 차나무 품종인 야부기다를 대상으로 발효도를 달리한 가공방법에 따른 기능성 성분과 기호성의 변화를 조사하였다.

차의 쓴맛과 수렴성의 주체는 카테킨 화합물이며 (+)-catechin, (-)-gallo catechin, (-)-epigallo catechin, (-)-epigallo catechin gallate, (-)-epi catechin, (-)-gallo catechin gallate 및 (-)-epi catechin gallate 등이 주요 카테킨 화합물이다. 차의 카테킨 화합물은 혈중 콜레스테롤을 저하시키고, 항산화, 항암, 해독, 항균, 충치예방 및 미백효과 등 대표적인 차의 기능성 물질로 인증 받고 있다. 최근 일본 차나무 유전자원으로부터 (-)epigallo catechin-3-O-gallate(EGCG3Me)의 신규 카테킨 유도체의 존재가 확인 되었고, 이 화합물은 강력한 항알러지 효과를 나타내는 것이 입증되었다(Cho 등, 1993; Asai 등, 1987; Hara 등, 1985; Ryou & Park, 1990; Kim 등, 1997).

차나무 품종 및 가공방법에 따른 카테킨 함량의 변화는 모든 품종에서 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순으로 함량이 감소하는 경향을 알 수 있었다. 그러나 품종에 따라서 감소하는 정도는 상이하였는데 이는 각 품종이 기본적으로 가지고 있는 유전적 물질합성 능력이 차이가 남으로써 카테킨 성분 함량이 달라지는 것으로 판단된다. 장원 3 호 품종은 야부기다와 SL07-88 에 비하여 높은 총 카테킨 함량을 나타내었으며, 신규 카테킨 유도체인 EGCG3Me 성분이 녹차 $4.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 우롱차 $3.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 홍차 $1.94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 함유되어 있었다(Table 21). EGCG3Me 성분도 일반적인 카테킨 화합물과 같이 가공에 의한 산화반응이 발생함에 따라 카테킨 중합체인

데오플라빈, 데오루비딘 등의 성분으로 변화 되어 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 다른 품종에 비해 발효차인 홍차에서도 약 $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 의 함량을 나타내는 것으로 보아 기능성 활성평가를 나타내는 최소함량 및 발효도에 따른 기호성의 변화에 따라 적합한 가공방법을 적용하여 다류제품을 개발하는 것이 중요하다고 판단된다.



Table 21. The catechin and caffeine contents ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) in different functional tea cultivars based on the tea manufacturing methods.

Manufacturing method		GA	GC	EGC	C	EGCG	EC	GCG	EGCG3Me	ECG	Total
Yabukita	Non fermented tea	2.20	2.70	21.30	1.20	59.30	7.78	3.20	0.00	12.10	109.78
	Semi fermented tea	1.30	2.10	13.20	0.90	34.20	0.58	0.21	0.00	7.50	60.00
	Fermented tea	1.23	1.90	1.44	0.47	7.25	1.16	1.75	0.00	7.90	23.11
JW 03	Non fermented tea	3.80	2.90	22.51	1.00	66.77	8.06	2.42	4.70	14.30	126.46
	Semi fermented tea	2.10	1.82	16.30	0.52	42.10	1.11	1.20	3.60	9.40	78.14
	Fermented tea	1.92	1.20	1.05	0.33	12.94	5.82	2.86	1.94	11.75	39.81
JW 04	Non fermented tea	3.10	1.20	20.60	1.12	57.30	4.69	3.67	0.00	13.10	104.78
	Semi fermented tea	2.13	2.56	12.90	0.31	32.60	0.64	1.00	0.00	8.30	60.44
	Fermented tea	1.61	2.30	0.59	0.82	6.26	0.73	2.29	0.00	6.30	20.90

루테인은 노화에 따른 황반퇴화 억제효능과 시력보호 효능이 알려져 있으며, 활성평가 실험결과 항산화와 전립선암 등의 높은 항암효과의 결과를 나타내는 차의 신규 기능성 성분이라 할 수 있다. 차나무 품종 및 가공방법에 따른 루테인과 클로로필계 화합물의 성분함량은 모든 품종에서 발효가 진행됨에 따라 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순서대로 감소하였으며 반발효차보다 발효차에서 감소하는 정도가 더 크게 일어나는 것을 알 수 있다(Table 22).

루테인 고함유 품종인 장원 4호는 불발효차 $758.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 반발효차 $663.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 발효차 $489.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 순으로 산화발효가 진행됨에 따라서 역시 감소하였다. 그러나 대비 품종인 야부기다와 비교하여 보았을 때 녹차에서는 약 2배 가량 높은 함량을 나타내었고, 가장 함유량이 낮은 발효차인 홍차에서도 야부기다를 이용한 녹차의 함량인 $372.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 보다 높았다. 차의 가공방법이 같음에도 품종간 아미노산과 카테킨 성분함량의 차이가 나는 것은 원료가 되는 품종 고유의 특성에 의한 것이라 하였는데(Masuda 등, 1977; Ikeda, 2002), 루테인 성분 역시 가공방법뿐만 아니라 물질합성에 관여하는 품종 고유의 유전적 특성에 의한 영향이 크게 작용한 것으로 판단 된다.

이러한 결과를 종합하였을 때 루테인이 고함유 되어 있는 장원 4호 품종은 루테인 손실이 적은 불발효차(녹차)의 가공방법을 이용하는 것이 기능성 성분을 활용한 다류제품의 개발에 효율적일 것으로 판단된다.

Table 22. Contents ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) of lutein, chlorophyll, pheophytin, β -carotene in different functional tea cultivars based on the tea manufacturing methods.

	Manufacturing method	Lutein	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Pheophytin b	Pheophytin a	β -carotene
Yabukita	Non fermented tea	372.2	850.1	1,283.9	211.4	2,764.5	581.6
	Semi fermented tea	353.4	854.5	1,184.2	207.0	2,698.1	499.4
	Fermented tea	267.2	149.7	375.1	98.6	942.0	328.5
JW 03	Non fermented tea	400.5	760.2	746.9	189.3	2,557.2	582.5
	Semi fermented tea	310.1	620.4	694.1	186.3	2,212.6	409.8
	Fermented tea	203.6	200.0	359.2	121.0	1,313.5	196.6
JW 04	Non fermented tea	758.2	1188.2	1524.4	509.6	4976.1	948.9
	Semi fermented tea	663.1	943.1	1,483.2	456.2	4,374.2	803.1
	Fermented tea	489.4	465.2	569.4	253.5	2,745.1	472.2

(2) 차의 발효도에 따른 기호성 변화

가. 고기능성 다류의 발효도에 따른 기호특성 변화

차 품질에 대한 관능검사는 차의 외관과 내질에 의해 평가되고, 차의 외관은 제품의 형상과 색택, 내질은 향, 수색, 맛 나누어져 있으며 각각의 항목은 20점으로 구성이 되어 있다. 품종과 발효도에 따른 관능평가에서 품종별로는 장원 4호 불발효차(92점), 야부기다 불발효차(91점), 장원 3호 반발효차(91점)가 각각 제품별 가장 높은 평가 결과를 나타냈다(Table 23). 대비품종으로 사용된 야부기다는 대표적인 녹차 품종으로서 역시 녹차에서 가장 높은 평가를 받았으며, 발효도가 증가 될수록 관능에서는 가장 낮은 평가를 받았다. 카테킨과 EGCG3Me의 함량이 높은 장원 3호는 불발효차(녹차)에서 카테킨 특유의 떫은 맛이 강하였으나, 전반적인 제품의 외관과 내질의 평가에서 다른 품종에 비해 큰 차이가 없었다. 특히 발효도가 증가한 반발효차인 우롱차, 발효차인 홍차에서 다른 품종에 비해 상대적으로 높은 평가를 받았는데 이는 풍부한 카테킨 화합물이 발효도를 증가할수록 데아플로빈, 데아루비딘 등으로 축합되면서 고유의 풍미를 증가시킨 것으로 판단된다. 루테인 고함유 품종인 장원 4호는 녹차품종인 야부기다와 비슷한 관능평가 양상을 나타내어 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순서로 기호도가 낮아 졌다.

Table 23. Qualities and their sensory scores of different functional tea cultivars based on the tea manufacturing methods.

Manufacturing method	Cultivar	Appearance			Quality of liquor			Total
		Shape	Color	Aroma	Color	Aroma	Taste	
Non fermented tea	Yabukita	18	19	19	17	18	18	91 a ^z
	JW 03	17	18	17	18	18	18	88 b
	JW 04	18	19	18	18	19	19	92 a
Semi fermented tea	Yabukita	17	16	16	15	16	16	80 c
	JW 03	18	18	18	18	19	19	91 a
	JW 04	17	17	16	17	16	16	83 bc
Fermented tea	Yabukita	17	16	15	16	14	14	78 d
	JW 03	18	17	17	17	17	17	86 b
	JW 04	17	17	15	17	15	15	81 c

^z The same letters in a column indicate no significant difference at 5% level by DMRT.

신규 기능성 성분 고함유 품종을 활용한 다류의 개발은 이상의 화학적 성분분석과 관능평가를 바탕으로 하여 지표 기능성 성분의 손실을 최대한 억제하고 기호성을 증진 시킬 수 있는 조건을 판단하였다. EGCG3Me 함량이 높은 장원 3 호 품종은 지표성분이 불발효차($4.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)에서 가장 높았으며 반발효차는 약간 감소한 $3.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 발효차는 $1.94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 급격히 감소를 하였다. 그러나 관능평가에서는 불발효차에서는 떫은 맛이 강하여 반발효차에서 가장 높은 기호성을 나타냈다. 또한 루테인 고함유 품종인 장원 4 호는 지표성분이 불발효차 $758.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 반발효차 $663.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 발효차 $489.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 발효도가 진행될수록 감소하는 경향이었고 관능평가에서도 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순서대로 낮아지는 전형적인 불발효차 품종의 특성을 나타냈다.



V. 종합 고찰

차 산업의 기초가 되는 것은 차나무 품종이라고 할 수 있으며, 주요 재배국가에서는 국가 차원에서 많은 노력을 기울여 다양한 품종을 개발, 보급을 하고 있다. 한국에서는 차의 긴 역사에 비해서 산업화가 늦어서 과학적 접근과 품종개발 또한 비교적 최근에서야 관심을 가지고 진행을 하고 있다. 차나무는 영년생 작물로서 새로운 우량 품종을 육성하는데 많은 시간과 노력이 필요하다. 그러므로 초기에 육성계획을 수립할 때부터 미래의 수요예측을 하는 것이 중요하며 이를 바탕으로 성공적인 품종 개발과 높은 보급을 통하여 산업에 이바지 할 수 있다. 최근에는 소비자들의 건강에 대한 관심 증가와 녹차에 대한 기능성이 과학적으로 밝혀지고 있어 이를 활용한 다양한 제품들이 개발되고 신규 시장을 형성하고 있어 무엇보다도 좋은 품종의 개발과 보급이 필요한 시점이다.

따라서 본 연구는 국내외 다양한 차나무 유전자원들을 이용하여 차의 기능을 활용한 산업의 근간이 되는 고기능성 차나무 품종 개발과 다양한 소재 개발을 위한 기초를 제시하고자 수행되었다.

본 연구에 사용된 차나무 유전자원은 국내 11개 지역에서 총 2,100점을 수집하였으며, 스리랑카의 주요 차산지인 누와라엘리아, 캔디, 덤블라, 우바 지역 유전자원 733점을 수집하여 증식하였다. 한국에서 수집된 차나무 유전자원의 경남, 하동, 전남지역이 엽폭의 평균은 각각 33.8 ± 8.1 , 24 ± 4.5 , 32.4 ± 2.7 mm, 엽장은 78 ± 12.7 , 53.3 ± 6.9 , 77.2 ± 3.5 mm를 나타 내었다. 하동지역이 타 지역에 비해서 잎의 크기가 작았는데 이는 주로 자생지 주변의 재배다원이 재래종으로 구성 되어 재배품종과의 인위적인 유전적 혼입이 적은 이유로 인하여 소엽종 특유의 잎형질을 나타낸다고 할 수 있다. 이는 국내 재래종 집단들의 형태적 특성을 평가한 결과 평균 엽장은 71mm, 엽폭은 29mm로 일본 도입품종 보다 엽장 및 엽폭이 좁았으며, 잎이 둥글면서 약간 뾰족한 소엽종의 형태라고 보고한 Park (2007)의 연구결과와 유사하였다. 스리랑카에서 수집된 차나무의 잎은 수집지역이 모두 한국의 차나무 유전자원 보다 약 2배 정도 큰 결과를 보여 전형적인 대엽종의 특성을 나타내었다.

차나무 유전자원에서 유용 성분을 찾기 위하여 차나무 잎을 아세톤 추출한 결

과 주요물질로 평가되는 약 11종의 성분을 분리하였다. 이들 성분을 open column chromatography 및 semi-preparative HPLC 방법으로 순수분리 하여 각각 분리 후 NMR, MS 및 UV-VIS. spectrometric 방법을 이용하여 화학적 구조를 동정하였다. 차나무 잎에서 루테인, 클로로필 a, 클로로필 b, 페오피틴 a, 페오피틴 b, 베타카로틴이 신규 성분으로 동정되었다. 특히 (*all-trans*)-lutein 은 본 실험에서 최초로 동정이 되었다.

국내외 차나무 유전자원에서의 기능성 성분 함량을 분석한 결과 카테킨의 평균적 함량비율을 살펴보면 EGCG 가 52.1%로 가장 많은 함량을 나타내었고, 다음으로 EGC 가 24.6%, ECG 가 11.4%, EC 가 8.2%를 나타내어 이들 4 종의 카테킨 화합물이 전체의 96.3%를 차지하는 양상을 나타내었으며, 신규 기능성을 나타내는 EGCG3Me 는 전체 평균함량의 0.7% 수준으로 극히 낮은 비율 분포를 나타내는 것으로 조사되었다. 클로로필 계 및 카로티노이드 계 성분 함량은 각각 루테인 99.4-555.8 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 클로로필 a 18.8-4,096.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 클로로필 b 187.9-1,111.0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 페오피틴 a 317.6-3,745.9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 페오피틴 b 25.5-407.2 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 베타카로틴 126.4-1,593.8 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 범위로 존재하여 유전자원간에 다양성이 크게 존재하였다. 또한 테아닌, 총 아미노산의 함량을 평가한 결과 테아닌이 0.49-3.07%, 총 아미노산인 0.71-4.79%, 범위로 존재하였다. 차의 쓴맛과 수렴성의 주체는 카테킨 화합물이며 (+)-catechin, (-)-gallo catechin, (-)-epigallo catechin, (-)-epigallo catechin gallate, (-)-epi catechin, (-)-gallo catechin gallate 및 (-)-epi catechin gallate 등이 주요 카테킨 화합물이다. 차의 카테킨 화합물은 혈중 콜레스테롤을 저하시키고, 항산화, 항암, 해독, 항균, 충치예방 및 미백효과 등 대표적인 차의 기능성 물질로 인증 받고 있다. 최근 일본 차나무 유전자원으로부터 (-)-epigallo catechin-3-O-gallate(EGCG3Me)의 신규 카테킨 유도체의 존재가 확인 되었고, 이 화합물은 강력한 항알러지 효과를 나타내는 것이 입증되었다(Cho 등, 1993; Asai 등, 1987; Hara 등, 1985; Ryou & Park, 1990; Kim 등, 1997).

차나무 잎의 생육에 따른 기능성 성분 변화는 생육이 진행 될수록 카페인, EGCG, ECG의 함량은 감소하는 경향을 나타내었으나 EGC와 EGCG3Me의 함량은 증가하였다. EGCG3Me의 함량은 1심 1엽기에 1.69 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 이었고 1심

5엽기에는 $4.55 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 생육시기가 증가 할수록 함량도 증가하였고 1심 1엽기 보다 5엽기에 2.5배 가량 함량이 높았다. Ikeda 등(1993)은 카테킨 함량은 1심 1엽기부터 1심 3엽기까지는 증가하다가 이후에는 감소한다고 하였으나 신규 성분인 EGCG3Me는 그 함량이 지속적으로 증가를 하였다. 또한 하위엽에서도 높은 함량을 나타내었다. 따라서 기능성 소재로 활용할 경우 일반적인 고급차들과 같이 어린잎을 수확하는 것 보다는 신아의 생육이 충분히 진전된 이후(4엽기, 5엽기), 3-4엽 이하의 하위엽 부분까지 수확을 하는 것이 효과적으로 차잎에 함유된 EGCG3Me성분을 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

차나무 잎 기능성 성분의 생리활성 평가 결과 신규 카테킨 화합물인 EGCG3Me가 고함유된 차나무 신품종 장원 3호의 항산화능력은 표준품으로 사용된 ascorbic acid 대비 5배 이상 높은 수준 이었다. 또한 암세포 증식 억제효과를 검정하기 위해서 전립선암 세포주(LNCaP), 유방암 세포주 (MCF-7), 피부암 세포주 (A431)를 대상으로 MTT assay를 수행한 결과 LNCaP, MCF-7, A431 암세포주에 대하여 농도의존적으로 암세포 증식을 억제하였다. 또한 전립선암 세포주나 유방암세포주에서 높은 암세포 증식억제효능을 나타내었다.

루테인 고함유 품종인 장원 4 호의 DPPH radical 소거활성 평가 결과 장원 4 호 아세톤 추출물이 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서 약 79%의 저해율을 나타낸 반면, α -tocopherol 은 동일한 수준의 저해율이 약 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 을 처리한 경우에서 관찰되어 장원 4 호의 항산화 능력이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 에서 약 87%의 소거활성을 나타내었고, 그 이상의 농도에서 일정하게 유지되는 결과를 나타낸 반면, α -tocopherol 의 경우 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 처리한 경우의 superoxide radicals 소거율이 루테인 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 을 처리한 경우의 superoxide radicals 소거율과 유사하여 superoxide radical 의 소거에 있어 장원 4 호가 α -tocopherol 보다 약 3 배 이상의 활성을 가지고 있음을 알 수 있다. 이 결과를 통하여 루테인은 동일한 농도의 항산화제보다 높은 superoxide radical 소거활성을 가지고 있음을 확인하였다. 이는 차나무 잎에서 분리된 루테인이 가지고 있는 구조적 특징에 의해 베타카로틴을 비롯한 다른 항산화제보다 보다 우수한 항산화 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 루테인의 경우 베타카로틴과 차이가 나는 부분 즉, β -ring 에서의 이중결합의 위치, β -ring 과 epsilon ring 에 부착되어 있는 2 개의 hydroxy 작용기에 의해

서로 다른 항산화 능력을 가지게 된다고 판단된다. 베타카로틴과 루테인의 human cancer cell line 에 대한 생육 및 증식억제 효과를 검정하기 위하여 폐암 세포주(A549), 신장암 세포주(ACHN), 결장암 세포주(HCT15), 전립선암 세포주(LNCaP)와 유방암 세포주(MCF-7)를 대상으로 MTT assay 를 수행하였다. 그 결과 차로부터 분리된 카로티노이드계 색소인 루테인의 경우 모두 암세포주에 대하여 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 처리한 수준에서 대조구에 비하여 약 50% 수준의 생존율을 나타내어 가장 높은 세포 독성을 나타내었으며, 농도의존적으로 암세포 증식 억제효능을 나타내는 것을 관찰할 수 있었고, 특히 전립선암 세포주(LNCaP)와 유방암 세포주 (MCF-7)에 대하여 높은 활성을 나타내었다.

차나무 잎을 시기별로 채취하여 가공하는 방법에 따라 다양한 다류제품이 만들어 지는데 이때 증기로 찌거나 튀는 과정을 통하여 산화효소를 불활성화시켜 발효를 방지한 녹차(불발효차)와 발효의 진행도에 따라 우롱차(반발효차), 홍차(발효차)로 구분된다. 일반적으로 발효가 진행됨에 따라서 맛과 향, 수색등의 기호성의 변화가 크게 발생하며 함유된 성분도 변화가 발생되기 때문에 차나무 잎을 다류로 가공한 상태에서의 기능성 성분들의 변화를 살펴보았다. 차나무 품종 및 가공방법에 따른 catechin 함량의 변화는 모든 품종에서 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순으로 함량이 감소하는 경향을 알 수 있었다.

그러나 품종에 따라서 감소하는 정도는 상이하였는데 이는 각 품종이 기본적으로 가지고 있는 유전적 물질합성 능력이 차이가 남으로써 카테킨 성분 함량이 달라지는 것으로 판단된다. EGCG3Me 성분도 일반적인 카테킨 화합물과 같이 가공에 의한 산화반응이 발생함에 따라 카테킨 중합체인 데오플라빈, 테오루비딘 등의 성분으로 변화 되어 감소하는 경향을 나타내었다. 루테인과 클로로필계 화합물의 성분함량은 모든 품종에서 발효가 진행됨에 따라 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순서대로 감소하였으며 반발효차보다 발효차에서 감소하는 정도가 더 크게 일어나는 것을 알 수 있다. 루테인 고함유 품종인 장원 4 호는 불발효차 $758.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 반발효차 $663.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 발효차 $489.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 역시 감소하였다.

발효도에 따른 고기능성 다류의 기호특성 변화는 EGCG3Me 의 함량이 높은 장원 3 호는 불발효차(녹차)에서 카테킨 특유의 떫은맛이 강하였으나, 전반적인 제품의 외관과 내질의 평가에서 다른 품종에 비해 큰 차이가 없었다. 특히 발효도가 증가한 반발효차인 우롱차, 발효차인 홍차에서 다른 품종에 비해 상대적으로 높은 평가를 받았는데 이는 풍부한 카테킨 화합물이 발효도를 증가할수록 데아플로빈, 데아루비딘 등으로 축합되면서 고유의 풍미를 증가시킨 것으로 판단된다. 루테인 고함유 품종인 장원 4 호는 녹차품종인 야부기다와 비슷한 관능평가 양상을 나타내어 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순서로 기호도가 낮아 졌다.

이는 수천년동안 전통적인 기호성 위주의 연구, 산업, 문화 발전으로 인하여 기존 품종에서는 차나무의 기능성에 대한 다양성이 부족하였는데, 이상의 실험 결과에서 국내외의 차나무 유전자원들은 폴리페놀 화합물 이외에도 다양한 기능성 성분들을 함유 하고 있는 것을 알 수 있고, 특히 기존에 알려져 있지 않았던 루테인, EGCG3Me 성분들은 강력한 항산화능력, 항암능력 등을 가지고 있어 향후 고기능성 품종개발에 유용할 것으로 판단된다.

또한 이러한 유전자원들을 지속적으로 활용하여 품종 개발을 한다면 기능성 다류 뿐만 아니라 건강 기능성 식품, 화장품 등 다양한 고부가가치를 가지는 산업의 소재로 활용될 수 있어, 지속적인 가치창출에 중요한 수단이 될 것으로 생각된다.

VI. 적 요

국내외 다양한 차나무 유전자원들을 이용하여 전통적인 기호성 위주의 품종개발에서 벗어나 새로운 기능성 시장에 적합한 품종개발을 위한 기초를 제시하고 자 국내외 유전자원의 수집, 신규성분 탐색과 분석, 육성 기능성 품종의 생리활성 평가 및 발효도에 따른 제차 특성에 대한 포괄적인 분석을 하였다.

국내 수집유전자원 중 하동의 차나무 유전자원의 잎의 크기가 다른 지역 보다 상대적으로 작았다. 스리랑카에서 수집된 차나무의 잎은 지역별로 큰 차이는 없었으나 모두 한국의 차나무 유전자원 보다 약 2배 정도 큰 결과를 보였다. 스리랑카 차나무 유전자원은 전형적인 대엽종의 특성을 나타내었으며 한국의 차나무 유전자원은 소엽종의 특성을 나타냈다.

수집 유전자원을 대상으로 유용 성분을 탐색하여 주요물질로 평가되는 약 11종의 성분을 분리하고 화학적 구조를 동정한 결과 차나무 잎에서 루테인, 클로로필 a, 클로로필 b, 페오피틴 a, 페오피틴 b, 베타카로틴이 신규 성분으로 동정되었다. 특히 (*all-trans*)-lutein은 본 실험에서 최초로 동정이 되었다. 분리된 성분과 총 9종의 카테킨 및 카페인 함량을 HPLC를 이용하여 정량적으로 평가하였다. 그 결과 EGCG3Me는 전혀 존재하지 않는 자원부터 최대 $4.45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 까지 존재하여 국내 수집 유전자원 간에 함량의 다양성이 존재하는 것으로 조사되었고, 총 카테킨 함량은 $50.67\text{--}147.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 최소함량과 최대함량 간에 약 3배의 함량차이가 있어 역시 유전자원의 함량 다양성이 있음을 알 수 있었다. 루테인은 $99.4\text{--}555.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 클로로필 a $18.8\text{--}4,096.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 클로로필 b $187.9\text{--}1,111.0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 페오피틴 a $317.6\text{--}3,745.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 페오피틴 b $25.5\text{--}407.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 베타카로틴 $126.4\text{--}1,593.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 범위로 존재하여 국내외 수집 유전자원 간에 클로로필계 및 카로티노이드계 화합물 함량의 다양성도 크게 존재하는 것으로 조사되었다.

우수 유전자원을 활용하여 신규 카테킨인 EGCG3Me가 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 고함유된 품종인 장원 3호 및 루테인이 $553.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 함유된 신품종 장원

4호를 개발 하였다. EGCG3Me는 기존의 차나무 품종 및 대부분의 유전자원에서 함유되어 있지 않은 성분으로 극소수의 유전자원에서만 소량으로 존재하는 것이 확인되었으며 장원 3호에는 그 함유량을 극대화 하였다. 장원 4호는 기존의 녹차 품종인 야부기다 보다 루테인이 $553.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 으로 4배 이상 고함유된 품종으로 아미노산과 테아닌이 각각 3.75%, 2.15%로 야부기다의 3.37%와 2.05%보다 높아 그 가능성이 주목된다.

차나무 잎 기능성 성분의 생리활성 평가 결과 신규 카테킨 화합물인 EGCG3Me가 고함유된 차나무 신품종 장원 3호의 항산화능력은 표준품으로 사용된 ascorbic acid 대비 5배 이상 높은 수준 이었다. 또한 암세포 증식 억제효과를 검증하기 위해서 전립선암 세포주(LNCaP), 유방암 세포주(MCF-7), 피부암 세포주 (A431)를 대상으로 MTT assay를 수행한 결과 LNCaP, MCF-7, A431 암세포주에 대하여 농도의존적으로 암세포 증식을 억제하였다. 루테인 고함유 품종인 장원 4호의 DPPH radical 소거활성 평가 결과 장원 4호의 아세톤 추출물이 α -tocopherol 보다 약 3배 이상의 활성을 가지고 있음을 알 수 있다.

발효도에 따른 고기능성 다류의 기호특성 변화는 EGCG3Me 의 함량이 높은 장원 3 호는 불발효차(녹차)에서 카테킨 특유의 떫은맛이 강하였으나, 발효도가 증가한 반발효차, 발효차에서 다른 품종에 비해 상대적으로 높은 평가를 받았다. 이는 풍부한 카테킨 화합물이 발효도를 증가할수록 데아플로빈, 데아루비딘 등으로 축합되면서 고유의 풍미를 증가시킨 것으로 판단된다. 루테인 고함유 품종인 장원 4 호는 녹차품종인 야부기다와 비슷한 관능평가 양상을 나타내어 불발효차(녹차) > 반발효차(우롱차) > 발효차(홍차)의 순서로 기호도가 낮아졌다.

VII. 인용문헌

김상현, 김봉호. 1984. 생활차예. p. 23-33. 태평양박물관.

송관정, 김찬식, 김영걸, 이진호 2006. 녹차학. 제주대학교 출판부.

이진호, 이민석. 2006. 遮光栽培에 따른 茶葉의 葉位別 葉綠素含量 및 色度變化, 한국차학회 추계학술대회: p. 113.

이민석, 이진호, 김영걸, 황영선, 정명근. 2008. 한국 재래종 차나무의 작물학적 특성 및 품질관련 성분 변이. 한국작물학회지 53: 333-338.

오상룡, 이상효, 신동화, 정동효, 손태화. 1988. 물리화학적 및 관능적 특성에 의한 국내외산 녹차의 물질평가, 한국농화학지 31:284-291.

정동효, 김종태. 2005. 차의과학. p. 34-35. 대광서림.

堀田博, フィリップオーフ. 1987. 케니아産品種紅茶および世界各産地の紅茶の香氣成分の比較とその特徴. 野菜茶業試験場研究報告 B(金谷) 1:55-65.

金鐘泰. 1996. 茶의 科學과 文化, 保林社: p. 103-273.

根角厚司, 西大樹, 池田奈実子. 1999. 一番茶芽における化学成分含有量の品種特性, 茶業研究報告 88(別冊):24-25.

大石千八. 1988. 新茶業全書. p. 168-509. 静岡縣茶業會義所.

藤卷正生. 1982. 香料の辞典. p. 351. 朝倉書店.

鳥丸萩夫, 瀧之上康元. 1991. 綠茶用主要品種の特性について(第5報). 茶業研究報

告 73:1-15.

木村政美. 2006. 茶園管理 12ヵ月. p. 50-56. 農文協.

武田善行. 2003. 茶の品種. p. 95-97. 静岡縣茶業會義所.

武田善行. 2008. 茶大百科(I). p. 330-380. 農山協.

武田善行, 和田光正, 根角厚司, 池田奈美子, 近藤貞昭, 八戸三千男, 築瀬好充. 1991. 煎茶用品種さえみどりの育成. 野菜茶業試験場研究報告 B(茶業) 4:1-15.

山口優一, 角川修, 澤井祐典, 深山大介, 吉富均. 1997. 蒸熱工程における茶葉の香氣成分變化. 茶業研究報告 85(別):62-63.

山口聰, 武弓利雄, 池田奈美子, 武田善行, 渡邊明, 築瀬好充, 安間舜. 1992. 煎茶用品種ふうしゅんの育成. 野菜茶業試験場研究報告 B(茶業) 5:1-13.

小柳津勤, 下田満哉, 松本清, 後藤正. 2001. 摘採時期の違いによる緑茶香氣成分の變化. 茶業研究報告 92(別):118-119.

阿南豊正, 高柳博次, 池池谷賢次郎, 中川致之. 1983. 緑茶 香氣の 品種間 差異. 茶業技術研究 65:46-55.

岩波潔. 1994. 茶の栽培と利用加工. 養賢堂:302-423.

原利男, 久保田悦郎. 1976. 緑茶と紅茶の香氣成分の比較. 茶業技術研究 50:68-73.

田中伸三, 深津修一, 岩浅潔. 1987. かまいり茶製造工程における香氣成分の變化. 野菜茶業試験場研究報告 B(金谷) 1:45-53.

田中伸三, 岩浅潔, 深津修一, 青野英也, 田中静夫, 佐波哲次. 1989. 茶葉の摘採時期と製茶品質との関係, 野菜・茶業試験場研究報告 B(金谷)3:55-64.

竹尾忠一. 1983. 烏龍茶の香りとその特徴. 茶業技術研究 65:1-12.

竹尾忠一, 津志田藤二郎, ピーケマハンタ, 田代正樹, 今村義成. 1985. 烏龍茶と紅茶の香氣に関する食品化学的研究. 茶業試験場研究報告 20:91-180.

前田茂, 中川致之. 1977. 各種緑茶の総合的理化学分析, 茶研報 45:85-92.

川上 美智子. 2007. 茶葉の香り. Ryokucha 21:8-12.

澤井祐典, 深津修一, 山口優一. 1997. かまいり茶炒り葉工程における香氣成分の變化. 茶業研究報告 82(別):54-55.

Kim, J.G. 2008. Growth, quality ingredient and manufacturing character of tea cultivars. Cheju national university.

Asai, H., K. Ogawa, Y. Hara, and K. Nakamura. 1987. Effect of alumina-tea catechin complex on the blood sugar in spontaneous diabetic mice. Clin. Report 21:163-166.

Cao, J. 1995. External test and clinical observation and evaluation of the caries preventive effect of tea. The 3rd international symposium on green tea, Seoul, Korea. p. 362-371.

Cho, Y. J., B. J. An, and C. Choi. 1993. Inhibition effect of against angiotensin converting enzyme of flavan-3-ols isolated Korean green tea. Kor. J. Food Sci. Technol. 25:238-242.

Choi, S. I., J. H. Lee, and S. R. Lee. 1994. Effect of green tea beverage for the removal of cadmium and lead by animal experiment. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26:745–749.

Choung, M. G and M. S. Lee. 2008. Optimal HPLC condition for simultaneous determination of catechins and caffeine in green tea extracts. *Korean. J. Crop Sci.* 53:224–232.

Choung, M. G and M. S. Lee. 2011. Optimal extracton conditions for simultaneous determination of catechins and caffeine in green tea leaves. *Food Sic. Biotechnol.* 20:327–333

Chun, B.S. 2000. The history of tea related culture in Korea. *J. Kor. Tea Soc.* 6(2):29–40.

Eun, J. B., J.H. Kim, and H.J. Chung, 2009. Antimicrobial effects of green tea extract against food-borne pathogens. *J. Kor. Tea Soc.* 15:1–11.

Fukai, K., T. Ishigami, and Y. Hara. 1991. Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacterial. *Agr. Biol. Chem.* 55:185–197.

Goto, T. 1992. Studies on NIR analyses of the chemical components in fresh tea leaves and crude tea and the evaluation of tea quality. *Tea Res. J.* 76:51–61.

Goto, T., H. Horie, and T. Mukai. 1993. Chemical composition of prized Japanese green tea in national tea competition (2). *Tea Res. J.* 76:27–32.

Goto, T., H. Horie, Y. Ozeki, H. Masuda, and J. Warashina. 1994. Chemical

- composition of Japanese green tea on market. *Tea Res. J.* 80: 23–28.
- Hara, T. 1994. Chemical properties of Japanese green tea analyzed by near infrared spectroscopy. *Tea Res. J.* 79:25–30.
- Hara, Y., S. Maysuzaki, and K. Nakamura. 1989. Antitumor activity of tea catechins. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi* 42:39–45.
- Higuchi, M., M. Hamasaki, T. Orita, and S. Satou. 2004. Development of the methods for the evaluation of the color of made tea and the analysis for the changes of the pigments during tea manufacturing. *Tea Res. J.* 97:17–25.
- Hunter, O. J., J. E. Manson, M. J. Stampger, G. A. Colditz, B. Rosner, C. H. Hennekens, F. E. Speizer, and W. C. Willett. 1992. A prospective study of caffeine, coffee, tea, and breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 136:1000–1001.
- Ikeda, N. and Y.G. Park. 2002. Morphological characteristics of Korean wild tea populations. *J. Jap. Breeding Research* 4:193–200.
- Isao O., N. Nakata, and K. Wada. 1970. Volatile components of black tea (part 1): Different of volatile components in essential oil of fresh tea leaves. *Tea Res. J.* 32:53–61.
- Je, S. J., Y. H. Lee, and Y. S. Chung. 2007. Morphological classification of tea leaves from varieties cultivated in Muye mountain area. *China. J. Kor. Tea Soc.* 13:131–142.
- Kato, S, and T. Liquors. 1971. Relation of amino acid with the sensory test evaluation of green tea liquors. *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.*, 18:388–393.

Kim, J.H., J. Choi, and Y.G. Park. 2007. The variation of morphological and functional property components of wild tea populations of Korea. J. Kor. Tea Soc. 13:123–140.

Kim, J.H., K.C. Lim, Y.G. Park, J.W. Kim, and H.G. Choi. 2002. Marks index for selection of the cultivar of (*Camellia sinesis* L.). J. Kor. Tea Soc. 8:43–54.

Kim, J.K., W.S. Cha, J.K. Park, S.Y. Oh, Y.J. Cho, S.S. Chun, and C. Choi. 1997. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannins from Korean green tea. Kor. J. Food Sci. Technol. 2:173–174.

Kim, K.J., J. Choi., K.H. Hur., J.I. Lyu, C.H. Bae, S.H. Lee, and H.J. Kim. 2006. Varietal classification by chemical components of *Camellia sinensis* germplasms. J. Kor. Tea Soc. 12:69–79.



Kubota, E. and T. Hara. 1976. Evaluating method of green tea grade by physical and chemical techniques, Tea Res. J. 50:63–67,

Lee, J.H. 2009. Cultural management to improve yield and quality of tea (*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze). p. 1–100.

Lee, M.S., J.H. Lee, J.D. Lee, J.W. Hyun, Y.G. Kim, Y.S. Hwang, H.J. Lee, S.S. Choi, S.J. Lee, and M.G. Choung. 2008. Growth characteristics and functional related components of Korean indigenous tea (*Camellia sinensis*) germplasms. Kor. J. Crop Sci. 53:333–338.

Lee S.B. 2001. A study on the first cultivation of tea in Korea. J. Kor. Tea Soc. 7(1):79–91.

Lee, S.H. and Y. Yamaguchi. 1997. Comparison of chemical components among spontaneous populations of Korean tea plant and Japanese green tea cultivar "Meiryoku". J. Kor. Tea Soc. 3: 57 – 65.

Lee, Y.H., K.W. Song, Y.O. Ko, S.M. Kim, and D.S. Chung. 2005. Studies on methods of raising seeding in native tea tree (*Camellia sinensis* L.). J. Kor. Tea Soc. 11:85–92.

Masuda, K., Y. Suzuki, and S. Amma. 1977. Difference of amino acids content among varieties and clones for green tea, Tea Res. J. 46: 1–8.

Masataka. Y. 1984. Analysis of high wield of tea leaves condition for the first tea crop on basis of shoot number and weight. Tea Res. J. 59:19–27.

Matsuzaki, T. and Y. Hara. 1985. Antioxidant activity of tea leaf catechins. Nippon Nogeikagaku Kaishi 59:129–134.

Michiko, K. and T. Yamanishi. 1983. Flavor constituents of Longjing tea. Agric. Biol. Chem. 47:2077–2083.

Michiko, N., Y. Nakatani, and T. Yamanishi. 1971. Studies on flavor of green tea, part IX. Identification and composition of intermediate and high boiling constituents in green tea flavor. Agric. Biol. Chem. 35:261–271.

Millin, D.J. 1987. Factors affecting the quality of tea. In S.M. Herschdoerfer(ed.), Quality control in the food industry. Academic press, London. p. 127–160.

Mukai, T., H. Horie, and T. Goto. 1992. Differences in total free amino acid and total nitrogen contents among various prices of green tea. *Tea Res. J.* 76:45–50.

Nakagawa, M., T. Anan, and K. Iwasa. 1977. The differences of flavor and chemical constituents characteristics between spring and summer green teas. *Tea Res. J.* 53:74–81.

Nakagawa M. and K. Furuya. 1975. Varietal difference of amino acids, tannin and nitrogen in tea shoots. *Study of Tea* 48:84–95.

Nou, I.S., Y. Yamaguchi and S.H. Lee. 1997. Comparison of chemical components among spontaneous populations of Korean tea plant and Japanese green tea cultivar "Meiryoku". *J. Kor. Tea Soc.* 3:57–65.

Oh, M.J. and B.H. Hong. 1995. Variation in chemical components of Korean green tea resulted from developing stages and processing recipe. *J. Kor. Tea Soc.* 40:518–524.

Oh, S.L., S.H. Lee, D.H. Shin and D.H. Chung. 1988. Quality evaluation of various green tea by the physico-chemical analysis and organoleptic characteristics. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 31:284–291.

Ota, I., N. Nakata, and K. Wada. 1970. Volatile components of black tea (part1). *Tea Research Journal.* 32:53–62.

Park, J.H., and K.S. Kim. 1998. Studies on growth environmental and inorganic components of Korean native tea plants (*Cmellia sinensis* O. Kuntze). *J. Kor. Soc. Soil Sci.* 13: 25–32.

Park, J.H., H.K. Choi, and K.H. Park. 1998. Chemical Components of various green teas on market. J. Kor. Tea Soc. 4(2):83-92.

Park, J.H., Y.O. Kim, S.H. Nam, and J.K. Kim. 2008. Effect of plucking season and days on main component content of green tea. J. Kor. Tea Soc. 14:167-174.

Park, Y.G. 2000. Biography of tea plant. genetic studies on *Camellia sinensis* var. *sinensis* of wild tea populations in Korea. The 1st Symposium on Tea Science and Culture p. 41-70.

Park, Y.G. 2007. Strategy of gene conservation of *Camellia sinensis* in Korea. J. Kor. Tea Soc. 13(1):125-140.

Park, Y.G., J.H. Kim, N. Ikeda, and D.I. Shin. 2001. Study on the origin and the transmission of Japanese and Korean tea plant. J. Kor. Tea Soc. 7: 117-123.

Park, Y.H., E.K. Won, and D.J. Son. 2002. Effect of pH on the stability of green tea catechins. J. Food Hygiene Safety 17:117-123.

Ryu, B.H. and C.O. Park. 1990. Antioxidant effect of green tea extracts on enzyme activities of hairless mice skin induced in ultraviolet B light. Kor. J. Food Sci. Technol. 22:355-361.

Saijo, R. 1981. Changes of catechin contents in tea leaves during development. Tea Res. J. 61:28-30.

Song, I.K., Y.D. Kim, S.G. Kang, and K.J. Song. 2012. Characteristics of tea shoot quality in yearly variation at different harvesting seasons and growth

stages in Jeju. J. Kor. Tea Soc. 18(2):60–68.

Shimada, K., M. Takahashi, A. Haji, M. Kaminohara, N. Matsuda, A. Nomura, E. Sawano, and K. Saeki. 1996. Changes in contents and extractabilities of some ingredients in tea leaves during manufacturing process of green tea (sencha), The Japanese Society for Food Sci. Tec. 43:695–702.

Shin, A.J. and S.J. Cheon. 1988. Physico-chemical properties of Korean green teas by varieties and processing methods. Kor. J. Soc. Food Sci. 4:47–52.

Song, Y.S., Y.H. Moon, S.K. Han, B.C. Jeong and J.K. Bang. 2005. Morphological characteristics of progeny population in collected wild Tea (*Camellia sinensis*). J. Kor. Tea Soc. 11:93–105.

Takanayagi, H. and M. Nakagawa. 1978. Distribution of the chemical constituents in different position of tea shoot. Tea Res. J. 47:48–52.

Takayanagi, H. and T. Anna. 1986. Changes in chemical and physical properties during the manufacturing of green tea, Tea Research Journal 64:39–43.

Takanayagi, H., T. Anan, K. Ikegaya, and M. Nakagawa. 1985. Variation of the chemical constituents during the development tea shoots. Tea Research Journal 61:20–25.

Tachibana, H. and T. Shoyama. 1979. Studies on the relation between color of tea leaves and its chlorophyll content. Tea Research Journal 49:56–60.

Tei, Y., A. Uchida, Y. Kawashima, Y. Fujinami, and M. Miyamoto. 1974.

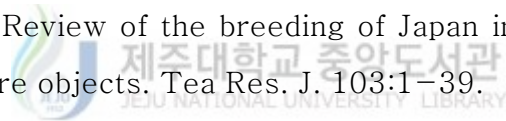
Comparison of aroma pattern between green teas from var. Sayamamidori and var. Yabukita. *Tea Research Journal* 41:48–53.

Yang, H.B., S.C. Lee, S.L. Kim, M.S. Lee, and K.J. Song. Effect of seed storage and sowing treatments on seed germination of tea. 2008. *J. Kor. Tea Soc.* 14(2):155–166.

Yeo, S.G., C.W. Ahn, Y.W. Lee, T.G. Lee, Y.H. Park, and S.B. Kim. 1995. Antioxidative effect of tea extracts from green tea, Oolong tea, and black tea. *J. Kor. Food Nutr. Soc.* 24:299–304.

Yoko, T., K. Ishiwata, and T. Yamanishi. 1976. Aroma component characteristic of spring green tea. *Agric. Biol. Chem.* 40:2151–2157

Takeda Y. 2007. Review of the breeding of Japan in the past one hundred years and its future objects. *Tea Res. J.* 103:1–39.



감사의 글

먼저 지난 10여 년간 어떠한 어려움 속에서도 곳곳하게 학자로서의 길을 걸을 수 있도록 도와 주시고, 이 논문이 완성될 수 있도록 지도해주신 송관정 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

또한 좋은 논문이 될 수 있도록 많은 지도와 심사를 해주신 강훈 교수님, 한상헌 교수님, 이영재 교수님, 바쁘신 중에도 가르침과 격려를 해주신 송인관 박사님과 조영렬 교수님께도 감사를 드립니다. 그리고 그 동안 굶은일을 항상 도맡아 하던 오은의님과 함께 고생한 김태균 박사님을 비롯해 실험실 동료 여러분들께도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

차와 인연을 맺은 후 인프라가 부족하던 어려운 시절부터 지금까지 한결같이 연구를 해올 수 있었던 것은 동고동락을 해온 동료들과 함께하였기에 가능했다고 생각합니다. 내일처럼 같이 고민하고 많은 격려를 해주신 설록차연구소 선후배님과 장원의 모든 식구들에도 함께 감사를 드립니다.



그리고 저를 처음 학문의 길로 이끌어 주신 박의호 교수님과 언제나 인생이란 길에서 등불을 밝혀준 멘토이자 형제인 전정기 교수님, 입사부터 지금까지 기술적인 것 뿐만 아니라 좋은 가치관을 가질 수 있도록 많은 가르침을 주신 이진호 대표님께 특별히 존경의 마음을 담아 감사를 드립니다.

돌이켜보면 학문을 시작하게 된 것이 작은 동기에 불과 했지만, 가족, 형제들, 좋은 스승들과 동료들의 믿음과 격려로 인해서 차츰 성장하였고 결국 지금의 성과로 결실을 맺게 되었다고 생각 됩니다. 이 마음을 잘 간직하여 앞으로도 언제나 배움의 자세로 살아갈 수 있도록 노력하겠습니다.

끝으로 누구 보다 오랫동안 손자의 박사학위를 기다리고 있을 외할머니께 이 기쁜 소식을 가장 먼저 전하고 싶습니다. 또한 그 동안 뒷바라지에 고생한 와이프 서창미 선생님과 현명한 사람으로 자라기를 믿어 의심치 않는 승은이에게 사랑한다 말과 기쁨을 함께하고 싶습니다. 그리고 언제나 한마음으로 든든하게 믿어주신 아버지, 어머니, 동생 내외에게 고마움을 느끼며 이 논문을 바칩니다.