

## 열처리에 의한 케일 새싹의 기능성물질 축적

이민정<sup>1</sup> · 임수연<sup>2</sup> · 김종기<sup>2</sup> · 오명민<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 원예과학과, <sup>2</sup>중앙대학교 식물시스템학과

### Heat Shock Treatments Induce the Accumulation of Phytochemicals in Kale Sprouts

Min-Jeong Lee<sup>1</sup>, Sooyeon Lim<sup>2</sup>, Jongkee Kim<sup>2</sup>, and Myung-Min Oh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>2</sup>Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

**Abstract.** The objective of this study was to determine the effect of heat shock treatments on the phytochemicals including antioxidants and anticancer materials in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) sprouts. In study I, kale sprouts grown under the growing system for four days were soaked at 40, 50, or 60°C distilled water for 10, 30, or 60 seconds, and in study II, kale sprouts were soaked at 50°C distilled water for 10, 20, 30, 45, or 60 seconds. After the heat shock treatments, the sprouts were transferred into normal growing conditions and recovered there for two days. Fresh and dry weights, electrolyte leakage, total phenolic concentration, antioxidant capacity, total flavonoid concentration, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and glucosinolates content of the sprouts were measured before and after the heat shock treatments. As a result, there was a significant decrease in the fresh and dry weight of kale sprouts treated with heat shock compared with control at harvest in study I. Especially, heat shock at 60°C lead to more pronounced growth inhibition compared with heat treatments at 40 and 50°C. Electrolyte leakage by cell collapse was the highest in the sprouts exposed to 60°C distilled water, which agreed with the growth results. Heat shock at 50°C significantly induced the accumulation of phenolic compounds. In study II, fresh weight of kale sprouts at 50°C heat shock showed a significant decrease compared with the control at one and two days after the treatment. However, the decrease was minimal and dry weight of kale sprouts was not significantly different from that in control. In contrast, the heat shock-treated kale sprouts had higher level of total phenolic concentration than control at harvest. Heat shock treatments at 50°C for 20 seconds or more showed at least 1.5 and 1.2 times higher total phenolic concentration and antioxidants capacity than control, respectively. The change of the total flavonoid concentration was similar with that of antioxidants. PAL activity after 24 hours of heat shock was higher in all the heat shock-treated sprouts than that in control suggesting heat shock may stimulate secondary metabolic pathway in kale sprouts. Seven glucosinolates were identified in kale sprouts and soaking the sprouts with 50°C water for 20 seconds had a pronounced impact on the accumulation of total glucosinolates as well as two major glucosinolates, progoitrin and sinigrin, at harvest. In conclusion, this study suggests that heat shock using hot water would be a potential strategy to improve nutritional quality of kale sprouts by inducing the accumulation of phytochemicals with antioxidant and anticancer properties.

**Additional key words:** *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, glucosinolates, phenolics, phenylalanine ammonia-lyase

#### 서 언

일반적으로 종자는 발아과정을 통해 영양소와 각종 기능성 성분의 활성도가 증가되어, 새싹채소의 경우 동일 종의

성숙채소보다 풍부한 비타민, 무기질, 아미노산, 기능성 물질 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2010; Lee et al., 2009). 따라서 새싹채소의 섭취는 인간의 건강을 유지하고 증진시키는데 매우

\*Corresponding author: moh@chungbuk.ac.kr

※ Received 9 May 2012; Revised 28 June 2012; Accepted 2 July 2012. 이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

효과적이며, 특히 항산화성이나 항암성 등을 띠는 기능성물질이 다량 함유되어 있어 새싹채소에 대한 관심이 높아지고 있다(Fahey et al., 1997; Takaya et al., 2003).

케일(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)은 배추과 중에서 야생 양배추(*Brassica oleracea*)에 가장 가까운 채소로서 원산지는 유럽이며, 수세기 동안 사람과 가축에게 모두 식용으로 사용되었다(Rosa and Heaney, 1996). 영양학적으로 케일은 비타민 A, B, C와 무기질(칼슘, 인, 칼륨)이 풍부하고 항암 물질로 잘 알려진 글루코시놀레이트(glucosinolates, GLS)를 다량 함유하고 있다(Schmidt et al., 2010). 또한 항암 물질 뿐만 아니라 항산화활성과 관련된 gallic acid, protocatechuic acid, caffeic acid 등과 같은 페놀성 물질도 케일 새싹 내에 상당량 존재한다(Jahangir et al., 2009). 플라보노이드류 중 대표 물질인 kaempferol은 케일( $211\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )이 양파( $< 2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 브로콜리( $72\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 등 다른 채소들에 비해 월등히 높다고 보고되었다(Hertog et al., 1992).

한편, 식물은 스트레스가 많은 환경조건에 노출되었을 때 자신을 보호하기 위한 방어 기작의 하나로써 항산화물질을 포함한 다양한 이차대사산물을 생합성하여 식물체 내에 축적하게 된다(Dixon and Paiva, 1995). 흥미롭게도 이러한 기능성물질의 대부분은 인체 내에서도 건강을 유지하고 질병을 예방하는데 중요한 역할을 담당한다. 최근 이런 점에 착안하여 생산 위주의 재배환경 조절보다는 이차대사산물의 생합성을 촉진시키는 재배환경을 조성하여 채소류의 항산화성을 포함한 기능성 물질 함량을 증가시키기 위한 재배법 연구가 활발히 진행되고 있다(Poiroux-Gonord et al., 2010; Rajashekar et al., 2009; Schreiner, 2005).

다양한 환경스트레스 중 열처리는 식물체 내 이차대사산물의 생합성의 핵심 효소인 페닐알라닌 암모니아-리아제(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)의 활성을 유도하였으며(Wahid et al., 2007), 재배 중의 상추의 열처리는 총 페놀 함량과 항산화도를 증가시켰다(Oh et al., 2009). 기능성물질이 풍부한 새싹채소에서 기능성물질의 변화는 품종(Pérez-Balibrea et al., 2011a), 유도인자(elicitors)(Pérez-Balibrea et al., 2011b), 광질(Samuoliené et al., 2011), 광도 및 저온(Oh and Rajashekar, 2009) 등에 유도되었다. 하지만 열처리에 의한 새싹채소를 포함한 채소류의 기능성물질의 축적에 대한 연구는 수확 후 가공 과정에 관한 것이 대부분이며(Dewanto et al., 2002; Hwang et al., 2006), 재배 중의 환경 스트레스 요인으로 처리한 연구는 거의 보고되고 있지 않다.

따라서 본 실험의 목적은 재배 시 고온의 물에 침지하여 열처리한 케일 새싹의 기능성물질의 함량과 생장의 변화를 확인함으로써 고품질 케일 새싹 생산을 위한 최적 열처리 조건을 구명하는 것이다.

## 식물 재료 및 재배환경

새싹 채소용 케일(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) 종자(아시아종묘, Korea)를 증류수에 30분간 침지시킨 후 트레이( $180 \times 90 \times 30\text{mm}$ , L  $\times$  W  $\times$  H)당 4g(약 1,200개)씩 파종하였다. 트레이가 담긴 자동새싹재배기(EasyGreen Mikro-Farm™, Seed and Grain Technologies, LLC, Albuquerque, NM, USA)를 식물생장상에 넣고 재배하였다. 식물생장상(DS51GLP, 다솔과학, Korea)은 온도  $20^\circ\text{C}$ , 광량  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (형광등 + 고압나트륨등), 광주기 12시간, 습도 65%로 유지하였다. 관수는 자동관수장치를 이용하여 하루에 6번(1, 5, 9, 13, 17, 21시), 각 15분씩 실시되었다. 동일한 관수조건을 조성하기 위해서 자동새싹재배기 안의 트레이를 하루 한번 시계방향으로 이동시켜 주었다. 케일 새싹 종자는 파종 후 6일간 재배하였다.

## 열처리

실험 I에서는 적정 열처리 온도와 대략적인 열처리 시간을 알아보기 위해 파종 후 4일째 된 케일 새싹을  $40^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$  증류수가 담긴 항온조(MSB-2011D, 모노텍, Korea)에 세가지 처리시간(10, 30, 60초)동안 새싹 전체를 침지시켰다가 꺼내어 다시 정상적인 생육 환경으로 이동시켜 추가적으로 2일 동안 재배하였다. 대조구를 포함하여 총 10개의 트레이가 실험 I에 사용되었다. 실험 II에서는 동일한 방법으로 파종 후 4일째 된 케일 새싹을 실험 I에서 선정된  $50^\circ\text{C}$  증류수가 담긴 항온조에 각각 다른 처리시간(10, 20, 30, 45, 60초)동안 케일 새싹을 침지시켰다가 다시 정상적인 생육 환경으로 옮겨 추가적으로 2일 동안 재배하였다. 실험 II에서는 대조구를 포함하여 처리당 1개의 트레이(총 6개 트레이)에서 자란 케일이 사용되었다.

## 생육

실험 I에서는 열처리 후 2일째, 실험 II에서는 열처리 후 1, 2일째 처리당 케일 새싹 12개체씩 4회(총 48개체) 수확하여 생육측정에 사용하였다. 페이퍼 타월로 물기를 제거한 뒤 케일 종자의 종피를 제외한 새싹 전체의 생체중은 전자저울(SI-234, Denver Instrument, USA)로 측정하였고, 그 후 건조부투에 넣어  $70^\circ\text{C}$  건조기(FS-420, Advantec, Japan)에서 3일간 건조한 후 건물중을 측정하였다.

## 전해질 추출

실험 I에서 열처리에 의한 세포조직의 파괴 정도를 알아

보기 위해 전해질 유출 정도를 측정하였다. 40, 50, 60°C에서 10, 30, 60초 열처리한 후 1일째 케일 새싹을 채취하여 50mL 튜브에 넣은 뒤 증류수를 15mL 넣고 10시간 동안 상온에 보관하였다. 그 후 1분간 진탕 혼합기(BV1000, Benchmark Scientific, Inc., USA)로 섞어준 후 EC 미터(HI 8633, Hanna Instruments, Italy)로 전기전도도(측정 1)를 측정하였다. 이 샘플은 80°C의 항온조에 2시간 처리하고 10시간 상온에 보관한 다음, 1분간 섞어준 뒤 전기전도도(측정 2)를 측정하였다. 전해질 유출 정도는 측정 1의 값을 측정 2의 값으로 나누어 표현하였다.

### 총 페놀 농도

총 페놀 농도는 Folin-Ciocalteu 방법으로 측정하였다(Ainsworth and Gillespie, 2007). 채취한 시료(약 0.2g)를 막자사발에 넣고 액체질소와 함께 갈아 가루로 만든 뒤 3mL의 80%(v/v) 아세톤을 넣고 잘 섞고, 2mL 마이크로 튜브에 추출액 1mL을 옮겨 담아 암기(4°C)에 12시간 이상 보관한 다음 원심분리(1000rpm, 2분)하여 얻은 상층액을 분석에 이용하였다. 2mL 마이크로 튜브에 135μL H<sub>2</sub>O, 750μL 10% Folin-Ciocalteu 용액(Sigma-Aldrich, USA)과 상층액 50μL를 넣고 섞어주었다. 영점조정 샘플에는 추출액 대신 80%(v/v) 아세톤 50μL를 넣었다. 마지막으로 600μL 7.5%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 추가한 후 10초간 섞어 45°C의 항온조에서 15분간 반응시켰다. 반응물을 식힌 후 분광광도계(UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용하여 765nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid(Acros Organics, Belgium)를 이용하여 0-1mg·mL<sup>-1</sup> 범위에서 얻었고, 단위 생체중(g) 당 gallic acid(mg)의 함량으로 표현하였다.

### 항산화도

항산화도는 ABTS(Aminobenzotriazole; 2,2'-Azino-bis[3-ethyl benzothiazoline 6-sulfonic acid] diammonium salt)를 이용한 방법으로 측정하였다(Miller and Rice-Evans, 1996). 케일 새싹(약 0.2g)을 막자사발에 갈아 80%(v/v) 아세톤으로 추출하여 이 추출액을 -20°C의 암기에 12시간 이상 두었다. 그 후 1000rpm에서 2분간 원심분리하여 얻은 상층액을 분석 시료로 사용하였다. ABTS(Sigma-Aldrich, USA) 27.4mg을 20mL의 증류수에 녹인 뒤 0.4g의 MnO<sub>2</sub>(Sigma-Aldrich, USA)를 넣고 30분간 섞어준 후 여과지(NO.2, Whatman International Ltd., UK)로 한번 걸러준 다음, 0.22μm 실린지 필터(NS25-N02, (주)노블바이오, Korea)로 한번 더 걸러주었다. 이렇게 활성화된 ABTS(ABTS\*)용액을 30°C의 항온조에 넣고, 5mM의 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4, ionic

strength[150mM NaCl])용액과 희석하여 730nm에서 흡광도를 0.7(± 0.02)로 맞추었다. 이 용액 1mL를 큐벳에 넣은 후 추출물 100μL과 반응 시켰으며 1분 후의 흡광도를 730nm에서 측정하였다. 표준곡선은 trolox(6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxyl acid)(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 얻었고, 단위 생체중(g) 당 trolox(mM)의 몰농도로 표현했다.

### 총 플라보노이드 농도

총 플라보노이드 농도는 Dewanto et al.(2002)이 사용한 방법을 이용하여 측정했다. 약 0.2g의 케일 새싹 샘플을 액체질소와 함께 막자사발에서 갈아 가루로 만든 후 3mL의 70% 에탄올(pH 3.2, formic acid 이용)을 넣고 추출하여 2mL 마이크로 튜브에 담아 4°C의 암기에서 12시간 이상 보관하였다. 추출액은 1000rpm에서 2분간 원심 분리시킨 후 상층액을 분석시료로 사용했다. 3mL 용기에 250μL의 상층액과 1.25mL의 증류수를 섞었고, 추가로 75μL의 5% NaNO<sub>2</sub>를 넣었다. 5분 후, 바로 만든 10% AlCl<sub>3</sub> 150μL를 첨가한 뒤 6분 후에 500μL의 1M NaOH와 증류수 275μL를 넣어 전체 반응물을 충분히 섞어 주었다. 이 때 영점조정 샘플로 추출액 대신 70% 에탄올(pH 3.2, formic acid 이용)을 넣어주었다. 모든 반응물을 5분간 반응시킨 후 510nm에서의 흡광도를 읽었다. 표준곡선은 (+)-catechin hydrate(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 0-500μg·mL<sup>-1</sup>의 범위에서 얻었고, 단위 생체중(g) 당 (+)-catechin hydrate(g)의 함량으로 표현했다.

### 페닐알라닌 암모니아-리아제 활성

PAL 활성은 L-phenylalanine과 반응하여 생성되는 trans-cinnamic acid를 측정하여 표현하였다(Boo et al., 2011). 약 0.2g의 케일 새싹 시료를 액체질소와 함께 막자사발에 갈고 25mM borate buffer(pH 8.8) 10mL과 2mL의 3mM β-mercapthoethanol을 넣어 추출한 후 그 추출액을 2mL 마이크로 튜브에 1.5mL을 취하여 담았다. 추출액은 1350rpm에서 20분간 원심분리시켰으며 상층액을 분석에 사용하였다. 시료의 0.5mL를 15mL 튜브에 넣고 2.5mL의 25mM borate buffer(pH 8.8)와 2.5mL의 10mM L-phenylalanine(Sigma-Aldrich, USA)을 추가로 넣은 뒤 섞어, 40°C의 항온조에서 2시간 동안 반응시켰으며, 5N HCl 100μL을 넣어 반응을 정지시킨 후 290nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 trans-cinnamic acid(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 0-1mM 범위에서 얻었고, 단위 생체중(g) 당 trans-cinnamic acid(mM)를 반응시간으로 나누어 표현했다.

## 글루코시놀레이트 함량

케일 새싹에서 GLS의 추출은 Official method ISO 9167-1에서 일부 변형된 desulfoGLS 분석 방법을 이용하였다. 동결건조 후 마쇄한 케일 새싹 시료 0.2g을 10mL의 끓인 70% 메탄올에 첨가하여 10분간 열처리하여 intact myrosinase을 불활성화시켰다. 열처리된 시료를 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 메탄올 추출액 3mL을 sodium acetate buffer(pH4.0)로 equilibrating 되어 있는 DEAE-Sephadex A-25 column(0.8mL)에 로딩하고 sodium acetate buffer로 1mL씩 2회 세척하였다. 정제된 aryl sulfatase(Sigma-Aldrich, USA) 75 $\mu$ L를 첨가하여 16시간 37 $^{\circ}$ C에서 GLS를 desulfoGLS로 유도시켰다. 이후 증류수 0.5mL로 2회 용출하여 HPLC로 desulfoGLS의 함량을 분석하였다.

DesulfoGLS의 정량분석은 UV/VIS 검출기(Gilson, USA)가 장착된 HPLC 305 시스템(Gilson, USA)을 이용하였다. C18 컬럼(XBD-C18, Agilent, USA, 4.5  $\times$  250mm, i.d., 5 $\mu$ m particle size)을 통해 물질을 분리하였고, 유속은 1mL $\cdot$ min $^{-1}$ 였으며, 컬럼 오븐 온도는 30 $^{\circ}$ C로 하였다. 시료 20 $\mu$ L를 물과 아세트나이트릴의 농도를 구배적으로 조성하여 물질을 분리하였다. 이동상 용매의 조성은 5분간 2%의 아세트나이트릴로 조성하였고, 20분까지 20% 아세트나이트릴로 증가시킨 뒤 10분간 유지하여 분리된 물질을 226nm에서 흡광도를 측정하였다. Internal standard로 2-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였고, 각 성분의 면적을 비교하여 정량( $\mu$ mol $\cdot$ g $^{-1}$  DW)하였다.

정성확인을 위하여 질량분석기(LTQ velos, Thermo Scientific, USA)가 장착된 Accela HPLC 시스템(Thermo Scientific, USA)를 사용하였고 negative 모드로 이온화된 입자들의 질량을 측정하였다. 전체 질량 스캔 범위는 m/z 50부터 m/z 2000까지 설정하였고, 질소가스의 유량은 10L $\cdot$ min $^{-1}$ , capillary 전압은 4kV로 조성하였다.

## 통계처리

실험설계는 하나의 트레이를 하나의 집구로 간주한 난괴법을 이용하였으며, GLS 함량(3반복)을 제외한 모든 항목은 4개체 반복으로 측정되었고, 실험 I과 II는 동일한 하나의 성장상에서 각각 2회 반복 시행하여 그 재현성을 검증하였다. 통계분석은 SAS 프로그램(SAS 9.2, SAS Institute Inc., USA)을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 평균간 비교는 Duncan의 다중범위검정을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 생육 특성(실험 I)

40, 50, 60 $^{\circ}$ C의 증류수에 각각 10, 30, 60초 동안 침지시켜 열처리 한 다음 추가로 2일 동안 재배한 케일 새싹의 생체중과 건물중은 대조구와 비교했을 때 유의적으로 낮은 값을 보였다(Table 1). 40 $^{\circ}$ C 모든 시간대의 열처리구에서 케일 새싹의 생체중은 대조구에 비해 유의적으로 낮았지만 다른 열처리 온도들에 비해서는 그 감소의 폭이 작았다. 50 $^{\circ}$ C 열

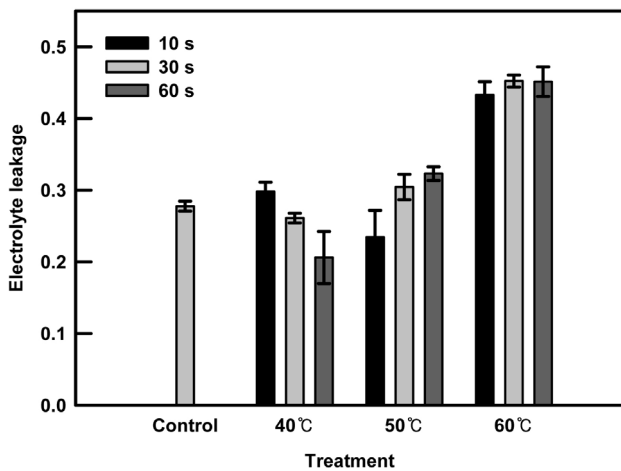
**Table 1.** Growth characteristics of kale sprouts at two days after heat shock. Kale sprouts were soaked at 40, 50, or 60 $^{\circ}$ C water for 10, 30, or 60 s.

Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time (s)	Fresh weight (mg/sprout)	Dry weight (mg/sprout)
Control		16.4 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> a <sup>y</sup>	3.2 $\pm$ 0.23 a
40	10	13.5 $\pm$ 0.10 cd	2.4 $\pm$ 0.10 bcd
	30	14.1 $\pm$ 0.22 bc	2.5 $\pm$ 0.11 bc
	60	14.7 $\pm$ 0.34 b	2.6 $\pm$ 0.16 bc
50	10	14.7 $\pm$ 0.41 b	2.9 $\pm$ 0.15 ab
	30	13.2 $\pm$ 0.34 cd	2.4 $\pm$ 0.09 cd
	60	12.5 $\pm$ 0.23 d	2.3 $\pm$ 0.05 cd
60	10	8.6 $\pm$ 0.67 f	2.0 $\pm$ 0.23 de
	30	7.2 $\pm$ 0.33 f	1.5 $\pm$ 0.13 e
	60	6.4 $\pm$ 0.36 f	1.8 $\pm$ 0.15 e
Significance			
Temperature (A)		***	***
Time (B)		***	***
A $\times$ B		***	***

<sup>a</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard error (n = 4).

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.001.

처리구의 생체중은 10, 30초 처리가 40°C에서의 열처리에 의한 결과와 비슷했지만 50°C의 60초 처리에서는 확연히 낮았다. 60°C 열처리에서의 생체중은 처리 시간에 관계없이 모든 처리구에 대해서 유의적으로 가장 낮았다. 특히 60°C의 60초 처리에서는 대조구에 비해 생체중이 2.5배 감소하였다. 건물중의 결과는 생체중과 비슷한 경향을 보였다. 40과 50°C에서 열처리한 케일 새싹의 건물중은 대조구에 비해 다소 낮았지만 60°C 열처리에서는 다른 처리구들에 비해서도 확연히 낮은 값을 나타냈다. 열처리가 새싹채소의 생장에 주는 영향은 세포막의 열 안정성과 관련된다. 열처리는 식물 세포막 단백질의 3차와 4차 구조에 변형을 초래하고, 그로 인해 막투과성을 증가시킨다(Wahid et al., 2007). 막투과성의 증가는 전해질의 유출을 유도하기 때문에, 전해질의 유출 정도는 세포의 열 안정성을 나타내는 지표로 여러 작물들에서 사용되고 있다(Blum et al., 2001; Chen et al., 1982). 또한 식물세포에서 전해질 유출은 광합성과 미토콘드리아 활성 감소와 관련된다. 광합성은 열에 민감한 과정으로 알려져 있고(Allakhverdiev et al., 2008), 실제 여러 작물에서 고온처리 시 순광합성율이 낮아지고, 생산량과 건물중의 감소가 보고되었다(Camejo et al., 2005; Giaveno and Ferrero, 2003). 본 실험에서 열처리에 의한 케일 새싹의 전해질 유출 정도를 측정할 결과 생육의 확연한 감소를 보였던 60°C 열처리구가 가장 높은 전해질 유출을 보인 반면, 40°C의 열처리구는 대조구와 유의적인 차이가 없었고, 50°C 열처리구는 처리시간의 증가에 따라 전해질 유출 정도가 증가하는 경향은 보였지만, 역시 대조구와 비교해서 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 1). 따라서 생육적인 측면에서 60°C의 열처리는 케일 새싹에 부적합한 것으로 판단되었다.

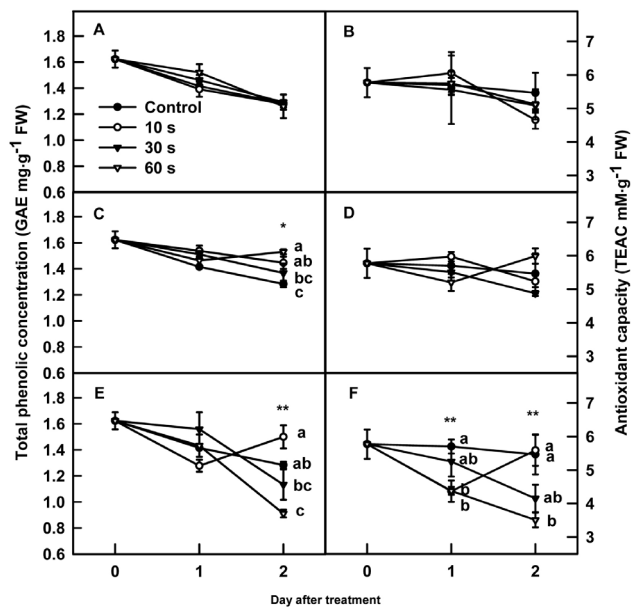


**Fig. 1.** Electrolyte leakage of kale sprouts one day after heat shock. Kale sprouts were soaked at 40, 50, or 60°C water for 10, 30, or 60 s.

### 총 페놀 농도와 항산화도(실험 I)

열처리에 따른 케일 새싹의 총 페놀 농도는 온도별로 다양한 변화 양상을 나타냈다(Fig. 2). 대조구의 총 페놀 농도와 비교했을 때 40°C 열처리 후 1일, 2일째의 농도는 모두 유의적인 차이를 보이지 않으며 점차 감소하였다. 반면 파종 후 6일(열처리 후 2일)까지 총 페놀 농도가 점차적으로 감소한 대조구에 비해 50°C의 열처리는 처리 후 1일째 유의적인 차이는 없었지만 높은 수치를 기록했고, 처리 후 2일째에는 60초 처리구에서 대조구에 비해 1.2배 유의적으로 높은 페놀물질 축적이 유도되었으며, 10초와 30초 또한 대조구에 비해 높았다. 60°C 열처리구의 총 페놀 농도는 가장 심한 변화를 나타냈다. 처리 후 1일째의 대조구와 열처리는 유의성은 나타나지 않은 반면, 처리 후 2일째의 총 페놀 농도는 60°C에서 10초 열처리가 처리 후 1일째에 비해 증가하였고, 60초 처리 시 총 페놀 농도는 대조구에 비해 오히려 유의적으로 감소하였다. 이는 심한 열처리가 세포 수준의 손상 뿐만 아니라 세포 수준 이하의 소기관들의 해부학적 구조 및 기능에 부정적인 영향을 미치기 때문으로 판단된다(Wahid et al., 2007).

항산화도 또한 침지처리에 사용된 증류수의 온도에 따라 다른 변화양상을 나타냈다(Fig. 2). 40°C 열처리 시 케일 새싹의 항산화도는 총 페놀 농도 변화와 비슷하게 처리 후 1일, 2일째 모두 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 50°C 열처리는 처리 시간 별 통계적 유의성은 나타나지 않았지만, 60초 처리에서 처리 후 1일째에 비해 처리 후 2일째에는 항산화



**Fig. 2.** Total phenolic concentration and antioxidant capacity of kale sprouts soaked at 40°C (A, B), 50°C (C, D), or 60°C (E, F) water for 10, 30, or 60 s. Significant at \* $P = 0.05$ , \*\* $P = 0.01$ .

도가 수치적으로 증가하였다. 60°C 열처리구에 의한 항산화도의 변화는 총 페놀 농도 변화 양상과 유사하였다. 60°C 열처리 후 2일째 항산화도는 대조구에 비해서 30, 60초 열처리가 상대적으로 낮았고, 60°C에서 10초 열처리 후 2일째 증가하여 대조구와 비슷하였다.

생육적온보다 높은 온도의 노출은 식물에 있어 형태적, 해부학적, 생리학적, 분자적으로 다양한 반응을 유도한다. 그 중 열처리에 의한 플라보노이드나 이소프레노이드 등과 같은 이차대사산물의 식물체 내의 축적은 다른 환경스트레스에 대한 식물의 내성 반응처럼 열에 대한 안정성을 높이기 위한 한 가지 수단으로 일어난다(Velikova and Loreto, 2005; Wahid and Ghazanfar, 2006). 또한 고온은 식물 세포 내의 엽록체와 미토콘드리아와 같은 장소에서 활성산소종을 발생시키고(Sairam and Tyagi, 2004), 이로 인해 항산화물질의 생합성을 유도한다(Wahid et al., 2007). 이전 연구에 의하면 열에 의한 신호를 전달하여 항산화물질 생합성을 유도하는 분자들도 밝혀지고 있다(Dat et al., 1998; Gong et al., 1997). 본 연구에서 50°C나 60°C의 열처리에 의해 페놀 물질과 항산화물질의 농도가 증가한 결과는 이런 측면에서 해석될 수 있을 것이다.

### 생육 특성(실험 II)

실험 I에서 생육과 페놀물질을 포함한 기능성물질 모두를 고려하여 가장 효과적이었던 50°C에서 적정 열처리 시간을 알아보기 위해 추가실험을 실시한 결과, 열처리 후 1일째와 2일째의 생체중은 대조구에 비해 모든 시간 처리구(10, 20, 30, 45, 60초)에서 유의적으로 낮은 값을 보였다(Table 2). 하지만 그 유의적 차이는 개체당 평균 6.2mg 정도였으며, 열처리한 케일 새싹의 건물중은 대조구와 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 이 실험을 통해서 50°C

의 열처리가 케일 새싹 성장에 큰 영향을 주지 않음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

### 총 페놀 농도, 항산화도 및 총 플라보노이드 농도(실험 II)

열처리를 하지 않은 대조구와 10, 20, 30, 45, 60초 동안 50°C의 증류수에 케일 새싹을 침지시킨 열처리구의 총 페놀 농도의 변화는 Fig. 3과 같다. 실험 I의 결과와 비슷하게 대조구에서는 파종 후 6일째(열처리 후 2일째)까지 점차적으로 총 페놀 농도가 감소했다. 열처리 후 1일째 60초를 제외한 나머지 열처리구는 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 하지만 열처리 후 2일째 10초를 제외한 20초 이상의 열처리에서 대조구에 비해 최소 1.5배 이상 총 페놀 농도가 증가하였다. 결국 50°C 열처리에 따른 케일 새싹의 생육과 총 페놀 농도의 변화를 분석해 보았을 때 생육 감소를 최소화하면서 총 페놀 농도를 극대화 할 수 있는 합리적인 열처리 시간은

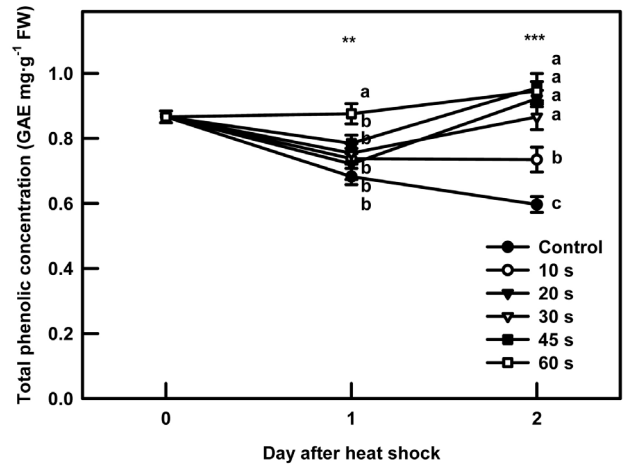


Fig. 3. Total phenolic concentration of kale sprouts soaked at 50°C water for 10, 20, 30, 45, or 60 s. Significant at \*\**P* = 0.01, \*\*\**P* = 0.001.

Table 2. Growth characteristics of kale sprouts soaked at one and two days after heat shock. Kale sprouts were soaked at 50°C water for 10, 20, 30, 45 or 60 s.

Time (s)	one day after heat shock		two days after heat shock	
	Fresh weight (mg/sprout)	Dry weight (mg/sprout)	Fresh weight (mg/sprout)	Dry weight (mg/sprout)
Control	20.3 ± 0.53 <sup>z</sup> a <sup>y</sup>	2.9 ± 0.14	21.8 ± 0.79 a	2.9 ± 0.26
10	14.7 ± 0.97 b	2.6 ± 0.10	16.8 ± 0.68 b	2.3 ± 0.08
20	13.7 ± 0.93 b	2.4 ± 0.22	14.6 ± 0.61 bc	2.1 ± 0.20
30	15.9 ± 0.96 b	2.7 ± 0.19	15.2 ± 0.59 bc	2.5 ± 0.17
45	13.3 ± 1.11 b	2.2 ± 0.14	14.2 ± 1.03 c	2.7 ± 0.28
60	15.1 ± 0.54 b	2.6 ± 0.12	14.8 ± 0.90 bc	2.3 ± 0.22
Significance	***	NS	***	NS

<sup>z</sup>Data are shown as mean ± standard error (n = 4).

<sup>y</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at *P* = 0.001.

<sup>NS</sup>Nonsignificant.

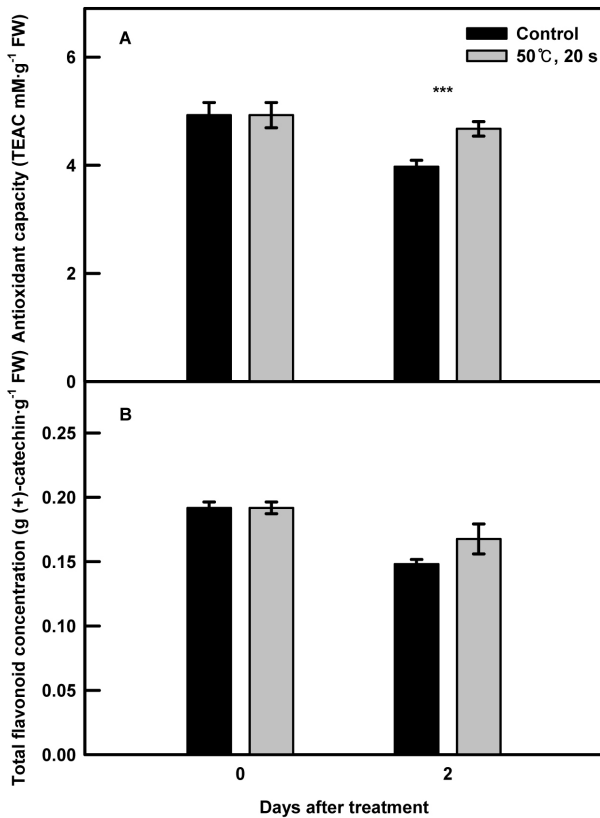


Fig. 4. Antioxidant capacity (A) and total flavonoid concentration (B) of kale sprouts soaked at 50°C water for 20 s. Significant at \*\*\* $P = 0.001$ .

20초임을 알 수 있었다. 추가적으로 50°C, 20초의 열처리는 항산화도와 총 플라보노이드 농도 증가에도 효과적이었다 (Fig. 4). 처리 후 2일째 대조구의 항산화도는 처리 전과 비교했을 때 확연히 감소하는 반면, 50°C에서의 20초 열처리구의 항산화도는 처리 전후의 감소 폭이 상대적으로 작아 처리 후 2일째의 항산화도는 대조구와 비교해서 유의적으로 약 20% 높은 값을 보였다. 총 플라보노이드 농도 또한 항산화도와 비슷한 경향을 나타냈다. 실제로 50°C에 20초 열처리한 케일 새싹의 배축은 대조구의 백색과는 달리 자주색을 띠는 것으로 보아 안토시아닌과 같은 기능성 관련 물질이 축적된 것으로 판단되었다(자료 미제시).

#### 페닐알라닌 암모니아-리아제 활성(실험 II)

50°C 열처리는 케일 새싹의 PAL 활성을 유도하였다(Fig. 5). 열처리 후 24시간 동안 6시간 간격의 PAL의 활성을 조사한 결과, 대조구의 케일 새싹은 18시간까지 높은 활성을 유지하다가 24시간에는 급격히 그 활성이 떨어진 반면, 열처리한 케일 새싹은 6시간째 다소 감소하는 경향을 보였지만 그 이후에 증가하기 시작하여 24시간까지 PAL의 활성을 유지하여 대조구에 비해 높은 활성을 보였다. 특히 열처리 시간

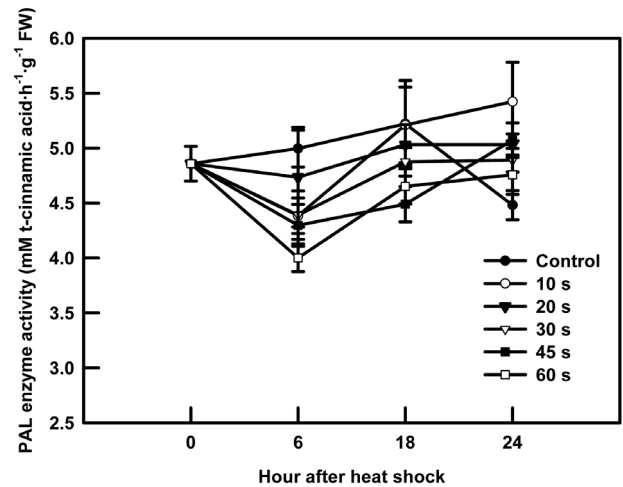


Fig. 5. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity of kale sprouts soaked at 50°C water for 10, 20, 30, 45, or 60 s.

이 짧을수록 PAL의 활성이 높게 나타났다. PAL은 플라보노이드를 포함한 폴리페놀릭물질과 다른 이차대사산물 생합성 경로상에서 매우 중요한 핵심 효소로 알려져 있다 (Chappell and Hahlbrock, 1984; Koukol and Conn, 1961). 따라서 이 효소의 활성은 이차대사산물의 식물체 내의 축적과 밀접한 관련을 갖고 있다. 이전연구에서 열처리에 의한 PAL 효소 활성의 증가는 열 스트레스에 대한 세포의 주요 순화반응으로 밝혀졌다(Rivero et al., 2001; Wahid et al., 2007). 이 실험에서도 열처리는 이 효소의 활성을 높였으며, 이는 열처리에 의한 총 페놀 농도와 항산화물질과 같은 기능성물질의 증가가 단순히 생체중의 감소로 인한 상대적인 증가효과가 아닌 실제적인 생합성 경로의 활성에 의한 증가임을 보여 주는 결과이다.

#### 글루코시놀레이트 함량(실험 II)

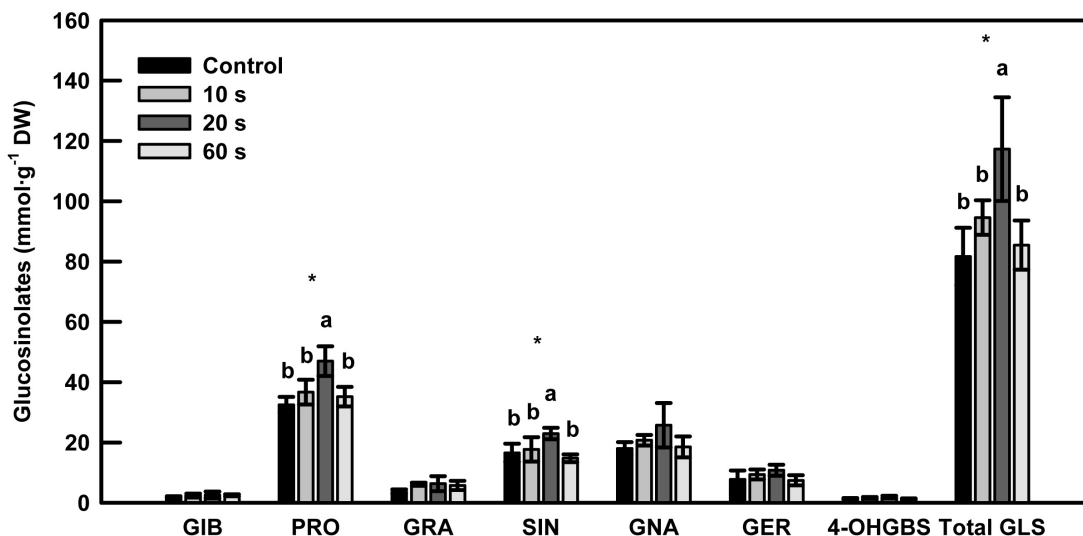
파종 후 6일째 케일 새싹의 주요 GLS는 progoitrin, gluconapin, sinigrin, glucoerucin, glucoraphanin, glucoiberin, 4-hydroxyglucobrassicin 순으로 나타났다(Table 3 and Fig. 6). 또한 본 분석에서 수행한 질량분석 실험을 통해 케일 새싹에서 7개의 GLS를 정성 확인하였다(Table 3). 이러한 결과는 Sarikamis et al.(2008)과 Velasco et al.(2007)에서 보고한 케일의 주요 GLS의 종류와 거의 일치하는 것으로 나타났다. 열처리에 의한 케일 새싹의 GLS 함량 및 조성의 변화는 다양하게 나타났다(Fig. 6). 50°C, 20초 처리구의 경우 progoitrin, sinigrin의 함량이 대조구와 다른 열처리구보다 유의적으로 높았으며, 총 GLS의 함량은 대조구에 비해 44% 유의적으로 높았다. 증가된 2종류의 GLS 중 sinigrin의 가수분해산물 중 하나인 allyl isothiocyanate는 살충, 항산화, 항암 및 항박테리아 효과를 직·간접적으로 나타낸다고

**Table 3.** Identified glucosinolates (GLS) and molecular weight of desulfoGLS in kale sprouts by mass spectrometry.

Trivial names	Abbreviation	DesulfoGLS	Mw <sup>z</sup> of desulfoGLS	Response Factor <sup>y</sup>
Glucoiberin	GIB	Desulfoglucosiberin	343	1.07
Progoitrin	PRO	Desulfoprogoitrin	309	1.09
Glucoraphanin	GRA	Desulfoglucoraphanin	357	1.07
Sinigrin	SIN	Desulfosinigrin	279	1.00
Gluconapin	GNA	Desulfoglucunapin	293	1.11
Glucoerucin	GER	Desulfoglucosucin	341	1.00
4-hydroxyglucobrassicin	4-OHGBS	Desulfo-4-hydroxyglucobrassicin	384	0.28

<sup>z</sup>Molecular weight.

<sup>y</sup>Glucosinolates contents were calculated using previously published response factor (ISO, 1992).



**Fig. 6.** Individual and total glucosinolates (GLS) content in kale sprouts soaked at 50°C water for 10, 20, or 60 s. Significant at \**P* = 0.05. GIB, glucoiberin; PRO, progoitrin; GRA, glucoraphanin; SIN, sinigrin; GNA, gluconapin; GER, glucoerucin; 4-OHGBS, 4-hydroxyglucobrassicin.

보고된 바 있다(Bhattacharya et al., 2010; Zhang, 2004). 또한 케일에서 검출된 gluconapin, glucoerucin, glucoraphanin 또한 가수분해 산물 중 isothiocyanates가 항암 및 항산화 효과를 보인다(Washida et al., 2010; Zhang, 2004). 따라서 본 결과를 통해 열처리는 페놀물질이나 항산화물질뿐만 아니라 생리활성이 뛰어난 GLS의 함량 증가에도 긍정적인 영향을 주었음이 확인되었다.

### 초 록

이번 연구는 새싹채소 재배 시 고온의 물을 이용한 열처리가 케일 새싹의 항산화물질과 항암성물질 등과 같은 기능성물질 축적에 영향을 주는지 확인하고자 수행되었다. 실험 I에서는 파종 후 4일째 40, 50, 60°C의 증류수가 담긴 항온조에 각각 10, 30, 60초 동안 침지하여 열처리 하였고, 실험 II에서는 50°C의 증류수에 각각 10, 20, 30, 45, 60초 침지

리 하였다. 열처리 한 케일 새싹은 다시 정상적인 생육 환경에서 2일 동안 추가적으로 재배되었다. 열처리 전, 후에 생체중, 건물중, 전해질 유출 정도, 총 페놀 농도, 항산화도, 총 플라보노이드 농도, 페닐알라닌 암모니아-리아제 활성, 글루코시놀레이트 함량을 측정하였다. 실험 I의 결과, 열처리 후 2일째 대조구에 비해 모든 처리구의 생체중, 건물중이 감소되었으며, 특히 60°C 열처리가 40, 50°C의 열처리보다 그 정도가 심했다. 세포 파괴에 의한 전해질 유출 정도 또한 60°C에서 가장 높게 나타났다. 총 페놀 농도는 50°C의 열처리에서 대조구에 비해 유의적으로 증가했으며 항산화도 또한 비슷한 경향을 보였다. 실험 II의 결과 50°C 열처리는 실험 I의 결과와 같이 생체중의 감소를 보였지만 그 정도는 크지 않았으며 건물중에서는 대조구와 유의적 차이가 없었다. 열처리 후 2일째 모든 처리구는 대조구에 비해 유의적으로 높은 총 페놀 축적을 유도하였다. 50°C에서 20초 이상의 열처리는 대조구에 비해 약 1.5배 이상 총 페놀 농도를 증가



시켰으며, 항산화도는 대조구에 비해 약 1.2배 유의적으로 높았고, 총 플라보노이드 농도 또한 대조구에 비해 높은 수준을 나타냈다. 페닐알라닌 암모니아-리아제의 활성은 열처리 24시간째에 대조구보다 모든 처리구에서 높게 나타나, 열처리가 이차대사산물의 생합성을 유도하는 것을 알 수 있었다. 열처리 후 2일째 글루코시놀레이트의 함량은 20초 열처리에서 유의적으로 가장 높은 값을 나타냈다. 따라서, 케일 새싹 재배 시 열처리는 항산화 및 항암물질과 같은 기능성물질의 축적을 유도하여 케일 새싹의 영양학적 품질향상을 도모할 수 있는 잠재적인 수단임을 확인할 수 있었다.

**추가 주요어 :** *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, 글루코시놀레이트, 페놀물질, 페닐알라닌 암모니아-리아제

## 인용문헌

- Ainsworth, E.A. and K.M. Gillespie. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2:875-877.
- Allakhverdiev, S.I., V.D. Kreslavski, V.V. Klimov, D.A. Los, R. Carpentier, and P. Mohanty. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosyn. Res.* 98:541-550.
- Bhattacharya, A., Y. Li, K.L. Wade, J.D. Paonessa, J.W. Fahey, and Y. Zhang. 2010. Allyl isothiocyanate-rich mustard seed powder inhibits bladder cancer growth and muscle invasion. *Carcinogenesis* 31:2105-2110.
- Blum, A., N. Klueva, and H.T. Nguyen. 2001. Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica* 117:117-123.
- Boo, H.O., B.G. Heo, S. Gorinstein, and S.U. Chon. 2011. Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Sci.* 181:479-484.
- Camejo, D., P. Rodríguez, M.A. Morales, J.M. Dell'amico, A. Torrecillas, and J.J. Alarcón. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.* 162:281-289.
- Cevallos-Casals, B.A. and L. Cisneros-Zevallos. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible species. *Food Chem.* 119:1485-1490.
- Chappell, J. and K. Hahlbrock. 1984. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* 311:76-78.
- Chen, H.H., Z.Y. Shen, and P.H. Li. 1982. Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Sci.* 22:719-725.
- Dat, J.F., C.H. Foyer, and I.M. Scott. 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of thermo tolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 118:1455-1461.
- Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adom, and R.H. Liu. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 50:3010-3014.
- Dixon, R.A. and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Fahey, J.W., Y. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10367-10372.
- Giaveno, C. and J. Ferrero. 2003. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. *Crop Breeding Appl. Biotechnol.* 3:89-94.
- Gong, M., S.N. Chen, Y.Q. Song, and Z.G. Li. 1997. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Austral. J. Plant Physiol.* 24:371-379.
- Hertog, M.G.L., P.C.H. Hollman, and M.B. Katan. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agr. Food Chem.* 40:2379-2383.
- Hwang, I.G., K.S. Woo, T.M. Kim, D.J. Kim, M.H. Yang, and H.S. Jeong. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 38:342-347.
- International Organization for Standardization (ISO). 1992. Rapeseed - Determination of glucosinolates content Part 1 (ISO 9167-1). ISO, Geneva.
- Jahangir, M., H.K. Kim, Y.H. Choi, and R. Verpoorte. 2009. Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety.* 8:31-43.
- Koukol, J. and E.E. Conn. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236:2692-2698.
- Lee, M.Y., S.L. Shin, S.H. Park, N.R. Kim, Y.D. Chang, and C.H. Lee. 2009. Development of optimal cultivation conditions and analysis of antioxidant activities of *Arctium lappa* sprout vegetables. *Kor. J. Plant Res.* 22:304-311.
- Miller, N.J. and C.A. Rice-Evans. 1996. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Rpt.* 2:161-171.
- Oh, M.M. and C.B. Rajashekar. 2009. Antioxidant content of edible sprouts: Effects of environmental shocks. *J. Sci. Food Agr.* 89:2221-2227.
- Oh, M.M., E.E. Carey, and C.B. Rajashekar. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 47:578-583.
- Pérez-Balibrea, S., D.A. Moreno, C. García-Viguera. 2011a. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chem.* 125:348-354.
- Pérez-Balibrea, S., D.A. Moreno, C. García-Viguera. 2011b. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem.* 129:35-44.
- Poiroux-Gonord, F., L.P. Bidel, A.L. Fanciullino, H. Gautier, F. Lauri-Lopez, and L. Urban. 2010. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *J. Agr. Food Chem.* 58:12065-12082.
- Rajashekar, C.B., E.E. Carey, X. Zhao, and M.-M. Oh. 2009. Health-promoting phytochemicals in fruits and vegetables:

- Impact of abiotic stresses and crop production practices. *Functional Plant Sci. Biotechnol.* 3:30-38.
- Rivero, R.M., J.M. Ruiz, P.C. Garcia, L.R. Lopez-Lefebre, E. Sanchez, and L. Romero. 2001. Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160:315-321.
- Rosa, E. and R.K. Heaney. 1996. Seasonal variation in protein, mineral and glucosinolate composition of Portuguese cabbages and kale. *Animal Feed Sci. Technol.* 57:111-127.
- Sairam, R.K. and A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Sci.* 86:407-421.
- Samuolienė, G., A. Urbonavičiūtė, A. Brazaitytė, G. Šabajevienė, J. Sakalauskaitė, and P. Duchovskis. 2011. The impact of LED illumination on antioxidant properties of sprouted seeds. *Central European J. Biol.* 6:68-74.
- Sarikamis, G., A. Balkaya, and R. Yanmaz. 2008. Glucosinolates in kale genotypes from the blacksea region of Turkey. *Biotechnol. Biotechnol. Equipment* 22:942-946.
- Schmidt, S., M. Zietz, M. Schreiner, S. Rohn, L.W. Kroh, and A. Krumbein. 2010. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 119:1293-1299.
- Schreiner, M. 2005. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European J. Nutr.* 44:85-94.
- Takaya, Y., Y. Kondo, T. Furukawa, and M. Niwa. 2003. Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L. *J. Agr. Food Chem.* 51:8061-8066.
- Velasco, P., M.E. Cartea, C. Gonzalez, M. Vilar, and A. Ordas. 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *J. Agr. Food Chem.* 55:955-962.
- Velikova, V. and F. Loreto. 2005. On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant Cell Environ.* 28:318-327.
- Wahid, A. and A. Ghazanfar. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol.* 163:723-730.
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf, and M.R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental Experimental Bot.* 61:199-223.
- Washida, K., M. Miyata, T. Koyama, K. Yazawa, and K. Nomoto. 2010. Suppressive effect of Yamato-mana (*Brassica rapa* L. *oleifera* group) constituent 3-butenyl glucosinolate (gluconapin) on postprandial hypertriglyceridemia in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74:1286-1289.
- Zhang, Y. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: Measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Res.* 555:173-190.