

브로콜리 꽃송이 및 줄기의 항산화, 항균 및 대장암 세포 생육억제효과

김미선¹, 이예슬¹, 권하영¹, 김종식², 손호용^{1*}

¹안동대학교 식품영양학과

²안동대학교 생명과학과

Received: January 27, 2014 / Revised: March 3, 2014 / Accepted: March 6, 2014

Antioxidative, Antimicrobial, and Anti-proliferative Activities of the Floret and Stalk of Broccoli (*Brassica oleracea* L.)

Mi-Sun Kim¹, Ye-Seul Lee¹, Ha-Young Kwon¹, Jong Sik Kim², and Ho-Yong Sohn^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

²Department of Life Science, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

In the course of study for a use for non-edible parts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), and the development of processed food utilizing these parts, edible floret and non-edible stalk were extracted with ethanol and different organic solvent fractions were prepared. With 10 different extracts and fractions, their useful components and various biological activities, such as antioxidant, antimicrobial and anti-proliferation activity, were investigated. The stalk has more abundant water soluble carbohydrate when compared with the floret, and floret has higher hexane-soluble pigments. Analysis of total flavonoid and total polyphenol contents showed that the floret has 1.5~1.99 times higher concentrations than the stalk. Among the fractions, ethylacetate (EA) fractions have the highest amount of total flavonoid and total polyphenol. The stalk and floret possessed 9.45 and 42.01 mg-total flavonoid/g, respectively. In the antioxidation activity assay, the EA fraction of floret showed strong radical scavenging activity and reducing power, while the n-hexane fraction of the stalk exhibited nitrite scavenging activity. In the antimicrobial activity assay, the EA fraction of floret showed a strong and broad-range of antibacterial activity, irrespective of gram positive or gram negative bacteria. In a while, the hexane and EA fractions revealed anti-proliferative effects against the human colorectal cancer cell HCT-116. Strong anti-proliferative activities were found in the hexane fraction of stalk (18.4% of cell viability), and the n-butanol fraction of floret (6.9% of cell viability). Our results suggest that the further study of the characterization of active fractions and the identification of active components from different parts of broccoli are needed to develop functional foods or novel plant-derived medicines.

Keywords: *Brassica oleracea* L floret, stalk, antioxidation, antimicrobial, anti-proliferation

서 론

브로콜리(*Brassica oleracea* L.)는 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 배추과 배추속에 속하는 작물로 “양배추의 꽃머리”라는 이탈리아 어원을 가지고 있으며, 녹색꽃 양배추로도 불린다. 브로콜리는 지중해 연안의 야생 양배추종에서 유래되었으며, 유럽, 미국 등 서양에서 주로 많이 소비되고 있는 야채이다. 전 세계적으로는 중국과 인도에서 75% 이상을 생산하고 있으며, 국내에서는 2000년 이후 기능성 채소에 대

한 선호도 증가와 함께 브로콜리 재배와 소비가 증가되고 있다[9, 21]. 브로콜리의 경우, 작은 꽃봉오리가 다발로 이루어진 꽃송이 부위를 주로 식용하며 잎과 줄기는 대부분 버려지고 있으며[13], 식용 꽃봉오리는 생으로 먹거나, 생즙을 만들어 먹으며, 식감을 증대시키고 섭취를 용이하게 하기 위해서는 물에 살짝 데쳐 먹는다[10]. 최근에는 브로콜리를 이용한 가공식품 개발에 관심이 집중되고 있는데, 특히 브로콜리 분말을 첨가하여 제조한 파운드 케익[21], 머핀 및 떡 개발 연구[4]가 보고되어 있으며, 기존에는 먹지 않았던 잎 부위 등을 이용한 장류 발효식품 개발[22]도 진행되고 있다.

브로콜리는 ascorbic acid, β -carotene, rutin, selenium, glutathione, quercetin 등이 다량 함유되어 있어 영양성분만 아니라, 기능성도 우수한 것으로 알려져 있으며, 민간에

*Corresponding author

Tel: +82-54-820-5491, Fax: +82-54-820-7804

E-mail: hysohn@anu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

서는 브로콜리가 신경을 진정시키고 간장의 기능을 활발하게 하는 기능이 있다고 알려져 있다. 과거에는 주로 브로콜리의 재배, 수확, 저장[17] 및 브로콜리 싹의 발아연구[16]가 이루어졌으나, 최근에는 유용 기능성 평가 및 활성 성분에 대한 연구가 집중되고 있다. 브로콜리에서 보고된 유용 생리 활성으로는, 항비만 및 콜레스테롤 저하효과[15], 항염증 효과[7], 항산화 효과[11], ovalbumin 유도성 천식 완화효과[23] 및 고압 열수 추출물의 그람 양성균에 대한 항세균 활성[13] 등이 알려져 있다. 또한 브로콜리에는 높은 함량의 glucosynolate가 함유되어 있는데[14], 대표적인 glucosynolate 전환체인 sulforaphane [25]은 발암억제 활성[3, 6, 20], non-small lung cancer, chondrosarcoma 및 인간 자궁암세포의 사멸효과[18, 19, 24, 28], 세포주기 인자의 조절활성[3] 등이 효과가 알려지면서 항암 및 암 예방 기능성 식품소재로서 관심이 집중되고 있다. 또한 최근 sulforaphane의 혈소판의 platelet adenylate cyclase 활성화 효과[5]도 보고되어 혈액순환 개선효과도 있는 것으로 보고되어 있다.

본 연구에서는 브로콜리의 비가식 부위의 효율적인 이용 및 브로콜리의 가공식품 개발 연구의 일환으로 브로콜리의 주요 가식부위인 꽃 부위(floret)와 비가식 부위인 줄기 부분(stalk)을 대상으로 각각 에탄올 추출물 및 이들의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 항산화, 항균 및 대장암 세포 생육억제능을 평가하였다. 그 결과, 브로콜리 꽃 및 줄기의 지용성 hexane 분획물 및 ethylacetate 분획물이 우수한 항산화, 항균 및 대장암 세포 생육억제효과를 나타냄을 확인하였으며, 선호도가 낮은 브로콜리 줄기를 이용한 가공식품 개발이 가능함을 제시하고 있다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 브로콜리는 2012년 6월에 H사에서 구입하였고, 흐르는 물에 세척 후 꽃송이(floret)와 줄기(stalk)를 각각 구분하여 사용하였다. 시료 조제를 위해서는 수세한 1 kg 브로콜리 줄기 및 꽃송이를 각각 세절하여 10 L의 에탄올(Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 첨가하여 실온에서 24시간씩 2회 추출하였으며, 각각의 추출액은 여과지(Whatman No. 2)로 거른 후 55°C에서 감압 건조(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)하여 조제하였다. 각각의 추출물의 유기용매 분획물 조제를 위해서 각각의 추출물을 증류수에 현탁한 후 *n*-hexane, ethylacetate 및 *n*-butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 최종적으로 물 잔류물을 회수하였으며, 여과지로 거른 후 55°C에서 감압 건조하여 분말화하였다. 각각의 시료는 DMSO에 적당한 농도로 녹여 *in-vitro* 항산화, 항

균 및 암세포 생육억제 활성 평가에 사용하였다. 기타 사용한 시약은 시약급 이상으로 Sigma Co. (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 브로콜리 꽃송이 및 줄기 시료는 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2012-BO-F1~F5 및 2012-BO-S1~S5).

항산화 활성

브로콜리 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) anion scavenging activity [DSA], ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] cation scavenging activity [ASA], nitrite scavenging activity [NSA] 및 환원력 측정으로 평가하였다[8]. 먼저 DSA 측정의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20 μ l에 99.5% ethanol에 용해시킨 2×10^{-4} M DPPH용액 380 μ l를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader (Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DSA(%)는 시료 첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였다[2]. ASA 측정의 경우, 7 mM ABTS (Sigma Co., USA) 5 ml와 140 mM potassium persulfate 88 ml를 섞은 후 상온에서 16시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 ethanol로 희석하였다. 조제된 희석용액 190 μ l와 시료 10 μ l를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA(%)를 결정하였다[1].

$$ASA (\%) = [(C - S)/C] \times 100$$

C: DMSO 첨가시 흡광도

S: 시료 첨가시 흡광도

한편 NSA측정의 경우, 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정된 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent (Sigma Co., USA)를 가하고 혼합하였다. 이후 15분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 nitrite 양을 측정하였다. NSA(%)는 다음의 식에 의해 계산하였다[2].

$$NSA (\%) = [1 - (A - C)/B] \times 100$$

A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도

B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도

C: 브로콜리 시료의 흡광도

환원력 평가의 경우 Oyaizu 등의 방법을 변형하여 측정하였다[2]. Ethanol에 용해한 시료 2.5 ml에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml와 10% potassium

ferricyanide 2.5 ml를 첨가하고 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 2.5 ml를 첨가하여 반응을 종료하고 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 증류수로 2배 희석한 후, 신선하게 조제된 0.1% ferric chloride 용액과 5:1 (v/v) 비율로 혼합하고 700 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다. 상기의 항산화 실험에서 대조구로는 vitamin C (Sigma Co., USA)를 사용하였으며, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다. 각각의 활성 평가는 각각 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 표시하였다.

항균 활성

조제된 브로콜리의 추출물 및 이의 분획물의 항균 활성은 기존의 보고된 방법과 동일하게 평가하였다[8]. 항세균 활성 평가를 위한 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* KCTC1916, *Listeria monocytogenes* KACC10550, *Bacillus subtilis* KCTC1924를 사용하였으며, 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* KCTC1682, *Pseudomonas aeruginosa* KACC10186, *Proteus vulgaris* KCTC2433, *Salmonella typhimurium* KCTC1926, 항진균 활성 평가를 위해서는 *Candida albicans* KCTC1940 및 *Saccharomyces cerevisiae* IF00233를 사용하였다. 항세균 활성 평가의 경우, Nutrient broth (Difco Co., USA)에 각각의 세균을 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각 균주를 OD₆₀₀ 0.1로 조정하여 Nutrient agar (Difco Co., USA) 배지를 포함하는 멸균 petri dish (90 × 15 mm, Green Cross Co., Ltd. Korea)에 100 µl 도말하고, 각각의 시료 5 µl를 멸균 disc-paper(지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여, 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며[1], 진균의 경우에는 Sabouraud dextrose (Difco Co., USA)를 이용하여 동일한 방법으로 30°C에서 24시간 동안 배양 후, 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다[12]. 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole (Sigma Co., USA)을 각각 1 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

대장암세포 생육억제 활성

인간유래 대장암세포 HCT-116 세포주의 배양 및 계대에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco-BRL Inc., USA)를 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL Inc., USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene Inc., Deageon, Korea)을 첨가하여 사용하였다[26]. 브로콜리 꽃송이 및 줄기 시료들의 HCT-116 세포주의 생육에 미치는 영향은 One solution cell proliferation assay kit

(Promega, USA)을 이용하여 평가하였다. 즉, 96 well plate에 well당 3×10^3 개의 세포를 접종하고 24시간 배양한 후 1 mg/ml 농도로 브로콜리 추출물 및 분획물들을 각각 처리하고 24시간 동안 반응시킨 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS; Promega, USA) 용액을 각 well 당 20 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응 시켰으며, 반응 종료 후 96 well plate reader (Expert 96 UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 성장률을 계산하였다[26]. 결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 평균과 편차 값으로 나타내었다.

기타 분석

브로콜리 꽃송이 및 줄기의 수분함량은 적외선 수분측정기(HG53 Halogen Moisture Analyzer, Mettler-Toledo International Inc., Zurich, Switzerland)로 측정하였으며, 각각의 추출물 및 분획물의 총 flavonoid의 함량 측정은 기존의 보고한 방법[8]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출액 400 µl에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 µl를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 추출액 400 µl에 50 µl의 Folin-ciocalteau, 100 µl의 Na₂CO₃ 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[27]. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 sucrose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 glucose를 표준물질로 하여 DNS 변법을 이용하여 측정하였다[2]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 21.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결과 및 고찰

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 성분 비교

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 수분함량은 각각 $90.9 \pm 3.1\%$ 와 $86.8 \pm 2.5\%$ 로 나타나 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 에탄올 추출 효율은 각각 시료량 대비 4.13%와 5.35%로 꽃송이의 추출효율이 줄기 부위보다 더 높게 나타났다. 줄기 추출물 및 꽃송이 추출물의 *n*-hexane, ethylacetate, *n*-

Table 1. The yields of ethanol extraction and organic solvent fractions of broccoli and their components analysis of extracts and fractions.

Samples	Extract/fraction	Yield (%)	Content (mg/g)			
			Total flavonoid (RE) ²⁾	Total polyphenol (TE) ³⁾	Total sugar (SE) ⁴⁾	Reducing sugar (GE) ⁵⁾
Stalk	ethanol extract	4.13	2.76 ± 0.00 ^{6),a}	16.87 ± 0.35 ^c	189.51 ± 2.38 ^e	172.96 ± 2.61 ^h
	<i>n</i> -hexane fr. ¹⁾	2.69	4.82 ± 0.48 ^{bc}	22.37 ± 0.92 ^{cd}	44.90 ± 0.69 ^b	20.65 ± 0.82 ^b
	ethylacetate fr.	1.05	9.45 ± 1.05 ^d	37.47 ± 0.79 ^e	39.99 ± 0.18 ^b	12.17 ± 0.16 ^a
	<i>n</i> -butanol fr.	21.87	4.25 ± 0.32 ^b	26.45 ± 0.88 ^{de}	258.19 ± 13.16 ^g	232.69 ± 3.26 ⁱ
	water residue.	74.15	1.62 ± 0.16 ^a	7.88 ± 0.48 ^a	205.86 ± 1.46 ^f	129.95 ± 0.98 ^f
Floret	ethanol extract	5.35	5.79 ± 0.40 ^c	25.34 ± 6.25 ^d	128.83 ± 0.09 ^{cd}	104.71 ± 0.98 ^f
	<i>n</i> -hexane fr.	6.94	4.02 ± 0.48 ^b	19.92 ± 0.70 ^c	31.21 ± 0.91 ^a	27.10 ± 0.65 ^c
	ethylacetate fr.	1.93	42.01 ± 1.21 ^f	181.12 ± 2.64 ^g	132.84 ± 1.37 ^d	51.32 ± 2.61 ^d
	<i>n</i> -butanol fr.	29.53	11.85 ± 1.70 ^e	44.89 ± 0.84 ^f	194.61 ± 2.19 ^e	165.12 ± 1.30 ^g
	water residue.	57.61	5.85 ± 0.38 ^c	11.74 ± 1.01 ^b	123.79 ± 1.64 ^c	93.06 ± 0.65 ^e

¹⁾fr.: fraction.

²⁾RE: rutin equivalent.

³⁾TE: tannic acid equivalent.

⁴⁾SE: sucrose equivalent.

⁵⁾GE: glucosae equivalent.

⁶⁾Values are means ± SD of triplicate determinations.

Different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$).

butanol의 순차적 분획의 경우, 각각 분획효율은 ethanol 추출물 대비 2.69, 1.05, 21.87% 및 6.94, 1.93, 29.53%로 나타났다. 분획 후의 물 잔류물은 줄기 추출물에서는 74.15%, 꽃송이 추출물에서는 57.61%로 나타나, 에탄올 추출물의 상당 부분이 수용성 물질로 구성되어 있음을 확인하였다(Table 1). 특히 *n*-hexane 분획물 및 ethylacetate 분획물의 분획효율에서 알 수 있듯이, 꽃송이의 경우 줄기보다 지용성 물질을 약 2.4배 많이 함유하고 있었으며, 반면 수용성 물질은 줄기가 꽃송이 보다 약 1.3배 높은 함량을 나타내었다. 이러한 결과는 브로콜리 꽃송이가 줄기보다 지용성 색소 성분 및 정유 성분을 더욱 많이 함유하고 있어 나타난 결과로 판단된다. 한편 에탄올 추출물의 총당 및 환원당 함량은 줄기가 꽃송이보다 1.47-1.65배 높은 함량을 나타내었으나, 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량은 꽃송이가 줄기보다 1.50-1.99배 높은 함량을 나타내었다. 즉, 브로콜리 줄기의 경우 수용성 당류를 많이 포함하며 꽃송이는 줄기보다 상대적으로 지용성 물질을 많이 포함하고 있었다. 분획물의 경우, 총 플라보노이드 함량은 줄기 및 꽃송이의 ethylacetate 분획이 9.45 mg/g 및 42.01 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 총 폴리페놀 함량도 꽃송이 ethylacetate 분획이 181.12 mg/g-extract로 가장 높게 나타났으며, 줄기 ethylacetate 분획보다 4.83배 높은 함량을 나타내었다(Table 1).

브로콜리의 줄기 및 꽃송이의 항산화 활성

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 에탄올 추출물 및 분획물들의 항산화 활성을 평가한 결과는 Fig. 1 및 Table 2에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 vitamin C의 경우 25 µg/ml 농도에서 62.8 ± 1.4%의 DPPH 음이온 소거능, 84.9 ± 0.4%의 nitrite 소거능 및 1.0 ± 0.04 (OD₇₀₀)의 환원력을 나타내었으며, 12.5 µg/ml 농도에서 90.6 ± 0.2%의 강력한 ABTS 양이온 소거능을 나타내었다. 이러한 vitamin C의 항산화 활성은 농도의존적으로 증가하였으며, 브로콜리 추출물 및 분획물에서도 농도 의존적인 항산화 활성 증가가 나타났다.

조제된 브로콜리 시료들을 대상으로 다양한 농도에서 DPPH 음이온 소거능을 평가한 결과, 줄기 및 꽃송이의 에탄올 추출물 경우 500 µg/ml 농도에서 각각 15.15% 및 17.18%의 소거능을 나타낸 반면, 꽃송이 및 줄기의 ethylacetate 분획은 500 µg/ml 농도에서 각각 65.9 ± 0.8 및 51.0 ± 3.2%로 우수한 DPPH 소거능을 나타내었다. 그 다음으로 꽃송이 *n*-butanol 분획이 동일 농도에서 34.85 ± 0.69% 소거능을 나타내었으며, 기타 분획물들의 DPPH 소거능은 상대적으로 미약하였다(Fig. 1A). ABTS 양이온 소거능의 경우, 꽃송이 및 줄기 추출물, 분획물 모두에서 DPPH 음이온 소거능보다 우수한 활성을 나타내었으며, 꽃송이 시료들이 줄기 시료들보다 우수한 소거활성을 나타내었다(Fig. 1B). 꽃송이 ethanol

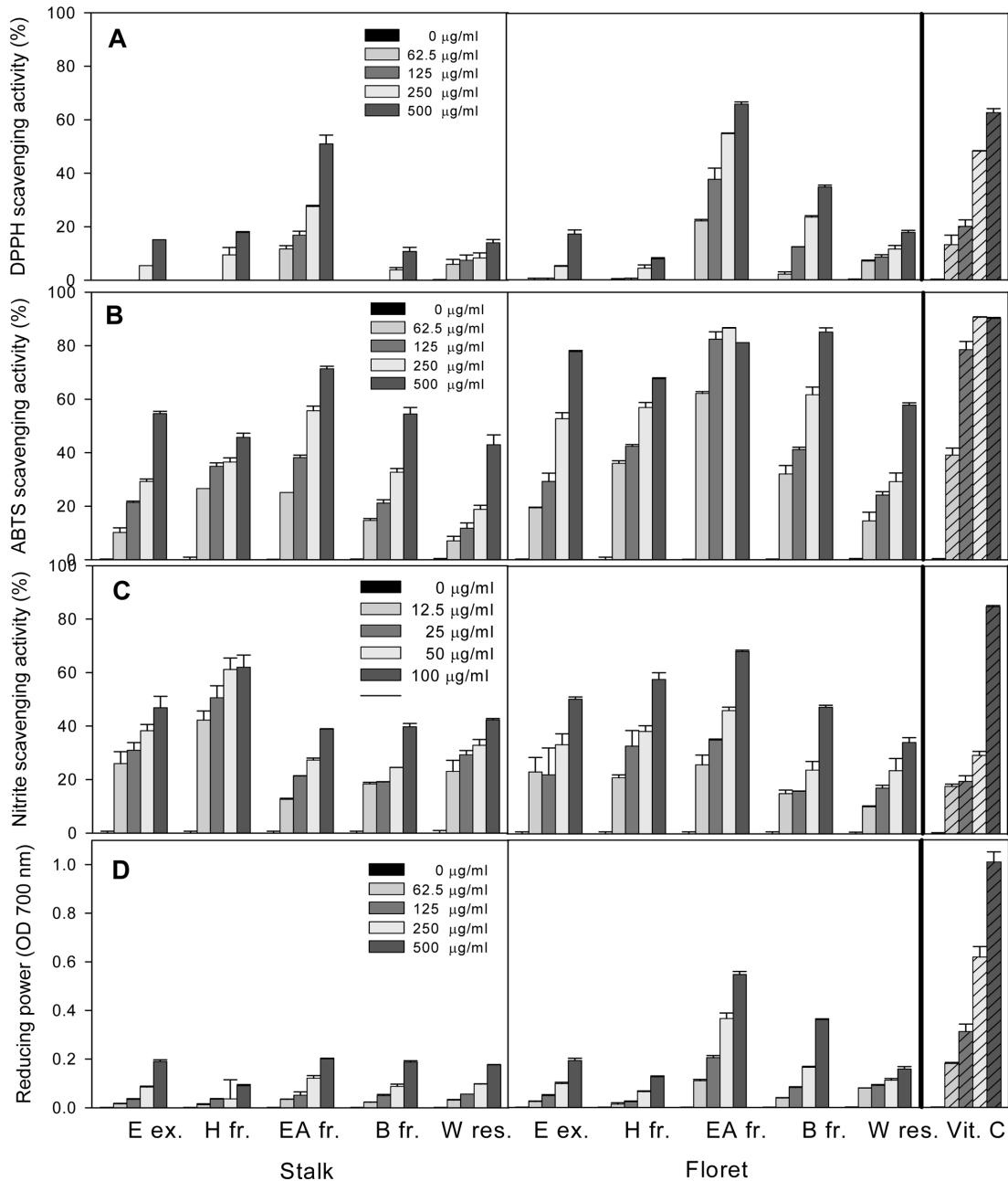


Fig. 1. Comparison of antioxidant and nitrite scavenging activities of the ethanol extracts and their organic solvent fractions of broccoli. Symbols for Vitamin C: ■, 0 µg/ml; ▨, 3.1 µg/ml; ▩, 6.2 µg/ml; and ▤, 12.5 µg/ml, respectively.

추출물, *n*-hexane 분획, ethylacetate 분획, *n*-butanol 분획 및 물 잔류물의 ABTS 소거능 IC₅₀는 각각 235.4 µg/ml, 190.4 µg/ml, 45.6 µg/ml, 178.9 µg/ml 및 431.8 µg/ml로 계산되어 브로콜리 꽃송이가 다양한 지용성 및 수용성 성분의 ABTS 양이온 소거물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다 (Table 2). 한편 대조군으로 사용된 vitamin C의 ABTS 소거능 IC₅₀는 4.0 µg/ml로 나타났다. Nitrite 소거능의 경우, 줄기

n-hexane 분획의 nitrite 소거능이 우수하였으며, 꽃송이의 경우에는 *n*-hexane 분획 및 ethylacetate 분획에서 우수한 소거능이 나타났다. 특히 줄기 *n*-hexane 분획의 nitrite 소거능의 IC₅₀는 24.1 µg/ml로 계산된 바, 이는 vitamin C의 IC₅₀ 17.6 µg/ml에 필적하는 강력한 활성으로 확인되었으며, 꽃송이 ethanol 추출물, *n*-hexane 분획 및 ethylacetate 분획의 nitrite 소거능 IC₅₀는 각각 99.1 µg/ml, 80.2 µg/ml 및

58.9 µg/ml로 계산되어 줄기 및 꽃송이에 매우 강력한 지용성 nitrite 소거물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1C, Table 2). 한편 환원력 측정의 경우는 전체적으로 모든

시료에서 미약한 활성을 나타내었으나, 꽃송이 ethylacetate 분획과 *n*-butanol 분획에서는 500 µg/ml 농도에서 0.74 ± 0.20과 0.55 ± 0.02의 흡광도(OD₇₀₀)를 나타내어 우수한 환

Table 2. The radical scavenging activities (IC₅₀s) of the ethanol extracts and their organic solvent fractions of different parts of broccoli.

Samples/ Chemicals	Extract./fr. ¹⁾	Radical scavenging activity: IC ₅₀ (µg/ml)		
		DPPH	ABTS	Nitrite
Stalk	ethanol extract	>500	454.5 ± 5.7 ^e	>100
	<i>n</i> -hexane fr.	>500	>500	24.1 ± 0.8 ^a
	ethylacetate fr.	489.3 ± 5.2 ^b	159.7 ± 11.2 ^b	>100
	<i>n</i> -butanol fr.	>500	448.8 ± 3.2 ^e	>100
	water residue.	>500	>500	>100
Floret	ethanol extract	>500	235.4 ± 5.2 ^d	99.1 ± 3.1 ^d
	<i>n</i> -hexane fr.	>500	190.4 ± 4.1 ^c	80.2 ± 2.2 ^c
	ethylacetate fr.	214.7 ± 1.9 ^a	45.6 ± 1.5 ^a	58.9 ± 3.0 ^b
	<i>n</i> -butanol fr.	>500	178.9 ± 7.5 ^b	>100
	water residue.	>500	431.8 ± 5.2 ^{de}	>100
Vitamin C	-	15.2	4.0	17.6

¹⁾fr.: fraction.

Different letters within a column differ significantly (*p* < 0.05).

Table 3. Antimicrobial activity of the ethanol extracts and their organic solvent fractions of different parts of broccoli against pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi.

Samples/ Chemicals	Extract/fr. ¹⁾	Growth inhibition zone (mm)								
		Gram positive			Gram negative				Fungi	
		SA ²⁾	LM	BS	EC	PA	PV	ST	CA	SC
Stalk	ethanol extract	8.0	- ³⁾	8.0	-	-	-	-	-	-
	<i>n</i> -hexane fr.	14.0	-	9.0	-	-	8.0	-	-	-
	ethylacetate fr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>n</i> -butanol fr.	9.0	-	8.0	-	-	-	-	-	-
	water residue.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floret	ethanol extract	-	-	9.0	-	-	-	-	-	-
	<i>n</i> -hexane fr.	-	-	8.0	-	-	-	-	-	-
	ethylacetate fr.	11.0	10.0	13.0	15.0	12.0	18.0	13.0	-	-
	<i>n</i> -butanol fr.	-	8.0	10.0	-	-	-	-	-	-
	water residue.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	25.0	24.0	26.0	10.0	13.0	38.0	16.0	-	-
Miconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	20.0	21.0

¹⁾fr.: fraction.

²⁾SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, PV: *Proteus vulgaris*, ST: *Salmonella typhimurium*, CA: *Candida albicans*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*.

³⁾-: No inhibition.

The concentrations of the extract/fractions and antibiotics used were 500 µg/disc and 1 µg/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a classical result of three independent determinations.

원력을 나타내었다. 상기의 항산화력 평가 결과, 브로콜리 꽃송이 에탄올 추출물의 ethylacetate 분획이 DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 환원력 평가에서 가장 우수한 활성을 나타내었으며, nitrite 소거능의 경우에는 줄기의 *n*-hexane 분획이 가장 강력한 활성을 나타내었다. 상기의 결과는 브로콜리 꽃송이의 우수한 항산화력과 더불어, 거친 식감으로 인해 조리시 제거되며 또한 선호도가 낮은 브로콜리 줄기부위를 섭취하는 경우, 위내에서 생성되는 발암성 물질인 니트로소아민의 생성 억제에 크게 기여할 수 있음을 의미한다.

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 항균활성 비교

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 에탄올 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물의 항균활성 평가 결과는 Table 3에 나타내었다. 먼저 대조구로 사용된 ampicillin과 miconazole은 각각 1 µg/disc 농도에서 다양한 병원성 세균, 식중독 세균 및 진균에 우수한 항균활성을 나타내었다. 브로콜리 꽃송이 및 꽃-줄기의 열수 추출물이 그람 양성균 중 *Bacillus amyloliquefaciens*에 대해서만 우수한 항균 활성을 보이며, *Staphylococcus aureus*와 같은 다른 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해서는 항균활성이 나타나지 않는다는 이 등의 보고[13]와 유사하게, 본 연구의 브로콜리 줄기 및 꽃송이 에탄올 추출물도 500 µg/disc 농도에서 *Bacillus subtilis*에 대해 선택적인 항균활성을 나타내었다. 한편 줄기 추출물의 *n*-hexane 및 *n*-butanol 분획은 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus subtilis*에 대해 항균활성을 나타낸 바, 이는 사용한 시료가 추출물과 정제된 분획물에서 기인한 결과로 판단된다. 브로콜리 시료 중 가장 강력한 항균 활성은 꽃송이의 ethylacetate 분획에서 나타났으며, 실험에 사용된 그람 양성 및 그람 음성 세균 모두에 강력한 항균력을 나타내어 향후 브로콜리 꽃송이의 ethylacetate 분획은 식품용 항세균 소재로 개발 가능성을 확인하였다. 이는 꽃송이 ethylacetate 분획물에 포함된 주요 항균성 물질인 sulforaphane 및 다른 isothiocyanate 물질에 의한 항균활성으로 추측되며, sulforaphane 보다 넓은 항균 spectrum을 고려하면, 꽃송이 ethylacetate 분획물에는 다양한 항균성 물질이 존재할 것으로 판단된다.

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 대장암세포 생육억제 활성

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 에탄올 추출물 및 이의 순차적 유기용매 분획물들의 인간 대장암세포 생육억제활성 결과는 Table 4에 나타내었다 무처리구에 비해 줄기 및 꽃송이 추출물(1 mg/ml)은 약 77%의 세포생존율을 나타내었으며, 이들의 분획물들은 6.9-86%의 다양한 세포 생존율을 나타내었다. 줄기 및 꽃송이에서 모두 *n*-hexane 분획 및 ethylacetate 분획에서 우수한 세포 생육억제 활성을 나타내

Table 4. Anti-proliferative activity of the ethanol extracts and their organic solvent fractions of different parts of broccoli against HCT-116 human cancer cell line.

Samples	Extract/fr. ¹⁾	Relative cell proliferation (%)
DMSO	-	100.0 ± 5.2 ²⁾
Stalk	ethanol extract	77.9 ± 3.0 ^d
	<i>n</i> -hexane fr.	18.4 ± 1.2 ^b
	ethylacetate fr.	23.0 ± 2.5 ^b
	<i>n</i> -butanol fr.	86.1 ± 1.6 ^e
	water residue.	82.5 ± 2.6 ^d
Floret	ethanol extract	77.0 ± 7.5 ^d
	<i>n</i> -hexane fr.	22.5 ± 3.9 ^b
	ethylacetate fr.	30.0 ± 1.9 ^c
	<i>n</i> -butanol fr.	6.9 ± 2.3 ^a
	water residue	77.5 ± 6.5 ^d

¹⁾fr.: fraction.

²⁾Values are means ± SD of triplicate determinations.

The samples (1 mg/ml) were used to treat into HCT-116 human colorectal cell in 96 well microplate for 24 h, respectively, and the cell proliferation was determined using One-solution cell proliferation assay kit. Different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$).

었으며, 줄기의 경우 *n*-hexane 분획에서 세포 생존율 18.4%를 나타내어 가장 강력한 활성이 나타났으나, 꽃송이에서는 특이하게도 *n*-butanol 분획에서 가장 강력한 활성이 나타났다. 이러한 결과는 브로콜리 주요 암세포 성장억제물질인 sulforaphane 등의 isothiocyanate들이 거의 *n*-hexane 및 ethylacetate 층에서 검출됨을 고려할 때[25], 브로콜리 꽃송이의 *n*-butanol 분획에는 기존의 알려지지 않은 강력한 암세포 성장억제물질이 존재하리라 예측된다.

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 유용성분과 생리활성과의 상관관계

브로콜리 줄기 및 꽃송이의 추출물 및 분획물들의 total polyphenol 및 total flavonoid 함량과 상기의 생리활성과의 상관관계를 검토하였으며, 그 결과는 Table 5에 나타내었다. 항균활성의 경우 줄기의 ethylacetate 분획에서만 유의적인 활성이 인정되므로 분석에서 제외하였다. 먼저 유용성분과 항산화 활성과의 상관관계를 검토한 결과, 줄기의 DPPH 음이온 및 ABTS 양이온소거활성은 total polyphenol 및 total flavonoid 함량과 0.846-0.912의 높은 상관계수를 나타내었으며, 꽃송이의 경우에는 DPPH 음이온 소거능 및 환원력에서 total polyphenol 및 total flavonoid 함량과 0.858-0.936의 높은 상관관계를 나타내었다. 따라서 꽃송이의 우수한 양이온 소거능은 다양한 물질에 의해 나타남을 추측할 수 있

Table 5. Correlation analysis between the content of total polyphenol and bioactivity or between the content of total flavonoid and bioactivity of different parts of broccoli.

Samples	X	Y	Calculation equation (X versus Y)	Correlation coefficient
Stalk	Total polyphenol	DPPH SA ¹⁾	$Y = 0.227X + 9.10$	0.912
		ABTS SA	$Y = 0.147X + 45.5$	0.876
		Reducing power	$Y = 2.839X + 0.15$	0.200
		Nitrite SA	$Y = -0.063X + 49.5$	0.221
		Anti-Proliferation	$Y = -1.813X + 97.8$	0.348
	Total flavonoid	DPPH SA	$Y = 0.977X + 8.17$	0.891
		ABTS SA	$Y = 0.638X + 44.9$	0.846
		Reducing power	$Y = 1.378X + 0.15$	0.241
		Nitrite SA	$Y = -0.316X + 50.3$	0.283
		Anti-Proliferation	$Y = -8.286X + 95.5$	0.539
Floret	Total polyphenol	DPPH SA	$Y = 0.309X + 11.23$	0.905
		ABTS SA	$Y = 0.080X + 69.3$	0.262
		Reducing power	$Y = 2.306X + 0.15$	0.858
		Nitrite SA	$Y = -0.227X + 9.10$	0.578
		Anti-Proliferation	$Y = -0.153X + 51.4$	0.110
	Total flavonoid	DPPH SA	$Y = 1.389X + 9.41$	0.936
		ABTS SA	$Y = 0.335X + 69.2$	0.232
		Reducing power	$Y = 0.010X + 0.13$	0.876
		Nitrite SA	$Y = 0.552X + 43.8$	0.490
		Anti-Proliferation	$Y = -0.628X + 51.5$	0.095

¹⁾SA : scavenging activity.

었다. 한편 줄기 및 꽃송이 모두에서 nitrite 소거능과 대장암세포 생육억제활성과는 의미있는 상관관계는 나타나지 않아, nitrite 소거능과 대장암세포 생육억제활성은 polyphenol 계 성분이 아닌 다른 활성성분에 의해 나타남을 추측하였다. 이상의 결과와 같이, 향후 향균 및 항산화 활성이 강력한 꽃송이의 ethylacetate 분획과 대장암세포 생육억제 활성이 우수한 *n*-butanol 분획 및 nitrite 소거능이 우수한 줄기의 *n*-hexane 분획을 대상으로 관련 활성물질의 탐색 연구가 필요하며, 현재 이에 대한 연구가 진행 중에 있다. 본 연구 결과는 향후의 브로콜리를 이용한 식의약품 소재개발의 기본자료로 이용될 것이다.

요 약

본 연구에서는 브로콜리의 비가식 부위의 효율적인 이용 및 브로콜리의 가공식품 개발 연구의 일환으로 브로콜리의 주요 가식부위인 꽃송이와 비가식 부위인 줄기 부분을 대상으로 각각 에탄올 추출물 및 이들의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 이들의 유용성분 분석 및 항산화, 항균, 대장

암 세포 생육억제능을 평가하였다. 먼저 성분 분석결과 브로콜리 줄기는 꽃송이보다 수용성 당류를 많이 포함하고 있으며, 꽃송이는 상대적으로 지용성 물질을 많이 포함하고 있었고, 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀은 꽃송이가 줄기보다 1.50-1.99배 높은 함량을 나타내었다. 분획물의 총 플라보노이드 함량은 줄기 및 꽃송이의 ethylacetate 분획이 9.45 mg/g 및 42.01 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 총 폴리페놀 함량도 꽃송이 ethylacetate 분획이 181.12 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 항산화 활성 평가결과, 브로콜리 꽃송이 에탄올 추출물의 ethylacetate 분획에서 강력한 DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 환원력을 확인하였으며, nitrite 소거능의 경우에는 줄기의 *n*-hexane 분획이 강력한 활성을 나타내었다. 항균 활성 평가에서는, 꽃송이의 ethylacetate 분획에서 실험에 사용된 그람 양성 및 그람 음성 세균 모두에서 강력한 항균력을 나타내었다. 대장암 세포성장 억제활성 평가에서는, 줄기 및 꽃송이에서 모두 *n*-hexane 분획 및 ethylacetate 분획에서 우수한 생육억제 활성을 나타내었으며, 줄기의 경우 *n*-hexane 분획에서 세포 생존율 $18.4 \pm 1.2\%$, 꽃송이에서는 *n*-butanol 분획에서 세포 생존율 $6.9 \pm 2.3\%$ 를

나타내어 가장 강력한 활성이 나타났다. 본 연구결과는 브로콜리의 다양한 부위로부터 관련 활성물질의 탐색, 정제를 통한 식의약품 소재 개발 연구가 가능함을 제시하고 있다.

References

- Ahn SM, Ryu HY, Kang DK, Jung IC, Sohn HY. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prunus avium* L. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 371-376.
- Ahn SM, Hong YK, Kwon GS, Sohn HY. 2011. Evaluation of antioxidant and nitrite scavenging activity of seaweed extracts. *J. Life Sci.* **21**: 576-583.
- Bae SJ, Kim GY, Yoo YH, Choi BT, Choi YH. 2006. Modulation of cell cycle regulators by sulforaphane in human hepatocarcinoma HepG2 cells. *J. Life Sci.* **16**: 1235-1242.
- Cho KR. 2009. Quality characteristics of seolgildeok added with broccoli (*Brassica oleracea* var *italica* Plen.) powder. *Korean J. Food Nutr.* **22**: 229-237.
- Jayakumar T, Chen WF, Lu WJ, Chou DS, Hsiao G, Hsu CY, et al. 2013. A novel antithrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylate cyclase: ex vivo and in vivo studies. *J. Nutr. Biochem.* **24**: 1086-1095.
- Jeong BG, Kim SY, Lee KJ, Kim JS. 2012. Up-regulation of NAG-1 and p 21 genes by sulforaphane. *J. Life Sci.* **22**: 360-365.
- Jang MW, Ha BJ. 2012. Effects of broccoli on anti-inflammation and anti-oxidation according to extraction solvents. *J. Fd. Hyd. Safety* **27**: 461-465.
- Kim JI, Jang HS, Kim JS, Sohn HY. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant Activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J. Microbiol Biotechnol.* **37**: 113-139.
- Kim JY, Park SH, Lee KT. 2009. Sulforaphane content and antioxidative effect of cooked broccoli. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **19**: 564-569.
- Kim MR, Lee KJ, Kim HY. 1997. Effect of processing on the content of sulforaphane of broccoli. *Korean J. Soc. Food Sci.* **13**: 422-426.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**: 626-632.
- Kum EJ, Park SJ, Bea BH, Kim SJ, Son KH, Sohn HY. 2006. Antifungal activity of phenanthrene derivatives from aerial bulbs of *Dioscorea batatas* Decne. *J. Life Sci.* **16**: 647-652.
- Lee HS. 2005. Antioxidant activity and antibacterial activities from different parts of broccoli extracts under high temperature. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 759-764.
- Lee JG, Kwak JH, Um YC, Lee SG, Jang YA, Choi CS. 2012. Variation of glucosinolate contents among domestic broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) accessions. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* **30**: 743-750.
- Lee JJ, Shin HD, Lee YM, Kim AR, Lee MY. 2009. Effect of broccoli sprouts on cholesterol-lowering and anti-obesity effects in rats fed high fat diets. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 309-318.
- Lee JJ, Lee YM, Kim AR, Lee MY. 2009. Physicochemical composition of broccoli sprouts. 2009. *J. Life Sci.* **19**: 192-197.
- Lee SJ, Kang HM, Kim IS. 2008. Effect of sodium selenate supplied condition by femigation on the growth and content of minerals ascorbic acid, nitrite and selenium of some western vegetables. 2008. *J. Bio-Env. Control.* **17**: 43-50.
- Lee WK, Kim SJ. 2011. Sulforaphane-induced apoptosis was regulated by p53 and caspase-3 dependent pathway in human chondrosarcoma, HTB-94. *J. Life Sci.* **21**: 851-857.
- Mi L, Wang X, Govind S, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, et al. 2007. The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells. *Cancer Res.* **67**: 6409-6416.
- Moon DO, Kim MO, Kang SH, Choi YH, Kim GY. 2009. Sulforaphane suppresses TNF-alpha-mediated activation of NF-kB and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett.* **274**: 132-142.
- Oh JB, Lee HJ. 2011. Effect of cake improver on antioxidant activity and properties characteristics of pound cakes prepare using broccoli stem powder. *Korean J. Food Nutr.* **24**: 567-576.
- Oh YS, Baek JW, Park KY, Hwang JH, Lim SB, 2013. Physicochemical and functional properties of kochujang with broccoli leaf powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 675-681.
- Park JH, Kim JW, Lee CM, Kim YD, Chung SW, Jung ID, et al. 2012. Sulforaphane inhibits the Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *BMB Reports* **45**: 311-316.
- Park SY, Bae SJ, Choi YH. 2005. Anti-proliferative effects of the isothiocyanate sulforaphane on the growth of human cervical carcinoma HeLa cells. *J. Life Sci.* **15**: 397-405.
- Sok DE, Kim JH, Kim MR. 2003. Isolation and identification of bioactive organosulfur phytochemicals from solvent extract of broccoli. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 315-319.
- Sohn HY, Shin YK, Kim JS. 2010. Anti-proliferative activities of solid-state fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* against human colorectal HCT116 cell. *J. Life. Sci.* **20**: 1268-1275.
- Valentina U, Facic J, Stampar F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**: 185-192.
- Yu SM, Kim SJ. 2011. Sulforaphane (SFN) and sodium nitroprusside (SNP) regulate proliferation and apoptosis through C-Jun N-terminal kinase (JNKinase) pathway in human breast cancer cell line, MDA-MB-231. *Cancer Prev. Res.* **16**: 318-325.