

수분스트레스에 의한 케일 내 글루코시놀레이트 변화

정나래 · 천진혁 · 박은재 · 임예훈 · 김선주*

충남대학교 생물환경화학과

Variations of glucosinolates in kale leaves (*Brassica oleracea* var. *acephala*) treated with drought-stress in autumn and spring seasons

Na-Rae Jeong, Jin-Hyuk Chun, Eun-Jae Park, Ye-Hoon Lim, Sun-Ju Kim*

Department of Bio-Environmental Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 8 May 2015, revised on 10 August 2015, accepted on 19 August 2015

Abstract : The present study aimed to investigate the effects of drought stress on the accumulation of glucosinolates (GSLs) in the leaves of Kale cultivated in autumn and spring. HPLC analysis guided to identify seven GSLs including progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin and neoglucobrassicin. Quantification of GSLs revealed that the contents of sigirin was the highest (45%) followed by the level of progoitrin (24%) in terms of total GSLs. The ranges of total GSL contents was 1.16 (84)-15.88 (89 DAS, $\mu\text{mol/g}$ dry wt. (DW)) in treatment plot and 1.23 (84)-7.05 (74 DAS, $\mu\text{mol/g}$ dry wt.) in control plot showed the enhancement in the contents of GSLs in treatment than in the control plot. The present results evidenced that the variation of total GSL contents were depending on the harvest period. In 105 DAS, comparatively no differences in the GSL contents on each sample in autumn season, whereas in spring season, although there was decrease in the GSLs tendency from 74 DAS to 84 DAS in both control and treatment plot, the GSL contents of treatment plot was dramatically increased in 89 DAS. In treatment plot, the GSL contents on 89 DAS (1.16) was 15 fold higher to 84 DAS (15.88 $\mu\text{mol/g}$ DW). The variation in the contents of GSL in spring and autumn did not documented significant differences because of their differences in the growth time and cultivation conditions. In conclusion, the GSL contents in kale was likely to be affected by drought stress treatment. Scrutiny and further research for exact relation between drought stress and GSL contents in kale should be needed.

Key words : Kale, Brassica crops, Glucosinolates, Drought-stress, HPLC analysis

I. 서론

케일(*Brassica oleracea* L. var. *acephala*)의 원산지는 유럽이며, 배추과 중에서 야생 양배추(*Brassica oleracea*)에 가장 가까운 채소로써, 수세기 동안 사람과 가축에게 모두 식용으로 사용되어 왔다(Rosa and Heaney, 1996). 영양학적으로 케일은 항암 물질로 잘 알려진 글루코시놀레이트(glucosinolates)를 다량 함유하고 비타민 A, B, C와 무기질(칼슘, 인, 칼륨)이 풍부하다(Schmidt et al., 2010). 케일은 비타민 중에서 특히 비타민 C 함량이 매우 높아 영양적 가치가 높으며 혈중 콜레스테롤과 혈당 저하 유해물

질 배설 등 보건적 효능이 우수하여 녹즙으로 주로 이용되었으며 최근 쌈으로도 널리 이용되고 있다(Park and Ryu, 1998). 또한 항암물질뿐만 아니라 항산화활성과 관련된 gallic acid, protocatechuic acid, caffeic acid 등과 같은 페놀성 물질도 케일새싹 내에 상당량 존재한다(Jahangir et al., 2009).

Glucosinolates (GSLs)는 황과 질소가 포함되어 있는 배추과 작물의 이차대사 산물로 배추과(Brassicaceae) 작물의 독특한 향과 매운 맛의 근원이고, 질소와 황의 저장소뿐만 아니라 식물방어기작 역할도 수행한다. 2001년까지 120종의 서로 다른 물질 등이 동정되었으나, 이후 지속적인 연구를 통해 새롭게 확인된 물질들을 포함하면 그 수는 현재 200종에 이른다(Clarke, 2010). GSL류 물질들은 그 기

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6738

E-mail address: kimsunju@cnu.ac.kr

본구조에 β -D-glucopyranose를 갖고 있으며 7개의 가지 각색의 아미노산으로부터 유래된 독특한 작용기에 따라 합성된다(Fahey et al., 2001; Halkier and Gershenzon, 2006). GSLs의 전구체는 L-amino acid로 알려져 있으며, GSLs는 전구체인 아미노산(methionine, tryptophan, phenylalanine)에 따라 각각 aliphatic, indolyl, aromatic GSLs로 구분되어진다(Sun et al., 2011). 채소의 조직이 손상될 때, GSLs는 식물체 내에 있는 myrosinase의 가수분해에 의하여 isothiocyanate, thiocyanate 및 nitrile를 생성하고, 그 중에서 isothiocyanates는 동물 또는 인체에 다양한 활성을 항암 나타낸다(Halkier and Gershenzon, 2006; Van Etten et al., 1969). Glucosinolates는 glucuronyl transferase, glutathione-S-transferase 등 phase II detoxification 효소의 활성을 유도함으로써 항암 기능을 발현시킨다(Holst and Williamson, 2004; Keum et al., 2004). GSL의 일종인 glucobrassicin (indolymethyl glucosinolate)의 자기분해산물인 indole-3-acetonitrile (IAN), 3,3-diindolylmethane, indole-3-cabinol (I3C)은 설취류에서 화학적으로 발생하는 종양을 저해하고, indole 중 동물실험에서 유발되는 발암 과정의 가장 강력한 저해제이며, monooxygenase의 가장 유력한 유발제는 indole-3-cabinol (I3C)라고 알려져 있다(Wattenberg, 1977). 배추과 채소의 종류에 따라 함유되어 있는 주요 GSLs의 종류, 함량 및 이들의 가수분해 물질이 각기 다르게 나타난다. 이들 분해산물 중에서 isothiocyanates는 주로 무독화효소 활성을 증가시키고, 세포예정사(apoptosis) 및 세포주기 억제 기전을 통하여 암을 예방하는 것으로 알려져 있다(Hwang et al., 2012). 간암, 위암, 폐암 등에 효과뿐만 아니라 강한 항균, 살충작용과 같은 생체방어 반응에 관여한다(Zhang and Talalay, 1994, Zhang and Talalay, 1996).

한편, 식물은 스트레스를 많이 받게 되는 환경조건에 주어졌을 때 자신을 지키기 위한 방어 기작의 하나로 여러 가지 다양한 이차대사산물을 생합성하여 식물체 내에 축적하게 된다(Dixon and Paiva, 1995). 이런 기능성물질은 대부분 대다수의 인체 내에서도 질병예방과 건강유지에 중요한 역할을 한다. 최근에는 이런 점에 초점을 맞춰 생산 위주의 재배환경 조절보다는 이차대사산물의 생합성을 보다 고조시키는 재배환경을 제공하여 채소류의 기능성 물질 함량을 증가시키려는 것을 목적으로 재배법연구가 활발히 진행

되고 있다(Poiroux-Gonord et al., 2010; Rajashekar et al., 2009; Schreiner, 2005). 또한, 최근에는 특정 기능성 glucosinolate 성분(예, glucoraphanin, glucobrassicin, gluconasturtiin 등)이 보다 증가된 계통의 선발 또는 형질 전환 관련 연구가 계속적으로 진행되고 있다(Holst and Williamson, 2004; Keum et al., 2004).

즉 식물은 스트레스가 많은 환경조건에 노출되었을 때 자신을 보호하기 위한 방어 기작의 하나로써 이차대사산물을 생합성하여 식물체 내에 축적하게 된다. 그러므로 본 실험에서는 이차대사산물의 생합성을 촉진시키는 재배환경(수분스트레스)을 조절하여 케일의 glucosinolate 함량을 조사한다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

HPLC-grade acetonitrile (CH_3CN)과 methanol (CH_3OH)은 J.T Baker Chemical Co. (New Jersey, USA) 것을 사용하였다. DEAE-Sephadex A-25는 GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden) 것을 사용하였고, Sodium acetate ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)은 Samchun Pure Chemical Co., Ltd. (Pyeongtaek, Korea) 것을 사용하였다. Sinigrin (2-propenyl GSL), aryl sulfatase (type H-1, EC 3.1.6.1)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA) 것을 사용하였다.

2. 시료

[가을 실험]의 케일 종자는 케일 'TBC'로 아시아종묘 (Asia seed Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 구입하였고 2013년 8월 22일에 충남대학교 농업생명과학대학 유리 온실에 파종하였다. 파종은 트레이(tray)에 원예용 상토-하이(주)부농, 경주)를 채운 후 물을 적시고, 케일 종자를 심은 다음 다시 상토로 가볍게 덮어주었다. 수분 증발과 햇빛의 차단을 위해 물에 적신 신문지로 덮어 그늘로 옮겼다. 22 DAS (days after sowing)에 상태가 좋은 모를 골라내어 흙을 채운 중형포트에 이식하였다. 그 후 2번 중간에 복합 비료를 각 2g씩 분말 후에 추비하였다(13년 10월 25일, 11월 10일) 그리고 물은 각 포트 당 2일 간격으로 400 mL씩 수돗물을 주었다. 재배기간은 총 105일로 수확은 2013년

11월 29일부터 12월 5일까지 99, 101, 103, 105 DAS, 2일 간격으로 하였다. 수확한 시료는 잎만 분리하여 -70°C 급속 초저온 냉동고(SFDSF 12, Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)에 보관하여 순차적으로 동결건조한 후에 막자와 막자사발로 분말하였다.

[봄 실험]의 케일 종자는 케일 'TBC'로 아시아종묘(Asia seed Co., Ltd, Seoul, Korea)에서 구입하였고 2014년 2월 20일에 가을실험과 같이 파종하였다. 파종 후 34일에 상태가 좋은 묘를 골라내어 흙을 채운 중형포트에 이식하였다. 물 빠짐이 좋지 않아 수분스트레스 실험에 적합한 조건의 흙이 아니라고 판단되어 41 DAS에 펠라이트 : 흙 = 1 : 2의 부피로 다시 채운 중형포트에 다시 이식하고 50 DAS에 복합비료를 각 1.5 g씩 추비하였다. 그리고 케일의 성장이 느려 55 DAS에 액비를 100배 희석하여 각 400 mL씩 추비하였으며 물은 각 포트 당 3일 간격으로 400 mL씩 수돗물을 주었다. 재배기간은 총 89일로 2014년 4월 29일부터 5월 19일까지 69, 74, 79, 84, 89 DAS, 5일 간격으로 수확하였다. 수확한 시료는 가을실험과 동일한 방법으로 동결건조한 후에 막자와 막자사발로 분말하였다.

3. Glucosinolate 추출

동결 건조된 분말하여 시료 100 mg을 칭량후 2.0 mL-Eppendorf tube에 넣고 myrosinase의 불활성화를 위하여 70% (v/v) methanol (1.5 mL)를 넣고 진동혼합(vortex)을 하였다. 항온수조(70°C)에서 5분간 조(crude) GSLs를 추출하는 동안 2분 30초가 지나고 진동혼합을 한 번 더 해주었다. 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C) 후에 상층액은 수거하고, 나머지는 동일한 과정으로 총 3회 추출하여 각 상층액을 모두 합하였다.

미니 칼럼 충전용 DEAE Sephadex A-25 (30 g)는 초순수에 녹여 분액여두에 넣은 다음 초순수가 거의 빠져나가면 0.5 M sodium acetate (68 g/L)를 넣어 H^{+} 형태로 활성화 시켰으며 탈지면으로 1,000 μL pipet tip 끝을 막은 mini-column에 상기의 활성화된 DEAE Sephadex A-25 (약 50 mg dry weight, DW)를 넣은 후 GSLs 조추출물(crude extract)을 pasteur pipette으로 로딩하였다. 로딩시킨 조추출물이 다 빠지면 증류수 2 mL을 로딩하여 컬럼을 세척하고, 세척 후 paraffin film으로 column 아래 부분을 막고 aryl sulfatase solution (115 mg/5 mL) 75 μL 을

넣은 후 column 위 부분을 paraffin film으로 막아서 16시간 동안 실험실(상온)에서 정치하였다. Aryl sulfatase solution을 넣을 때 수평으로 로딩하여 벽에 붙지 않도록 주의하여야한다. 16시간이 지난 후 초순수(0.5 mL \times 3회)로 2.0 mL-Eppendorf tube에 DS-GSLs를 용출시켰다. 용출시킨 시료(DS-GSLs)는 0.45 μm hydrophilic PTFE syringe filter(직경 13 mm)로 필터한 후, HPLC용 vial병에 넣어 냉장 보관하였다(modified from Kim et al., 2007).

4. HPLC 분석

DS-GSLs의 분석은 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, CA, USA)를 사용하였고, 분석 칼럼은 Inertsil ODS-3 column (150 \times 3.0 mm I.d., particle size 3 μm)를 사용하였으며 가드 칼럼으로는 Inertsil ODS-2 Cartridge Guard column E (10 \times 2.0 mm I.d., particle size 5 μm) (GL Science, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 칼럼 온도는 40°C , 검출 파장은 227 nm, 유량은 0.4 mL/min로 설정하였다. 시료는 automatic injector를 사용하여 10.0 μL 주입하였다. 용매 A(초순수)와 용매 B (acetonitrile)를 이동상 용액으로 사용한다. 용매 B를 7분까지는 0 \rightarrow 10%로 증가시키고, 16분까지는 10 \rightarrow 31%를 증가시키고 19분까지 31%로 유지시킨다. 21까지 31 \rightarrow 0%로 감소, 27분까지 0%를 유지시켰다.

각 GSL 성분은 외부표준물질인 sinigrin (0.5 mg/ 5 mL, DS-sinigrin(분자량 279)의 HPLC 크로마토그램의 피크 면적(area)과 각 성분피크의 면적을 비교하고 그 값에 response factor (ISO 9167-1, 1992; Clarke, 2010)를 곱하여 정량화($\mu\text{mol/g}$ DW)하였다.

5. 통계분석

각각의 시료는 HPLC를 분석하였고 분석 결과를 Microsoft Office Excel 2010을 이용하여 각 성분에 대한 함량의 평균값과 반복($n=3$)의 표준편차(SD, standard deviation)를 구하였다. 통계처리 프로그램은 IBM SPSS 21 Statistics을 사용하였다. 유의수준(P)은 0.05 이하로 설정하였고, 사후분석은 Tukey 방법으로 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 케일의 생장

[가을실험]의 105 DAS에서 케일 잎의 가로길이는 10.26 cm, 세로길이 14.30 cm의 생장을 하였다. 잎의 수는 평균 16.1장이며, 전체적으로 케일의 잎의 수에서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 추가적인 비료공급은 하엽(늙은잎)이 황화 되기 시작한 65 DAS와 81 DAS때 복합비료(N-P-K, 12-10-9%)로 2회 준비하였다.

[봄 실험]의 88 DAS에서 케일 잎의 가로평균길이는 7.52 cm, 세로평균길이 9.75 cm의 생장을 하였으며 중형 포트에 이식한 후 토양의 물 빠짐이 너무 좋지 않아 '수분스트레스' 실험에 적합한 조건의 토양이 아니라고 판단하여 펄라이트 : 흙(1 : 2의 부피비)를 혼합한 포트에 바꾸었다. 추가적인 비료공급으로 하엽(늙은잎)이 황화 되기 시작한 80 DAS와 86 DAS때 복합비료(N-P-K, 12-10-9%)를 준비했지만, 회복이 빨리 되지 않아 추가적으로 액비(N-P-K, 10-1-5 mM)를 주었다.

2. GSL 분리 및 동정

GSL 동정 및 정량은 식물환경생리실험실 자료를 참고하여 7종의 GSLs (progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicin, methoxyglucobrassicin, neoglucobrassicin)를 분리 및 동정하였다(Table 1). HPLC를 통하여 케일 'TBC'의 GSLs를 분석한 결과(Fig. 1), 전체

GSLs 함량 중에 sinigrin의 함량이 45%로 가장 많은 양을 차지하였으며 그 다음으로 progoitrin함량이 24%로 높게 나왔다.

7종류의 GSLs중 aliphatic GSLs는 pogotrין, gucoraphanin, sinigrin, gluconapin으로 4가지, indolic GSLs는 glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, neoglucobrassicin으로 3가지였다.

3. 수분스트레스 처리에 따른 글루코시놀레이트 함량

[가을 실험]은 GSLs중 sinigrin 함량이 가장 많은 비중을 차지하였다. 수분 함량은 99-105 DAS동안 약 87%에서 84%까지 지속적으로 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 총 GSL 함량 범위는 처리구(+)에서 3.48 (105 DAS)-15.10 (101 DAS)이었고 비처리구(-)에서는 10.57 (105 DAS)-12.05 (99 DAS) $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 으로 처리구(+)에서 급격한 변화를 보였다. 또한 101 DAS 와 103 DAS에서는 비처리구(-)의 GSL 함량이 더 높았으나 105 DAS에서 처리구(+)가 비처리구(-)보다 GSL 함량이 높은 값을 가지는 것을 볼 수 있다(Table 3). 이 때 케일의 비처리구(-)의 GSL 함량은 3.36 $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 이고 처리구(+)의 GSL 함량은 10.44 $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 로 가장 많은 GSL 함량 차이가 측정되었다(Table 3). Aliphatic GSL 함량은 처리구(+)에서 99 DAS (10.56)와 105 DAS (9.96)사이에서 변화가 적었고, 비처리구(-)에서 103 DAS (11.98)와 105 DAS (3.27 $\mu\text{mol/g dry wt.}$)사이에서 급격하게 감소하였다. 반면에 indolyl GSL 함량은 처리구(+)에서 99 DAS (1.4)와 105 DAS (0.48 μ

Table 1. Identification of glucosinolates in kale leaves treated with drought-stress.

No.1	RT	Trivial names	[M+H] ⁺ (m/z)	Response factor ²
Aliphatic				
1	9.40	Progoitrin	310	1.09
2	9.95	Glucoraphanin	358	1.07
3	10.29	Sinigrin	280	1.00
4	12.85	Gluconapin	294	1.11
Indolic				
5	16.35	Glucobrassicin	369	0.29
6	17.31	4-Methoxyglucobrassicin	399	0.25
7	19.51	Neoglucobrassicin	399	0.20

¹⁾No., the elution order of HPLC analysis.

²⁾The international Organization for Standardization (ISO 9167-1, 1992).

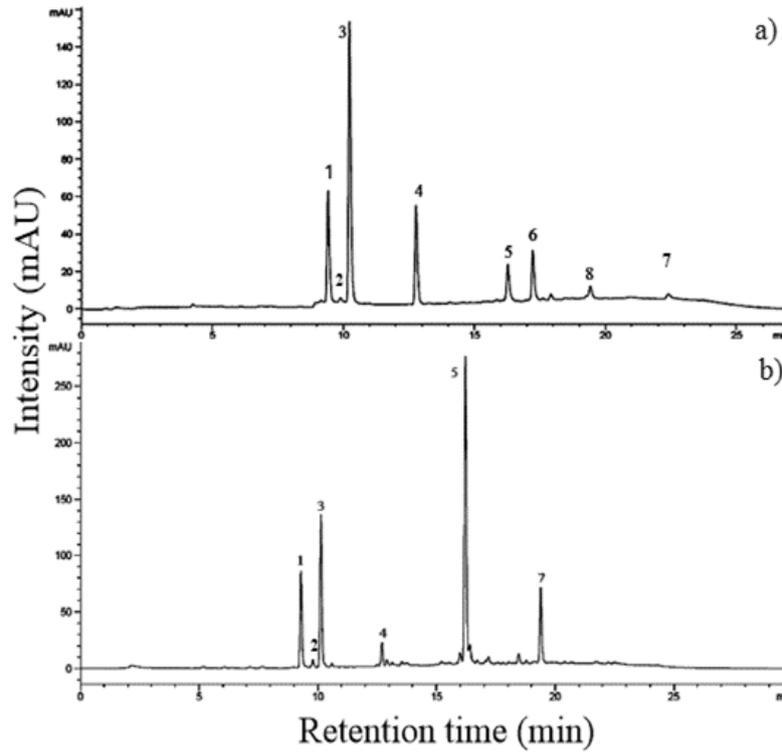


Fig. 2. HPLC chromatograms of glucosinolates separated from kale leaves. a) treated with drought-stress at 101 DAS in the 2013 Autumn Experiment; b) treated with drought-stress at 89 DAS in the 2014 Spring Experiment.

Table 2. Plant growth of kale leaves untreated (-) or treated (+) with drought-stress

Seasons	Harvest (DAS)	Drought-stress	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)
Autumn (n=2)	99	(-)	80.00±13.04	10.60±1.21	86.61±1.87
	101	(-)	97.95±4.03	13.35±0.35	86.37±0.20
		(+)	80.15±6.58	11.60±0.71	85.51±0.31
	103	(-)	77.75±1.20	9.90±0.2671	87.26±1.11
		(+)	75.35±5.02	9.95±0.35	86.75±1.35
	105	(-)	88.10±16.97	13.55±2.05	84.56±0.65
(+)		66.55±10.25	10.90±1.14	83.59±0.40	
Spring (n=3)	66	(-)	5.75±0.77	0.63±0.07	89.03±0.31
	74	(-)	6.21±1.03	1.04±0.12	83.19±1.57
		(+)	4.02±0.74	0.75±0.18	81.41±1.40
	79	(-)	3.83±0.97	0.85±0.26	77.92±1.33
		(+)	5.64±0.78	1.00±0.21	82.46±1.63
	84	(-)	4.08±0.19	0.98±0.06	76.06±0.29
		(+)	1.57±0.41	0.80±0.14	48.18±3.95
	89	(-)	21.40±1.07	5.16±0.13	75.87±0.69
(+)		2.72±0.44	2.63±0.41	3.24±0.36	

mol/g dry wt.)사이에서 감소하였다. 비처리구(-)에서도 99 DAS (1.4)와 105 DAS (0.1 μmol/g dry wt.)사이에서 감소하였다(Fig. 2).

[봄 실험]은 가을실험과 마찬가지로 sinigrin 함량이 가장 많은 비중을 차지하였다. 또한 수분 함량은 69-89 DAS 동안 약 89%에서 3%까지 지속적으로 감소하는 경향을 보

Table 3. Variations of glucosinolate contents ($\mu\text{mol/g}$ dry wt.) at different harvest dates (days after sowing, DAS) in kale leaves (-) untreated or (+) treated with drought-stress in autumn and spring seasons.

Seasons	No	RefTime	Trivial name	99 DAS		101 DAS		103 DAS		105 DAS			
				(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)		
Autumn (n=2)	1	9.02	Progoitrin	2.95±1.04ab	4.60±1.06a	3.22±0.83ab	3.97±1.03ab	3.04±0.23ab	1.11±0.40b	2.81±0.84ab			
	2	9.95	Glucoraphanin	0.25±0.01a	0.32±0.06a	0.34±0.03a	0.33±0.00a	0.32±0.01a	0.16±0.22a	0.35±0.03a			
	3	10.10	Sinigrin	5.17±2.14a	6.31±1.28a	4.46±2.35a	4.94±0.12a	4.62±0.35a	1.30±0.22a	4.67±3.45a			
	4	12.54	Gluconapin	2.19±0.70a	2.84±0.01a	2.30±0.81a	2.74±0.65a	2.23±0.10a	0.70±0.13a	2.13±0.95a			
	5	16.16	Glucobrassicin	0.87±0.21a	0.52±0.37a	0.61±0.52a	0.52±0.10a	0.38±0.04a	0.05±0.01a	0.22±0.14a			
	6	17.20	4-Methoxy glucobrassicin	0.39±0.16a	0.22±0.12a	0.34±0.17a	0.20±0.01a	0.18±0.02a	0.03±0.00a	0.20±0.21a			
	7	19.39	Neoglucobrassicin	0.14±0.06a	0.19±0.18a	0.13±0.09a	0.15±0.08a	0.12±0.07a	0.02±0.02a	0.06±0.03a			
Total				12.05±4.16a	15.10±3.05a	11.50±4.93a	12.94±1.75a	10.96±0.09a	3.48±0.98a	10.57±5.64a			
Spring	No	RefTime	Trivial name	69 DAS		74 DAS		79 DAS		84 DAS		89 DAS	
				(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Spring (n=3)	1	9.02	Progoitrin	0.16±0.12b	1.17±0.60ab	1.27±0.37ab	0.51±0.35b	0.61±0.25b	0.36±0.10b	0.31±0.11b	0.60±0.10b	0.60±0.10b	3.31±2.57a
	2	9.95	Glucoraphanin	ND	0.09±0.08ab	0.18±0.06a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	10.10	Sinigrin	0.75±0.02d	3.35±1.39bc	4.07±0.83b	1.04±0.59cd	1.46±0.53cd	0.63±0.18d	0.54±0.28d	1.20±0.15cd	1.20±0.15cd	8.12±1.86a
	4	12.54	Gluconapin	0.16±0.05c	0.86±0.35ab	0.94±0.34a	0.27±0.20abc	0.43±0.14abc	0.18±0.03c	0.10±0.02c	0.27±0.06abc	0.27±0.06abc	0.79±0.50abc
	5	16.16	Glucobrassicin	0.31±0.06b	1.33±0.80b	1.06±0.61b	0.12±0.08b	0.28±0.23b	0.05±0.01b	0.18±0.10b	0.11±0.04b	0.11±0.04b	2.99±0.88a
	6	17.20	4-Methoxy glucobrassicin	0.11±0.02ab	0.13±0.05a	0.10±0.05abc	0.05±0.03abc	0.06±0.05abc	0.02±0.02bc	0.03±0.01bc	0.01±0.02c	0.01±0.02c	0.08±0.01abc
	7	19.39	Neoglucobrassicin	0.02±0.02b	0.12±0.06b	0.12±0.06b	0.02±0.02b	0.03±0.03b	0.01±0.02b	ND	ND	0.02±0.00b	0.59±0.14a
Total				1.50±0.28d	7.05±3.28bc	7.73±2.20b	2.00±1.22d	2.87±0.40bcd	1.25±0.24d	1.16±0.47d	2.21±0.21cd	15.88±3.04a	

ND: not detected.

였으며(Table 2) 총 GSL 함량 범위는 처리구(+)에서 1.16 (84 DAS)–15.88 (89 DAS)이었고, 비처리구에서는 1.25 (84 DAS)–7.05 (74 DAS) $\mu\text{mol/g}$ dry wt.으로 처리구(+)가 비처리구(-)에 비하여 GSL 함량이 높은 경향을 보였다(Table 3). Aliphatic GSL 함량은 처리구(+)에서 74 DAS (6.46)에서 증가하였다가 84 DAS (0.95)까지 감소하였으며 마지막, 89 DAS (11.22)에서 급격히 증가하였다. 비처리구(-) 역시 74 DAS (5.47)에서 증가하였다가 84 DAS (1.17)까지 감소하였고 89 DAS (2.07)에서 미세하게 증가하였다. Indolyl GSL 함량은 처리구(+)에서 74 DAS(1.28)에서 증가하였다 84 DAS (0.21)까지 감소하였고 마지막 89 DAS (3.66)에서 급격히 증가하였다. 비처리구(-)는 74 DAS (1.58)에서 증가 하였다가 84 DAS (0.08)까지 감소한 후, 89 DAS (0.14 $\mu\text{mol/g}$ dry wt.)에서 미세하게 증가하였다(Fig. 2). 즉, [봄실험]에서는 처리구(+)의 수분함량은 감소하는 추세를 보이다가 84 DAS에서 48%의 수분함량이 89 DAS에 최저 수분함량값(3%)으로 급격히 감소하였으며 이 때 케일의 GSL 함량이 15 $\mu\text{mol/g}$ dry wt.로 가장 많은 양의 GSL 함량이 측정되었다(Table 3).

수분스트레스 처리구(+)의 GSL 함량이 [가을 실험]에서는 거의 변하지 않고 비처리구(-)에서는 감소한 반면, [봄 실험]에서는 수분스트레스 경과일수에 따라 처리구(+)와 비처리구(-)의 GSL 함량이 비슷하다가 처리구(+)의 마지막 수확물의 GSL 함량이 급격히 상승하였다. 즉, 본 [가을 실험]과 [봄 실험] 결과, GSL 함량의 경향이 전혀 다르게 나타난 것(Fig. 2)을 알 수 있는데 이것은 실험 시기 및 수분스트레스 수준이 너무 달랐기 때문이라 생각된다. [가을 실험]에서는 2013년 11월 29일부터(99 DAS) 2일 간격으로 4회 수확하였는데, 마지막 4번째 처리구(+) 수확물은 8일 동안 물을 주지 않았지만 식물이 완전히 건조(영구위조)할 정도의 수분스트레스 수준이 아니었다. 또한 실험 종료일이 12월 5일(105 DAS)로 기온 및 일사량이 급격히 감소하면서 수확초기부터 끝날 때까지 위조가 심하지 않아 시들 시들하면서도 아직은 푸른 상태인 잎을 수확할 수 있었다. 그러나 [봄 실험]에서는 2014년 4월 29일부터(69 DAS) 5일 간격으로 5회 수확하고, 마지막 5번째(5월 19일, 89 DAS) 처리구(+) 수확물은 25일 동안 물을 주지 않아 심한 영구위조 증상을 보였다. 특히 물을 주지 않는 기간이 18일

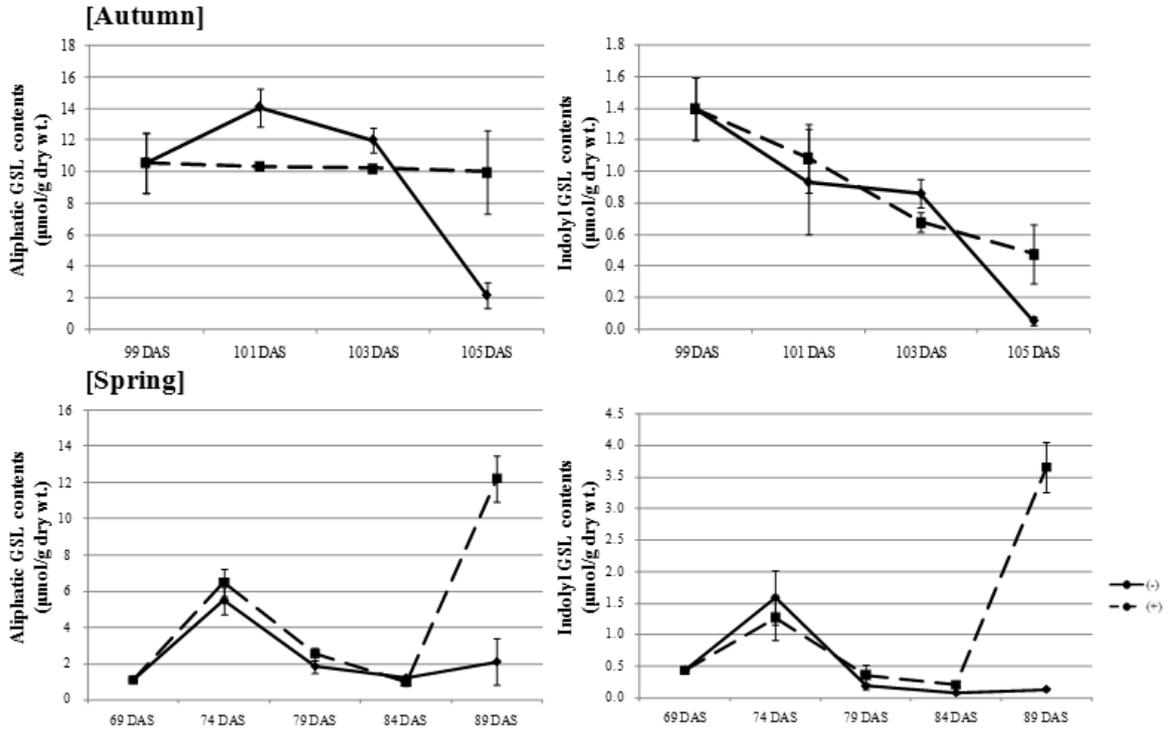


Fig. 2. Variations of GSL contents ($\mu\text{mol/g}$ dry wt.) in kale leaves in kale leaves (-) untreated or (+) treated with drought-stress in autumn (a) and spring (b) seasons.

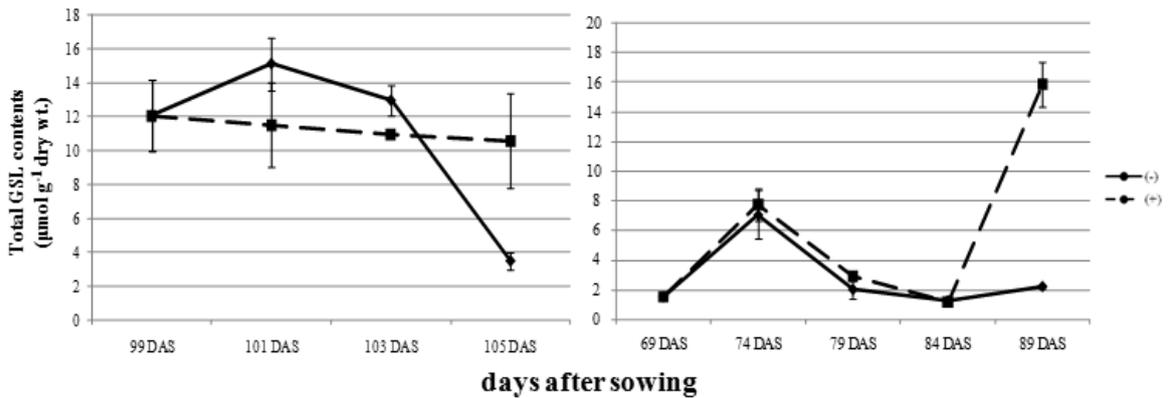


Fig. 3. Variations of total GSL contents ($\mu\text{mol/g}$ dry wt.) in kale leaves (-) untreated or (+) treated with drought-stress in autumn (a) and spring (b) seasons.

을 경과하면서 잎의 주변부부터 마르기 시작하여 4번째 수확일에는 총 14-16장 중 하엽 3-4장이 고사하여 떨어졌고, 그 증상은 점점 심해지면서 5번째 수확일에는 총 11-12장 중 하엽 8-9장이 떨어졌다. 이렇게 두 실험이 동일하게 진행되지 않아 GSL 함량의 경향이 다르지만 수분스트레스를 처리한 기간이 짧았을 때보다 그 기간을 늘렸을 때 비처리구와 처리구의 GSL 함량이 차이가 더 커지는 것을 알 수 있었다. 즉, 식물은 스트레스가 많은 환경조건에 노출되었을 때 자신을 보호하기 위한 방어 기작의 하나로써 항산화

물질을 포함한 다양한 이차대사산물을 생합성하여 식물체 내에 축적하게 되는데(Dixon and Paiva, 1995), 이번 실험 결과에서는 케일이 수분 스트레스를 더 심하게 받을수록 급격히 많은 양의 GSLs를 축적하는 것으로 보인다 (Brown et al., 2002) (Table 3, Fig. 3).

IV. 결론

가을과 봄 2차례 재배한 케일('TBC')에 수분스트레스를

처리하여 글루코시놀레이트(glucosinolates, GSLs)변화를 조사하였다. 케일에서는 HPLC 분석 결과 총 7종의 GSLs (progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, neoglucobrassicin)가 분리 및 동정되었다. 총 GSL 함량 중 sinigrin이 가장 높은 비율(45%)을 보였고, progoitrin (24%)이 그 다음 순이었다. [가을실험] 파종(8월 22일) 후, 99일을 기점으로 수분스트레스 처리구(+)과 비처리구(-)로 설정하여 2일 간격으로 99, 101, 103, 105 DAS에 수확하였다. GSL 함량 범위는 처리구에서 3.48 (105 DAS)–15.10 (101 DAS)이었고 비처리구(-)에서는 10.57 (105 DAS)–12.05 (99 DAS) $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 으로 처리구(+)에서 급격한 변화를 보였다. 또한 처음 99 DAS와 103 DAS 사이에선 수분스트레스를 처리한 처리구(+)보다 비처리구(-)의 GSL 함량이 높았으나 105 DAS부터 비처리구의 GSL 함량이 급격히 감소하면서 처리구(+)의 GSL 함량이 비처리구(-)의 GSL 함량보다 더 높아졌다.

[봄 실험] 파종(2월 20일) 후, 69일을 기점으로 처리구(+)와 비처리구(-)로 설정하여 5일 간격으로 69, 74, 79, 84, 89 DAS에 수확하였다. 총 GSL 함량 범위는 처리구(+)에서 1.16 (84 DAS)–15.88 (89 DAS)이었고, 비처리구(-)에서는 1.25 (84 DAS)–7.05 (74 DAS) $\mu\text{mol/g dry wt.}$ 으로 처리구(+)가 비처리구(-)에 비하여 GSL 함량이 높은 경향을 보였다. 그리고 처리구(+)와 비처리구(-)결과 모두 74 DAS와 84 DAS 사이까지 GSL 함량이 감소하는 경향을 보이다가 89 DAS때 처리구(+) GSL 함량이 급격히 증가하여 84 DAS 처리구(+)의 GSL 함량($1.16 \pm 0.47 \mu\text{mol/g dry wt.}$)보다 89 DAS 처리구(+)의 함량($15.88 \mu\text{mol/g dry wt.}$)이 약 15배 정도 급격히 증가하였다. 이와 같이 두 실험의 재배시기와 재배환경이 달라 일정한 경향을 보이지는 않았으나, 수분스트레스에 의해 GSL 함량이 증감하였으므로 향후 면밀한 검토가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업 (311022-05-5-SB020)에 의해 이루어진 것임.

참고 문헌

- Brown AF, Yousef GG, Jeffery EH, Klein BP, Wallig MA, Kushad MM, Juvik JA. 2002. Glucosinolate profiles in broccoli: Variation in levels and implications in breeding for cancer chemoprotection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 807-813.
- Clarke DB. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Methods* 2:310-325.
- Dixon RA, Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:303-333.
- Holst B, Williamson G. 2004. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 21:425-447.
- Hwang ES, Hong EY, Kim GH. 2012. Determination of bioactive compounds and anti-biocancer effect from extracts of Korean cabbage and cabbage. *Korean J. Food & Nutr.* 25:259-265.
- Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. 2009. Health-affecting compounds in *Brassicaceae*. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 8:31-43.
- Keum YS, Jeong WS, Kong ANT. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 555:191-202.
- Kim SJ, Kawaharada C, Jin S, Hashimoto M, Ishii G, Yamauchi H. 2007. Structural elucidation of 4-(cystein-S-yl) butyl glucosinolate from the leaves of *Eruca sativa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:114-121.
- Lee SM, Rhee SH, Park KY. 1997. Antimutagenic effect of various Cruciferous vegetables in *salmonella* assaying system. *J. Food Hyg. Safety.* 12:321-327.
- Park KW, Ryu KO. 1998. Functional property and health stuffed vegetables. pp. 172-175. *Herbworld*, Seoul, Korea.
- Poiroux-Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L. 2010. Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *J. Agric. Food Chem.* 58:12065-12082.
- Rajashekar CB, Carey EE, Zhao X, Oh MM. 2009. Health-promoting phytochemicals in fruits and vegetables: Impact of abiotic stresses and crop production practices. *Functional Plant Sci. Biotechnol.* 3:30-38.
- Rosa E, Heaney RK. 1996. Seasonal variation in protein, mineral and glucosinolate composition of Portuguese cabbages and kale. *Animal Feed Sci. Technol.* 57:111-127.
- Schreiner M. 2005. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European J. Nutr.* 44: 85-94.

- Schmidt S, Zietz M, Schreiner M, Rohn S, Kroh LW, Krumbein A. 2010. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 119:1293-1299.
- Sun B, Liu N, Zhao Y, Yan H, Wang Q. 2011. Variation of glucosinolates in three edible parts of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) varieties. *Food Chemistry* 124(3):941-947.
- Van Etten CH, Daxenbichler ME, Wolff IA. 1969. Natural glucosinolates (thioglucosides) in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* 17:483-491.
- Wattenberg LW. 1977. Inhibition of carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbons by benzylisothiocyanate and related compounds. *J. Natl. Cancer. Inst.* 58:398-398.
- Zhang Y, Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms. *Cancer Research* 54:1976-1981.
- Zhang Y, Wade K., Prestera T, Talalay P. 1996. Quantitative Determination of Isothiocyanates, Dithiocarbamates, Carbon Disulfide, and Related Thiocarbonyl Compounds by Cyclocondensation with 1,2-Benzenedithiol. *Analytical Biochemistry* 239:160-167.