

국내 브로콜리(*Brassica oleracea* L. var. *italica*) 유전자원 내 Glucosinolate 함량 변이

이준구* · 광정호 · 엄영철 · 이상규 · 장윤아 · 최장선

국립원예특작과학원 채소과

Variation of Glucosinolate Contents among Domestic Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Accessions

Jun Gu Lee*, Jung-Ho Kwak, Yeong Cheol Um, Sang Gyu Lee, Yoon-Ah Jang, and Chang Sun Choi

Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 440-706, Korea

Abstract. A total of 95 broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) accessions were evaluated for the identification of desulfo-glucosinolates and their content variation in the flower head using ultra performance liquid chromatography, to select the potentially functional broccoli breeding lines. The six individual desulfo-glucosinolates, including progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicinapin, and glucobrassicin, were commonly identified, based on the chromatogram peak comparison with those of the nine individual glucosinolate standards. The total glucosinolate contents varied from 4.2 to 29.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW and the glucoraphanin (1.6 to 13.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) was confirmed as a major constituent in the total glucosinolate profile among the six identified individual glucosinolate species, whereas the progoitrin, which was only detected in 13 accessions, showed accession-specific variation and negative correlation with glucoraphanin content. It was also revealed that the four major glucosinolates, such as glucobrassicinapin, glucoraphanin, glucobrassicin, and gluconapin, affected major content variation and showed higher positive inter-correlation. These results might be used for the selection of potential breeding materials as functional broccoli germplasm through the further evaluation on the stability and reproducibility of glucosinolate profile depending on environmental factors or cultural managements using the selected accessions.

Additional key words: glucobrassicinapin, glucobrassicin, gluconapin, glucoraphanin, progoitrin, sinigrin, UPLC

서 언

Glucosinolate는 황과 질소가 포함되어 있는 배추과 작물 특이 기능성 이차대사 산물로서 2001년까지 120종의 서로 다른 물질들이 여러 작물에서 동정되었으며, 이후 지속적인 연구 결과를 통해 새롭게 확인된 물질들까지 포함하면 그 수는 현재 200종에 이르는 것으로 보고되고 있다(Clarke, 2010). Glucosinolate에 속하는 각각의 물질들은 β -D-glucopyranose를 포함하고 있으며 8개의 서로 다른 아미노산으로부터 유래된 특이한 작용기에 따라 구분된다(Fahey et al., 2001). 식물생리학적으로 중요한 작용을 하는 각각의 glucosinolate

종류들은, 식물체 내에 존재하는 myrosinase 효소의 가수분해에 의하여 생성된 isothiocyanates에 의해 동물 또는 인체에 다양한 활성을 나타내게 된다(Halkier and Gershenzon 2006). Glucosinolates는 배추과(Brassicaceae) 작물의 독특한 맛과 향의 원천이고, 고유한 기능성 물질로서 인식되어 왔으며, 이들 특정 glucosinolate 성분이 증대된 계통의 선발 관련 연구가 지속적으로 수행되고 있다.

Glucosinolates는 quinone reductase, glutathione-S-transferase 및 glucuronyl transferase 등 phase II detoxification 효소의 활성을 유도함으로써 항암 기능을 발휘하는 것으로 알려져 있다(Holst and Williamson, 2004; Keum et al., 2004). 개별적인

*Corresponding author: goahead1@korea.kr

※ Received 2 July 2012; Revised 3 August 2012; Accepted 3 August 2012. 본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구사업(과제번호: PJ006722042012)의 지원에 의해 수행되었음.

glucosinolate들의 tryptophane, methionine, phenylalanine 등 주요 아미노산으로부터의 생합성 경로와 기작들은 많은 연구를 통해 알려져 있고 고찰되어 있다(Halkier and Gershenzon, 2006). 120여 종의 서로 다른 구조의 glucosinolate 중, 그 기능의 일부가 밝혀진 종류들은, glucoraphanin, glucobrassicin, gluconasturtiin 등인데, glucoraphanin과 glucobrassicin은 myrosinase에 의해 생성된 각각의 2차 대사산물인 sulforaphane과 indole-3-carbinol에 의하여 항암 기능성을 발휘하는 것으로 알려져 있으며(Traka and Mithen, 2009), gluconasturtiin으로부터 가수분해된 2-phenylethyl isothiocyanate 역시 phase I 효소의 활성을 억제하고 phase II 효소의 활성을 유도함으로써 암의 발생을 억제함이 밝혀졌다(Engelen-Eiglesemd et al., 2006; Hecht et al., 1999).

이와 같은 glucosinolate의 기능성 연구와 더불어, 배추과 작물 간 또는 동종 작물 내 품종 간 특이 glucosinolate의 동정과 함량변이의 분석 관련 연구들이 다수 수행된 바 있다(Fahey et al., 2001; Rangkadilok et al., 2002a, 2002b; Velasco and Becker, 2000; West et al., 2004). 이러한 각각의 주요 glucosinolate 종류별로 식물체 부위, 재배조건 및 환경조건에 따른 함량 변화 역시 다각도로 보고된 바 있다(Pereira et al., 2002; Petersen et al., 2002; Rangkadilok et al., 2002c; Vallejo et al., 2003a, 2003b).

브로콜리에 함유되어 있는 glucosinolate에 대해서는 다른 배추과 작물들에 비해 더욱 활발히 연구되어 왔다. 브로콜리의 섭취는 전립선 암(Joseph et al., 2004)과 폐암의 발생을 억제하며(Spitz et al., 2000), 이와 같은 작용의 유효물질로써 내재성 myrosinase에 의한 glucoraphanin의 분해 대사산물인 sulforaphane(1-isothiocyanato-4-methylsulphonylbutane)이 가장 유력한 물질로써 밝혀진 바 있다(Sarikamis et al., 2006). 또한 브로콜리는 화구에 함유되어 있는 glucobrassicin의 분해 대사물질인 indole-3-carbinol(I3C)과 3,3'-di-indolylmethane(DIM)에 의해 항암작용을 하는 것으로 알려져 있다(Bonnesen et al., 2001; Nachshon-Kedmi et al., 2004).

브로콜리의 인간 영양학적인 기능성 관련 다수의 연구결과를 근거로, 화구 내 glucosinolate의 저장조건에 따른 함량변화(Jones et al., 2006; Rangkadilok et al., 2002; Schreiner et al., 2006), sulforaphane의 생성에 미치는 대사기작(Matusheski et al., 2004; Williams et al., 2008), 품종별 glucosinolate 변이에 관여하는 유전적, 환경적 영향의 분석(Bellostas et al., 2007; Cartea et al., 2008; Perez-Balibrea et al., 2011; Rosa and Rodrigues, 2001) 등 많은 연구결과가 최근 보고된 바 있다. 이와 같이, 배추과에 속하는 작물별로 특이 glucosinolate의 동정 및 함량변이는 많이 연구되었으며, 특히 브로콜리

에 대한 glucosinolate 관련 식물생리 분야의 연구도 많은 진전을 보이고 있다.

반면, 국내에서의 브로콜리의 glucosinolate 관련 연구는 주로 수확 후 처리 또는 재배조건에 따른 함량의 변화에 한정되어 있고(Kwon et al., 2008; Lee et al., 2005), 국내 보유 브로콜리 유전자원 또는 육성계통들의 개별적 glucosinolate의 함량 변이와 물질간 상호관계에 대한 연구는 제한적인 실정이다. Glucosinolate의 분석방법적 측면에서는, 개별 glucosinolate에 대한 표준물질의 확보가 어렵기 때문에 단일 표준물질(sinigrin 등)을 이용하여 이미 알려진 response factor(Clarke, 2010; ISO 9167-1, 1992)를 적용하여 간접적으로 정량하는 것이 일반적으로 통용되고 있으나, 정확한 물질동정과 정량에 한계가 있었다.

따라서 본 연구에서는 9종의 주요 glucosinolate 표준물질을 이용하여 브로콜리 유전자원 중의 개별적 desulfo-glucosinolate를 동정하고 그 함량의 변이를 객관적으로 제시하고자 하였으며, 궁극적으로 glucosinolate 고함유 브로콜리의 품질육종을 위한 기초자료로 이용하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 분석시료의 조제

국립원예특작과학원 보유 브로콜리 유전자원 및 육성계통 95점을 대상으로 화구 내 desulfo-glucosinolate 함량 변이를 분석·평가하였다. 국내 브로콜리 주산지인 제주 지역에서 월동 작형으로 재배된 화구를 시험재료로 이용하였다. 95점의 브로콜리 계통을 8월 25일에 파종하고 9월 25일에 정식한 후 다음 해 1월부터 2월까지 계통별 최적 수확기에 화구를 채취하였다. 브로콜리 95계통에 대하여 수확 적기의 건전한 화구를 각각 3개씩 채취하여 가식부위를 절단한 후 골고루 혼합하여 계통별로 균일한 시료가 포함되도록 하였다. 1차 조제된 브로콜리 시료는 -70℃ 냉동고에 보관하였으며, 순차적으로 동결건조하여 분말화한 후 glucosinolate 분석을 위하여 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

Glucosinolate 추출

Desulfo-glucosinolates는 ISO 9167-1(1992) 및 Kliebenstein et al.(2001)의 방법을 일부 변형하여 추출하였다. 동결건조 후 마쇄된 계통별 브로콜리 화구 시료 100mg을 1mL의 끓는 70% methanol로 20분간 추출하고, 4℃에서 10분간 12,000rpm으로 원심분리하여 glucosinolates를 추출하였으며, 이 과정을 3회 반복한 후 상등액을 별도의 용기에 모두

모아 -20°C에서 냉동상태로 보관하였다. 브로콜리 화구로부터 1차 추출한 glucosinolates를 탈황산(desulfation)화 하기 위하여 별도의 Bio-Spin chromatography column(1.2mL bed volume, Bio-Rad Co., USA)을 이용하였다. Column에 충전시키는 DEAE-Sephadex A 25(Sigma-Aldrich Co.)는 0.1M sodium acetate(pH 4.0)로 활성화시켰으며 각각의 column에 0.75mL씩 분주하여 충전하였다. 미리 추출해 놓은 glucosinolate 추출액 전체를 DEAE-Sephadex A 25가 충전된 column에 가한 후, 10unit의 aryl sulfatase(EC 3.1.6.1, type H-1 from *Helix pomatia*) 200μL를 가하고 상온조건에서 24시간 동안 desulfation 시켰다. Desulfation된 glucosinolates는 증류수 1.5mL을 column에 가하여 추출하였고 0.2μm PTFE syringe filter를 이용하여 필터링한 후 UPLC 분석에 이용하였다.

UPLC 분석

Desulfo-glucosinolate 동정을 위하여 photo diode array (PDA) detector가 장착된 UPLC(H-Class, Waters Co., USA)를 이용하였으며 BEH-C18 컬럼(1.7μm, 2.1 × 100mm, Waters Co., USA)으로 분리하였다. 용매는 물(A)과 20%(v/v) acetonitrile(B)을 이용하여 1-99% gradient 변화로 0.2mL·min⁻¹ 조건에서 분석하였다(총 머무름시간 15분). Gradient 조건은 최초 6분까지 A 99%에서 B 99%로 변화시키고 10분까지 B 99% 조건에서 유지시킨 후, 12분까지 다시 A 99% 조건으로 변화시키고 15분까지 유지하여 개별 desulfo-glucosinolates를 분리하였다.

브로콜리 화구에 존재하는 glucosinolates를 동정하기 위하여, glucoiberin, progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicinapin, glucoerucin, glucobrassicin, gluconasturtiin의 총 9종의 표준물질(Cfm Oskar Tropitzsch Co., Germany)을 이용하였다. 각각의 표준물질들은 25, 50, 100ppm으로 각각 희석한 후 브로콜리 시료와 동일한 방법으로 desulfation 시키고, UPLC로 분리된 피크의 머무름 시간을 이용하여 동정하였으며, 파장 229nm에서의 각 9종 표준물질들의 농도에 따른 피크의 면적을 이용하여 정량분석하였다.

통계분석

브로콜리 화구 내 glucosinolate 함량변이의 분석에는 Sigmaplot 11.2(Systat Co., USA)와 SAS 9.1을 이용하였다. 개별 glucosinolate 정량분석을 위하여 균질화된 시료를 이용하여 3반복으로 분석하였으며, 계통별 평균함량은 평균과 표준오차(SE)로서 표시하였다. 개별 glucosinolate 상관분석에는 Pearson 상관분석법($P \leq 0.05$)을 사용하였다.

결과 및 고찰

농촌진흥청 국립원예특작과학원 보유 95점의 브로콜리 유전자원 및 육성계통의 제주도에서 재배한 시료에 대하여 화구 내 주요 desulfo-glucosinolate 종류를 표준물질의 UPLC chromatogram과 비교하여 동정하고 각 개별 glucosinolate의 함량변이를 평가하였다. 비교대상으로 이용한 총 9종의 glucosinolate 표준물질 중 브로콜리 화구에는 6종의 glucosinolates (progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicinapin, 및 glucobrassicin)가 동정되었으며, 그 중에서 glucobrassicin (indole 형)을 제외한 5종은 aliphatic형 glucosinolates이었고, 모든 glucosinolates는 8분 이내에 분리되었다(Table 1).

브로콜리 화구에서의 desulfo-glucosinolate 동정은 별도로 이용한 9종의 표준물질과의 비교를 통해 수행되었으며(Fig. 1), 총 9종의 glucosinolate 각각 표준물질들은 본 실험의 UPLC 분석조건에 의하여 명확히 분리 동정되었다(Fig. 1A). 브로콜리에서 핵심 기능성 물질로 알려져 있는 glucoraphanin 함량이 낮은 계통(PR96-1)의 경우, 총 6종의 서로 다른 glucosinolates가 동정되었으나(Fig. 1B and Table 1), glucoraphanin 함량이 상대적으로 높은 계통(M448)의 경우에는 progoitrin, gluconapin, 및 glucobrassicinapin은 동정되지 않았거나 미미한 농도로 존재함이 확인되었다(Fig. 1C). 대부분의 브로콜리 화구 시료에서 9종 glucosinolate 표준물질에 해당하지 않는 RT = 11.3min의 피크가 관찰되었는데(Figs. 1B and 1C) 이는 neo-glucobrassicin으로 추정되며, LC-MS 분석에 의한 분자량 확인 또는 표준중자물질

Table 1. The UPLC spectroscopy information on six identified major desulfo-glucosinolates in broccoli flower head.

Peak No.	Trivial name	Abbr.	R Side chain	Group ^z	Observed RT (min)
1	Progoitrin	PRO	(2R)-2-hydroxy-3-butenyl	Aliphatic	3.70
2	Glucoraphanin	RAP	4-methylsulphinylbutyl	Aliphatic	3.92
3	Sinigrin	SIN	2-propenyl	Aliphatic	4.12
4	Gluconapin	NAP	3-butenyl	Aliphatic	5.49
5	Glucobrassicinapin	CAN	4-pentenyl	Aliphatic	7.03
6	Glucobrassicin	BRA	3-indolylmethyl	Indolic	7.82

^zGlucosinolates are grouped on their biosynthetic origin.

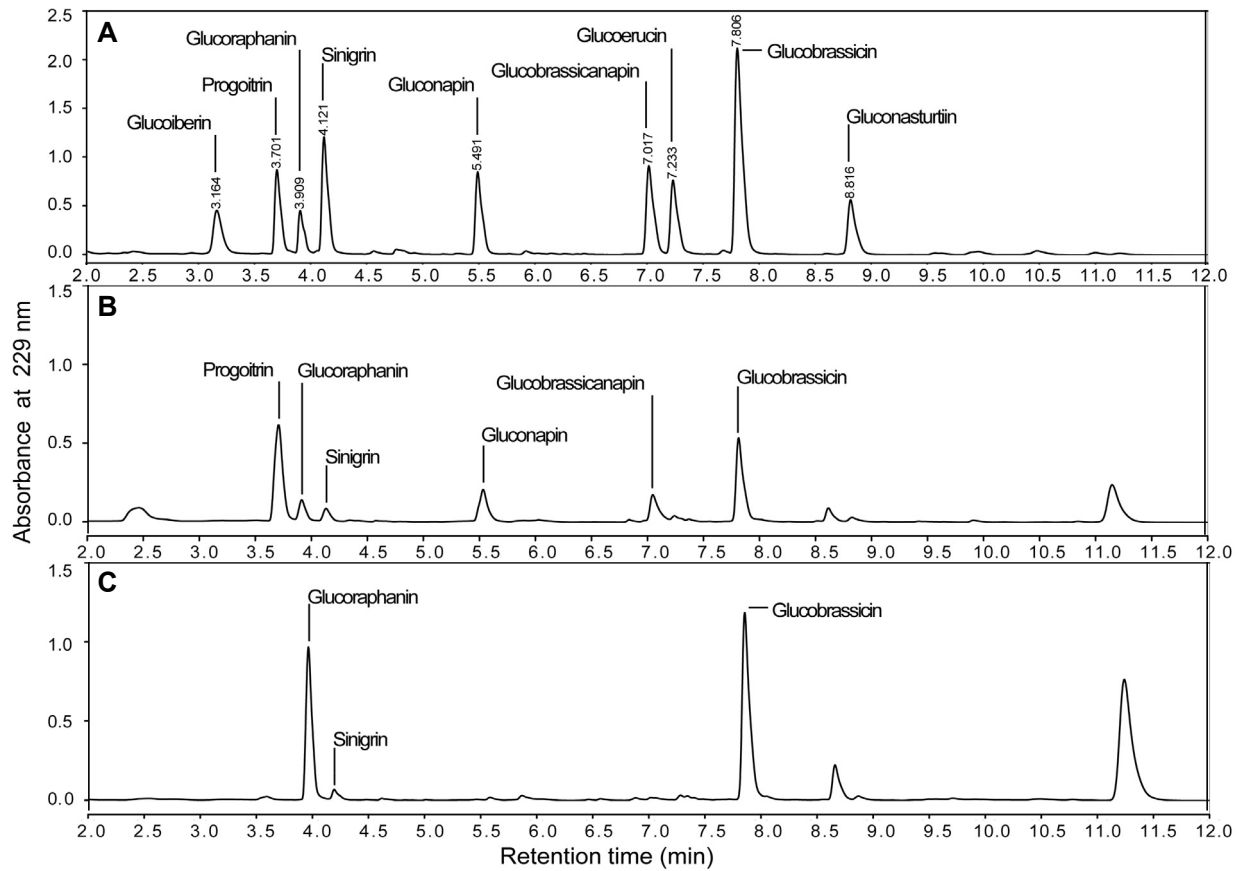


Fig. 1. Typical UPLC chromatograms of desulfo-glucosinolates from broccoli flower head. A, chromatographic separation of nine desulfo-glucosinolate standards; B, a UPLC chromatogram for low-glucoraphanin accession (PR96-1); C, a UPLC chromatogram for high-glucoraphanin accession (M448). The labels for the respective peaks represent the trivial names and retention times.

(BCR-367 등)의 chromatogram과의 비교분석을 수행한 다수의 선행 연구를 통해 확인된 바 있다(Cartea et al., 2008; Perez-Balibrea et al., 2011; Schreiner et al., 2006).

따라서 본 연구에서 브로콜리 화구에서는 품종에 따라 최대 6종의 개별적 glucosinolates가 표준물질과의 비교를 통해 동정되었으며 1개의 명확한 추가 피크(4-methoxyglucobrassicin 또는 neo-glucobrassicin)가 존재함이 추정되었다. 브로콜리 화구에 존재하는 glucosinolate 종류는 연구자에 따라 달리 보고된 바 있는데, Lee et al.(2005)은 브로콜리 싹채소에서 10종의 서로 다른 물질이, Kushad et al.(1999)은 화구에서 14종의 glucosinolates가 *Brassica oleracea*의 작물군에서 동정되었다고 보고하였다. 또한, Perez-Balibrea et al.(2011)은 최근 브로콜리의 종자와 싹채소에서 6종의 glucosinolates가 LC-MS를 이용하여 동정되었다고 보고하여 브로콜리의 생육단계와 부위에 따라 동정되는 물질의 종류에 차이가 있음을 보고하였다. 특히 indole glucosinolates의 경우 일반적으로 4종의 glucosinolates(4-hydroxyglucobrassicin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin 및 neo-glucobrassicin)가 존재함이 알려져 있고(Rosa et al., 2001), aliphatic glucosinolates

인 glucoiberin도 일반적으로 미량 동정이 되지만(Rosa and Rodrigues, 2001) 본 연구에서는 검출되지 않았고, indolic glucosinolates로써는 glucobrassicin만이 동정되었다. 이와 같이 동정된 개별 glucosinolate들의 종류가 서로 달리 보고된 이유는 채취 당시의 브로콜리의 부위, 생육단계 및 최초 추출의 방법적 차이에 기인한 것으로 판단되며, 기존의 연구결과들이 대부분 표준물질과의 비교를 통한 동정이 아니라 BCR-367 등 표준 종자물질과의 chromatogram 비교 후, response factor에 의한 정량과정을 통해 간접적으로 분석되었기 때문에 판단된다(Cartea et al., 2008; Perez-Balibrea et al., 2011).

제주도에서 재배한 95점 브로콜리 육성계통의 화구에서 동정된 6종 glucosinolate들의 함량변이를 평가하였다(Fig. 2). 총 함량에 있어서는 $4.2\text{--}29.0\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight(DW)의 범위로 확인되었으며 전체 95계통에 대한 평균 함량은 $10.9\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW이었다. 총 함량 중 glucoraphanin이 높은 비율을 차지하고 있었으며, 최소 $1.6\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, 최대 $13.9\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW의 함량을 보였다. 전체 95 계통에 대한 평균 glucoraphanin 함량은 $4.5\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW으로 나타났다.

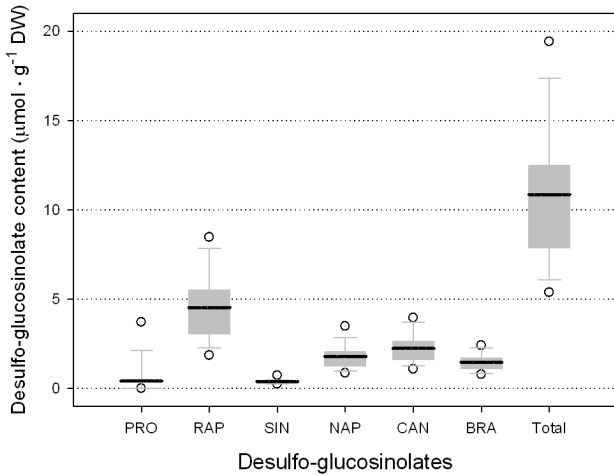


Fig. 2. The variations of six individual and total desulfo-glucosinolate contents in 95 broccoli accessions. The lower and upper circles represent 5 and 95% ranges. The bi-directional vertical error bars represent 10 and 90% ranges. The lower and upper borders represent 25 and 75% ranges. The horizontal solid lines represent the mean values of the corresponding GLS variation for 95 broccoli accessions. The identified desulfo-glucosinolates are shown in Table 1.

Glucoraphanin 이외에 동정된 progoitrin($0.0\text{--}6.7\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$), sinigrin($0.2\text{--}2.7\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$), gluconapin($0.7\text{--}4.7\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$), glucobrassicinapin($0.9\text{--}6.3\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$), glucobrassicin($0.6\text{--}3.8\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)의 5종 glucosinolate은 최대 함량을 보이는 계통들에 있어서도 평균 glucoraphanin 함량에 미치지 못하였다. 특히 progoitrin의 경우 95 공시계통 중 13종 계통의 화구에서만 존재하는 것으로 나타나 유전자원 및 계통에 따라 변이가 극명히 다른, 계통 특이적인 물질로 확인되었다. 본 연구의 결과로, 광범위한 유전자원 집단에 대한 개별적 glucosinolate의 정량분석 결과, progoitrin과 sinigrin의 경우 낮은 평균함량($0.40\text{--}0.41\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)으로, gluconapin, glucobrassicinapin, glucobrassicin의 3종 물질은 중간 정도의 평균함량($1.47\text{--}2.24\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$)의 변이를 보였으며, glucoraphanin이 가장 높은 함량으로 분포하는 것으로 확인되었다. 13종의 제한된 유전자원에서 가장 낮은 평균 함량 범위를 보인 progoitrin의 경우, 계통에 따라서는 최대 $6.7\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 의 높은 함량을 나타내어 progoitrin의 동물에 대한 유해성 관련 기존 결과(Chavadej et al., 1994; Ratzka et al., 2002)에 비추어 볼 때, 내적 성분을 목표로 한 선발에 있어서 glucoraphanin과 함께 필수적으로 고려해야 할 성분인 것으로 판단되었다.

Rosa et al.(2001)은 브로콜리 glucosinolate들 중에서 가장 많은 비율로 존재하는 것은 glucoraphanin이라고 보고하였으며, 11품종에 대하여 재식 시기별로 $4.5\text{--}28.5\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 범위로 존재함을 확인하여 본 연구에서의 결과와 유

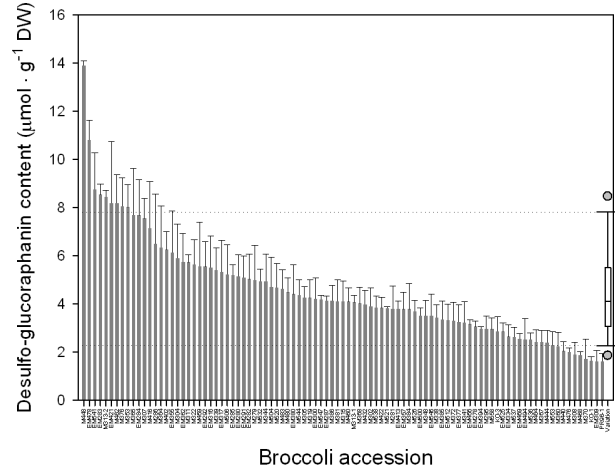


Fig. 3. Desulfo-glucoraphanin contents in 95 broccoli accessions. Vertical bars represent SE of the means ($n = 3$). The box plot represents the total variation of desulfo-glucoraphanin. The lower and upper circles represent 5 and 95% ranges. The bi-directional vertical error bars and dotted lines represent 10 and 90% ranges. The lower and upper borders represent 25 and 75% ranges. The horizontal solid line represents the total mean value of desulfo-glucoraphanin for 95 broccoli accessions.

사하였다. 총 glucosinolate 함량은 $15.9\text{--}59.3\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 범위로 본 연구에 비해 다소 높은 변이 폭을 보였다. 개별 glucosinolate의 질적인 분포에 있어서 역시 glucoraphanin이 다른 glucosinolate 종류에 비해 높은 비율을 차지하고 있어 본 연구 결과와 일치하였다.

브로콜리 육성계통 95점에 대해서 평균 glucoraphanin 함량은 최대 $13.9\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$, 최소 $1.6\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 으로, 상위 및 하위 10% 함량 범위에 속하는 각 9계통을 선발할 수 있었다(Fig. 3). 이들 중 M448과 EM478의 계통들은 desulfo-glucoraphanin 함량으로서 $10\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 을 상회하는 계통으로 확인되어 향후 고품질 육종의 소재로서 활용 가치가 높을 것으로 판단되었다. 반면 PR96-1 계통의 glucoraphanin 함량은 평균 $1.6\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 로, 최대 함량을 보였던 M448 계통에 비해 8.7배 낮은 함량을 보였고, progoitrin 함량은 $3.7\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$ 의 비교적 높은 함량을 나타내어, 계통에 따라 개별적 glucosinolate 함량과 질적인 변이의 차이가 큰 것으로 나타났다.

주성분 분석 결과, 주성분 1(Prin 1)로 전체 변이의 63.3%를 설명할 수 있었고 주성분 2(Prin 2)로는 전체 변이의 21.8%를 설명할 수 있었다. 개별적 glucosinolate 종류 중 glucobrassicinapin, glucoraphanin, glucobrassicin 및 gluconapin의 4종 glucosinolates가 전체 브로콜리 유전자원의 변이에 크게 영향을 미쳤고, glucoraphanin 함량이 상대적으로 낮았던 계통들의 경우 progoitrin과 sinigrin의 함량이 변이에 중요하게 작용하였다. 따라서 브로콜리의 glucosinolate 종류별

질적인 함량변이는 평균함량이 가장 높았던 glucoraphanin과 aliphatic glucosinolate인 glucobrassicinapin, gluconapin의 4종 glucosinolates에 의해 결정되는 것으로 판단되었다(Fig. 4). Glucoraphanin 함량이 높았던 상위 10%의 계통들은 glucobrassicinapin 함량도 높은 경향이었으며, 반면 하위 10%의 계통들은 4종 주요 glucosinolate의 함량은 낮으나 progoitrin의 함량이 높은 경향이었다(Fig. 4). 개별적 glucosinolate의 상관분석 결과, 핵심 기능성 물질인 glucoraphanin은 gluconapin($r = 0.8183$), glucobrassicinapin($r = 0.9786$), glucobrassicin($r = 0.8924$)과 높은 상관을 보였고 이들 4종 물질들은 상호간에도 높은 정의 상관관계가 있음이 확인되었으며 progoitrin과는 부의 상관관계($r = -0.2143$)가 인정되었다(Table 2).

본 연구에서 동정된 aliphatic glucosinolate 종류는 methionine으로부터 carboxylation에 의한 chain elongation 반응으로 순차적으로 합성된다(Chisholm and Wetter, 1967).

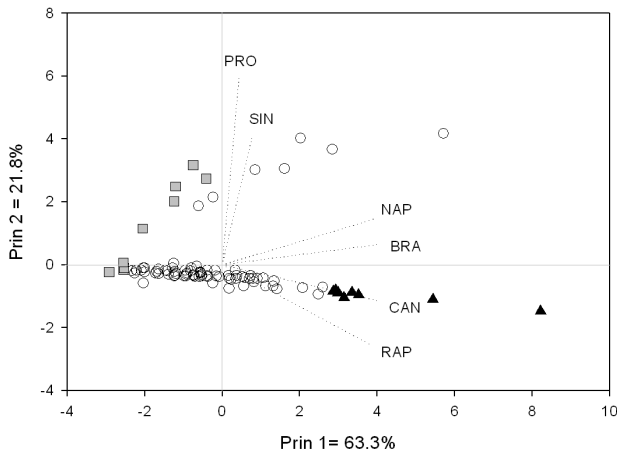


Fig. 4. PCA plot of individual desulfo-glucosinolate contents for 95 broccoli accessions. Abbreviations: PRO, progoitrin; RAP, glucoraphanin; SIN, sinigrin; NAP, gluconapin; CAN, glucobrassicinapin; BRA, glucobrassicin. The gray squares represent nine low-glucoraphanin accessions (lower 10% range among 95 broccoli accessions), and the black triangle represents 9 high-glucoraphanin accessions (upper 10% range among 95 broccoli accessions).

Sinigrin(2-propenyl glucosinolate)은 homo-methionine으로부터, glucoraphanin, gluconapin, progoitrin은 dihomomethionine으로부터, glucobrassicinapin은 trihomomethionine으로부터 각각 합성되어지는데, Brassica 작물별로 이러한 각각의 생합성 단계에서 chain elongation에 관여하는 GSL-ALK나 GSL-OH 등의 효소의 활성의 차이로 인하여, 생성 glucosinolate의 종류에 있어서 양적 또는 질적인 차이를 보이게 된다(Halkier and Du, 1997). Progoitrin은 dihomomethionine으로부터 시작하여 glucoraphanin으로, 다시 gluconapin으로 chain elongation되며 최종적으로 progoitrin으로 합성되는데, glucoraphanin과 progoitrin의 함량간 부의 상관관계가 나타나며 일부 계통에서만 특이적으로 progoitrin이 검출되는 것은 chain elongation 과정에 관여하는 GSL-ALK 또는 GSL-OH 효소의 활성에 있어서의 계통간 유전적 특성의 차이 때문으로 추정해 볼 수 있다. 또한 브로콜리에 있어서 glucoraphanin 함량을 높이기 위해서는 하위단계 생성 물질인 gluconapin이나 progoitrin으로의 전환을 억제하는 육종적, 생명공학적 전략이 가능할 것으로 판단된다.

최근 채소 작물의 육종에 있어서 인간 영양학적으로 우수한 성능을 보이는 계통의 선발과 이들을 적극적으로 품종화시키는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 브로콜리 역시 이와 같은 연구 필요성 하에, 이미 인간 보건적 기능의 많은 부분이 밝혀져 있는 glucoraphanin(sulforaphane의 전구물질) 고함유 브로콜리 품종의 개발 연구가 해외를 중심으로 수행되고 있다(Sarikamis et al., 2006). 브로콜리의 육종계통 내 glucosinolate 함량변이 역시 해외를 중심으로 많은 연구가 수행되어 핵심 물질들의 환경 및 유전적 변이 관련 연구 등이 보고된 바 있다(Bellostas et al., 2007; Cartea et al., 2008; Perez-Balibrea et al., 2011; Rosa and Rodrigues, 2001). 그러나 현재까지 국내에서의 브로콜리의 기능성 평가 연구는 상당히 제한적으로, 본 연구에서와 같이 폭넓은 유전자원을 대상으로 유효 glucosinolate 함량 변이의 분석 관련 연구가 수행된 바는 없다.

Table 2. Pearson's correlation coefficients for the individual desulfo-glucosinolate contents.

	Desulfo-glucosinolates				
	RAP	SIN	NAP	CAN	BRA
PRO ^z	-0.2143*	0.1462 ^{NS}	0.3745*	-0.0487 ^{NS}	0.1619 ^{NS}
RAP		-0.0352 ^{NS}	0.8183**	0.9786**	0.8924**
SIN			0.1656 ^{NS}	0.1111 ^{NS}	0.2870*
NAP				0.9078**	0.9650**
CAN					0.9662**

^zPRO, progoitrin; RAP, glucoraphanin; SIN, sinigrin; NAP, gluconapin; CAN, glucobrassicinapin; BRA, glucobrassicin.
^{NS,*,**}Non-significant, significant at $P = 0.05$, and 0.01 , respectively.

본 연구를 통해 브로콜리에서 동정된 6종의 glucosinolate 종류는 기존의 보고와 일치하고 있고 브로콜리의 glucosinolate 함량을 결정하는 주요 물질로 확인되었다. 반면, 미량으로 존재하는 물질에 대해서는 6-14종으로 연구자에 따라 달리 동정되었으며, 이들 동정 물질들의 상호관계와 질적인 함량 차이에 대한 정보 역시 부족한 상태로 이에 대한 추가 검토가 필요할 것으로 판단된다. 또한 본 연구의 glucosinolate 분석은 일반적으로 통용되고 있는, 표준종자물질(BCR367 등)과의 비교나 LC-MS에 대한 개별 물질의 분자량 확인 작업이 아닌, 표준물질에 의한 동정과 정량분석을 수행한 것으로서 브로콜리 유전자원 중에 존재하는 주요한 6종 glucosinolate에 대한 객관적인 변이의 평가가 가능하여, 향후 다른 배추과 작물의 기능성 물질 변이 평가에 있어서도 유용한 자료가 될 것으로 판단된다. 개별 물질들 중 glucoraphanin이 가장 변이에 크게 기여하였으며 glucoraphanin의 함량이 높은 계통들은 glucobrassicinapin 등 다른 aliphatic glucosinolate 함량도 높은 경향이였다. 계통에 따른 progoitrin의 함량은 품종 특이적인 함량 특성을 보였고 핵심 glucosinolate인 glucoraphanin과 progoitrin은 부의 상관관계가 있음이 확인되었다.

결론적으로, 본 연구는 glucosinolate 표준물질과 비교하여 국내 브로콜리 육성계통 및 유전자원에 대한 주요 glucosinolate 변이를 폭넓은 유전자원을 대상으로 평가한 것으로서, 향후 브로콜리 품질육종을 위한 중요한 근거자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 이와는 별도로 progoitrin 함량이 높은 특이 계통과 그 함량이 상대적으로 낮은 일반 계통과의 대사 생리적 차이에 대한 구명이 추가적으로 필요할 것으로 보이며, 향후 glucosinolate의 개별적 함량에 있어서의 질적·양적 차이에 대한 체계적인 평가가 국내 배추과 작물 전반에 대하여 연구될 필요가 있을 것으로 판단된다.

초 록

본 연구는 UPLC를 이용하여 국내 브로콜리 육성계통 95점의 화구 내 desulfo-glucosinolate를 표준물질과 비교하여 정량 분석하고 그 함량변이를 평가하여, 궁극적으로 고기능성 국내 브로콜리 품종 육성의 기초자료로 이용하고자 수행되었다. 브로콜리 화구에서 9종의 표준물질과 비교하여 progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicinapin 및 glucobrassicin 등 6종의 glucosinolate가 동정되었다. 전체 브로콜리 육성계통 95점에 대해서 총 glucosinolate 함량은 $4.2\text{-}29.0\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW의 변이를 보였다. 총 glucosinolate 중 glucoraphanin의 함량은 $1.6\text{-}13.9\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW로 가장 높

은 비율을 차지하였고 progoitrin은 제한적인 13개의 계통에서만 특이적으로 함유되어 있었으며 glucoraphanin의 함량과는 부의 상관관계를 보였다. 동정된 glucosinolate 중 glucobrassicinapin, glucoraphanin, glucobrassicin 및 gluconapin의 4종 물질이 전체 브로콜리 계통의 함량변이에 크게 영향하였고 이들 4종 물질 상호 간에는 높은 정의 상관관계가 있음이 확인되었다. 본 연구결과에서 선발된 브로콜리 유망 계통에 대해서는, 향후 재배 작형 및 연차간 물질함량의 안정성 평가와 유전자원 간 추가적인 비교평가 연구를 통하여 고기능성 육종소재로의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

추가 주요어 : glucobrassicinapin, glucobrassicin, gluconapin, glucoraphanin, progoitrin, sinigrin, UPLC

인용문헌

- Bellostas, N., P. Kachlicki, J.C. Sorensen, and H. Sorensen. 2007. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Sci. Hort.* 114:234-242.
- Bonnesen, C., I.M. Eggleston, and J.D. Hayes. 2001. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 61:6120-6130.
- Cartea, M.E., P. Velasco, S. Obregon, G. Padilla, and A. de Haro. 2008. Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* 69:403-410.
- Chavadej, S., N. Brisson, J.N. McNeil, and V. de Luca. 1994. Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2166-2170.
- Chisholm, M.D. and L.R. Wetter. 1967. The biosynthesis of some isothiocyanates and oxazolidinethiones in Rape (*Brassica campestris* L.). *Plant Physiol.* 42:1726-1730.
- Clarke, D.B. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Methods* 2:310-325.
- Engelen-Eigles, G., G. Holden, J.D.C. Cohen, and G. Garnder. 2006. The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J. Agric. Food Chem.* 54:328-334.
- Fahey, J.W., A.T. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Halkier, B.A. and J. Gershenzon. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:303-333.
- Halkier, B.A. and L. Du. 1997. The biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant Sci.* 11:425-431.
- Hecht, S.S., S.G. Carmella, and S.E. Murphy. 1999. Effects of watercress consumption on urinary metabolites of nicotine in smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 8:907-913.
- Holst, B. and G. Williamson. 2004. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod.*

- Rep. 21:425-447.
- International Organization for Standardization (ISO) 1992. Rapeseeds-determination of glucosinolates content. Part I. Method using high performance liquid chromatography, 9167-1. ISO, Geneva, Switzerland.
- Jones, R.B., J.D. Faragher, and S. Winkler. 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biol. Technol.* 41:1-8.
- Joseph, M.A., K.B. Moysich, J.L. Freudenheim, P.G. Shields, E.D. Bowman, Y. Zhang, J.R. Marshall, and C.B. Ambrosone. 2004. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases ml and tl, and prostate cancer risk. *Nutr. Cancer* 50:206-213.
- Keum, Y.S., W.S. Jeong, and A.N.T. Kong. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen* 555:191-202.
- Kliebenstein, D.J., J. Kroymann, P. Brown, A. Figuth, D. Pedersen, J. Gershenzon, and T. Mitchell-Olds. 2001. Genetic control of natural variation in arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.* 126:811-825.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem.* 47:1541-1548.
- Kwon, Y.D., E.Y. Ko, S.J. Hong, and S.W. Park. 2008. Comparison of sulforaphane and antioxidant contents according to different parts and maturity of broccoli. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:344-349.
- Lee, J.G., J.C. Jeong, Y.H. Yoon, D.C. Chang, and C.S. Park. 2005. S and N fertilizations affect the content of desulfoglucosinolates in broccoli sprouts. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 46:305-310.
- Matusheski, N.V., J.A. Juvik, and E.H. Jeffery. 2004. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry* 65:1273-1281.
- Nachshon-Kedmi, M., F.A. Fares, and S. Yannai. 2004. Therapeutic activity of 3,3'-diindolylmethane on prostate cancer in an in vivo model. *Prostate* 61:153-160.
- Pereira, F.M.V., E. Rosa, J.W. Fahey, K.K. Stephenson, R. Carvalho, and A. Aires. 2002. Influences of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 50:6239-6244.
- Perez-Balibrea, S., D.A. Moreno, and C. Garcia-Viguera. 2011. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chem.* 125:348-354.
- Petersen, B.L., S. Chen, C.H. Hansen, C.E. Olsen, and B.A. Halkier. 2002. Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214:562-571.
- Rangkadilok, N., B. Tomkins, M.E. Nicolas, R.R. Premier, R.N. Bennett, D.R. Eagling, and P.W.J. Taylor. 2002a. The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *J. Agric. Food Chem.* 50:7386-7391.
- Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, R.R. Premier, D.R. Eagling, and P.W.J. Taylor. 2002b. Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three *Brassica* species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea*, and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Sci. Hort.* 96:11-26.
- Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, R.R. Premier, D.R. Eagling, and P.W.J. Taylor. 2002c. Determination of sinigrin and glucoraphanin in *Brassica* species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. *Sci. Hort.* 96:27-41.
- Ratzka, A., H. Vogel, D.J. Kliebenstein, T. Mitchell-Olds, and J. Kroymann. 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11223-11228.
- Rosa, E.A.S. and A.S. Rodrigues. 2001. Total and individual glucosinolate content in 11 broccoli cultivars grown in early and late seasons. *HortScience* 36:56-59.
- Sarikamis, G., J. Marquez, R. MacCormack, R.N. Bennett, J. Roberts, and R. Mithen. 2006. High glucosinolate broccoli: A delivery system for sulforaphane. *Mol. Breeding* 18:219-228.
- Schreiner, M.C., P.J. Peters, and A.B. Krumbein. 2006. Glucosinolates in mixed-packaged mini broccoli and mini cauliflower under modified atmosphere. *J. Agric. Food Chem.* 54:2218-2222.
- Spitz, M.R., C.M. Duphorne, M.A. Detry, P.C. Pillow, C.I. Amos, L. Lei, M. de Andrade, X.J. Gu, W.K. Hong, and X.F. Wu. 2000. Dietary intake of isothiocyanates: Evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Bio-markers Prev.* 9:1017-1020.
- Traka, M. and R. Mithen. 2009. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem. Rev.* 8:269-282.
- Vallejo, F., C. Garcia-Viguera, and F.A. Tomas-Barberan. 2003a. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *J. Agric. Food Chem.* 51:3776-3782.
- Vallejo, F., F.A. Tomas-Barberan, and C. Garcia-Viguera. 2003b. Effect of climatic and sulphur fertilization conditions on phenolic compounds and vitamin C in the inflorescences of eight broccoli cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 216:395-401.
- Velasco, L. and H.C. Becker. 2000. Variability for seed glucosinolates in a germplasm collection of the genus *Brassica*. *Genet. Resources Crop Evol.* 47:231-238.
- West, L.G., K.A. Meyer, B.A. Balch, F.J. Rossi, M.R. Schultz, and G.W. Haas. 2004. Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, brussels sprouts, kale, and cabbage. *J. Agric. Food Chem.* 52:916-926.
- Williams, D.J., C. Critchley, S. Pun, S. Nottingham, and T.J. O'Hare. 2008. Epithiospecifier protein activity in broccoli: The link between terminal alkenyl glucosinolates and sulphoraphane nitrile. *Phytochemistry* 69:2765-2773.