

브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*) 잎에서 sulforaphane의 함량 변화

정민철* · 임태현** · 고순보*** · 최용화****

Content changes of Sulforaphane in Leaves of *Brassica oleracea* var. *italica*

Jung, Min-Chul · Lim, Tae-Heon · Ko, Sun-Bo · Choi, Yong-Hwa

Analyzing the 13 sort contents of broccoli leaves by using GC/MS, sulforaphane was found in 11 sort of broccoli leaves for the result. After being grinded by the blinder, amount of sulforaphane in broccoli leaves was rapidly raised after thirty minutes and maintained the amount till sixty minutes have passed. Among the parts of broccoli, the root had the most sulforaphane. In freezing temperature, biosynthesized sulforaphane maintained longer than in room temperature. However, even in frozen condition, the amount of sulforaphane was reduced to half or less after 3 weeks.

Key words : *biosynthesis, broccoli, helicobacter pylori, sulforaphane*

I. 서 론

브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*)는 십자화과에 속하는 채소로 항산화, 항위장병균, 항발암 및 해독효소의 유도 효과가 크다고 알려져 서양에서는 브로콜리의 소비량이 증가되고 있다(Aspry and Bjeldans., 1983; Zhang et al., 1992; Beecher, 1994; Howard et al., 1997; Kim et al., 1997a; Kim et al., 1997b; Kim et al., 1997c). 브로콜리에 함유된 주요 생리활성물

* 경북대학교 생태환경대학 생태환경시스템학부

** (주)삼호유비 농생명과학연구소

*** 제주특별자치도 농업기술원

**** Corresponding author, 경북대학교 생태환경대학 생태환경시스템학부(ychoi@knu.ac.kr)

질로는 β -carotene, α -tocopherol, ascorbate, folic acid, Vitamin A와 같은 강한 항산화 물질 외에 glucoraphanin, aliphatic glucosinolates 및 indolyl glucosinolates 등과 같은 영양분이 알려져 있고(Jeffery et al., 2003) 약효성분으로는 sulforaphane, indole-3-carbinol 및 diindolylmethane 등의 화합물이 존재하는 것으로 밝혀졌다.

Sulforaphane (S-methylsulfanylbutyl isothiocyanate)는 phase II 효소(glutathione S-transferase)들의 활성을 유도하지만 발암전구체를 발암원으로 활성화 시키는데 관여하는 것으로 알려진 phase I 효소는 유도하지 않는 것으로 알려져 있으며, Fahey 등(1997)은 위궤양과 위암의 원인균인 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과를 보고하였다. 브로콜리의 꽃 봉우리와 어린 새싹에 함유되어 있는 sulforaphane은 위염을 일으키는 원인균으로 알려진 *Helicobacter pylori* 45종 중 대부분의 균에 대한 Minimum inhibitory concentration (MIC)이 4 ppm 이하로 강한 항균활성을 보이는 것으로 알려졌다(Fahey et al., 2002). *Helicobacter pylori*에 의한 감염을 치료하는 방법으로는 bismuth 제제, metronidazole, amoxicillin 및 tetracycline 등을 포함하는 3가지 항균제를 동시에 투여하는 방법이 유효한 것으로 보고되었다(Rauws et al., 1988). 그러나 이러한 치료법은 환자의 순응도가 필요 하고 항생제에 대한 내성, 재발 가능성 내재 및 고비용 등의 문제점들이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 일환으로 백리향(Tabak et al., 1996), 중국차(Yee et al., 2002), Cashew apple(Kubo et al., 1999), 소목과 향련(Lee et al., 1999) 및 연교(Yoon et al., 2004)와 같은 천연자원 유래의 항균물질 탐색에 대한 연구들이 보고되었다.

다발로 이루어진 꽃을 식용하는 브로콜리는 한 줄기에서 꽃이 4~5개 정도 맺히고, 잎은 10~15장 이상 나와 매우 무성하나 꽃만 식용으로 이용되고 잎은 모두 버려지고 있다(Kim et al., 1999). 그러나 브로콜리의 줄기와 잎에도 sulforaphane의 전구물질인 glucosinolates가 다량으로 함유되어 있어 마쇄과정을 통해서 sulforaphane의 생합성을 촉진할 수 있을 것으로 추정된다.

따라서 본 연구에서는 브로콜리 잎을 이용하여 sulforaphane의 생합성을 유도하고 생합성된 sulforaphane의 함량의 변화에 대해서 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

브로콜리는 제주특별자치도 농업기술원에서 시험포장에서 관행재배되어 10월 중순에 수확한 조생종 13종을 분양받아 사용하였고, sulforaphane 표준품은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약들은 특급시약 혹은 HPLC급을 사용하였다.

2. 시료조제

Sulforaphane의 생합성 실험은 blinder로 브로콜리 잎 100 g을 2분간 균질화한 후 상온에서 방치하면서 sulforaphane의 함량을 분석하였으며, 생합성 된 sulforaphane의 함량변화 실험은 여러 조건하에서 경시 sulforaphane의 함량변화를 분석하였다.

3. Sulforaphane 추출 및 정제

용매추출에 의한 시료 전처리는 액상추출법에 의해 처리하였다. 동결건조 된 시료 1 g에 50 ml dichloromethane을 가하여 12시간 동안 shaking 후 여과하고 다시 50 ml dichloromethane을 가하여 여과 후 농축하였다. 농축물에 50 ml 증류수와 1 ml 생리 식염수를 가한 후 50 ml hexane으로 2회 추출하여 농축, 다시 농축물에 9 ml 생리식염수를 가하고 100 ml dichloromethane으로 2회 추출하여 농축하였다. 1 g Silica gel column chromatography에 loading 후 hexane과 10 ml EtOAc, 7ml 2% acetone- 98% chloroform으로 씻어준 후 10 ml 5% methanol-95% chloroform으로 용출 농축, 2 ml hexane으로 정용하여 sulforaphane을 정량 분석하였다.

4. 기기분석

GC는 agilent 6890N을 사용하였으며, EI/MS는 agilent 5973N mass selective detector를 사용하였다.

Column은 DB-5MS (5% phenyl, 95% dimethyl arylene siloxane 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm)를 사용하였고, Inlet 온도는 300 °C, oven 온도는 180°C 에서 15분간 머무른 후, 10°C/min으로 280°C 후 10분간 머무른 후, 10°C/min으로 300°C 후 10분간 진행하였으며, 유량은 1 ml/min (He 99.99995%)이고, MSD transfer line heater는 230°C 10분간 후, 10°C/min으로 300°C로 하였다.

5. GC/MS에 의한 sulforaphane 정량분석

정제된 시료를 GC/MS에 주입하고 선택이온측정법(Selective ion monitoring)으로 m/z 177, 160, 115를 monitoring하여 얻어진 피크면적을 표준품 sulforaphane의 정량곡선에 의해 정량 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 균질화 후 방치시간에 따른 sulforaphane의 생합성량

브로콜리 품종 필그림의 잎을 blinder로 2분간 균질화 후 상온에 방치하면서 경시적인 sulforaphane의 생합성량을 분석한 결과, 초기 30분까지는 검출되지 않았으나, 30분 이후부터 sulforaphane이 급격하게 증가되기 시작하여 40분 이후부터 60분까지는 완만하게 증가하였다. 브로콜리의 잎에서는 꽃 봉우리와 달리 sulforaphane이 함유되어 있지 않지만 균질화 후 시간이 경과됨에 따라서 sulforaphane이 생합성되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이는 브로콜리 잎에 함유되어 있는 sulforaphane의 전구물질인 glucosinolates 화합물이 균질화 과정에서 발현되는 myrosinase에 의해서 sulforaphane이 생합성된 것으로 추정되며 기 보고된 문헌과 일치하였다(Kjaer, 1963).

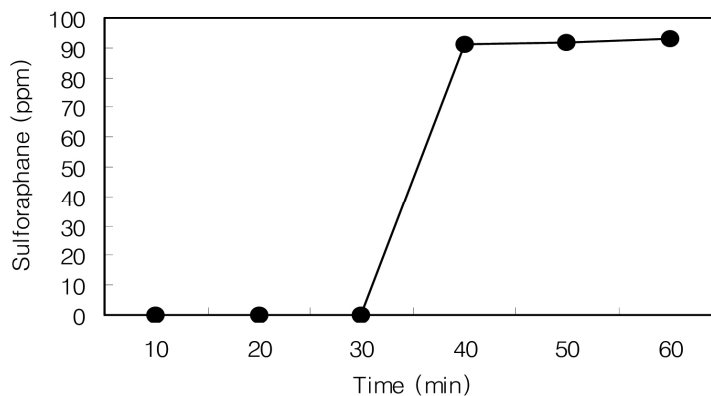


Fig. 1. Variation in content of sulforaphane in broccoli leaves after being grinded by the blinder.

2. 브로콜리 품종별 sulforaphane의 함량

브로콜리 조생종 13종의 잎에서 sulforaphane의 생합성능을 비교하고자 브로콜리 잎을 각각 blinder로 균질화 한 후 60 min 동안 상온에 방치 후 sulforaphane의 함량은 분석하였다. “Well- bing up”과 “파트너” 품종의 잎에서는 sulforaphane이 전혀 검출되지 않았으나 나머지 품종에서는 sulforaphane이 검출되었다. 동일한 조건하에서는 “필그림” 품종의 잎에서 가장 많은 sulforaphane이 검출되었으며, “청제”와 “브로드웨이” 순이었다(Fig. 2). “필그림”에서 sulforaphane의 함량이 가장 높게 검출된 결과는 kim 등(1997a)의 보고와 일치하였으나 함량 면에서는 큰 차이를 나타내었다. 이는 동일한 품종이라도 재배시기, 재배지역, 균질화

후 방치시간 및 추출방법 등의 차이에 기인된 것으로 판단된다.

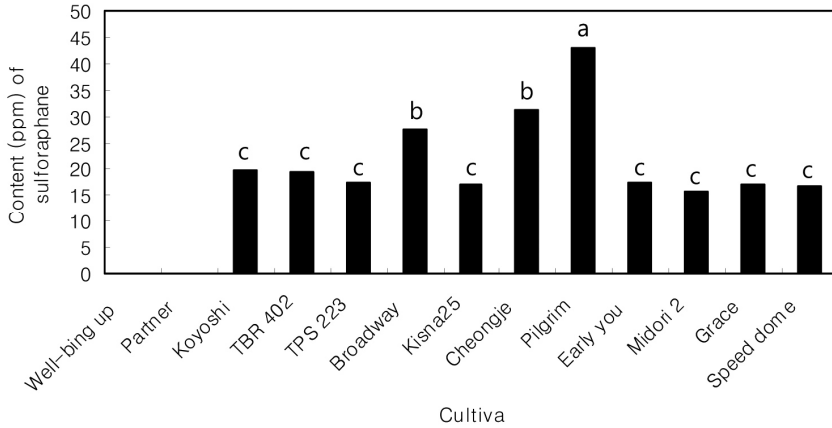


Fig. 2. Content of sulforaphane among leaves of broccoli varieties. The same letter in a column are not significantly different at 5% level by DMRT.

3. 브로콜리 부위별 sulforaphane 함량

브로콜리 4종을 대상으로 꽃 봉우리, 잎, 줄기, 뿌리 부위로 구별하여 sulforaphane의 생합성 함량을 비교하고자 부위별 시료 100 g씩 blinder로 2분간 균질화한 후 상온에서 60 min 동안 방치한 후 각각 1 g씩 취하여 50 ml dichloromethane을 가하고 상기 추출방법에 의해 정제하여 sulforaphane의 함량을 분석하였다.

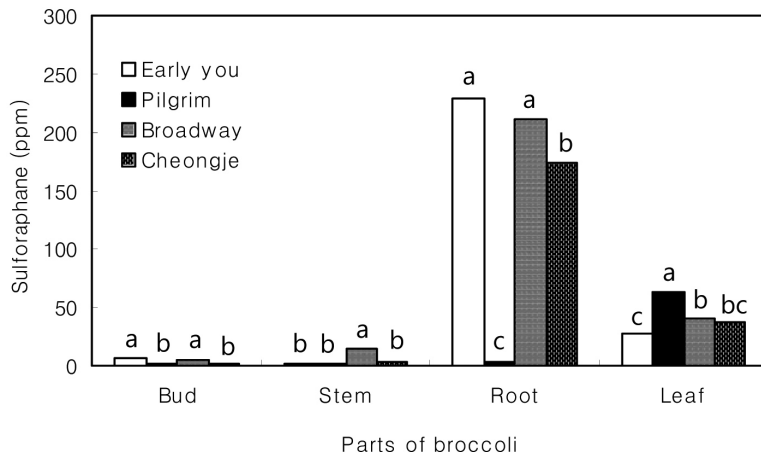


Fig. 3. Content of sulforaphane among the parts of broccoli. The same letter in a column are not significantly different at 5% level by DMRT.

필그림 품종을 제외한 3종 얼리유, 브로드웨이 및 청제에서는 뿌리부위에서 월등히 많은 sulforaphane이 검출되었으며 다음으로 잎에서 많이 생합성 되었다. 뿌리에서 sulforaphane의 함량은 잎의 5배 이상 높았다(Fig. 3). 그러나 꽃 봉우리에서는 상대적으로 적게 검출되었다. 이는 꽃 봉우리에서는 균질화 하기 전 이미 존재하는 endogenous sulforaphane이 균질화 후 60 min 동안 방치되는 사이 분해되었거나 sulforaphane nitrate로의 전환에 기인한 것으로 추정된다.

4. Sulforaphane 함량의 경시변화

브로콜리 잎에 생합성 된 sulforaphane 함량의 경시변화를 분석하고자 브로콜리 4종의 잎을 blinder로 균질화한 후 상온에 60 min 동안 방치한 후 동결건조 한 시료를 상온보관과 냉동보관하면서 경과일수에 따른 sulforaphane의 경시변화를 분석하였다(Fig. 4).

상온보관에서는 보관 3일후에 초기 함량의 절반수준이하로 감소하였으며 냉동보관에서도 상온보관 보다 다소 감소 속도가 지연되었지만 경과 일수에 따라서 함량은 지속적으로 감소되었다. 품종 간 분해속도의 차이는 인정되지 않았다(Fig. 5).

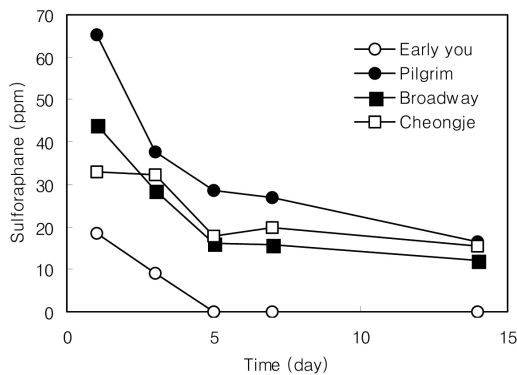


Fig. 4. Content of sulforaphane in broccoli leaves stored under room temperature.

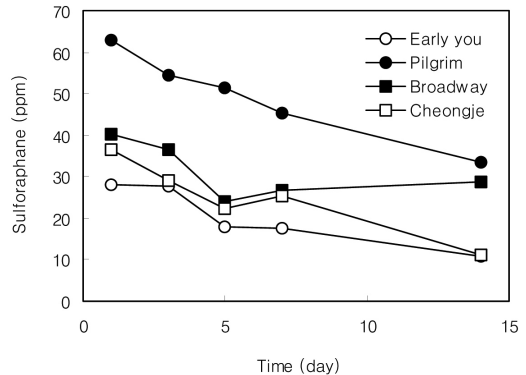


Fig. 5. Content of sulforaphane in broccoli leaves stored under freezing.

Kawakishi와 Namiki (1969)는 sulforaphane과 같은 isothiocyanates 화합물은 실온에서 서서히 분해되며 물이 isothiocyanates 분해의 주요 역할을 한다고 보고하였으나 sulforaphane 화합물의 분해속도는 물뿐만 아니라 온도에도 밀접한 연관이 있는 것으로 생각되었다.

IV. 요약

브로콜리 13종의 잎을 대상으로 sulforaphane의 함량을 분석한 결과, 2종에서는 검출되지 않았으나 11종에서는 검출되었다. “필그림” 품종이 가장 많은 sulforaphane 함량을 나타냈다. 브로콜리 잎을 blinder로 브로콜리의 잎을 균질화한 후에 sulforaphane의 생합성능은 30분 후에 급격히 증가하여 60분까지 함량이 유지되었다. 또한 sulforaphane은 동결건조를 할 경우 브로콜리 잎의 분말에서 검출되었으나 열풍건조를 할 경우 휘산 되어 분말에서 검출되지 않았다. 브로콜리의 부위별로(꽃 봉우리, 잎, 줄기 및 뿌리) sulforaphane의 함량을 분석한 결과, 뿌리에서 가장 많은 sulforaphane이 검출되었고 다음으로 잎에서 높았다. 브로콜리 잎에서 생합성된 sulforaphane의 경시변화를 분석한 결과, 상온보관 보다 냉동보관 상태에서 오래 지속되었으나 냉동보관 조건에서도 3주 후에 sulforaphane의 함량이 1/2 이하로 감소하였다.

[Submitted, February. 11, 2016 ; Revised, February. 16, 2016 ; Accepted, February. 17, 2016]

References

1. Aspry, K. E. and L. F. Bjeldans. 1983. Effects of dietary broccoli and butylated hydroxyanisole on liver mediated metabolism of benzo[a]pyrene. *Food Chem. Toxicol.* 21: 133-142.
2. Beecher, C. W. W. 1994. Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*: A review. *Am J Clin. Nutr.* 59: 1166-1170.
3. Fahey, J. W., X. H. Haristoy, P. M. Dolan, T. W. Kensler, I. Scholtus, K. K. Stephenson, P. Talalay, and A. Lozniewski. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *PNAS* 99: 7610-7615.
4. 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.
5. Howard, L. A., E. H. Jeffery, M. A. Walling, and B. P. Klein. 1997. Retention of phytochemicals in fresh and processed broccoli. *J. Food Sci.* 62: 1098-1100.
6. Jeffery, E. H., A. F. Brown, A. C. Kurilich, A. S. Keck, N. Matusheski, B. P. Klein, and

- J. A. Juvik. 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 323-330.
7. Kawakishi, S., and M. Namiki. 1969. Decomposition of allyl isothiocyanates in aqueous solution. *Agric. Biol. Chem.* 33: 452-459.
 8. Kim, M. R., J. H. Kim, D. S. Wi, J. H. Na, and D. E. Sok. 1999. Volatile sulfur compounds, proximate components, minerals, vitamin C content and sensory characteristics of the juices of kale and broccoli leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 1201-1207.
 9. Kim, M. R., K. J. Lee, and H. Y. Kim. 1997a. Effect of Processing on the content of sulforaphane of broccoli. *Korean J. Soc. Food Sci.* 13: 422-426.
 10. Kim, M. R., K. J. Lee, J. H. Kim, and D. E. Sok. 1997b. Determination of sulforaphane in cruciferous vegetables by SIM. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 882-887.
 11. Kim, M. R., K. J. Lee, J. H. Kim, and D. E. Sok. 1997c. Induction of hepatic glutathione S-transferase activity in mice administered with various vegetable extracts. *J. Food Sci. Nutr.* 2: 207-213.
 12. Kjaer, A. 1963. Mass spectra of isothiocyanates. *Acta. Chem. Scan* 17: 2143-2154.
 13. Kubo, J., J. R. Lee, and I. Kubo. 1999. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the Cashew Apple. *Agric. Food Chem.* 47 : 533- 537.
 14. Lee, J. J., S. H. Kim, B. S. Chang, J. B. Lee, C. S. Huh, T. J. Kim, and Y. J. Beak. 1999. The antimicrobial activity of medicinal plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 764-770.
 15. Rauws, E. A., W. Langenberg, H. J. Houthoff, H. C. Zanen, and G. N. Tytgat. 1988. *Campylobacter pyloridis*-associated chronic active antral : a prospective study of its prevalence and the effect of antibacterial and antiulcera treatment. *Gastroenterol.* 94: 33-40.
 16. Tabak, M., R. Armom, I. Potasmam, and I. Neemam. 1996. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 667-672.
 17. Yee, Y. K., M. W. Koo, and M. L. Szeto. 2002. Chinese tea consumption and *Helicobacter* infection. *J. Gastroenterol. Hepato.l* 17: 552-555.
 18. Yoon, Y. S., S. H. Lee, N. I. Baek, H. Y. Kim, and C. H. Park. 2004. Inhibition of cell growth and urease activity of *Helicobacter pylori* by medicinal plant extracts. *Kor. J. Biotechno. Bioeng.* 19: 187-191.
 19. Zhang Y, P. Talalay, C. G. Cho, and G. H. Posner. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli; Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2339-2403.